(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-301817
(P2008-301817A)
(43)公開日 平成20年12月18日(2008.12.18)

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N 15/00 | ZNAA | 4B024 |
| C07K 14/35 | (2006.01) | C07K 14/35 | | 4B064 |
| C07K 19/00 | (2006.01) | C07K 19/00 | | 4B065 |
| C12N 1/21 | (2006.01) | C12N 1/21 | | 4C085 |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N 1/15 | | 4H045 |

審査請求 有　請求項の数 24　ＯＬ　（全 84 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号 特願2008-131389(P2008-131389)
(22)出願日 平成20年5月19日(2008.5.19)
(62)分割の表示 特願平10-541074の分割
原出願日 平成10年4月1日(1998.4.1)
(31)優先権主張番号 0376/97
(32)優先日 平成9年4月2日(1997.4.2)
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号 60/044,624
(32)優先日 平成9年4月18日(1997.4.18)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 1277/97
(32)優先日 平成9年11月10日(1997.11.10)
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号 60/070,488
(32)優先日 平成10年1月5日(1998.1.5)
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 507006422
スタテンス　セールム　インスティトゥート
デンマーク王国　コペンハーゲン　エス　ディーケイ－２３００，アルティラリィベイ　５
(74)代理人 100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人 100114188
弁理士　小野　誠
(74)代理人 100140523
弁理士　渡邉　千尋
(74)代理人 100119253
弁理士　金山　賢教

最終頁に続く

(54)【発明の名称】結核菌由来の核酸フラグメント及びポリペプチドフラグメント

(57)【要約】　（修正有）
【課題】結核菌に対するサブユニットワクチンの成分として有効であるか、又は結核菌感染の検出用診断組成物の成分として有用な、新規の抗原を提供する。
【解決手段】結核菌由来の、新規な幾つかの特定のアミノ酸配列を有する、ポリペプチド及びそれらの免疫的に活性なフラグメント、それらをエンコードする遺伝子、ワクチンのような免疫組成物、及びポリペプチドを含有する皮膚試験試薬。特に、特定の抗原ポリペプチドＥＳＡＴ－６とＭＰＴ５９の融合物は、それぞれの非融合タンパク質に比較して優れた免疫原性を有する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２で表されるアミノ酸配列のうちの少なくとも１０アミノ酸残基の長さのフラグメントを含み、結核菌群に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引き起こす能力、又は結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での過去あるいは現在の感作を示す診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力を有するポリペプチド、又は
ｂ）
【化１】

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}}$$

［式中、$N_{dif}$は整列している際の２つの配列中で同一でない残基の全数であり、$N_{ref}$は１つの配列における残基数である］により算出して、ａ）に定義したポリペプチドと少なくとも９５％同一の配列を有し、結核菌群に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引き起こす能力、または結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での過去あるいは現在の感作を示す、診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド。
【請求項２】
結核菌群に属する細菌からのいずれの他の抗原も含まない請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
ヘルパーＴ細胞のエピトープを含む請求項１又は２に記載のポリペプチド。
【請求項４】
少なくとも７アミノ酸残基の長さのフラグメントからなる請求項１～３に記載のポリペプチド。
【請求項５】
いずれのシグナル配列もない請求項１～４のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【請求項６】
１）一次感染から２週間以内か、又はマウスを結核菌群に属するマイコバクテリアに再度感染させてから４日以内のマウスから回収した感作記憶Ｔ－リンパ球からのＩＦＮ－γの放出を誘導し、
その誘導が、約２００，０００個の脾臓細胞／ｍｌを含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が１～４μｇポリペプチド／ｍｌ懸濁液となり、ＩＦＮ－γの放出が、懸濁液にポリペプチドを添加して２日後に回収した上清中のＩＦＮ－γの測定により評価できる、及び／又は
２）感染第１相のＴＢ患者又はＢＣＧ予防接種した健康なドナー又はＴＢ患者に接触している健常者から単離した約１，０００，０００個のヒトＰＢＭＣ（末梢血液単核細胞）／ｍｌから、少なくとも３００ｐｇ以上のレベルでＩＦＮ－ガンマの放出を誘導し、その誘導が、約１，０００，０００個のＰＢＭＣ／ｍｌを含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が１～４μｇポリペプチド／ｍｌ懸濁液となり、ＩＦＮ－γの放出が、懸濁液にポリペプチドを添加して２日後に回収した上清中のＩＦＮ－γの測定により評価できる、及び／又は
３）結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作した動物由来のウシＰＢＭＣからＩＦＮ－γの放出を誘導し、その放出が、結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作していない動物由来のウシＰＢＭＣから観察される放出の少なくとも２倍である請求項１～５のいずれか１つに記載のポリペプチド。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか１つに記載の少なくとも１つのポリペプチドと少なくとも１つ

の融合パートナーからなる融合ポリペプチド。
【請求項８】
融合パートナーが、請求項１〜６のいずれか１つに定義するポリペプチド及び結核菌群に属する細菌由来の他のポリペプチドからなる群から選択される請求項７に記載の融合ポリペプチド。
【請求項９】
融合パートナーが請求項１〜６のいずれかのポリペプチド及び、ＥＳＡＴ－６又は少なくとも１つのそのＴ－ｃｅｌｌエピトープ、ＭＰＢ６４又は少なくとも１つのそのＴ－ｃｅｌｌエピトープ、ＭＰＴ６４又は少なくとも１つのそのＴ－ｃｅｌｌエピトープ、あるいはＭＰＢ５９又は少なくとも１つのそのＴ－ｃｅｌｌエピトープのような結核菌群に属する細菌に由来する他のポリペプチドからなる群から選択される請求項７又は８に記載の融合タンパク質。
【請求項１０】
請求項１〜６のいずれかに記載のポリペプチド又は請求項７〜９のいずれかに記載の融合タンパク質を含む免疫組成物。
【請求項１１】
少なくとも２つの異なるポリペプチドを含む免疫組成物であって、それぞれの異なるポリペプチドが請求項１〜６のいずれかに記載のポリペプチドである請求項１０に記載の免疫組成物。
【請求項１２】
３〜２０の異なるポリペプチドを含み、それぞれの異なるポリペプチドが請求項１〜６のいずれかに記載のポリペプチドである請求項１０又は１１に記載の免疫組成物。
【請求項１３】
１）請求項１〜６のいずれかに記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含むか、又はその相補的な核酸配列からなるか、又は
２）配列番号１に記載の核酸フラグメントに少なくとも９６％の同一性を有する少なくとも１０ヌクレオチドの長さの核酸配列または当該配列に相補的な配列を含む単離形態の核酸。
【請求項１４】
請求項７に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む単離形態の核酸。
【請求項１５】
請求項８に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む請求項１４に記載の核酸。
【請求項１６】
請求項９に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む請求項１４又は１５に記載の核酸。
【請求項１７】
ＤＮＡフラグメントである請求項１３〜１６のいずれかに記載の核酸。
【請求項１８】
請求項１３〜１７に記載の核酸を含む複製可能な発現ベクター。
【請求項１９】
ウィルス、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド及びマイクロクロモソームからなる群から選択される請求項１８に記載のベクター。
【請求項２０】
請求項１８又は１９に記載の少なくとも１つのベクターを有する形質転換細胞。
【請求項２１】
結核菌群に属する細菌である請求項２０に記載の形質転換細胞。
【請求項２２】
請求項１〜６のいずれかに記載のポリペプチドを発現する請求項２０又は２１に記載の形質転換細胞。

【請求項２３】
請求項１３～１７のいずれかに記載の核酸を、宿主細胞で複製可能なベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞へ導入し、ポリペプチドを発現させるのに十分な条件下、培養培地で宿主細胞を培養し、宿主細胞又は培養培地からポリペプチドフラグメントを回収する；又は
短期培養ろ液から請求項１～６のいずれかに記載されたポリペプチドを単離する；又は
結核菌群の全マイコバクテリア又はその溶解物または画分からポリペプチドを単離する；又は
固相又は液相ペプチド合成でポリペプチドフラグメントを合成すること、
を含む請求項１～６のいずれかに記載のポリペプチド又は請求項７～９のいずれかに記載の融合タンパク質の産生方法。
【請求項２４】
イムノアッセイで請求項１～６のいずれかに記載のポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル又はポリクローナル抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、結核菌（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）由来で免疫学的に活性な幾つかの新規のポリペプチドフラグメント、免疫原性成分として該フラグメントを含むワクチン及び他の免疫性組成物、及び該ポリペプチドの産生方法ならびにその用途に関する。また、本発明は、本発明のポリペプチドフラグメントの製造又は結核菌感染の診断に有用な結核菌由来の新規の核酸フラグメントに関する。さらに、本発明は、ある融合ポリペプチド、特にＥＳＡＴ－６とＭＰＴ５９の融合物に関する。
【背景技術】
【０００２】
結核菌により引き起こされるヒトの結核（以下、「ＴＢ」で示す）は、ＷＨＯによれば、一年に約３００万件の死亡原因となっている世界的に深刻な健康問題である。新しいＴＢの症例の世界的な発症率は、最近１０年の間、徐々に減少しているが、ごく最近は、エイズの発生や多くの薬剤に耐性の結核菌株の出現により、この傾向が著しく変わってきている。
【０００３】
臨床的な用途に現在利用可能な唯一のワクチンはＢＣＧであり、有効なワクチンが議論の対象となっている。ＢＣＧは、一般的にＴＢの動物モデルにおいて高レベルな後天的耐性を誘導するが、開発途上国での数回のヒトの試験では、重要な防護を立証していない。特に、ＢＣＧは、合衆国での使用がＦＤＡにより許可されていない。
【０００４】
このため、新規かつＴＢに対して改良されたワクチンの開発は緊急課題となっており、ＷＨＯによってかなり優先的に扱われている。防護的なマイコバクテリ物質を同定するための多くの試験がなされ、数人の研究者が、１９５０～１９７０年の間に実験的な予防接種後の耐性の増大を報告している。しかし、ＢＣＧの効力に対する特に長期間の防護的な免疫応答は、可溶性タンパク質又は細胞壁断片の投与によっても依然として立証されておらず、現在、短期培養ろ液から誘導されたポリペプチド（後述参照）によって研究中である。
【０００５】
結核菌に対する免疫性は、３つの基本的な特色で特徴づけられる。ｉ）生細菌は、死菌製剤と対照的に防護的な免疫応答を有効に誘導する；ｉｉ）特異的な感作Ｔリンパ球は、この防護を媒介する；ｉｉｉ）もっとも重要な媒介分子は、インターフェロンガンマ（ＩＮＦ－γ）であると思われる。
【０００６】
短期培養ろ液（ＳＴ－ＣＦ）は、液体培地で最初の数日成長させる間に結核菌から放出

されるタンパク質の複合混合物である［Ａｎｄｅｒｓｅｎら、１９９１］。培養ろ液は、ＴＢ感染の第一相で宿主に認識される防護抗原を有していることが示唆されている［Ａｎｄｅｒｓｅｎら、１９９１、Ｏｒｍｅら、１９９３］。幾つかの研究機関からの最近のデータにより、培養ろ液の抗原をベースにする実験的なサブユニットワクチンは、ＴＢに後天的な耐性を高レベルで生じることが立証されている［Ｐａｌ及びＨｏｒｗｉｔｚ、１９９２；Ｒｏｂｅｒｔｓら、１９９５；Ａｎｄｅｒｓｅｎ、１９９４；Ｌｉｎｄｂｌａｄら、１９９７］。しかし、培養ろ液は複雑なタンパク質混合物で、これまで、この防護的な免疫反応を果たす分子について利用可能な情報は非常に限られている。この点に関しては、２つの培養ろ液抗原、つまり低質量抗原ＥＳＡＴ－６［Ａｎｄｅｒｓｅｎら、１９９５及びＥＰ－Ａ－０７０６５７１号］及び３１ｋＤａのＡｇ８５Ｂ分子［ＥＰ－０４３２２０３］が免疫防護に関連して記載されているにすぎない。

【０００７】

したがって、最終的に有効なサブユニットワクチンを産生するために、ＴＢに対する免疫防護誘導に関与する別の抗原を同定する必要がある。

【発明の開示】

【０００８】

発明の目的

本発明の目的は、ＴＢに対するサブユニットワクチンの成分として有効であるか、又はマイコバクテリア（特に、毒性結合性（ｖｉｒｕｌｅｎｃｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ）のマイコバクテリア）感染の検出用診断組成物の成分として有用な新規の抗原を提供することにある。また、新規の抗原は、重要な薬剤の標的であってもよい。

【０００９】

発明の要約

本発明は、結核菌由来で、これまでに特徴づけされていない幾つかの培養ろ液抗原の同定と特徴づけに基づく。ＴＢの動物モデルで、Ｔ細胞が介在する免疫性は、６～１２及び１７～３０ｋＤａの範囲のＳＴ－ＣＦ中の抗原に優勢である。本発明では、低分子量領域の８抗原（ＣＦＰ７、ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ７Ｂ、ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ９、ＣＦＰ１０Ａ及びＣＦＰ１１）及び１７～３０ｋＤａの範囲の１８抗原（ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１７、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ１９Ｂ、ＣＦＰ２０、ＣＦＰ２１、ＣＦＰ２２、ＣＦＰ２２Ａ、ＣＦＰ２３、ＣＦＰ２３Ａ、ＣＦＰ２３Ｂ、ＣＦＰ２５、ＣＦＰ２６、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ２８、ＣＦＰ２９、ＣＦＰ３０Ａ及びＣＦＰ３０Ｂ）が同定された。これらのうち、ＣＦＰ１９ＡとＣＦＰ２３が選択された。これは、結核菌の２つのＤＮＡ配列ｏｒｆ１９Ａとｏｒｆ２３に相同性を示すＣＦＰ２１とＣＦＰ２５をエンコードする遺伝子（それぞれｃｆｐ２１及びｃｆｐ２５）を有するサンガー（Ｓａｎｇｅｒ）データベース（後述参照）でヌクレオチドのホモロジーシークエンスを調査した限りでは、それらが、それぞれＣＦＰ２１とＣＦＰ２５に比較的高い相同性を示すからである。ｏｒｆ１９ａとｏｒｆ２３の２つの配列は、それぞれ約１９及び２３ｋＤａの分子量を有する仮想（ｐｕｔａｔｉｖｅ）タンパク質ＣＦＰ１９ＡとＣＦＰ２３をエンコードする。ＣＦＰ２１とＣＦＰ２５に対するアミノ酸レベルでの同一性は、両タンパク質についてそれぞれ４６％及び５０％である。ＣＦＰ２１とＣＦＰ２５は優勢なＴ細胞抗原であることを示しており、それ故、ＣＦＰ１９ＡとＣＦＰ２３は新規なＴ－細胞抗原である可能性がある。

【００１０】

さらに、５０ｋＤａの抗原（ＣＦＰ５０）が培養ろ液から単離され、３０ｋＤａの領域の抗原（ＣＷＰ３２）も細胞壁から単離されている。

【００１１】

また、本発明は、マイコバクテリア・ボビス（Ｍ．ｂｏｖｉｓ）ＢＣＧ株に存在しない結核菌由来の幾つかの仮想抗原の同定に基づく。これらの仮想抗原をエンコードするヌクレオチド配列は、ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ表びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂである。

【００１２】

最後に、本発明は、ＥＳＡＴ－６とＭＰＴ５９の融合物が、それぞれ非融合タンパク質に比較して優れた免疫原性があるという驚くべき発見に基づいている。

【００１３】

３３個の抗原をエンコードする遺伝子が決定され、様々なマイコバクテリア株での幾つかの抗原の分布が研究され、生成物の生物活性が特徴づけられた。抗原は、全て代謝しているマイコバクテリアにより分泌されるので、ワクチン目的ならびに診断目的での可能性がある抗原をパネルした。

【００１４】

以下の表は、ここで用いる名称ならびに関連するＮ－末端配列、全アミノ酸配列及び抗原をエンコードするＤＮＡ配列のＳＥＱ　ＩＤ番号を参照して、本発明の抗原を挙げている。

【００１５】

【表１】

| 抗原 | N－末端 配列 SEQ ID NO: | ヌクレオチド配列 SEQ ID NO: | アミノ酸配列 SEQ ID NO: |
|---|---|---|---|
| CFP7 | | 1 | 2 |
| CFP7A | 81 | 47 | 48 |
| CFP7B | 168 | 146 | 147 |
| CFP8A | 73 | 148 | 149 |
| CFP8B | 74 | 150 | 151 |
| CFP9 | | 3 | 4 |
| CFP10A | 169 | 140 | 141 |
| CFP11 | 170 | 142 | 143 |
| CFP16 | 79 | 63 | 64 |
| CFP17 | 17 | 5 | 6 |
| CFP19 | 82 | 49 | 50 |
| CFP19A | | 51 | 52 |
| CFP19B | 80 | | |
| CFP20 | 18 | 7 | 8 |
| CFP21 | 19 | 9 | 10 |
| CFP22 | 20 | 11 | 12 |
| CFP22A | 83 | 53 | 54 |
| CFP23 | | 55 | 56 |
| CFP23A | 76 | | |
| CFP23B | 75 | | |
| CFP25 | 21 | 13 | 14 |
| CFP25A | 78 | 65 | 66 |
| CFP27 | 84 | 57 | 58 |
| CFP28 | 22 | | |
| CFP29 | 23 | 15 | 16 |
| CFP30A | 85 | 59 | 60 |
| CFP30B | 171 | 144 | 145 |
| CFP50 | 86 | 61 | 62 |
| MPT51 | | 41 | 42 |
| CWP32 | 77 | 152 | 153 |
| RD1-ORF8 | | 67 | 68 |
| RD1-ORF2 | | 71 | 72 |
| RD1-ORF9B | | 69 | 70 |
| RD1-ORF3 | | 87 | 88 |
| RD1-ORF9A | | 93 | 94 |
| RD1-ORF4 | | 89 | 90 |
| RD1-ORF5 | | 91 | 92 |
| MPT59-ESAT6 | | | 172 |
| ESAT6-MPT59 | | | 173 |

【００１６】

Ｔ－細胞エピトープがＴＢに対する後天性免疫性を引き出す原因であることは当該分野で周知であるが、Ｂ－細胞エピトープは、後天性免疫と生体内でのマイコバクテリアの認識に全く影響しない。このようなＴ－細胞エピトープは直鎖状で、６アミノ酸残基という最も小さい長さであることが知られているので、本発明は、特に、このようなＴ－細胞エピトープの同定と利用に関している。

【００１７】

したがって、もっとも広い態様において、本発明は実質的に純粋なポリペプチドフラグメントに関し、ａ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか１つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６

４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか１つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３及び１６８～１７１のいずれか１つで示される配列から選択されるアミノ酸配列からなり、ｂ）少なくとも６アミノ酸残基の長さを有するａ）で定義されるポリペプチドフラグメントのサブ配列であって、結核菌群（ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ　ｃｏｍｐｌｅｘ）に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引き起こす能力、又は結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示す、診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力に関して、ａ）で定義されるポリペプチドに免疫学的に等しい配列からなり、又はｃ）ａ）に定義したポリペプチド又はｂ）で定義したサブ配列と少なくとも７０％同一な配列を有し、同時に結核菌群に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引起こす能力、又は結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示す、診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力に関して、ａ）で定義されるポリペプチドに免疫学的に等しいアミノ酸配列からなり、但し、ｉ）ポリペプチドフラグメントがＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２のアミノ酸配列１～９６からなるか、又はβ－ガラクトシダーゼに融合するＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４のアミノ酸配列８７～１０８からなる際には、本質的に純粋形であり、ｉｉ）ｃ）における配列の同一性の程度が、ポリペプチドがＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２のアミノ酸配列か、ｂ）で定義するそのサブ配列を有するポリペプチドのホモログからなる際に、少なくとも９５％であり、ｉｉｉ）ポリペプチドフラグメントがＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２の少なくとも６アミノ酸のアミノ酸配列からなる際に、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２の２１３の位置に相当するスレオニン残基を含む。

【００１８】

本発明の他の部分は、上記の定義を有するポリペプチドをエンコードするＤＮＡフラグメント、ならびにこのようなポリペプチドをエンコードするＤＮＡの存在を決定づけるのに有用なＤＮＡフラグメントに関する。

【００１９】

発明の詳細な説明

この明細書及び請求の範囲において、「ポリペプチドフラグメント」の語は、少なくとも２アミノ酸残基、多くて１０アミノ酸残基の長さの短いペプチド、オリゴペプチド（１１～１００アミノ酸残基）及び長いペプチド（「ポリペプチド」について通常想定されるもの、つまり長さ１００アミノ酸残基以上）ならびにタンパク質（機能的単位は、少なくとも１つのペプチド、オリゴペプチド又はポリペプチドからなり、グリコシル化、脂質化（ｌｉｐｉｄａｔｅ）あるいは補欠分子族からなることにより化学的に修飾されていてもよい）を示す。また、ポリペプチドの定義は、マイコバクテリア中で天然型のペプチド／タンパク質、ならびにいずれかの種類の宿主を形質転換する、いずれかのタイプの発現ベクター中の組換えタンパク質又はペプチド及び化学的に合成したペプチドも含む。

【００２０】

この明細書で、「実質的に純粋なポリペプチドフラグメント」は、天然に結合している他のポリペプチド物質を、多くて５重量％（他のポリペプチド物質は、より低い％、例えば多くて４％、多くて３％、多くて２％、多くて１％及び多くて０．５％が好ましい）含むポリペプチド調製物を意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、少なくとも９６％純粋であることか好ましい。つまり、ポリペプチドは調製物中に存在する全ポリペプチド物質の少なくとも９６重量％を構成し、より高い％であることが好ましく、例えば少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、少なくとも９９．２５％、少なくとも９９．５％及ひ少なくとも９９．７５％が好ましい。

【００２１】

特に、ポリペプチドフラグメントは「本質的に純粋形」、つまり、ポリペプチドフラグメントは、天然に結合しているいずれの他の抗原も本質的になく、結核菌群に属する細菌由来のいずれの他の抗原もないことが好ましい。これは、以下に詳細に記載するように、マイコバクテリアでない宿主細胞で組換え法によりポリペプチドフラグメントを調製するか、又は周知の固相あるいは液相ペプチド合成法（例えば、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄにより

記載の方法やその変法）でポリペプチドフラグメントを合成してなされる。

【００２２】

語「サブ配列」は、２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３及び１６８～１７１のいずれか一つから選択されるＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯを有する本発明のポリペプチドに関して用いられる際に、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３、１６８～１７１のいずれか一つの結核菌由来のポリペプチドから得られる少なくとも６アミノ酸残基のいずれかの連続的な範囲であって、結核菌群に属する細菌感染に抵抗性を増すことができる能力に関して上記ポリペプチドに免疫学的に等しいものを示す。

【００２３】

したがって、異なる由来源、例えば他の細菌や真核細胞由来のポリペプチドも含まれる。

【００２４】

「免疫学的に等しい」ポリペプチドに関しては、ワクチン又は診断剤（つまり、医薬的に受容な担体もしくは賦形剤及び任意のアジュバントと組合さって）に製剤化される際に、ポリペプチドが、ここでＩ）投与（単独、又は他の抗原と組合わさった免疫学的に活性な成分のいずれか）

により、マウス及び／又はモルモット及び／又はヒトのような霊長類に、結核菌群に属する細菌感染に対して後天的に増した特異的な耐性を付与すること、（その少なくとも２０％がマイコバクテリア・ボビスＢＣＧにより生じた後天的に増した耐性で、さらに少なくとも２０％がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８～１７１のいずれか一つからなる親ポリペプチド（親ポリペプチドは、図６に示した２ＤＥゲルと実質的に同じ相対位置とパターンを有する。実施例参照）により生じる後天的に増した耐性であり、後天的に増した耐性を、結核菌のビルレント株に実験的に感染させたマウスあるいはモルモットから単離した脾臓、肺又は他の器官のホモジネート由来のマイコバクテリア数の減少を計測するか、又はヒトのような霊長類では、プラセボもしくはＢＣＧを受けた対照の群に対して予防接種した群で観察される臨床的な結核の進行に対する防護を測定することにより評価する（増大した抵抗性はより高く、マイコバクテリア・ボビスＢＣＧにより誘発される免疫防護応答の少なくとも５０％、例えば少なくとも６０％に相当することが好ましく、マイコバクテリア・ボビスＢＣＧにより誘発される免疫防護応答の少なくとも８０％、例えば少なくとも９０％が、さらに好ましい。増大した抵抗性が、マイコバクテリア・ボビスＢＣＧにより生じる抵抗性を代替することが期待される場合には、抵抗性は、増大した抵抗性の少なくとも１００％、例えば少なくとも１１０％であることが好ましい））、及び／又はＩＩ）結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示している哺乳類で、診断上、顕著な免疫応答を誘発する（この診断上、顕著な免疫応答は、例えば皮膚試験で決定できる遅延型の過度感作反応の形態、又は例えば以下に詳述するＩＦＮ－γアッセイで測定されるＩＦＮ－γ放出の形態であってもよい。一連の皮膚試験で、診断上、顕著な反応は、少なくとも直径５ｍｍで、少なくとも６５％（好ましくは、少なくとも７５％、例えば少なくとも８５％）がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８

～１７１のいずれか一つからなる親ポリペプチドにより誘発される皮膚反応（皮膚反応直径として評価）を生じる反応である）ことを意味する。
【００２５】
したがって、免疫性を増すポリペプチドフラグメントの能力は、予めポリペプチドで免疫化した後で結核菌群に属するマイコバクテリアのビルレント株に実験的に感染させた実験動物（例えば、マウス又モルモット）から単離した脾臓、肺又は他の器官のホモジネートからのマイコバクテリア数の減少を、同じビルレント株に感染させた実験動物（結核に対して予め免疫化していない）の対照群のマイコバクテリア数と比較して、実験動物で計測して評価することができる。マイコバクテリア数の比較は、マイコバクテリア・ボビスＢＣＧで免疫化した後に同じビルレント株で実験的に感染させた実験動物群からのマイコバクテリアを計測して行ってもよい。
【００２６】
本発明のポリペプチドフラグメントで免疫化した実験動物由来のホモジネート中のマイコバクテリア数は、マイコバクテリア・ボビスＢＣＧで免疫化したマウス又はモルモットで多くて５倍の数で、例えば多くて３倍の数、好ましくは多くて２倍の数である。
【００２７】
抵抗性を増す本発明のポリペプチドフラグメントの能力についてのより適切な評価は、一方の群が本発明の抗原を含む、ここに記載するワクチンを受けており、他方の群がプラセボもしくは他の公知のＴＢワクチン（例えばＢＣＧ）のいずれかを受けている、２つ個体群（例えば、ヒト又は他の霊長類）での臨床的な結核の発症率の比較である。このような条件では、本発明の抗原は（当業者に公知の統計方法で測定されるように）プラセボの投与で生じるよりも著しく高い免疫防護を生じるはずである。
【００２８】
「結核菌群」は通常の意味でＴＢを生じるマイコバクテリアの複合体であり、結核菌、マイコバクテリア・ボビス、マイコバクテリア・ボビスＢＣＧ及びマイコバクテリア・アフリカヌム（Ｍ．ａｆｒｉｃａｎｕｍ）がある。
【００２９】
この明細書で、語「代謝しているマイコバクテリア」は、対数的に増殖し、培養されている培養培地にポリペプチドを放出している生きたマイコバクテリアを意味する。
【００３０】
語「配列の同一性」は、等しい長さの２つのアミノ酸配列又は２つのヌクレオチド配列間のホモロジーの程度の定量測定を示す。配列の同一性は、
【００３１】
【化２】

$$\frac{(N_{ref}-N_{dif})100}{N_{ref}}$$

［式中、$N_{dif}$は配列している際の２つの配列中で同一でない残基の全数であり、$N_{ref}$は１つの配列における残基数である］として算出することができる。それ故、ＤＮＡ配列ＡＧＴＣＡＧＴＣは、配列ＡＡＴＣＡＡＴＣと７５％の配列の同一性を有するであろう（$N_{dif}$＝２、$N_{ref}$＝８）。
【００３２】
配列の同一性は、所定のポリペプチドのアミノ酸配列とＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８～１７１のいずれか一つに示すアミノ酸配列との同一性の程度を例示するためにここで用いる。ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４

、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８～１７１のいずれか一つに示すアミノ酸配列と比較されるアミノ酸配列は、例えば後述するハイブリダイゼーションで得られるＤＮＡ配列から推定するか、又は従来のアミノ酸配列法により得ることができる。配列の同一性は成熟ポリペプチドのアミノ酸配列について、つまり、いずれのリーダー配列も考慮せずに測定することが好ましい。

【００３３】

上記の記載から明らかであるように、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８～１７１のいずれか一つを有するポリペプチドと同一でないポリペプチドは本発明には含まれない。本発明は、親配列に匹敵する免疫原性に不都合な影響を及ぼさす、重要かつ有用な新規の結合特性や生物学的機能及び免疫原性等を生じ得るマイナーな変形を可能にするものである。

【００３４】

したがって、各ポリペプチドフラグメントは、特定のアミノ酸配列と核酸配列で特徴づけることができる。このような配列が組換え法で産生される類似体及び変異体を含み、このような核酸及びポリペプチド配列が、核酸配列への１以上のヌクレオチドの置換、挿入、付加及び／又は欠損により修飾され、組換えポリペプチド中での１以上のアミノ酸残基の置換、挿入、付加又は欠損を生じることは理解されるであろう。語ＤＮＡを以下で用いる際、語ＤＮＡが、ＤＮＡがＳＲＮＡで置換され得る目的のために当業者に明らかなＲＮＡの具体例を含むように解釈すべきであることは理解されるべきである。ハイブリダイゼーション用には、ＰＮＡが、非常にダイナミックなハイブリダイゼーションプロフィルを示すことが分かっているので、ＤＮＡの代わりに用いてもよい（ＰＮＡは、Ｎｉｅｌｓｅｎ　Ｐ　ＥらのＳｃｉｅｎｃｅ　２５４：１４９７－１５００に記載）。

【００３５】

免疫応答診断及びワクチン調製で、公知の免疫原性のタンパク質又はポリペプチドのセグメントから抗原を調製することは、ともにしばしば可能であり、実用的である。あるエピトープ領域を用いて、抗原ポリペプチド全体で生じる反応に似た反応を生じることができる。抗原性又は免疫原性の可能性がある領域は、幾つかの試験法、例えばＪａｍｅｓｏｎ－ＷｏｌｆもしくはＫｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅの抗原性解析又はＨｏｐｐ及びＷｏｏｄｓ（１９８１）の疎水性解析［例えばＪａｍｅｓｏｎ及びＷｏｌｆ、１９８８；Ｋｙｔｅ及びＤｏｏｌｉｔｔｌｅ、１９８２；又は米国特許第４，５５４，１０１号参照］のいずれかで同定できる。各アミノ酸残基に平均的な親水値を割り当てる疎水性解析により、これらの値から平均的な親水度を算出でき、もっとも親水性の領域を決定することができる。推測される抗原性領域は、これらの方法を１以上用いて本発明のポリペプチドを指定するアミノ酸配列から誘導することができる。

【００３６】

また、免疫応答のあいだに認識される関連したＴ－細胞エピトープを同定するために、「ブルートフォース（ｂｒｕｔｅ　ｆｏｒｃｅ）」法を使用することもできる。Ｔ－細胞エピトープは直鎖状であるので、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８～１７１のいずれか一つのポリペプチドの欠損変異体は、系統的に構築すると、例えばこれらの欠損変異体をここに記載するＩＦＮ－γアッセイに付すことにより免疫認識に必要なポリペプチドの領域を示す。別の方法は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３いずれかの一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４

、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８～１７１のいずれか一つのポリペプチドから誘導される重複オリゴマー（好ましくは、例えば２０アミノ酸残基の長さの合成物）を利用している。これらのなかには、ＩＦＮ－γアッセイで陽性の反応を生じるものと生じないものとがあるであろう。

【００３７】

本発明の好ましい具体例で、本発明のポリペプチドフラグメントはヘルパーＴ－細胞のエピトープからなる。

【００３８】

Ｔ－細胞エピトープの最も小さい長さは少なくとも６アミノ酸であることが示されているが、このようなエピトープはより長い範囲のアミノ酸から構成されていることが普通である。それ故、本発明のポリペプチドフラグメントは少なくとも７アミノ酸残基で、例えば少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１２、少なくとも１４、少なくとも１６、少なくとも１８、少なくとも２０、少なくとも２２、少なくとも２４及び少なくとも３０のアミノ酸残基を有していることが好ましい。

【００３９】

実施例から明らかであるように、本発明のポリペプチドの幾つかはリーダー配列（又は他の短いペプチド配列）を含む天然の翻訳産物であるが、結核菌群に属する細菌由来の短期培養ろ液から単離できる生成物は、これらの配列を有しない。これらのポリペプチドを組み換えて産生し、これに関連して、ポリペプチドの遺伝子にリーダー配列をエンコードする情報を含むことによって宿主細胞からのポリペプチドの輸送を容易にすることは幾つかの用途で有利であるが、むしろ輸送を行う宿主系で優れていることが示されている配列でリーダー配列を置換するか又はリーダー配列を（例えば、ペプチド合成によるポリペプチド産生時に）全体的に省くことが、より好ましい。それ故、本発明の好ましい具体例は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６の－３０～－１及び／又はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０の－３２～－１及び／又はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２の－８～－１及び／又はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４の－３２～－１及び／又はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４２の－３３～－１及び／又はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５２の－３８～－１及び／又はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５６の－３３～－１及び／又はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５８の－５６～－１及び／又はＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５１の－２８～－１のアミノ酸残基がないポリペプチドである。

【００４０】

別の好ましい具体例では、本発明のポリペプチドフラグメントは、いずれのシグナル配列もない。これは、ポリペプチドフラグメントが合成して産生される際に特に重要であるが、ポリペプチドフラグメントが組換えて産生される際には、通常、それらがペリプラズムや細胞外空間へ宿主細胞により輸送されないようにすることができる。ポリペプチドフラグメントは宿主細胞の破壊後に細胞質から従来法（以下、参照）で回収でき、ポリペプチドフラグメントの再生が必要な場合には一般的な再生方法（例えば、このような一般的に使用可能な再生法を記載するＷＯ９４／１８２２７号の開示参照）を用いることができる。

【００４１】

ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８～１７１のいずれか一つから誘導される所定のポリペプチドフラグメントの潜在的な有用性について適切なアッセイは、感作記憶Ｔ－リンパ球からのＩＦＮ－γの放出に影響するポリペプチドフラグメントの能力の評価である。この能力を有するポリペプチドフラグメントは、本発明によれば本発明の特に重要な具体例である。感染の開始後すぐにＴリンパ球免疫応答を刺激するポリペプチドフラグメントは、マイコバクテリアが一瞬の感染で生じる細菌数まで増殖をなし遂げる前に感染を引き起こすマイコバクテリアの制御に重要であるものと推測される。

【００４２】

したがって、本発明の重要な具体例は、上記に定義されるポリペプチドフラグメントであって、１）一次感染から２週間以内か、又はマウスを結核菌群に属するマイコバクテリアに再度実験的に感染させてから４日以内のマウスから回収した感作記憶Ｔ－リンパ球からのＩＦＮ－γの放出を誘導し、その誘導が約２００，０００個の脾臓細胞／ｍｌを含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が１～４μｇポリペプチド／ｍｌ懸濁液となり、ＩＦＮ－γの放出が懸濁液にポリペプチドを添加して２日後に回収した上清中のＩＦＮ－γの測定により評価できる、及び／又は２）感染第１相のＴＢ患者又はＢＣＧ予防接種した健康なドナー又はＴＢ患者に接触している健常者から単離した約１，０００，０００個のヒトＰＢＭＣ（末梢血液単核細胞）／ｍｌから少なくとも１，５００ｐｇ／ｍｌ上のレベルでＩＦＮ－γの放出を誘導し、その誘導が約１，０００，０００個のＰＢＭＣ／ｍｌを含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が１～４μｇポリペプチド／ｍｌ懸濁液となり、ＩＦＮ－γの放出が懸濁液にポリペプチドを添加して２日後に回収した上清中のＩＦＮ－γの測定により評価できる、及び／又は３）結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作した動物由来のウシＰＢＭＣからＩＦＮ－γの放出を誘導し、その放出が結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作していない動物由来のウシＰＢＭＣから観察される放出の少なくとも２倍である。

【００４３】

１）及び２）の代わりに、ポリペプチドフラグメントによりもたらされる放出は上清中で少なくとも１，５００ｐｇ／ｍｌのＩＦＮ－γを生じることが好ましく、より高い濃度、例えば上清中で少なくとも２，０００ｐｇ／ｍｌ、少なくとも３，０００ｐｇ／ｍｌであることが好ましい。ウシＰＢＭＣからのＩＦＮ－γの放出は、例えば標準的なサイトカインＥＬＩＳＡでバックグラウンドに対し光学密度（ＯＤ）指数として測定でき、少なくとも２であるべきであるが、少なくとも３、５、８及び１０のような、より高い数値であることが好ましい。

【００４４】

本発明のポリペプチドフラグメントは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２、４、６、８、１０、１２、１４、１６、１７～２３のいずれか一つ、４２、４８、５０、５２、５４、５６、５８、６０、６２、６４、６６、６８、７０、７２～８６のいずれか一つ、８８、９０、９２、９４、１４１、１４３、１４５、１４７、１４９、１５１、１５３又は１６８～１７１のいずれか一つと７０％より高い配列の同一性を有する、少なくとも６アミノ酸残基の長さのアミノ酸配列からなることが好ましい。配列の同一性の最小割合は少なくとも８０％、例えば少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％及び少なくとも９９．５％であることが好ましい。

【００４５】

上述のとおり、本発明のポリペプチドフラグメントからリーダー配列を省くことは、通常、重要であろう。しかし、融合ポリペプチドの産生により、本発明のポリペプチドフラグメントは、より良好に特徴づけることができる。例えば、組換えて産生される際にポリペプチドの輸送を容易にする融合パートナー（ｐａｒｔｎｅｒ）、ポリペプチドの精製を容易にする融合パートナー及び本発明のポリペプチドフラグメントの免疫原性を高める融合パートナーは全て重要である可能性がある。したがって、本発明は、少なくとも１つの上記ポリペプチドフラグメントと少なくとも１つの融合パートナーからなる融合ポリペプチドにも関する。免疫原性を増すためには、融合パートナーは、例えば（関連するエピトープを多重発現できるように）上記の別のポリペプチドフラグメント及び結核菌群に属する細菌由来の他のポリペプチド（例えば、ＥＳＡＴ－６、ＭＰＢ６４、ＭＰＴ６４及びＭＰＢ５９）又はこれらの抗原のいずれかに対する少なくとも１つのＴ－細胞エピトープからなる群から選択できる。融合パートナーとして役立つことができる他の免疫原性を高めるポリペプチドは、Ｔ－細胞エピトープ（例えば、ポリペプチドＥＳＡＴ－６、ＭＰＢ６

４、ＭＰＴ６４又はＭＰＢ５９由来）又は標的の遺伝子産物の免疫原性を高める他の免疫原性エピトープ（例えば、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２及びＩＬ－１２のようなリンホカイン）である。発現及び／又は精製を容易にするためには、融合パートナーは、例えば細菌の線毛タンパク質、例えばピリン線毛成分及びｐａｐＡ；タンパク質Ａ；ＺＺ－ペプチド（ＺＺ－融合物は、スウェーデンのＰｈａｒｍａｃｉａより市販されている）；マルトース結合タンパク質；グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ；β－ガラクトシダーゼ；又はポリヒスチジンであってもよい。

【００４６】

他の重要な融合パートナーは、脂質化されていることによって免疫原性ポリペプチドを免疫系に適切な様式で存在させるポリペプチドである。この作用は、例えばボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ　ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）のＯｓｐＡポリペプチドベースのワクチンから公知であり、ポリペプチド中の脂質化膜アンカーが産生細胞から単離されると、ポリペプチド（天然に脂質化されている）に自己アジュバント作用を付与する。逆に、ＯｓｐＡポリペプチドは、脂質化アンカーなしで調製される際に免疫学的に比較的休止（ｓｉｌｅｎｔ）状態にある。

【００４７】

実施例６Ａに明らかにされているように、ＥＳＡＴ－６のＮ－末端に直接融合しているＭＰＴ５９からなる融合ポリペプチドは、ＭＰＴ５９及びＥＳＡＴ－６のみの免疫原性から予想される以上にＥＳＡＴ－６の免疫原性を高める。この驚くべき知見が得られた正確な理由は依然として不明であるが、両方の抗原の存在により免疫原性に関する相乗効果が生じたか、又はＥＳＡＴ－６配列のＮ－末端配列の存在により、この免疫的に優勢なタンパク質をＮ－末端での存在が知られている重要なエピトープの損失から保護したものと考えられる。また、第三に、ＭＰＴ５９配列のＣ－末端に配列が存在することにより、この抗原の免疫特性が高められた可能性がある。

【００４８】

したがって、本発明の一部は、結核菌タンパク質ＥＳＡＴ－６又はＭＰＴ５９由来のＴ－細胞エピトープを構成する少なくとも１つの範囲のアミノ酸を含む第一アミノ酸配列と、ＥＳＡＴ－６（最初のアミノ酸範囲がＥＳＡＴ－６から誘導される場合）又はＭＰＴ５９（最初のアミノ酸範囲がＭＰＴ５９から誘導される場合）とは異なる結核菌タンパク質由来の少なくとも１つのＴ－細胞エピトープを含み、及び／又は生体内分解又は翻訳後プロセシングから第一アミノ酸配列を保護するアミノ酸の範囲を含む第二アミノ酸配列からなる融合ポリペプチドフラグメントに関する。第一アミノ酸配列は、第二アミノ酸配列にＮ－又はＣ－末端で位置していてもよいが、ＥＳＡＴ－６のＮ－末端保護についての上記の点を考慮すると、第一アミノ酸配列がＥＳＡＴ－６由来である際に第一アミノ酸配列は第二アミノ酸配列にＣ－末端で位置していることが好ましい。

【００４９】

現在はＭＰＴ５９とＥＳＡＴ６の融合作用が研究されているにすぎないが、ＥＳＡＴ６とＭＰＴ５９又はそれら由来のエピトープは、融合構築物の全体的な免疫原性に対し実質的に同じ作用を有する他の融合パートナーに有利に融合させることができると考えられる。それ故、本発明の融合ポリペプチドフラグメントは、第二アミノ酸配列に含まれる少なくとも１つのＴ－細胞エピトープが、上記及び実施例に記載される本発明のポリペプチドフラグメントからなる群から選択される結核菌ポリペプチド（「親」ポリペプチド）に由来するか、又はアミノ酸配列が結核菌タンパク質ＤｎａＫ、ＧｒｏＥＬ、ウレアーゼ、グルタミンシンセターゼ、プロリンリッチ複合体、Ｌ－アラニンデヒドロゲナーゼ、ホスフェート結合タンパク質、Ａｇ８５複合体、ＨＢＨＡ（ヘパリン結合血球凝集素）、ＭＰＴ５Ｌ１、ＭＰＴ６４、スーパーオキシドジスムターゼ、１９ｋＤａリポタンパク質、α－クリスタリン、ＧｒｏＥＳ、ＭＰＴ５９（第一アミノ酸配列がＥＳＡＴ－６由来である場合）及びＥＳＡＴ－６（第一アミノ酸配列がＭＰＴ５９由来である場合）のいずれか１つに由来するものが好ましい。第一及び第二Ｔ－細胞エピトープは、由来タンパク質中の天然に存在する配列と少なくとも７０％の配列同一性をそれぞれ有することが好ましく、第

一及び／又は第二アミノ酸配列は、由来タンパク質と少なくとも７０％の配列同一性を有することがさらに好ましい。この融合ポリペプチドのもっとも好ましい具体例は、第一アミノ酸配列がＥＳＡＴ－６又はＭＰＴ５９のアミノ酸配列であり、及び／又は第二アミノ酸配列が上記の潜在的な「親」ポリペプチドのアミノ酸配列の全長であるポリペプチドである。

【００５０】

もっとも好ましい具体例において、融合ポリペプチドフラグメントはＭＰＴ５９に融合したＥＳＡＴ－６（ＥＳＡＴ－６は、ＭＰＴ５９のＣ－末端に融合していることが有利である）からなり、１つの詳細な具体的では、２つの親ポリペプチドフラグメントからなる２つのアミノ酸配列間にリンカーは導入されていない。

【００５１】

本発明の別の部分は、

１）上記のポリペプチド又は融合ポリペプチドをエンコードする核酸配列からなるか、又はその相補的な核酸配列からなり、及び／又は

２）少なくとも１０ヌクレオチドの長さを有し、

【００５２】

【表２】

SEQ ID NO: 1 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 3 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 5 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 7 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 9 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 11 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 13 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 15 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 41 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 47 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 49 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 51 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 53 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 55 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 57 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 59 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 61 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 63 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 65 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 67 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 69 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 71 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 87 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 89 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 91 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 93 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 140 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 142 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 144 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 146 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 148 又はその相補鎖、
SEQ ID NO: 150 又はその相補鎖及び
SEQ ID NO: 152 又はその相補鎖

から選択されるヌクレオチド配列を有する核酸フラグメントと、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件（当該分野で定義のとおり、つまり融解温度Ｔｍの５～１０℃下、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９、１１．４５－１１．４９頁参照）下で容易にハイブリダイズし、但し、核酸フラグメントかＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１の配列からなる際、核酸フラグメントはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１の７８１の位置に相当するＡを含み、核酸フラ

グメントがＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１に正確に相補的なヌクレオチド配列のサブ配列からなる際は、核酸フラグメントはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１の７８１の位置に相当するＴを含む、単離形態の核酸フラグメントに関する。

【００５３】

核酸フラグメントは、ＤＮＡフラグメントであることが好ましい。

【００５４】

本発明を正確に有用なものとするには、ハイブリダイゼーションの研究やアッセイに用いる際の核酸配列は、選択される配列の少なくとも１０～４０ほどの範囲のヌクレオチドに相補的な配列を含むことが好ましい。少なくとも１０ヌクレオチド長の大きさでフラグメントが十分な長さとなり、安定かつ選択的な二重らせん分子の形成が確実となる。ハイブリッドの安定性と選択性を増すためには、１０塩基長より長い範囲の相補配列を有する分子が一般的に好ましく、それにより、得られる特異的なハイブリッド分子の質と程度が改善される。

【００５５】

それ故、語「サブ配列」は、本発明の核酸フラグメントに関して用いる際に、上記のハイブリダイゼーションパターンを示す少なくとも１０ヌクレオチドの連続的な範囲を示すことが意図される。このため、最低でも、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１、３、５、７、９、１１、１２、１５、２１、４１、４７、４９、５１、５３、５５、５７、５９、６１、６３、６５、６７、６９、７１、８７、８９、９１、９３、１４０、１４２、１４４、１４６、１４８、１５０又は１５２を有するハイブリダイゼーションパートナーのサブ配列との配列同一性が少なくとも７０％であることが、通常、必要となるであろう。核酸フラグメントは１０ヌクレオチドより長く、例えば少なくとも１５、少なくとも２０、少なくとも２５、少なくとも３０、少なくとも３５、少なくとも４０、少なくとも４５、少なくとも５０、少なくとも５５、少なくとも６０、少なくとも６５、少なくとも７０及び少なくとも８０ヌクレオチドの長さであることが好ましい。また、配列同一性は７０％より高く、例えば少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９２％、少なくとも９４％、少なくとも９６％及び少なくとも９８％であることが好ましい。配列同一性は１００％であることが、もっとも好ましい。このようなフラグメントは、例えば化学的手段によるフラグメントの直接合成で、核酸再生技術（例えば、米国特許４，６０３，１０２号のＰＣＲ技術）の応用で、又は組換え産物用の組換えベクターへの選択配列の導入で容易に調製できる。

【００５６】

同じアミノ酸が様々なコドンでエンコードされていてもよく、用いられるコドンがヌクレオチド配列を発現する対象の微生物の好みに特に関係していることは周知である。したがって、本発明の核酸フラグメントの少なくとも１つのヌクレオチド又はコドンは他で置換されて、発現時に、対象の核酸フラグメントでエンコードされるポリペプチドと同一か、実質的に同一のポリペプチドを生じてもよい。それ故、本発明により、核酸フラグメントやそのサブ配列でエンコードされるポリペプチドに実質的に影響しない、１以上のヌクレオチドの置換、挿入（イントロン含む）、付加、欠損及び転位のような配列の変化が可能になる。語「置換」は、全ヌクレオチド配列中の１以上のヌクレオチドを、１以上の異なるヌクレオチドで置換することを意味する。「付加」は、全ヌクレオチド配列のいずれかの末端での１以上のヌクレオチドの付加を意味するものと理解される。「挿入」は、全ヌクレオチド配列内での１以上のヌクレオチドの導入を意味する。「欠損」は、１以上のヌクレオチドが、全ヌクレオチド配列から、配列のいずれかの末端又は配列内のいずれかの適切な位置で欠損されていることを示す。「転位」は、２以上のヌクレオチド残基が互いに置換されていることを意味する。

【００５７】

修飾されるヌクレオチド配列は、上記のｃＤＮＡ又はゲノム由来でもよいが、合成由来であってもよい。さらに、配列は、上述のとおり混合したｃＤＮＡならびにゲノム、混合したｃＤＮＡならびに合成物又はゲノム、及び合成物由来でもよい。配列は、例えば部位

特異的突然変異で修飾し、所望のポリペプチドをエンコードする所望の核酸フラグメントを生じてもよい。ポリペプチドをエンコードする核酸の修飾に焦点をしぼった以下の記載は、このような可能性、ならびに２以上のＤＮＡフラグメントを結合して所望の核酸フラグメント及び上記主題の組合せを生じる核酸構築の可能性も含むものと理解されるべきである。

【００５８】

ヌクレオチド配列をいずれかの適切な技術を用いて修飾し、本発明のポリペプチドをエンコードする核酸フラグメントを産生することができる。

【００５９】

本発明のポリペプチドのアミノ酸配列をエンコードするヌクレオチド配列の修飾は、得られるポリペプチドの免疫学的機能を損なわないものであるべきである。

【００６０】

ここに開示する抗原変異体の製造に好ましい方法は、部位特異的突然変異である。この技術は、基礎となる核酸の特異的突然変異により、抗原配列由来の個々のペプチド又は生物学的機能が等しいタンパク質もしくはペプチドの製造に有用である。さらに、前記の記載を考慮すると、この技術により例えば核酸へ１以上のヌクレオチドの変更が導入されて、配列変異体の調製及び試験を容易に行うことができる。部位特異的突然変異によって、所望の変異のヌクレオチド配列ならびに十分な数の隣接したヌクレオチドをエンコードする特異的なオリゴヌクレオチド配列を用いる変異体の産生が、欠損連結点の両側が交差している安定な二重らせんの形成に十分な大きさで複雑な配列のプライマー配列を生じることができる。一般的には、配列連結点の両側の約５～１０残基が変えられている約１７～２５ヌクレオチドの長さのプライマーが好ましい。

【００６１】

一般に、部位特異的突然変異の技術は、刊行物で例示されているように当該分野で周知である［Ａｄｅｌｍａｎら、１９８３］。この技術は、一般的に一本鎖及び二本鎖の両形態で存在するファージベクターを用いることが好ましい。部位特異的突然変異に有用な代表的なベクターは、Ｍ１３ファージのようなベクターを含む［Ｍｅｓｓｉｎｇら、１９８１］。これらのファージは容易に市場で入手でき、それらの用途は一般的に当業者に周知である。

【００６２】

一般に、この明細書によれば部位特異的突然変異は、その配列内に本発明のポリペプチドをエンコードする核酸配列を含む一本鎖ベクターを最初に得ることにより行なわれる。所望の変異配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーは、例えばＣｒｅａら（１９７８）の方法で一般的に合成して調製される。このプライマーは、次いで一本鎖ベクターにアニールされ、変異を有する鎖を完全に合成するために大腸菌ポリメラーゼＩクレノウフラグメントのようなＤＮＡポリメラーゼ酵素に付される。このようにして、一方の鎖が本来の非変異配列をエンコードし、第二の鎖が所望の変異を有するヘテロ二本鎖が形成される。このヘテロ二本鎖ベクターは、次いで大腸菌細胞のような適切な細胞を形質転換するのに用いられ、変異された転位配列を有する組換えベクターを含むクローンが選択される。

【００６３】

部位特異的突然変異を用いる本発明の選択される核酸フラグメントの配列変異体の調製は、有用である可能性がある遺伝子種の産生手段として提供されるもので、本発明の核酸フラグメントの配列変異体が得られる他の方法の限定を意図するものではない。例えば、所望の遺伝子をエンコードする組換えベクターは、ヒドロキシルアミンを用いるプラスミドＤＮＡの突然変異用の配列変異体を得るために突然変異剤を用いて処理してもよい［例えば、Ｅｉｃｈｅｎｌａｕｂ、１９７９により記載の方法参照］。

【００６４】

また、本発明は、上記の核酸フラグメントからなる複製可能な発現ベクター、特に本発明のポリペプチドフラグメントをエンコードする核酸フラグメントからなるベクターに関する。

【００６５】
　ベクターは、組換えＤＮＡ方法に便利に付すことができるいずれのベクターでもよく、ベクターの選択は、しばしばベクターが導入される宿主細胞による。したがって、ベクターは、その複製が染色体の複製から独立した自律複製ベクター（つまり、染色体外の単位として存在するベクター）であってもよい。このようなベクターの例は、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニークロモソーム又はウィルスである。また、ベクターは、宿主細胞に導入される際に宿主ゲノムに組込まれ、組み込まれた染色体とともに複製されるベクターでもよい。
【００６６】
　発現ベクターは、ここに開示するＤＮＡセグメントのいずれかを含むように構築してもよい。そのようなＤＮＡは、マイコバクテリアのビルレント株に特異的な抗原性タンパク質又はサンプル中のマイコバクテリア核酸の検出用ハイブリダイゼーションプローブをエンコードしていてもよい。所望の抗原性タンパク質によって、長い又は短いＤＮＡセグメントを用いることができる。開示されるＤＮＡで発現又はエンコードされるタンパク質のエピトープ領域は、ＤＮＡの比較的短いセグメントとして含まれることができる。広範囲な発現ベクターは、例えば異種遺伝子産物及び／又は耐性遺伝子、例えば形質転換細胞の同定に有用な抗生物質耐性遺伝子の同定に有用なレポーター遺伝子産物をエンコードするＤＮＡセグメントを含んでいてもよい。
【００６７】
　本発明のベクターを細胞の形質転換に用いて、本発明の核酸フラグメントを増殖させたり、本発明のポリペプチドフラグメントを発現させることができる。それ故、本発明は、本発明のベクターを少なくとも１つ有する形質転換細胞（その中に含まれる本発明のベクター及び／又は核酸フラグメントを天然に有しない細胞）にも関する。このような形質転換細胞（本発明の一部でもある）は、いずれかの適切な細菌の宿主細胞又はいずれかの他のタイプの細胞（例えば、単核真核生物、真菌もしくは酵母）又は多細胞生物（例えば動物や植物）由来細胞であってもよい。特に、タンパク質のグリコシル化は原核生物では珍しい事象であるが、グリコシル化が望ましい場合には哺乳類細胞が用いられる。しかし、通常は、例えばマイコバクテリア、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、バシラス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）及びエシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｉａ）属に属する細菌のような原核細胞が好ましい。形質転換細胞は、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）又はマイコバクテリア・ボビスＢＣＧ細胞が好ましく、形質転換細胞が、本発明のポリペプチドを発現することが特に好ましい。後者によって、本発明のポリペプチドが、形質転換細胞を含む培養液から単に回収することで産生できる可能性が増す。この発明の部分のもっとも好ましい具体例では、形質転換細胞はマイコバクテリア・ボビスＢＣＧ株のダニシュ（Ｄａｎｉｓｈ）１３３１、つまりデンマーク、コペンハーゲンのＢＣＧ研究所（Ｓｔａｔｅｎｓ　Ｓｅｒｕｍｉｎｓｔｉｔｕｔ）からのマイコバクテリア・ボビス株コペンハーゲンである。
本発明の核酸フラグメントは、本発明のポリペプチドフラグメントの組換え体を産生できる。しかし、ペプチド合成としてのポリペプチドフラグメントの提供方法は、天然源からの単離でもよい。
【００６８】
　したがって、本発明は、宿主細胞で複製可能なベクターに上記の核酸フラグメントを挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入し（形質転換細胞は、分化ハイブリダイゼーション、融合レポーター遺伝子産物の同定、耐性マーカー、抗－抗原抗体などでのスクリーニングを含む様々な技術を用いて選択できる）、ポリペプチドの発現を生じるのに十分な条件下、培養培地で宿主細胞を培養（当然、細胞は環境に適切な条件下で培養でき、ＤＮＡが望ましい場合には複製条件が用いられる）し、宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収するか；又は請求項１に記載の短期培養ろ液からポリペプチドを単離するか；又は結核菌群の全マイコバクテリア又はその溶解物もしくは画分（例えば、細胞壁含有画分）からポリペプチドを単離するか；又は固相又は液相ペプチド合成でポリペプチド

を合成することからなる本発明のポリペプチドフラグメントの製造方法にも関する。

【００６９】

形質転換細胞の成長に用いられる培地は、目的に合った従来のいずれかの培地であればよい。適切なベクターは上記のベクターのいずれでもよく、適切な宿主細胞は上記に挙げた細胞タイプのいずれでもよい。ベクターの構築と宿主細胞へのその導入に用いられる方法は、組換えＤＮＡの分野で、このような目的に公知のいずれの方法でもよい。以下に、考えられ得る可能性について、より詳細に記載する。

【００７０】

一般に、本発明の核酸配列の初期クローニングと本発明に有用なベクターの構築には、原核生物が好ましい。例えば、以下のより詳細に記載する特定の株に加えて、一例として大腸菌Ｋ１２株２９４（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．３１４４６）、大腸菌Ｂ及び大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ　Ｎｏ．３１５３７）のような株が挙げられる。これらの例は当然に本発明の例示であり、限定するものではない。

【００７１】

発現にも、原核生物か好ましい。上記の株ならびに大腸菌Ｗ３１１０（Ｆ－、ラムダー、原栄養性、ＡＴＣＣ　Ｎｏ．２７３３２５）、枯草菌のような桿菌又はサルモネラ・ティフィムリウム（Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）もしくはセラチア・マルセッセンス（Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｍａｒｃｅｓａｎｓ）のような他の腸内細菌及び様々なシュードモナス種を用いることができる。

【００７２】

特に、成長の早いマイコバクテリア、例えばマイコバクテリア・スメグマ（Ｍ．ｓｍｅｇｍａｔｉｓ）は結核菌群のマイコバクテリアと高度に類似し、それ故に発現産物の翻訳後修飾を行う必要を減じる可能性があるので、重要である。

【００７３】

一般に、宿主細胞と適合性の種から誘導されるレプリコン及び制御配列を含むプラスミドベクターは、これらの宿主に関して用いられる。ベクターは、複製部位ならびに形質転換細胞での表現型を選択させることができるマーキング配列を有する。例えば、大腸菌は、通常、大腸菌種由来プラスミドｐＢＲ３２２を用いて形質転換される［例えばＢｏｌｉｖａｒら、１９７７、Ｇｅｎｅ　２：９５参照］。プラスミドｐＢＲ３２２はアンピシリンとテトラサイクリン耐性遺伝子を含み、形質転換細胞の同定手段を容易にしている。プラスミドｐＢＲ又は他の微生物プラスミド又はファージは、発現用の微生物で用いることができるプロモーターを含んでいてもよく、含むように修飾されてもよい。

【００７４】

組換えＤＮＡの構築でもっとも一般的に用いられるプロモーターは、β－ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）及びラクトースプロモーターシステム［Ｃｈａｎｇら、１９７８；Ｉｔａｋｕｒａら、１９７７；Ｇｏｅｄｄｅｌら、１９７９］及びトリプトファン（ｔｒｐ）プロモーターシステム［Ｇｏｅｄｄｅｌら、１９７９；ＥＰＯ出願公報Ｎｏ．００３６７７６］を含む。これらはもっとも一般的に用いられるが、他の細菌プロモーターが発見され、利用されており、それらのヌクレオチド配列に関する詳細が公表され、プラスミドベクターとのそれらの機能的な結合が当業者により可能となっている［Ｓｉｅｂｗｅｎｌｉｓｔら、１９８０］。原核生物由来の遺伝子は、それら自身のプロモーター配列から大腸菌で効率よく発現され、人為的手段による別のプロモーターの付加の必要性をなくしている。

【００７５】

本発明のポリペプチドの組換え調製後、ポリペプチドの単離は、例えば本発明のポリペプチドに実質的に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いるアフィニティクロマトグラフィー（又はクロマトグラフィーに基づく他の従来の生化学的方法）で行うことができる。さらに、Ａｎｄｅｒｓｅｎらにより記載されている電気溶出技術［Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１６１：２９－３９］を同時に用いてもよい。

【００７６】

本発明によれば、翻訳後修飾は、ポリペプチドの脂質化、グリコシル化、切断又は伸長を含む。

【００７７】

ある態様において、この発明で提供されるＤＮＡ配列情報により、マイコバクテリア遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする能力を有する比較的短いＤＮＡ（又はＲＮＡ又はＰＮＡ）配列を調製することができる。これらの態様において、適切な長さの核酸プローブは、関連する配列を考慮して調製される。このような核酸プローブがマイコバクテリア遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする能力により、種々の具体例でプローブに特定の有用性が付与される。プローブは、サンプル中の病原性微生物の存在を検出するための様々な診断アッセイに使用できることが非常に重要である。しかし、変異種プライマー又は他の遺伝子構築物の調製に用いるプライマーの調製のための配列情報の使用をはじめ、いずれの用途も想定される。

【００７８】

本発明の核酸フラグメントは、本発明のポリペプチド合成及び（直接的なハイブリダイゼーションアッセイ又は例えばＰＣＲもしくは他の分子増幅方法でのプライマーとして有用な）ハイブリダイゼーションプローブのための原点としての用途とは別に、抗原の生体内発現に用いてもよい。つまり、核酸フラグメントは、いわゆるＤＮＡワクチンに用いることができる。最近の研究により、真核細胞で複製しないベクターにクローンされたＤＮＡフラグメントは、例えば筋肉内注射もしくは経皮投与（いわゆる「遺伝子銃」法）により動物（ヒト含む）へ導入できることが示されている。ＤＮＡは例えば筋肉細胞により採取され、重要な遺伝子は、真核生物で機能するプロモーター、例えばウィルスプロモーターで発現され、遺伝子産物は、その後免疫系を刺激する（これらの新たに発見された方法は、ここで参照により導入されるＵｌｍｅｒら、１９９３を参照のこと）。

【００７９】

それ故、本発明は、本発明の核酸フラグメントからなるワクチンにも関し、このワクチンは、ワクチンを投与したヒトを含む動物により抗原を生体内で発現させ、抗原の発現量は、ヒトを含む動物での結核菌群のマイコバクテリア感染に対する耐性を実質的に増す効果を有する。

【００８０】

このような「ＤＮＡワクチン」の効力は、免疫応答の調節能力を有するポリペプチドをエンコードするＤＮＡフラグメントとともに発現産物をエンコードする遺伝子を投与して増強される可能性がある。例えば、リンホカイン前駆体又はリンホカイン（例えば、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２又はＩＬ－１２）をエンコードする遺伝子は、２つの別のＤＮＡフラグメントを投与するか、又は同じベクターに含まれるＤＮＡフラグメントをともに投与することにより、免疫原性タンパク質をエンコードする遺伝子とともに投与することができる。また、ここに開示されるポリペプチドの関連するエピトープをそれぞれエンコードする多くのヌクレオチド配列からなるＤＮＡフラグメントを投与して、これらのエピトープの広いスペクトルを有する免疫系を連続的に感作させてもよい。

【００８１】

上記のとおり、本発明のポリペプチドフラグメントは、結核菌群に属する代謝しているビルレントマイコバクテリアを含む培養培地で細胞外に存在するため、又はこのような細胞外抗原とホモロジーが高いため、又はマイコバクテリア・ボビスＢＣＧに存在しないために、ワクチンの構成要素又は免疫診断剤の構成要素として優れている可能性がある。
したがって、本発明の別の態様は、本発明のポリペプチド又は融合ポリペプチドからなる免疫性組成物に関する。このような免疫性組成物の能力を確実に最適化するためには、免疫学的かつ医薬的に受容な担体、賦形剤又はアジュバントを含むことが好ましい。

【００８２】

適切な担体は、ポリペプチド（類）が疎水性の非共有相互作用で結合しているポリマー（例えばポリスチレンのようなプラスチック）、又はポリペプチド（類）が共有結合しているポリマー（例えば多糖）又はポリペプチド（例えば、ウシ血清アルブミン、オボアル

ブミン又は鍵穴アオダイ（ｋｅｙｈｏｌｅ　ｌｉｍｐｅｔ）ヘモシアニン）からなる群から選択される。適切な賦形剤は、希釈剤及び懸濁剤からなる群から選択される。アジュバントは、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（ＤＤＡ）、キュイル（Ｑｕｉｌ）Ａ、ポリＩ：Ｃ、フロイント不完全アジュバント、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２、ＩＬ－１２、モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ）及びムラミルジペプチド（ＭＤＰ）からなる群から選択することが好ましい。

【００８３】

少なくとも２つの異なるポリペプチドフラグメントからなり、異なるポリペプチドフラグメントが、それぞれ上記のポリペプチド又は融合ポリペプチドである本発明の免疫性組成物が好ましい。免疫性組成物は、３～２０の異なるポリペプチドフラグメント又は融合ポリペプチドを含むことが好ましい。このような免疫性組成物は、ワクチン形態又は皮膚試験の試薬形態であることが好ましい。

【００８４】

したがって、上記によれば、本発明は、本発明のポリペプチドを調製、合成又は単離し、ワクチン用媒体にポリペプチドを可溶化又は分散させ、任意に他の結核菌抗原及び／又は担体、賦形剤及び／又はアジュバント物質を加えることからなる、本発明の免疫性組成物の産生方法にも関する。

【００８５】

活性成分としてペプチド配列を含むワクチンの調製は、ここで参照として導入する米国特許第４，６０８，２５１号、第４，６０１，９０３号、第４，５９９，２３１号、第４，５９９，２３０号、第４，５９６，７９２号及び第４，５７８，７７０号に例示されているように、一般的に当該分野で十分理解されている。このようなワクチンは、代表的には液体溶液又は懸濁液のいずれかのような注射可能な剤として調製される。注射前の溶液中又は懸濁液中の液体に適切な固体の形態が調製されてもよい。製剤は、乳化されていてもよい。活性免疫原性成分は医薬的に受容で、活性成分と適合性である賦形剤としばしば混合される。適切な賦形剤は、例えば水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等とそれらの組合せである。さらに、所望の場合には、ワクチンは少量の補助物質、例えば湿潤剤もしくは乳化剤、ｐＨ緩衝剤又はワクチンの効果を高めるアジュバントを含んでいてもよい。

【００８６】

ワクチンは、通常、非経口、例えば皮下又は筋肉内のいずれかの注射により投与される。他の投与様式に適切な別の製剤には座薬が含まれ、経口製剤が含まれる場合がある。座薬には、伝統的な結合剤及び担体、例えばポリアルカレングリコール又はトリグリセリドが含まれていてもよい。このような座薬は０．５～１０％、好ましくは１～２％の範囲で活性成分を含む混合物から形成してもよい。経口製剤は、このような通常用いられる賦形剤、例えば医薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。これらの組成物は溶液、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、継続放出製剤又は粉末形態であり、１０～９５％、好ましくは２５～７０％の活性成分を含む。

【００８７】

タンパク質は、中性又は塩の形態としてワクチンに製剤化できる。医薬的に受容な塩は、酸付加塩（ペプチドの遊離のアミノ基とともに形成される）を含む。

【００８８】

酸付加塩は、無機酸（例えば塩酸もしくはリン酸）又はオキサル酢酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸などとともに形成される。遊離のカルボキシル基とともに形成される塩は、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は水酸化鉄のような無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインのような有機塩基などに由来してもよい。

【００８９】

ワクチンは、服用製剤に適合する様式で、治療上、有効かつ免疫原性であるような量で

投与される。投与量は、処置すべき対象（例えば、免疫応答を増すための個々の免疫系の能力を含む）及び望まれる保護の程度による。投与範囲は、予防接種１回当たりに数１００の微生物活性成分のオーダーが適切であり、約０．１～１０００μｇの範囲、例えば約１～３００μｇの範囲が好ましく、特に約１０～５０μｇの範囲が好ましい。最初の投与に適切な型及びブースター注射は変えることもできるが、最初の投与後の接種又は他の投与によって特徴づけられる。

【００９０】

応用方法は、広範囲に変えることができる。ワクチンの従来の投与方法は、いずれも使用することができる。これらは、固形の生理学的に受容な基剤又は生理学的に受容な分散剤での経口的な用途、非経口的な注射などを含むものと考えられる。ワクチンの用量は投与経路によっており、予防接種される人の年齢、症状の程度（ｌｅｓｓｅｒ　ｄｅｇｒｅｅ）、予防接種される人の体重により変化する。

【００９１】

ワクチンのポリペプチドには、ワクチンにおいて十分免疫原性なものがあるが、そうでないものについては、ワクチンがさらにアジュバント物質を含む際に免疫応答が高められるものがある。

【００９２】

ワクチンにアジュバント作用をさせるための様々な方法は、例えば生理食塩水中で通常０．０５～０．１％溶液として用いられる水酸化アルミニウム又はホスフェート（ａｌｕｍ）、０．２５％溶液として用いられる糖（カルボポール）の合成ポリマーとの混合物、それぞれ３０秒～２分間、７０～１０１℃の範囲の温度で熱処理することによるワクチン中のタンパク質の凝集物のような剤の使用を含む。ペプシン処理（Ｆａｂ）抗体でアルブミンに再活性化させることによる凝集物、シー・パルブム（Ｃ．ｐａｒｖｕｍ）のような細菌細胞又はエンドトキシン又はグラム陰性細菌のリポ多糖成分との混合物、マンニットモノオレエート（Ａｒａｃｅｌ　Ａ）のような生理学的に受容な油性賦形剤中のエマルジョン又はブロック置換体として用いられるパーフルオロカーボン（Ｆｌｕｏｓｏｌ－ＤＡ）の２０％溶液とのエマルジョンも、用いることができる。本発明によれば、ＤＤＡ（ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド）はアジュバントの重要な代替物であるが、フロイントの完全及び不完全アジュバント、ならびにキュイルＡ及びＲＩＢＩも重要である可能性がある。さらに、モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ）及びムラミルジペプチド（ＭＤＰ）でもよい。

【００９３】

さらに、アジュバント作用をなす可能性があるものとして、Ｇｏｓｓｅｌｉｎらが１９９２年に記載する技術（ここで、参照により導入される）を用いることは、かなり重要（したがって、好ましい）である。要約すれば、本発明の抗原のような関連性のある抗原の存在は、単核細胞／マクロファージ上のＦｃγレセプターに対する抗体（又は抗体フラグメント結合抗原）に抗原を結合させて高められる。特に、抗原と抗－ＦｃγＲＩの結合は、予防接種目的のための免疫原性の増強を立証している。

【００９４】

ほかに、リンホカイン（例えば、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２及びＩＬ－１２）のような免疫調節物質又はポリＩ：Ｃのような合成ＩＦＮ－γインデューサーが、上記アジュバントと組合わせて使用されてもよい。実施例３で論じるように、抗原とアジュバントの混合物は、優れたワクチン製剤を生じるものと推測される。

【００９５】

多くの例で、何回にもわたって、通常６回の予防接種を越えないで、さらに、通常４回の予防接種を越えないで、好ましくは１又は２回、通常、少なくともほぼ３回の予防接種でワクチンを投与する必要があるであろう。予防接種は２～１２週間隔が通常であり、３～５週間隔がより普通である。１～５年、通常３年間隔の定期的なブースターが、所望の免疫防護レベルを維持するのに望ましい。免疫化の進行は、ＥＳＡＴ－６又はＳＴ－ＣＦと同時培養したＰＢＬ（末梢血液リンパ球）の生体外での増殖アッセイ、特に感作リンパ

球から放出されたＩＦＮ－γレベルの測定により追跡できる。アッセイは、放射性核種、酵素、蛍光発色物などのような従来の標識を用いて行ってもよい。

【００９６】

これらの技術は周知であり、これらのアッセイタイプの例として広範囲な特許、例えば米国特許第３，７９１，９３２号、第４，１７４，３８４号及び第３，９４９，０６４号に見出すことができる。

【００９７】

遺伝的変化のために、異なる個体が、同じポリペプチドに対する強度を変えて免疫応答と反応することがある。したがって、本発明のワクチンは、免疫応答を増すために幾つかの異なるポリペプチドを含んでいてもよい。ワクチンは、全ポリペプチドが上記のとおりであるか、又は全てではなく幾つかのポリペプチドが結核菌複合体に属する細菌由来である２以上のポリペプチドを含んでいてもよい。後者の例で、ポリペプチドについて上記する基準を充たす必要のないポリペプチドは、それら自身の免疫原性により作用するか、又は単なるアジュバントとして作用することができる。このような重要なポリペプチドの例にはＭＰＢ６４、ＭＰＴ６４及びＭＰＢ５９があるが、マイコバクテリアから単離できるいずれかの他の物質も代替物となり得る。

【００９８】

ワクチンは、３～２０の異なるポリペプチド、例えば３～１０の異なるポリペプチドからなっていてもよい。

【００９９】

本発明のポリペプチドをアジュバントと混合する理由の１つは、細胞の免疫応答を有効に活性化させる点にある。しかし、この作用は、他の方法、例えば非病原性微生物のワクチンで有効な抗原を発現させてなすことができる。このような微生物の周知の例は、マイコバクテリア・ボビスＢＣＧである。

【０１００】

したがって、本発明の別の重要な態様は、結核菌群に属するマイコバクテリアで引起こされるＴＢに対して動物（ヒトを含む）を免疫化し、有効成分として微生物を含み、上記ポリペプチドをエンコードするＤＮＡ配列の１以上のコピーが、微生物にポリペプチドを発現、分泌させる様式で微生物ゲノムに挿入されているワクチンである現在利用可能なＢＣＧ生ワクチンの改良である。

【０１０１】

この明細書で、語「ゲノム」は、微生物の染色体ならびにプラスミドのような染色体外のＤＮＡもしくはＲＮＡをいう。しかし、導入される遺伝物質の損失を妨げるために、本発明のＤＮＡ配列を非病原性微生物の染色体に導入することが好ましい。

【０１０２】

非病原性微生物は、例えばマイコバクテリア、サルモネラ、シュードモナス及びエシェリキア属からなる群から選択される細菌が好ましい。特に、非病原性微生物は、マイコバクテリア・ボビスＢＣＧ、例えばマイコバクテリア・ボビスＢＣＧ株のダニシュ１３３１が好ましい。

【０１０３】

マイコバクテリア・ボビスＢＣＧ株由来のマイコバクテリアでの本発明のポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列の１以上のコピーの導入は、ＢＣＧ株の免疫原性作用を高めるであろう。本発明のヌクレオチド配列の１以上のコピーの導入は、さらに免疫応答を高めるものと推測される。したがって、本発明の態様は、ポリペプチドをエンコードするＤＮＡ配列の少なくとも２コピー、例えば少なくとも５コピーが微生物のゲノムに導入されているワクチンである。ＤＮＡ配列のコピーは、同一のポリペプチドをエンコードする同一物もしくは同一物をエンコードする同じＤＮＡ配列の変型もしくはポリペプチドのホモログのいずれであってもよく、又は別の具体例では、ポリペプチドの少なくとも１つが本発明によるものである異なるポリペプチドをエンコードする異なるＤＮＡ配列でもよい。

【０１０４】
本発明の生ワクチンは、本発明による形質転換された非病原性細胞を培養し、これらの細胞をワクチン用の培地に移し、任意に担体、賦形剤及び／又はアジュバント物質を加えて製造することができる。
【０１０５】
また、本発明は、本発明のポリペプチド又は上記する皮膚試験試薬を動物に皮肉注射することからなり、注射位置での陽性の皮膚反応はＴＢを有する動物を示し、注射位置で陰性の皮膚反応はＴＢを有しない動物を示す、結核菌、マイコバクテリア・アフリカヌム又はマイコバクテリア・ボビスにより動物（ヒトを含む）に引き起こされるＴＢの診断方法に関する。陽性反応は少なくとも直径が５ｍｍの皮膚反応であるが、より大きい反応、例えば直径が少なくとも１ｃｍ、１．５ｃｍ、少なくとも２ｃｍであることが好ましい。皮膚試験試薬として用いられる組成物は、上記ワクチンについての記載と同じ方法で製造できる。
【０１０６】
ワクチンの製造と用途に関する上記の記載内において、本発明は、本発明のポリペプチド又は上記のような本発明のワクチン組成物又は上記した生ワクチンを動物に投与することからなる、結核菌群に属するマイコバクテリアにより引き起こされるＴＢに対する動物（ヒトを含む）の免疫化方法にも関する。投与経路は、非経口（例えば、静脈及び動脈内）、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、経口、口腔、舌下、鼻、直腸又は経皮経路が好ましい。
【０１０７】
マイコバクテリア由来の短期培養ろ液に存在するタンパク質ＥＳＡＴ－６ならびにマイコバクテリアゲノム中のｅｓａｔ－６遺伝子は、他のマイコバクテリア株での分布が非常に限られているので、結核菌、例えばｅｓａｔ－６がＢＣＧ及び環境から単離される多くのマイコバクテリア種（例えば、マイコバクテリア・アビウム（Ｍ．ａｖｉｕｍ）及びマイコバクテリア・テラエ（Ｍ．ｔｅｒｒａｅ））の両方に存在しないことを立証している。これは、本発明の抗原及びその遺伝子の少なくとも１つにも当てはまると考えられ、それ故に本発明の診断の具体例は、結核菌群のビルレントマイコバクテリア株での現在又は過去の感染診断を行うのに特に適している。１）例えばＢＣＧワクチンであらかじめ予防接種されるか、又は非ビルレントマイコバクテリア由来抗原に付された対象（動物又はヒト）と２）ビルレントマイコバクテリアに活性に感染しているか、又は感染していた対象は、区別できると考えられる。
【０１０８】
幾つかの診断アッセイ及び方法が、可能であると考えられる。
【０１０９】
過去又は現在のビルレントマイコバクテリア感染の診断が目的である際、患者の単核細胞（つまり、Ｔ－リンパ球）からなる血液サンプルを、本発明の１以上のポリペプチドサンプルに接触させることができる。この接触は生体外で行うことかでき、陽性反応は、例えばＴ－細胞の増殖又はγ－インターフェロンのようなサイトカインの細胞外相（例えば、培養上清）への放出であってもよい。生体内試験では、上記のように皮膚試験が適している。血清サンプル中の抗体とポリペプチド間の結合の立証は過去又は現在の感染を示すので、対象の血清サンプルを本発明のポリペプチドを接触させることも考えられる。
【０１１０】
したがって、本発明は、動物又はヒトの血液サンプルを提供し、本発明のポリペプチドと動物由来のサンプルを接触させることからなる、動物又はヒトにおける結核菌群に属する細菌との現在又は過去の感作を診断するための生体外の方法にも関する。血液サンプル中の単核細胞による細胞外相への少なくとも１つのサイトカインの顕著な放出は、動物が感作されていることを示す。ここで、サイトカインの放出が、結核でない対象（例えば、ＴＢに対する伝統的な皮膚試験で反応しない対象）由来の血液サンプルからのサイトカインの放出より著しく高いことは、語「顕著な放出」により意味する。通常、顕著な放出は

、このようなサンプルから認められる放出の少なくとも２倍である。

【０１１１】

また、器官を感染する可能性があるサンプルは、本発明のポリペプチドに対して生じる抗体と接触させてもよい。当該分野で周知の方法でサンプルと抗体間の反応を立証することにより、現在の感染が示されるであろう。

【０１１２】

当然、対象由来の血清サンプルを本発明のポリペプチドフラグメントの少なくとも１つと接触させ、抗体及び抗原間の反応を可視化する周知の方法を用いることにより、血清中の抗マイコバクテリア抗体の存在を立証することもできる可能性がある。

【０１１３】

また、動物に本発明の核酸フラグメントを投与するか、又はサンプルを本発明の核酸フラグメントもしくはその相補的な核酸フラグメントとインキュベートし、インキュベーションで生じるハイブリダイズした核酸の存在を検出する（当該分野で周知のハイブリダイゼーションアッセイを用いることによる）ことからなる、動物（ヒトを含む）又はサンプル中のマイコバクテリア核酸の存在の決定方法が、本発明に含まれる。このようなＴＢの診断方法は、上記ヌクレオチド配列の少なくとも一部からなる組成物の使用、及び試験される動物又はヒト由来のサンプルでのヌクレオチド配列（ＰＣＲ技術を用いることにより、核酸フラグメント（又はその相補フラグメント）とハイブリダイズする）の存在の検出を含む。

【０１１４】

開示されるある種の抗原はマイコバクテリア・ボビスＢＣＧに存在しないが、ビルレントマイコバクテリアに存在するという事実は、それらが重要な薬剤の標的となることを示している。抗原は、マイコバクテリア感染を容易にするレセプター分子又は毒素を構成していてもよく、そのような機能が阻害される際にマイコバクテリアの感染性が減じられる。

【０１１５】

本発明の抗原のうちで特に適切な薬剤の標的を決定するために、本発明のポリペプチドの少なくとも１つをエンコードする遺伝子と必要な制御配列が、マイコバクテリア（例えばＢＣＧ）の非ビルレント株に導入され、毒性に決定的なポリペプチドを決定することができる。いったん特定のタンパク質が毒性に決定的である／寄与しているとして同定されると、重要な遺伝子の発現を阻害するか又は重要な遺伝子産物を攻撃するように、抗マイコバクテリア剤を合理的にデザインすることができる。例えば、抗体又はそのフラグメント（例えばＦａｂ及び（Ｆａｂ’）２フラグメント）は、当該分野で公知の方法で重要なポリペプチドに対して調製し、その後、予防又は治療剤として用いることができる。また、小さい分子は、例えば遺伝子の内在性プロモーターを含む組換え発現系を用いて、重要な遺伝子産物の発現を選択的に阻害する能力又は標的の作用を直接阻害する能力についてスクリーニングすることができる。次いで、これらの小分子は、マイコバクテリアの毒性を阻害する治療剤又は予防剤として用いられる。

【０１１６】

また、ビルレントマイコバクテリアを非毒性にする抗マイコバクテリア剤は、発現制御配列に実施可能に連結させ、ビルレントマイコバクテリアを形質転換するのに用いることができる。このような抗マイコバクテリア剤は、マイコバクテリアでの剤の転写又は翻訳により特定のマイコバクテリアの複製を阻害する。このような「新規の非ビルレント」マイコバタテリアは、免疫性が例えばＢＣＧに比較してビルレントマイコバクテリアに非常に似ているので、ワクチン目的用に修飾した上記ＢＣＧの優れた代替物となっている。

【０１１７】

最終的に、イムノアッセイで本発明のポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル又はポリクローナル抗体、又は特異的な抗体結合フラグメントも、本発明の一部である。このようなポリクローナル抗体の産生は、適切な動物がポリペプチドで免疫化されること、その後これらの抗体がイムノアフィニティクロマトグラフィーにより適切に単離される

ことを要する。本発明は、免疫化及び陽性ハイブリドーマのスクリーニングの両方に十分な量の抗原を提供するので、モノクローナルの産生は、当該分野で周知の方法で行うことができる。

【０１１８】

図面の説明

図１：長期記憶免疫マウスは、結核菌感染に対して非常に有効に防護される。マウスを結核菌に付し、異なる時間のポイントで脾臓を単離した。脾臓リンパ球をＳＴ－ＣＦと生体外で刺激し、ＩＦＮ－γの放出を研究した（パネルＡ）。２群のマウスの脾臓中のＣＦＵ含量は、パネルＢに示す。免疫記憶マウスは１週間以内で感染を制御し、ＳＴ－ＣＦ中の抗原に応じて大量のＩＦＮ－γを産生する。

【０１１９】

図２：免疫防護に関与するＴ細胞は、６～１２及び１７～３８ｋＤａの分子に関して優勢である。脾臓のＴ細胞は結核菌に付してから４日後に単離し、ＳＴ－ＣＦの狭い分子質量画分で生体外で刺激した。ＩＦＮ－γの放出を研究した。

【０１２０】

図３：ｃｆｐ７のヌクレオチド配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）。ＣＦＰ７の推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）は、ヌクレオチド配列の下に従来の一文字のコードで示す。下線を付したイタリックで示す仮想のリボソーム結合部位は、－１０～－３５領域と推定される。太線で示したヌクレオチドは、ＣＦＰ７をエンコードするヌクレオチドである。

【０１２１】

図４：ｃｆｐ９のヌクレオチド配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）。ＣＦＰ９の推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）は、ヌクレオチド配列の下に従来の一文字のコードで示す。下線を付したイタリックで示す仮想のリボソーム結合部位シャインダルガノ配列は、－１０～－３５領域と推定される。太線で示したヌクレオチドは、ＣＦＰ９をエンコードするヌクレオチドである。ラムダ２６６ファージから得られるヌクレオチド配列は、二重線を付している。

【０１２２】

図５：ｍｐｔ５１のヌクレオチド配列。ＭＰＴ５１の推定されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列の下に一文字のコードで示す。シグナルは、イタリックで示す。リボソーム結合部位の可能性がある箇所に、下線を付している。ヌクレオチドの違い及びアミノ酸の違いをＭＰＢ５１のヌクレオチド配列と比較して［Ｏｈａｒａら、１９９５］、７８０の位置に下線を付した。イタリッ示したヌクレオチドは、結核菌Ｈ３７Ｒｖに存在しない。

【０１２３】

図６：２ＤＥ系での精製抗原の位置を決定し、参照ゲルにマッピングした。新たに精製した抗原を丸で囲み、周知のタンパク質の位置も示している。

【０１２４】

実施例１：免疫防護に関与する単一培養ろ液抗原の同定

有効に防護されているマウスの群は、８～１２週齢のメスのＣ５７Ｂｌ／６ｊマウスに５ｘ１０$^{4}$結核菌を静脈で感染させて得た。感染から３０日後に、マウスはイソニアジドで処理した抗生物質に６０日間付し、次いで、休眠長期記憶免疫（ｒｅｓｔｉｎｇ　ｌｏｎｇ－ｔｅｒｍ　ｍｅｍｏｒｙ　ｉｍｍｕｎｉｔｙ）を確立するために２００～２４０日間放置した。このような免疫記憶マウスは、二次感染に対して非常に効率良く防護される（図１）。このモデルで長期に続く免疫は、感染部位に補充された高度に反応性のＣＤ４細胞の増殖で媒介され、ＳＴ－ＣＦに応じて大量のＩＦＮ－γの産生を誘導する（図１［Ａｎｄｅｒｓｅｎら、１９９５］。

【０１２５】

我々は、防護Ｔ細胞によって認識される単一抗原の同定にこのモデルを用いた。免疫記憶マウスを１ｘ１０$^{6}$個の結核菌に静脈で再感染させ、再感染から４～６日、つまり、この増殖がＳＴ－ＣＦに高度に反応性な時間で、脾臓のリンパ球を回収した。これらのＴ細

胞で認識される抗原は、多重溶出（ｍｕｌｔｉ－ｅｌｕｔｉｏｎ）技術によりマッピングした［Ａｎｄｅｒｓｅｎ及びＨｅｒｏｎ、１９９３］。この技術は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離した複雑なタンパク質混合物を、生理緩衝液中で狭い画分に分ける。これらの画分は生体外で脾臓リンパ球を刺激するのに用い、ＩＦＮ－γの放出をモニターした（図２）。

【０１２６】

長期記憶免疫マウスは、ＴＢ感染前はこれらの画分を認識しなかったが、免疫防護の回復のあいだに得られる脾臓リンパ球は、ある範囲の培養ろ液抗原を認識し、ＩＦＮ－γの産生ピークが６～１２及び１７～３０ｋＤａの見かけ分子量のタンパク質に応じて見出された（図２）。したがって、これらの領域内の培養ろ液抗原は、免疫防護応答の第一相のあいだにＩＦＮ－γの放出を誘発する記憶エフェクターＴ－細胞で認識される主要な標的であることが結論づけられた。

【０１２７】

<u>実施例２</u>：低質量培養ろ液抗原を発現する遺伝子のクローニング

実施例１で、低分子質量画分中の抗原は、免疫記憶マウスから単離した細胞で強く認識されることが立証された。それ故、これらの抗原に対するモノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、ＲＩＢＩアジュバントで低質量画分と免疫化し（第一及び第二免疫化）、次いで水酸化アルミニウム中の画分で２回注射して得られた。反応性セルラインの融合及びクローニングは、標準的な方法にしたがって行った［Ｋｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎ、１９７５］。ＳＤＳ－ＰＡＧＥでの抗原の移動から分子量を見積もると、この方法により、２つのｍＡｂ：９ｋＤａの培養ろ液抗原（ＣＦＰ９）に対するＳＴ－３及び７ｋＤａの抗原（ＣＦＰ７）に対するＰＶ－２が得られた。

【０１２８】

Ｍａｂ類に結合する抗原を同定するために、以下の実験を行った。

【０１２９】

モノクローナル抗体ＳＴ－３及びＰＶ－２に結合する遺伝子産物を発現するファージについて、Ｒ．Ｙｏｕｎｇ［Ｙｏｕｎｇ，Ｒ．Ａ．ら、１９８５］により構築され、世界保健機構ＩＭＭＴＵＢプログラム（ＷＨＯ．００３２．ｗｉｂｒ）を通して得られる組換えλｇｔ１１結核菌ＤＮＡライブラリーをスクリーニングした。

【０１３０】

約１ｘ１０$^{5}$ｐｆｕの遺伝子ライブラリー（約２５％の組換えファージ含有）は、柔らかい寒天で大腸菌Ｙ１Ｏ９０（ＤｌａｃＵ１６９、ｐｒｏＡ$^{+}$、Ｄｌｏｎ、ａｒａＤ１３９、ｓｕｐＦ、ｔｒｐＣ２２：：ｔｎ１０［ｐＭＣ９］ＡＴＣＣ＃３７１９７）にプレートし、４２℃で２．５時間培養した。

【０１３１】

プレートは、イソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトピラノシドで飽和したニトロセルロース膜で積層（ｏｖｅｒｌａｙ）し、３７℃で２．５時間培養を続けた。ニトロセルロースを除き、最終濃度が０．０５％になるように加えたツイン２０を有するＰＢＳ中のモノクローナル抗体サンプルとインキュベートした。結合モノクローナル抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ－結合ウサギ抗マウス免疫グロブリン（Ｐ２６０、Ｄａｋｏ、Ｇｌｏｓｔｒｕｐ、ＤＫ）及び５，５’，３，３’－テトラメチルベンジジン及び$H_2O_2$を含む染色反応で可視化した。

【０１３２】

陽性プラークを再クローンし、プラーク１つから得たファージを大腸菌Ｙ１０８９（ＤｌａｃＵ１６９、ｐｒｏＡ$^{+}$、Ｄｌｏｎ、ａｒａＤ１３９、ｓｔｒＡ、ｈｆｌ１５０［ｃｈｒ：：ｔｎ１０］［ｐＭＣ９］ＡＴＣ Ｃｎｒ．３７１９６）の溶原化に用いた。得られた溶原株は、ＤＮＡ抽出用ファージ粒子の増殖に用いた。これらの溶原性大腸菌株は、以下のように命名した：ブダペスト条約の規定にしたがって、Ｄｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｕｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ（ＤＳＭ）のコレクションに１９９３年6月２８日に受託番号ＤＳＭ８３７７で寄託されたＡＡ２２６（ＳＴ－３反応性ポリペプチドＣＦＰ９を発現する）、及

びブダペスト条約の規定にしたがって、Ｄｅｕｔｓｃｈｅ　Ｓａｍｍｌｕｎｇ　ｖｏｎ　Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｕｍｅｎ　ｕｎｄ　ＺｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎＧｍｂＨ（ＤＳＭ）のコレクションに１９９３年６月２８日に受託番号ＤＳＭ８３７９で寄託されたＡＡ２４２（ＰＶ－２反応性ポリペプチドＣＦＰ７を発現する）。

【０１３３】

これらの２つの溶原性大腸菌株はＷＯ　９５／０１４４１号に開示され、それによりマイコバクテリアポリペプチド産物が発現される。しかし、これらのポリペプチドのアミノ酸配列又はそれらの遺伝子起源に関する情報がないために、ＡＡ２２６とＡＡ２４２の直接的な発現産物が公衆に利用可能となっているにすぎない。

【０１３４】

ｓｔ－３結合タンパク質は、β－ガラクトシダーゼに融合するタンパク質として発現するが、ｐｖ－２結合タンパク質は非融合型で発現されるようである。

【０１３５】

ＰＶ－２及びＳＴ－３結合タンパク質をエンコードするヌクレオチド配列のシーケンシング

ｐｖ－２結合タンパク質をエンコードする遺伝子のヌクレオチド配列を得るために、ＡＡ２４２の約３ｋｂの結核菌由来のＥｃｏＲＩ－ＥｃｏＲＩフラグメントを、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ＋［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］のＥｃｏＲＩ部位にサブクローンし、大腸菌ＸＬ－１Ｂｌｕｅ［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］の形質転換に用いた。

【０１３６】

同様に、ｓｔ－３結合タンパク質をエンコードする遺伝子のヌクレオチド配列を得るために、ＡＡ２２６の約５ｋｂの結核菌由来のＥｃｏＲＩ－ＥｃｏＲＩフラグメントを、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ＋［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］のＥｃｏＲＩ部位にサブクローンし、大腸菌ＸＬ－１Ｂｌｕｅ［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］の形質転換に用いた。

【０１３７】

両遺伝子の完全なＤＮＡ配列は、シーケナーゼＤＮＡシーケンシングキット１．０バージョン［Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐ．，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，ＯＨ］を用いるスーパーコイルＤＮＡ用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー（ｒｅａｄｅｒ）（モデル３７３Ａ；Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）と組合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンシングにより得た。ＤＮＡ配列は、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１（ＣＦＰ７）及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３（ＣＦＰ９）ならびに図３及び４に示す。ＤＮＡの両鎖をシークエンスした。

【０１３８】

ＣＦＰ７

９６アミノ酸残基の配列をエンコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、９１～９３位置のＡＴＧ開始コドンから伸長する３７９～３８１位置のＴＡＧ停止コドンまで同定した。推定されるアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２（及び従来の一文字アミノ酸コードを用いる図３）に示す。

【０１３９】

ＣＦＰ７は、非融合型として大腸菌で発現されると考えられる。７８～８４位置のヌクレオチド配列はシャインダルガノ配列であると考えられ、４７～５０及び１４～１９位置の配列は、それぞれ－１０及び－３５領域であると推測される。

【０１４０】

ＣＦＰ９

ＳＴ－３で認識されるタンパク質は、ＡＡ２２６ラムダファージから発現する際に、β－ガラクトシダーゼ融合タンパク質として産生した。この融合タンパク質は、約１１６～１１７ｋＤａの大きさ（β－ガラクトシダーゼ１１６．２５ｋＤａに対するＭｗ）を有し、ＣＦＰ９遺伝子のごく一部は、ラムダクローン（ＡＡ２２６）に含まれたことを示唆している。

【０１４１】
ラムダファージＡＡ２２６からの挿入で得られるヌクレオチド配列９０ｂｐに基づいて、結核菌ゲノムのヌクレオチド配列とのホモロジー検索をサンガーデータベース（Ｓａｎｇｅｒ Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｓｏｓｉｓ ｄａｔａｂａｓｅ）；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｐａｔｈｏｇｅｎｓ／ＴＢ－ｂｌａｓｔ－ｓｅｒｖｅｒ．ｈｔｍｌ；Ｗｉｌｌｉａｍｓ、１９９６で行った。クローンされた配列との１００％の同一性は、ＭＴＣＹ４８コスミドで見出された。１０９アミノ酸残基の配列をエンコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）は、１４１～１４３１位置のＧＴＧ開始コドンから伸長する４６５～４６７位置のＴＡＧ停止コドンまで同定した。推定されるアミノ酸配列は、従来の一文字コードを用いて図４に示す。

【０１４２】
１２３～１３０位置のヌクレオチド配列はシャインダルガノ配列であると推測され、７３～７８及び４～９位置の配列は、それぞれ－１０及び－３５領域であると推測される（図４）。ＡＡ２２９の配列の５’末端と重複するＯＲＦは、二重線で図４に示す。

【０１４３】
発現ベクターでのＣＦＰ７及びＣＦＰ９のサブクローニング

ＣＦＰ７及びＣＦＰ９をエンコードする２つのＯＲＦは、それぞれｐＭＳＴ２４［Ｔｈｅｉｓｅｎら、１９９５］にＰＣＲクローンして発現ベクターｐＲＶＮ０１、又はｐＱＥ－３２［ＱＩＡＧＥＮ］にクローンして発現ベクターｐＲＶＮ０２とした。

【０１４４】
ＰＣＲ増幅は、マスターミックス（各オリゴヌクレオチドプライマー０．５μＭ、ＢＳＡ［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］０．２５μＭ、低塩緩衝液（ｐＨ８．８、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ２０ｍＭ、ＫＣｌ １０ｍＭ、$(NH_4)_2SO_4$ １０ｍＭ、$MgSO_4$ ２ｍＭ及びＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００ ０．１％）［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］、各デオキシヌクレオシド三リン酸０．２５ｍＭ及びＴａｑ Ｐｌｕｓ Ｌｏｎｇ ＤＮＡポリメラーゼ０．５Ｕ［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］）とプラスミドＤＮＡ １０ｎｇを混合して温度反応器（Ｒａｐｉｄ ｃｙｃｌｅｒ，Ｉｄａｈｏ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｄａｈｏ）で行った。最終容量は、１０μｌとした（示した全濃度は、最終容量での濃度である）。予備変性は、３０秒９４℃で行った。後の３０サイクルは、３０秒９４℃での変性、３０秒５５℃でのアニーリング、及び１分７２℃での伸長で行った。

【０１４５】
オリゴヌクレオチドプライマーは、ＤＮＡシンセサイザー［Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｒｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，Ｃａ，ＡＢＩ－３９１，ＰＣＲ様式］で自動合成し、脱遮断（ｄｅｂｌｏｃｋ）し、エタノール沈殿で精製した。

【０１４６】
ｃｆｐ７オリゴヌクレオチド（表１）は、ＣＦＰ７配列のヌクレオチド配列（図３）をベースにして合成した。オリゴヌクレオチドは、直接的なサブクローニング用に５’末端のＳｍａＩ制限酵素部位及び３’末端のＢａｍＨＩ制限酵素部位を含むように設計した。ｃｆｐ９オリゴヌクレオチド（表１）は、部分的にＡＡ２２９クローンの配列のヌクレオチド配列をベースにし、部分的にサンガーデータベースのコスミドＭＴＣＹ４８に見出されたのと同一の配列（図４）から合成した。オリゴヌタレオチドは、直接的なサブクローニング用に５’末端のＳｍａＩ制限酵素部位及び３’末端のＨｉｎｄＩＩＩ制限酵素部位を含むように設計した。

【０１４７】
ＣＦＰ７

コード領域のみが発現されるように、ＳｍａＩ部位が、ＰＣＲを用いてｃｆｐ７遺伝子をエンコードする２９１ｂｐのＯＲＦの最初のコドンの５’に隣接して設計され、ＢａｍＨＩ部位が３’末端の停止コドンの直後に挿入された。２９１ｂｐのＰＣＲフラグメントはＳｍａＩとＢａｍＨＩで切断し、アガロースゲルから精製し、ｐＭＳＴ２４発現ベクタ

ーのＳｍａＩ－ＢａｍＨＩ部位にサブクローンした。融合遺伝子を含むベクターＤＮＡは、大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅの形質転換に用いた（ｐＲＶＮ０１）。

【０１４８】

ＣＦＰ９

コード領域のみが発現されるように、ＳｍａＩ部位が、ＰＣＲを用いてｃｆｐ９遺伝子をエンコードする３２７ｂｐのＯＲＦの最初のコドンの５’に隣接して設計され、ＨｉｎｄＩＩＩ部位が３’末端の停止コドンの直後に挿入された。３２７ｂｐのＰＣＲフラグメントはＳｍａＩとＨｉｎｄＩＩＩで切断し、アガロースゲルから精製し、ｐＱＥ－３２発現ベクター［ＱＵＩＡＧＥＮ］のＳｍａＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ部位にサブクローンした。融合遺伝子を含むベクターＤＮＡは、大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅの形質転換に用いた（ｐＲＶＮ０２）。

【０１４９】

組換えＣＦＰ７とＣＦＰ９の精製

ＯＲＦは、（Ｈｉｓ）$_{6}$－ｔａｇのＮ－末端に融合させた［ＥＰ－Ａ－０　２８２　２４２号参照］。組換え抗原は、以下のようにして調製した。要約すれば、ｐＲＶＮ０１又はｐＲＶＮ０２プラスミドのいずれかを有する大腸菌のコロニー１つを、アンピシリン１００μｇ／ｍｌ及びテトラサイクリン１２．５μｇ／ｍｌを含むルリアーベルタニ培地に接種し、ＯＤ$_{600nm}$が０．５になるまで３７℃で成長させた。次いで、最終濃度が２ｍＭになるようにＩＰＴＧ（イソプロピルβ－Ｄ－チオガラクトシド）を加え（発現が、強力なＩＰＴＧ誘発性Ｐ$_{tac}$又はＴ５プロモーターのいずれかで調節される）、さらに２時間成長させた。細胞は、８分４℃で４，２００ｘｇの遠心分離で回収した。ペレット化した細菌は、－２０℃で一晩保存した。ペレットは、ＢＣ４０／１００緩衝液（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　ｐＨ７．９　２０ｍＭ、２０％グリセロール、ＫＣｌ　１００ｍＭ、イミダゾール４０ｍＭ）に再懸濁し、４℃での超音波処理（３０秒間隔、３０秒間５回）、その後の４℃で３０分の１２，０００ｘｇの遠心分離で細胞を破壊し、上清（粗抽出物）を組換え抗原の精製に用いた。

【０１５０】

２つのヒスチジン融合タンパク質（Ｈｉｓ－ｒＣＦＰ７及びＨｉｓ－ｒＣＦＰ９）は、１００ｍｌ容量のＮｉ$^{2+}$－ＮＴＡカラム［ＱＵＩＡＧＥＮ］でのアフィニティクロマトグラフィーで粗抽出物から精製した。Ｈｉｓ－ｒＣＦＰ７及びＨｉｓ－ｒＣＦＰ９は、Ｎｉ$^{2+}$に結合する。ＢＣ４０／１００緩衝液でカラムを大量に洗浄した後、イミダゾール１００ｍＭ、Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．９２０ｍＭ、２０％グリセロール及びＫＣｌ　１Ｍを含むＢＣ　１０００／１００緩衝液を用いて融合タンパク質を溶出した。次いで、精製した生成物を、ＴｒｉｓｐＨ８．０　１０ｍＭに大量に透析した。次いで、Ｈｉｓ－ｒＣＦＰ７及びＨｉｓ－ｒＣＦＰ９は、０～１ＭのＮａＣｌの直鎖状勾配でＴｒｉｓ　ｐＨ８．０　１０ｍＭのアニオン交換カラム（Ｍｏｎｏ　Ｑ、Ｐｈａｒｍａｃｉａ、スウェーデン）によりタンパク質高速液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）で不純物から分離した。画分のアリコートは、１０～２０％勾配のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）で分析した。精製したＨｉｓ－ｒＣＦＰ７又はＨｉｓ－ｒＣＦＰ９のいずれかを含む画分をプールした。

【０１５１】

【表３】

表１.オリゴヌクレオチド[a] *cfp7* と *cfp9* の配列

| 方向及び オリゴヌクレオチド | 配列 (5' → 3') | 位置[b] (ヌクレオチド) |
|---|---|---|
| センス | | |
| pvR3 | GCAACACCCGGGATGTCGCAAATCATG (SEQ ID NO: 43) | 91-105 (SEQ ID NO: 1) |
| stR2 | GTAACACCCGGGGTGGCCGCCGACCCG (SEQ ID NO: 44) | 141-155 (SEQ ID NO: 3) |
| アンチセンス | | |
| pvF4 | CTACTAAGCTTGGATCCCTAGCCGCCCCATTTGGCGG (SEQ ID NO: 45) | 381-362 (SEQ ID NO: 1) |
| stF2 | CTACTAAGCTTCCATGGTCAGGTCTTTTCGATGCTTAC (SEQ ID NO: 46) | 467 - 447 (SEQ ID NO: 3) |

[a]　ｃｆｐ７オリゴヌクレオチドは、図３に示すヌクレオチド配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）に基づく。ｃｆｐ９オリゴヌクレオチドは、図４に示すヌクレオチド配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）に基づく。

【０１５２】

下線を付したヌクレオチドは、ｃｆｐ７及びｃｆｐ９のヌクレオチド配列に含まれない。

【０１５３】

[b]　示している位置は、プライマーの下線を付していない部分であって、図３及び図４それぞれに示すヌクレオチド配列に対応する。

【０１５４】

実施例２Ａ：ＢＣＧ株で発現されない抗原の同定

ＴＢの治療を制御するために、弱毒化細菌カルメットーゲラン（ＢＣＧ）を生の弱毒化ワクチンとして用いた。ＢＣＧは、ビルレントマイコバクテリア・ボビスの弱毒化誘導体である。パスツール研究所（フランス、パリ）由来のオリジナルのＢＣＧは、１９０８〜１９２１年に液体培地で２３１回継代してつくられたものであり、動物に毒性を復帰しないことが示されている。ＢＣＧでの弱毒化変異は、容易に復帰しない安定な欠失及び／又は多重変異であることを示している。

【０１５５】

ＢＣＧ及び結核菌及びマイコバクテリア・ボビスの生理的な差異が認められているが、オリジナルのＢＣＧ株の一連の継代のあいだに生じる弱毒化変異は、最近まで知られていなかった。記載されている最初の変異は、幾つかのＢＣＧ株でＭＰＢ６４をエンコードする遺伝子［Ｌｉら、１９９３、ＯｅｔｔｉｎｇｅｒとＡｎｄｅｒｓｅｎ、１９９４］及び試験される全てのＢＣＧ株でＥＳＡＴ－６をエンコードする遺伝子［Ｈａｒｂｏｅら、１９９６］を欠落しており、その後、ＢＣＧでの３つの大きな欠失が同定されている［Ｍａｈａｉｒａｓら、１９９６］。ＲＤ１と命名される領域は、ＥＳＡＴ－６をエンコードする遺伝子及びＭＰＴ６４をエンコードする他の遺伝子（ＲＤ２）を含む。抗原は、ともに診断剤の可能性があることを示しており、ＥＳＡＴ－６は、ワクチンの代替物としての特性を有することが分かっている［ＰＣＴ／ＤＫ／００２７３号及びＰＣＴ／ＤＫ／００２７０号参照］。結核菌に特異的な新規の診断用抗原ならびにＴＢに対する新規のワクチン用抗原を見出すために、結核菌Ｈ３７ＲｖのＲＤ１領域（１７．４９９ｂｐ）を、オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）について分析した。ＢｏｒｏｄｏｖｓｋｙとＭｃＩｎｉｎｃｈ（１９９３）により記載されているアルゴリズムを用いて、最小で９６ｂｐの長さのＯＲＦが推測された。推測された全体で２７個のＯＲＦにおいて、これらの２０個は、全ての公知のＢＣＧ株から欠失されているので、診断剤としての可能性及び／又はワクチンとしての可能性がある。推測されるＯＲＦは、アルゴリズムの能力についての正の対照として、あらかじめ記載［Ｓｏｒｅｎｓｅｎら、１９９５］されているＥＳＡＴ－６（

ＲＤ１－ＯＲＦ７）及びＣＦＰ１０（ＲＤ１－ＯＲＦ６）を含む。ここでは、推測される７つの抗原のＴＢ診断に対する可能性ならびにＴＢに対する新規のワクチン代替物としての可能性を記載する。

【０１５６】

診断剤及びワクチンとしての可能性がある１７，４９９ｋｂのＲＤ１領域由来のオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）７つを同定し、クローンした。

【０１５７】

ＯＲＦのｒｄ１－ｏｒｆ２、ｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｆ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂの同定

結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のｒｄ１－ｏｒｆ２のヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１に記載する。ＲＤ１－ＯＲＦ２の推定されるアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７２に記載する。

【０１５８】

結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のｒｄ１－ｏｒｆ３のヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８７に記載する。ＲＤ１ＯＲＦ２の推定されるアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８８に記載する。

【０１５９】

結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のｒｄ１－ｏｒｆ４のヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８９に記載する。ＲＤ１－ＯＲＦ２の推定されるアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９０に記載する。

【０１６０】

結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のｒｄ１－ｏｒｆ５のヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１に記載する。ＲＤ１－ＯＲＦ２の推定されるアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９２に記載する。

【０１６１】

結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のｒｄ１－ｏｒｆ８のヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６７に記載する。ＲＤ１－ＯＲＦ２の推定されるアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６８に記載する。

【０１６２】

結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のｒｄ１－ｏｒｆ９ａのヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９３に記載する。ＲＤ１－ＯＲＦ２の推定されるアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９４に記載する。

【０１６３】

結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のｒｄ１－ｏｒｆ９ｂのヌクレオチド配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６９に記載する。ＲＤ１－ＯＲＦ２の推定されるアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７０に記載する。

【０１６４】

ＤＮＡ配列ｒｄ１－ｏｒｆ２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１）は、８８９～８９１位置のＡＴＧコドンで開始し、２６６２～２６６４の位置（位置の数は、ＲＤ１での位置を参照）の終始コドン（ＴＡＡ）で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７２）は、分子量６４，５２５に相当する５９１残基を含む。

【０１６５】

ＤＮＡ配列ｒｄ１－ｏｒｆ３（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８７）は、２８０７～２８０９位置のＡＴＧコドンで開始し、３１０１～３１０３位置（位置の数は、ＲＤ１での位置を参照）の終始コドン（ＴＡＡ）で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８８）は、分子量９，７９９に相当する９８残基を含む。

【０１６６】

ＤＮＡ配列ｒｄ１－ｏｒｆ４（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８９）は、４０１４～４０１２位

置のＧＴＧコドンで開始し、３５９７～３５９５位置（位置の数は、ＲＤ１での位置を参照）の終始コドン（ＴＡＧ）で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９０）は、分子量１４，２１０に相当する１３９残基を含む。

【０１６７】

ＤＮＡ配列ｒｄ１－ｏｒｆ５（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９１）は、３１２８～３１３０位置のＧＴＧコドンで開始し、４２４１～４２４３位置（位置の数は、ＲＤ１での位置を参照）の終始コドン（ＴＧＡ）で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９２）は、分子量３７，６４７に相当する３７１残基を含む。

【０１６８】

ＤＮＡ配列ｒｄ１－ｏｒｆ８（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６７）は、５５０２～５５００位置のＧＴＧコドンで開始し、５０８４～５０８２位置（位置の数は、ＲＤ１での位置を参照）の終始コドン（ＴＡＧ）で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６８）は、分子量１１，７３７に相当する１３９残基を含む。

【０１６９】

ＤＮＡ配列ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９３）は、６１４６～６１４８位置のＧＴＧコドンで開始し、７０７０～７０７２位置（位置の数は、ＲＤ１での位置を参照）の終始コドン（ＴＡＡ）で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９４）は、分子量３３，４５３に相当する３０８残基を含む。

【０１７０】

ＤＮＡ配列ｒｄ１－ｏｒｆ９ｂ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６９）は、５０７２～５０７４位置のＡＴＧコドンで開始し、７０７０～７０７２位置（位置の数は、ＲＤ１での位置を参照）の終始コドン（ＴＡＡ）で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７０）は、分子量７０，６５０に相当する６６６残基を含む。

【０１７１】

ＯＲＦのｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂのクローニング

ＯＲＦのｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂは、発現ベクターｐＭＳＴ２４［Ｔｈｅｉｓｅｎら、１９９５］（ｒｄ１－ｏｒｆ３）又はｐＱＥ３２［ＱＩＡＧＥＮ］（ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂ）にＰＣＲクローンした。オリゴヌクレオチドの製造とｒｄ１－ｏｒｆエンコード遺伝子のＰＣＲ増幅は、実施例２に記載のようにして行った。結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来の染色体ＤＮＡは、ＰＣＲ反応で鋳型として用いた。オリゴヌクレオチドは、ＲＤ１領域のヌクレオチド配列（受託番号Ｕ３４８４８）に基づいて合成した。オリゴヌクレオチドプライマーは、５’末端及び３’末端に制限酵素部位を含むように設計し、それによって後のサブクローニングを可能にした。プライマーを表２に示す。

【０１７２】

ｒｄ１－ｏｒｆ２。ＢａｍＨＩ部位はｒｄ１－ｏｒｆ２の最初のコドンの５’に隣接して設計し、ＨｉｎｄＩＩＩ部位は、３’末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子ｒｄ１－ｏｒｆ２はｐＱＥ３２にサブクローンし、ｐＴＯ９６とした。

【０１７３】

ｒｄ１－ｏｒｆ３。ＳｍａＩ部位はｒｄ１－ｏｒｆ３の最初のコドンの５’に隣接して設計し、ＮｃｏＩ部位は、３’末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子ｒｄ１－ｏｒｆ３はｐＭＳＴ２４にサブクローンし、ｐＴＯ８７とした。

【０１７４】
ｒｄ１－ｏｒｆ４。ＢａｍＨＩ部位はｒｄ１－ｏｒｆ４の最初のコドンの５’に隣接して設計し、ＨｉｎｄＩＩＩ部位は、３’末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子ｒｄ１－ｏｒｆ４はｐＱＥ３２にサブクローンし、ｐＴＯ８９とした。
【０１７５】
ｒｄ１－ｏｒｆ５。ＢａｍＨＩ部位はｒｄ１－ｏｒｆ５の最初のコドンの５’に隣接して設計し、ＨｉｎｄＩＩＩ部位は、３’末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子ｒｄ１－ｏｒｆ５はｐＱＥ３２にサブクローンし、ｐＴＯ８８とした。
【０１７６】
ｒｄ１－ｏｒｆ８。ＢａｍＨＩ部位はｒｄ１－ｏｒｆ８の最初のコドンの５’に隣接して設計し、ＮｃｏＩ部位は、３’末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子ｒｄ１－ｏｒｆ８はｐＭＳＴ２４にサブクローンし、ｐＴＯ９８とした。
【０１７７】
ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ。ＢａｍＨＩ部位はｒｄ１－ｏｒ９ａの最初のコドンの５’に隣接して設計し、ＨｉｎｄＩＩＩ部位は、３’末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子ｒｄ１－ｏｒｆ９ａはｐＱＥ３２にサブクローンし、ｐＴＯ９１とした。
【０１７８】
ｒｄ１－ｏｒｆ９ｂ。ＳｃａＩ部位はｒｄ１－ｏｒｆ９ｂの最初のコドンの５’に隣接して設計し、ＨｉｎｄＩＩＩ部位は、３’末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子ｒｄ１－ｏｒｆ９ｂはｐＱＥ３２にサブクローンし、ｐＴＯ９０とした。
【０１７９】
ＰＣＲフラグメントは適切な制限酵素で消化し、アガロースゲルから精製し、ｐＭＳＴ２４又はｐＱＥ３２のいずれかにクローンした。７つの構築物を用いて、大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅを形質転換した。融合遺伝子のエンドポイントは、ジデオキシ鎖末端法で決定した。ＤＮＡの両鎖をシークエンスした。
【０１８０】
組換えＲＤ１－ＯＲＦ２、ＲＤ１－ＯＲＦ３、ＲＤ１－ＯＲＦ４、ＲＤ１－ＯＲＦ５、ＲＤ１－ＯＲＦ８、ＲＤ１－ＯＲＦ９ａ及びＲＤ１－ＯＲＦ９ｂの精製
ｒＲＤ１－ＯＲＦは、（Ｈｉｓ）$_6$－ｔａｇのＮ－末端に融合させた。組換え抗原は、接種用にｐＴＯ８７、ｐＴＯ８８、ｐＴＯ８９、ｐＴＯ９０、ｐＴＯ９１、ｐＴＯ９６又はｐＴＯ９８のいずれかを有する大腸菌のコロニー１つを用いて実施例２に記載（例外として、ｐＴＯ９０は３７℃でなく３０℃で発現させた）のようにして調製した。Ｎｉ$^{2+}$アフィニティクロマトグラフィーによる組換え抗原の精製も、実施例２に記載のようにして行った。精製したＨｉｓ－ｒＲＤ１－ＯＲＦ２、Ｈｉｓ－ｒＲＤ１－ＯＲＦ３、Ｈｉｓ－ｒＲＤ１－ＯＲＦ４、Ｈｉｓ－ｒＲＤ１－ＯＲＦ５、Ｈｉｓ－ｒＲＤ１－０ＲＦ８、Ｈｉｓ－ｒＲＤ１－０ＲＦ９ａ又はＨｉｓ－ｒＲＤ１－ＯＲＦ９ｂを含む画分をプールした。Ｈｉｓ－ｒＲＤ１－ＯＲＦは、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、ユレア３Ｍに大量に透析し、次いで、タンパク質高速液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）［Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｕｐｐｓａｌａ，スウェーデン］を用いてアニオン交換カラム（Ｍｏｎｏ　Ｑ）でさらに精製工程を行った。精製は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ（ｐＨ８．５）、ユレア３Ｍ中で行い、０～１ＭのＮａＣｌの直鎖状勾配でタンパク質を溶出した。Ｈｉｓ－ｒＲＤ１－ＯＲＦを含有する画分をプールし、次いで、使用前に２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ８．０）に大量に透析した。
【０１８１】

【表４】

表２．*rd1-orf*オリゴヌクレオチド[a]の配列

| 方向及び オリゴヌクレオチド | 配列 (5'→ 3') | 位置 (nt) |
|---|---|---|
| センス | | |
| RD1-ORF2f | CTGGGGATCCGCATGACTGCTGAACCG | 886 - 903 |
| RD1-ORF3f | CTTCCCGGGATGGAAAAAATGTCAC | 2807 - 2822 |
| RD1-ORF4f | GTAGGATCCTAGGAGACATCAGCGGC | 4028 - 4015 |
| RD1-ORF5f | CTGGGGATCCGCGTGATCACCATGCTGTGG | 3028 - 3045 |
| RD1-ORF8f | CTCGGATCCTGTGGGTGCAGGTCCGGCGATGGGC | 5502 - 5479 |
| RD1-ORF9af | GTGATGTGAGCTCAGGTGAAGAAGGTGAAG | 6144 - 6160 |
| RD1-ORF9bf | GTGATGTGAGCTCCTATGGCGGCCGACTACGAC | 5072 - 5089 |
| アンチセンス | | |
| RD1-ORF2r | TGCAAGCTTTTAACCGGCGCTTGGGGGTGC | 2664 - 2644 |
| RD1-ORF3r | GATGCCATGGTTAGGCGAAGACGCCGGC | 3103 - 3086 |
| RD1-ORF4r | CGATCTAAGCTTGGCAATGGAGGTCTA | 3582 - 3597 |
| RD1-ORF5r | TGCAAGCTTTCACCAGTCGTCCTCTTCGTC | 4243 - 4223 |
| RD1-ORF8r | CTCCCATGGCTACGACAAGCTCTTCCGGCCGC | 5083 - 5105 |
| RD1-ORF9a/br | CGATCTAAGCTTTCAACGACGTCCAGCC | 7073 - 7056 |

[a] オリゴヌクレオチドは、受託番号Ｕ３４４８４のヌクレオチド配列から構築した［Ｍａｈａｉｒａｓら、１９９６］。下線を付したヌクレオチド（ｎｔ）は、ＲＤ１－ＯＲＦのヌクレオチド配列に含まれない。位置は、受託番号Ｕ３４４８４のヌクレオチド配列に対応する。

【０１８２】

結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のヌクレオチド配列ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂは、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１、８７、８９、９１、６７、９３及び６９に記載する。推定されるｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂのアミノ酸配列は、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７２、８８、９０、９２、６８、９４及び７０に記載する。

【０１８３】

実施例３：ＳＴ－ＣＦ由来の１７～３０ｋＤａの抗原を発現する遺伝子のクローニングＣＦＰ１７、ＣＦＰ２０、ＣＰ２１、ＣＦＰ２２、ＣＦＰ２５及びＣＦＰ２８の単離

ＳＴ－ＣＦは、８０％飽和硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後、ユレア８Ｍで洗浄した。ＣＨＡＰＳとグリセロールは、それぞれ最終濃度が０．５％（ｗ／ｖ）及び５％（ｖ／ｖ）になるまで加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞（Ｒｏｔｏｆｏｒ　ｉｓｏｅｌｅｃｔｒｉｃａｌ　Ｃｅｌｌ）［Ｂｉｏｒａｄ］に塗布した。ロトフォル細胞は、０．５％（ｗ／ｖ）ＣＨＡＰＳ、５％（ｖ／ｖ）グリセロール、３％（ｖ／ｖ）バイオリット（Ｂｉｏｌｙｔ）３／５及び１％（ｖ／ｖ）バイオリット４／６［Ｂｉｏｒａｄ］を含むユレア８Ｍ緩衝液で平衡化した。等電点フォーカスは、３～６のｐＨ勾配で行った。画分は、銀染色した１０～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析した。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、１～３ｍｌの最終容量になるように３ｋＤａのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ（Ｃｅｎｔｒｉｐｒｅｐ）濃縮器［Ａｍｉｃｏｎ］でＰＢＳを用いて３回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のＳＤＳを加え、タンパク質溶液を５分煮沸した後、電気勾配下の１６％ポリアクリルアミドのマトリクスでプレップ細胞（Ｐｒｅｐ　Ｃｅｌｌ）［Ｂｉｏｒａｄ］でさらに分離した。１７～３０ｋＤａの分子質量を有する純粋なタンパク質を含有する画分を回収した。

【０１８４】
ＣＦＰ２９の単離
ＣＦＰ２９と反応する抗－ＣＦＰ２９は、２週間の間隔でＲＩＢＩアジュバント（第一及び第二回目の免疫化）又は水酸化アルミニウム（第三回目の免疫化及び追加免疫化（ｂｏｏｓｔｉｎｇ））中の破砕したゲル片で、ＢＡＬＢ／ｃマウスを免疫化して生じた。２～５μｇのＣＦＰ２９を含むＳＤＳ－ＰＡＧＥのゲル片は、免疫化にそれぞれ用いた。マウスは、脾臓を除く前に３日間、抗原で追加免疫化した。ＣＦＰ２９に対する抗体を産生するモノクローナルセルラインの発生は、本質的にＫｏｈｌｅｒとＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５）により記載されているようにして得られた。
【０１８５】
成長しているクローン由来の上清のスクリーニングは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離したＳＴ－ＣＦを含むニトロセルロースのストリップをイムノブロットして行った。各ストリップは、ＳＴ－ＣＦを約５０μｇ含んだ。抗ＣＦＰ２９の抗体のクラスは、製造者の指示にしたがったマウスモノクローナル抗体イソタイピングキットＲＰＮ２９［Ａｍｅｒｓｈａｍ］によりＩｇＭとして同定した。
【０１８６】
ＣＦＰ２９は、以下の方法で精製した：ＳＴ－ＣＦは限外ろ過で１０倍に濃縮し、４５～５５％の飽和範囲で硫酸アンモニウム沈殿を行った。ペレットは、５０ｍＭリン酸ナトリウム、１．５Ｍ硫酸アンモニウム（ｐＨ８．５）に再溶解し、Ａｆｆｉ－Ｔゲルカラム［Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃ］でチオフィル（ｔｈｉｏｐｈｉｌｉｃ）吸着クロマトグラフィー［Ｐｏｒａｔｈら、１９８５］に付した。タンパク質は１．５Ｍ～０Ｍの硫酸アンモニウムの直鎖状勾配で溶出し、０．４４～０．３１Ｍの範囲の硫酸アンモニウムで回収した画分を、ｍＡｂ抗－ＣＦＰ２９を用いるウェスタンブロット実験でＣＦＰ２９含有画分として同定した。これらの画分をプールし、ＦＰＬＣシステム［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］に接続したＭｏｎｏ　Ｑ　ＨＲ　５／５カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）で平衡化し、０～５００ｍＭ　ＮａＣｌの線状勾配で溶出を行った。４００～５００ｍＭの塩化ナトリウムから、かなり純粋なＣＦＰ２９が溶出された。最終精製工程として、ＣＦＰ２９を含むＭｏｎｏ　Ｑ画分を１２．５％のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルにローディングし、多重溶出技術［Ａｎｄｅｒｓｅｎ及びＨｅｒｏｎ、１９９３］
により純粋なＣＦＰ２９を得た。
【０１８７】
Ｎ－末端のシーケンシング及びアミノ酸解析
ＣＦＰ１７、ＣＦＰ２０、ＣＦＰ２１、ＣＦＰ２２、ＣＦＰ２５及びＣＦＰ２８は、１０ｋＤａのカットオフを有するセントリコン（Ｃｅｎｔｒｉｃｏｎ）濃縮機［Ａｍｉｃｏｎ］で水と洗浄し、次いで、プロスピン（ＰｒｏＳｐｉｎ）濃縮機［Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］にアプライしてタンパク質をＰＶＤＦ膜に回収した。膜は、プロサイス（Ｐｒｏｃｉｓｅ）シークエンサー［Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］でシークエンスする前に、メタノール２０％で５回洗浄した。
【０１８８】
ＣＦＰ２９含有画分は、トリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥ後にＰＶＤＦ膜にブロットした［Ｐｌｏｕｇら、１９８９］。関連するバンドを切りだし、プロサイスシークエンサー［Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］でアミノ酸解析［Ｂａｒｋｈｏｌｔ及びＪｅｎｓｅｎ、１９８９］及びＮ－末端配列解析に付した。
【０１８９】
以下のＮ－末端配列が得られた：
【０１９０】

【表５】

CFP17について: A/S E L D A P A Q A G T E X A V (SEQ ID NO: 17)
CFP20について: A Q I T L R G N A I N T V G E (SEQ ID NO: 18)
CFP21について: D P X S D I A V V F A R G T H (SEQ ID NO: 19)
CFP22について: T N S P L A T A T A T L H T N (SEQ ID NO: 20)
CFP25について: A X P D A E V V F A R G R F E (SEQ ID NO: 21)
CFP28について: X I/V Q K S L E L I V/T V/F T A D/Q E (SEQ ID NO: 22)
CFP29について: M N N L Y R D L A P V T E A A W A E I (SEQ ID NO: 23)

「Ｘ」は、用いたシークエンス法により決定できないアミノ酸を示すが、２つのアミノ酸間の「／」は、２つのアミノ酸のどちらが実際存在するものか、シークエンス法で決定できないことを示す。

【０１９１】

ＣＦＰ２９をエンコードする遺伝子のクローニング

ＣＦＰ２９のＮ－末端配列は、シークエンス解析ソフトウェアパッケージ［Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ］のＴＦＡＳＴＡプログラムを用いてＥＭＢＬデータベースでのホモロジー検索に用いた。検索により、ＣＦＰ２９の１９個のＮ－末端アミノ酸と７４％の同一性を有するブレビバクテリウム・リネンス（Ｂｒｅｖｉｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｌｉｎｅｎｓ）由来のタンパク質、リノシン（Ｌｉｎｏｃｉｎ）Ｍ１８が同定された。

【０１９２】

ＣＦＰ２９のＮ－末端配列とブレビバクテリウム・リネンス由来のリノシンＭ１８タンパク質とのこの同一性に基づいて、ＣＦＰ２９をエンコードする結核菌遺伝子のＰＣＲクローニング用に一連の変性プライマーを構築した。ＰＣＲ反応物は、１０μｌの反応容量に４つの各ヌクレオチド２５０μＭ［Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ］、ＢＳＡ ０．５ｍｇ／ｍｌ［ＩｇＧ ｔｅｃｈｎｌｏｇｙ］、１％ ＤＭＳＯ［Ｍｅｒｃｋ］、各プライマー５ｐｍｏｌ及びＴａｑ＋ＤＮＡポリメラーゼ０．５ユニット［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］を加えた１ｘ低塩Ｔａｑ＋緩衝液［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］に結核菌の染色体ＤＮＡ １０ｎｇを含むものであった。反応は、最初に２５秒間９４℃に加熱し、サーモサイクラー装置［Ｉｄａｈｏ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ］を用いて１５秒間９４℃、１５秒間５５℃及び９０秒間７２℃のプログラムを３０サイクル行った。

【０１９３】

約３００ｂｐのフラグメントが、配列

【０１９４】

【表６】

1: 5'-CCCGGCTCGAGAACCTSTACCGCGACCTSGCSCC (SEQ ID NO: 24)
2: 5'-GGGCCGGATCCGASGCSGCGTCCTTSACSGGYTGCCA (SEQ ID NO: 25)
-ここで S = G/C 及び Y = T/C

を有するプライマーを用いて得られた：

フラグメントを１％アガロースゲルから切りだし、スピン－Ｘ スピン（Ｓｐｉｎ－Ｘ ｓｐｉｎｎ）カラム［Ｃｏｓｔａｒ］で精製し、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ ＩＩ＋Ｔ－ベクター［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］にクローンし、最後にシーケナーゼキット［Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ］でシークエンスした。

【０１９５】

この配列の最初の１５０ｂｐは、サンガーの結核菌データベース：（ｈｔｔｐ／／ｗｗｗ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｐｒｏｊｅｃｔｓ／Ｍ－ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ／ｂｌａｓｔ＿ｓｅｒｖｅｒ）のブラスト（Ｂｌａｓｔ）プログラムを用いてホモロジー検索に用いた。

【０１９６】

このプログラムにより、データベースのコスミドｃｙ４４４上の結核菌配列が、ＣＦＰ２９タンパク質の配列１５０ｂｐにほぼ１００％同一であることが同定された。この配列は、５’末端が、精製したＣＦＰ２９タンパク質のＮ－末端シークエンスされた１９アミノ酸に１００％同一な配列に翻訳するオープンリーディングフレーム７９５ｂｐ内に含まれている。

【０１９７】

最後に、７９５ｂｐのオープンリーディングフレームは、プライマー：

【０１９８】

【表７】

| | | |
|---|---|---|
| 3: | 5'-GGAAGCCCCATATGAACAATCTCTACCG | (SEQ ID NO: 26) |
| 4: | 5'-CGCGCTCAGCCCTTAGTGACTGAGCGCGACCG | (SEQ ID NO: 27) |

を用いて上記と同じＰＣＲ条件下でＰＣＲクローンした。

【０１９９】

得られたＤＮＡフラグメントは、上記のようにしてアガロースゲルから精製し、以下のプライマー：

【０２００】

【表８】

| | | |
|---|---|---|
| 5: | 5'-GGACGTTCAAGCGACACATCGCCG-3' | (SEQ ID NO: 115) |
| 6: | 5'-CAGCACGAACGCGCCGTCGATGGC-3' | (SEQ ID NO: 116) |

に加えてプライマー３及び４を用いてシークエンスした。

【０２０１】

３つの独立したクローンをシークエンスした。３つのクローンは全て、コスミドｃｙ４４４上の配列と１００％一致した。

【０２０２】

全ての他のＤＮＡ操作は、Ｍａｎｉａｔｉｓら（１９８９）にしたがって行った。

【０２０３】

Ｔａｑポリメラーゼ以外の全ての酵素は、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓのものであった。

【０２０４】

サンガーデータベースでのホモロジー検索

ＣＦＰ１７、ＣＦＰ２０、ＣＦＰ２１、ＣＦＰ２２、ＣＦＰ２５及びＣＦＰ２８について、各タンパク質のＮ－末端アミノ酸配列は、サンガーの結核菌のデータベース：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｐａｔｈｏｇｅｎｓ／ＴＢ－ｂｌａｓｔ－ｓｅｒｖｅｒ．ｈｔｍｌ．のブラストプログラムを用いてホモロジー検索に用いた。ＣＦＰ２９については、ＤＮＡ配列の最初の１５０ｂｐを検索に用いた。さらに、ＥＭＢＬデータベースで、ＣＦＰ２９とホモロジーを有するタンパク質を検索した。

【０２０５】

これにより、以下の情報が得られた。

【０２０６】

ＣＦＰ１７

ＣＦＰ１７で決定された１４アミノ酸について、ＭＴＣＹ１Ａ１１．１６ｃ．と９３％の同一性が見出された。２つの配列間の違いは、最初のアミノ酸にある。つまり、決定されたＮ－末端配列では、それはＡ又はＳであり、ＭＴＣＹ１Ａ１１ではＳである。Ｎ－末端シークエンスからは、１３番目のアミノ酸を決定することはできなかった。

【０２０７】

オープンリーディングフレーム内で、翻訳されたタンパク質は１６２アミノ酸の長さである。培養ろ液から精製したタンパク質のＮ－末端は３１番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子質量１３８３３Ｄａ及び理論ｐＩ　４．４に相当する１３２アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められた質量は、１７ｋＤａである。

【０２０８】

ＣＦＰ２０

ＣＦＰ２０の決定された１５アミノ酸に１００％同一な配列が、翻訳されたコスミドｃｓｃｙ０９Ｆ９に見出された。停止コドンは、１の位置のアミノ酸Ｍから１６６番目のアミノ酸に見出された。これにより、理論分子質量１６８９７ｋＤａ及びｐＩ　４．２に相当する１６５アミノ酸の長さの生じることが推測される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められた分子量は、２０ｋＤａである。

【０２０９】

ＴＦＡＳＴＡアルゴリズム［Ｐｅａｒｓｏｎ及びＬｉｐｍａｎ、１９８８］を用いたＧｅｎＥＭＢＬデータベースの検索で、１６４アミノ酸長と推測される翻訳タンパク質にホモロジーを有する幾つかのタンパク質が示された。

【０２１０】

最高のホモロジー、つまり１６３アミノ酸が重複する５１．５％の同一性が、ヘモフィルス・インフルエンザ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａ）Ｒｄ　ｔｏｘＲ　ｒｅｇ（ＨＩＨＩ０７５１）に見られた。

【０２１１】

ＣＦＰ２１

ＣＦＰ２１の決定された１４アミノ酸に１００％同一な配列は、ＭＴＣＹ３９に見られた。Ｎ－末端シークエンスから、３番目のアミノ酸を決定できなかった。このアミノ酸は、ＭＴＣＹ３９ではＣである。おそらくこの違いにより、アミノ酸Ｃをシークエンサーで決定できない。

【０２１２】

オープンリーディングフレーム内で、翻訳タンパク質は２１７アミノ酸長である。培養ろ液から精製したタンパク質の決定されたＮ－末端配列は３３番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子質量１８６５７Ｄａ、理論ｐＩ　４．６に相当する１８５アミノ酸長の成熟タンパク質が得られる。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められた分子量は、２１ｋＤａである。

【０２１３】

タンパク質は、１９３アミノ酸を重複して、２０９アミノ酸長のクチナーゼ（ｃｕｔｉｎａｓｅ）前駆体（ＣＵＴＩ＿ＡＬＴＢＲ　Ｐ４１７４４）に３２．６％の同一性を有する。

【０２１４】

マイコバクテリア・ボビスＢＣＧで欠失された翻訳領域（ＲＤ２）と決定されたＮ－末端の１４アミノ酸との比較により、１００％同一な配列（ｍｂ３４８４）が示された［Ｍａｈａｉｒａｓら、１９９６］。

【０２１５】

ＣＦＰ２２

ＣＦＰ２２の決定された１５アミノ酸に１００％同一な配列は、ＭＴＣＹ１０Ｈ４に見られた。オープンリーディングフレーム内で、翻訳タンパク質は１８２アミノ酸長である。培養ろ液から精製したタンパク質のＮ－末端配列は８番目のアミノ酸で始まり、それ故に結核菌培養ろ液中で１７５アミノ酸長のタンパク質を生じる。これにより、理論分子質量１８５１７Ｄａ及びｐＩ　６．８が得られる。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められた分子量は、２２ｋＤａである。

【０２１６】

１８２アミノ酸の重複で、翻訳タンパク質は、Ｅ２３５７３９、ペプチジループロリル

シスートランスイソメラーゼと９０．１％の同一性を有する。
【０２１７】
ＣＦＰ２５
決定された１５アミノ酸に９３％同一な配列は、コスミドＭＴＣＹ３３９．０８ｃに見出された。２つの配列間で異なる１つのアミノ酸は、ＭＴＣＹ３３９．０８ｃでＣであり、Ｎ－末端シークエンスデータによればＸである。シークエンサーでは、おそらくこの違いによりＣを決定できない。
【０２１８】
培養ろ液から精製したタンパク質の決定されたＮ－末端配列は３３番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子量１９６６５Ｄａ及び理論ｐＩ　４．９に相当する１８７アミノ酸長の成熟タンパク質が得られる。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められた分子量は、２５ｋＤａである。
【０２１９】
タンパク質は、２１７アミノ酸の重複でＣＦＰ２１（ＭＴＣＹ３９．３５）に４２．９％の同一性を有する。
【０２２０】
ＣＦＰ２８
データベース検索でＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２の２～８、１１、１２及び１４残基の決定された１０アミノ酸を用いる際に、ホモロジーは見られなかった。
【０２２１】
ＣＦＰ２９
サンガーデータベース検索：ＣＦＰ２９タンパク質の配列１５０ｂｐにほぼ１００％同一な配列は、コスミドｃｙ４４４に見出された。配列は、オープンリーディングフレーム７９５ｂｐ内に含まれ、その５’末端は、精製されたＣＦＰ２９タンパク質のＮ－末端シークエンスされた１９アミノに１００％同一な配列に翻訳する。オープンリーディングフレームは、２６５アミノ酸のタンパク質をエンコードする。
【０２２２】
精製タンパク質について行ったアミノ酸解析により、コスミド４４４でのオープンリーディングフレームにエンコードされるタンパク質とＣＦＰ２９の同一性がさらに確認された。
【０２２３】
ＥＭＢＬデータベース検索：オープンリーデイングフレームは、リノシンＭ１８タンパク質（ＤＮＡレベルで６１％同一）に５８％同一で、７４％類似している２６５アミノ酸タンパク質をエンコードしている。これは、バクテリオシン活性を有する２８．６ｋＤａのタンパク質である［Ｖａｌｄｅｓ－Ｓｔａｕｂｅｒ及びＳｃｈｅｒｅｒ、１９９４；Ｖａｌｄｅｓ－Ｓｔａｕｂｅｒ及びＳｃｈｅｒｅｒ、１９９６］。２つのタンパク質は同じ長さ（１アミノ酸を除いて）を有し、同じ理論物理化学特性を有する。したがって、ＣＦＰ２９は、ブレビバクテリウム・リネンスのリノシンＭ１８タンパク質と相同なマイコバクテリア（ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａｌ　ｈｏｍｏｌｏｇ）であることが示唆される。
【０２２４】
サンガーデータベースから選んだ精製抗原のアミノ酸配列を以下のリストに示す。Ｎ－末端シークエンスで決定したアミノ酸は、太字で示す。
【０２２５】

【表９】

CFP17 (SEQ ID NO: 6):

1 MTDMNPDIEK DQTSDEVTVE TTSVFRADFL **SELDAPAQAG TESAV**SGVEG
51 LPPGSALLVV KRGPNAGSRF LLDQAITSAG RHPDSDIFLD DVTVSRRHAE
101 FRLENNEFNV VDVGSLNGTY VNREPVDSAV LANGDEVQIG KFRLVFLTGP
151 KQGEDDGSTG GP

CFP20 (SEQ ID NO: 8):

1 M**AQITLRGNA INTVGE**LPAV GSPAPAFTLT GGDLGVISSD QFRGKSVLLN
51 IFPSVDTPVC ATSVRTFDER AAASGATVLC VSKDLPFAQK RFCGAEGTEN
101 VMPASAFRDS FGEDYGVTIA DGPMAGLLAR AIVVIGADGN VAYTELVPEI
151 AQEPNYEAAL AALGA

CFP21 (SEQ ID NO: 10):

1 MTPRSLVRIV GVVVATTLAL VSAPAGGRAA HA**DPC**SDIAV
41 **VFARGTE**QAS GLGDVGEAFV DSLTSQVGGR SIGVYAVNYP ASDDYRASAS
91 NGSDDASAHI QRTVASCPNT RIVLGGYSQG ATVIDLSTSA MPPAVADHVA
141 AVALFGEPSS GFSSMLWGGG SLPTIGPLYS SKTINLCAPD DPICTGGGNI

191 MAHVSYVQSG MTSQAATFAA NRLDHAG

CFP22 (SEQ ID NO: 12):

1 MADCDSV**TNS PLATATATLH TN**RGDIKIAL FGNHAPKTVA NFVGLAQGTK
51 DYSTQNASGG PSGPFYDGAV FHRVIQGFMI QGGDPTGTGR GGPGYKFADE
101 FHPELQFDKP YLLAMANAGP GTNGSQFFIT VGKTPHLNRR HTIFGEVIDA
151 ESQRVVEAIS KTATDGNDRP TDPVVIESIT IS

CFP25 (SEQ ID NO: 14):

1 MGAAAAMLAA VLLLTPITVP AGYPGAVAPA TA**ACPDAEVV FARGRFE**PPG
51 IGTVGNAFVS ALRSKVNKNV GVYAVKYPAD NQIDVGANDM SAHIQSMANS
101 CPNTRLVPGG YSLGAAVTDV VLAVPTQMWG FTNPLPPGSD EHIAAVALFG
151 NGSQWVGPIT NFSPAYNDRT IELCHGDDPV CHPADPNTWE ANWPQHLAGA
201 YVSSGMVNQA ADFVAGKLQ

CFP29 (SEQ ID NO: 16):

1 **MNNLYRDLAP VTEAAWAEI**E LEAARTFKRH IAGRRVVDVS DPGGPVTAAV
51 STGRLIDVKA PTNGVIAHLR ASKPLVRLRV PFTLSRNEID DVERGSKDSD
101 WEPVKEAAKK LAFVEDRTIF EGYSAASIEG IRSASSNPAL TLPEDPREIP
151 DVISQALSEL RLAGVDGPYS VLLSADVYTK VSETSDHGYP IREHLNRLVD
201 GDIIWAPAID GAFVLTTRGG DFDLQLGTDV AIGYASHDTD TVRLYLQETL
251 TFLCYTAEAS VALSH

６つのタンパク質全てについて配列から推測される分子量は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められる分子量に一致する。

【０２２６】

ＣＦＰ１７、ＣＦＰ２０、ＣＦＰ２１、ＣＦＰ２２及びＣＦＰ２５をエンコードする遺伝子のクローニング

ＣＦＰ１７、ＣＦＰ２０、ＣＦＰ２１、ＣＦＰ２２及びＣＦＰ２５をエンコードする遺伝子は、大腸菌内で組換えタンパク質が発現されるように、遺伝子の特異的なプライマーを用いるＰＣＲ増幅により発現ベクターｐＭＣＴ６に全てクローンした。

【０２２７】

ＰＣＲ反応物は、１０μｌの反応容量に４つの各ヌクレオチド２５０mM［Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ］、ＢＳＡ ０．５mg／ml［ＩｇＧ ｔｅｃｈｎｌｏｇｙ］、１％ ＤＭＳＯ［Ｍｅｒｃｋ］、各プライマー５ｐｍｏｌ及びＴａｑ＋ＤＮＡポリメラーゼ０．５ユニット［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］を加えた１ｘ低塩Ｔａｑ＋緩衝液［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］に結核菌の染色体ＤＮＡ １０ｎｇを含むものであった。反応は、最初に２５秒間９４℃に加熱し、サーモサイクラー装置［ＩｄａｈｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ］を用いて１０秒間９４℃、１０秒間５５℃及び９０秒間７２℃のプログラムを３０サイクル行った。

【０２２８】

次いで、ＤＮＡフラグメントを１％アガロースゲルに付し、バンドを切りだしてスピン－Ｘ スピンカラム［Ｃｏｓｔａｒ］で精製し、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ ＩＩ＋－Ｔベクター［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］にクローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミドＤＮＡを調製し、適切な制限酵素で消化し、発現ベクターｐＭＣＴ６（発現されるタンパク質のＮ－末端に加えられる８個のヒスチジン残基とフレームを合わせた）にサブクローンした。得られたクローンは、この後、シーケナーゼＤＮＡシーケンシングキットバージョン１．０［Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ．、合衆国］を用いるスーパーコイルＤＮＡ用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー［モデル ３７３Ａ、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシークエンスにより、シークエンスした。

【０２２９】

個々の抗原のクローニングには、以下の遺伝子の特定のプライマーを用いた：

Ｃ Ｆ Ｐ １ ７：ｃｆｐ１７のクローニングに用いられるプライマー：

【０２３０】

【表１０】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-51: | ACAGATCTGTGACGGACATGAACCCG | (SEQ ID NO: 117) |
| OPBR-52: | TTTTCCATGGTCACGGGCCCCCGGTACT | (SEQ ID NO: 118) |

ＯＰＢＲ－５１及びＯＰＢＲ－５２は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０２３１】

Ｃ Ｆ Ｐ ２ ０：ｃｆｐ２０のクローニングに用いられるプライマー：

【０２３２】

【表１１】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-53: | ACAGATCTGTGCCCATGGCACAGATA | (SEQ ID NO: 119) |
| OPBR-54: | TTTAAGCTTCTAGGCGCCCAGCGCGGC | (SEQ ID NO: 120) |

ＯＰＢＲ－５３及びＯＰＢＲ－５４は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＨｉｎＩＩＩ部位をそれぞれ生じる。

【０２３３】

Ｃ Ｆ Ｐ ２ １：ｃｆｐ２１のクローニングに用いられるプライマー：

【０２３４】

【表１２】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-55: | ACAGATCTGCGCATGCGGATCCGTGT | (SEQ ID NO: 121) |
| OPBR-56: | TTTTCCATGGTCATCCGGCGTGATCGAG | (SEQ ID NO: 122) |

ＯＰＢＲ－５５及びＯＰＢＲ－５６は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０２３５】

Ｃ Ｆ Ｐ ２ ２：ｃｆｐ２２のクローニングに用いられるプライマー：

【０２３６】

【表１３】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-57: | ACAGATCTGTAATGGCAGACTGTGAT | (SEQ ID NO: 123) |
| OPBR-58: | TTTTCCATGGTCAGGAGATGGTGATCGA | (SEQ ID NO: 124) |

ＯＰＢＲ－５７及びＯＰＢＲ－５８は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇ

ｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。
【０２３７】
ＣＦＰ２５：ｃｆｐ２５のクローニングに用いられるプライマー：
【０２３８】
【表１４】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-59: | ACAGATCTGCCGGCTACCCCGGTGCC | (SEQ ID NO: 125) |
| OPBR-60: | TTTTCCATGGCTATTGCAGCTTTCCGGC | (SEQ ID NO: 126) |

ＯＰＢＲ－５９及びＯＰＢＲ－６０は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。
【０２３９】
ＣＦＰ１７、ＣＦＰ２０、ＣＦＰ２１、ＣＰ２２及びＣＦＰ２５の組換えタンパク質の発現／精製
組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。各タンパク質について、アンピシリン１００μｇ／ｍｌを含有するＬＢ－培地１１を、組換えｐＭＴＣ６プラスミドを有するＸＬ１－Ｂｌｕｅ細胞の一晩培養液１０ｍｌに接種した。培養は、$OD_{600}$が０．４～０．６の密度に達するまで３７℃で振盪した。
【０２４０】
最終濃度が１ｍＭになるようにＩＰＴＧをこの後加え、さらに４～１６時間培養した。細胞を回収して１ｘ超音波処理緩衝液＋８Ｍユレアに再懸濁し、パルスの間に３０秒停止して、５ｘ３０秒、超音波処理した。
【０２４１】
遠心分離後、再懸濁したタロン（Ｔａｌｏｎ）樹脂［Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，ＰａｌｏＡｌｔｏ、合衆国］２５ｍｌを含むカラムに溶解物を用いた。製品に記載されているようにしてカラムを洗浄し、溶出した。
【０２４２】
溶出後、全画分（各１．５ｍｌ）を、マイティ・スモール（Ｍｉｇｈｔｙ　Ｓｍａｌｌ）［Ｈｏｅｆｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、合衆国］システムを用いるＳＤＳ－ＰＡＧＥでの分析に付し、タンパク質濃度を２８０ｎｍで見積もった。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）中の３Ｍユレアに透析した。透析したタンパク質は、６ｍｌのＲｅｓｏｕｒｃｅ－Ｑカラムを用いてＦＰＬＣ［Ｐｈａｒｍａｃｉａ、スウェーデン］でさらに精製し、０～１ＭのＮａＣｌの線状勾配で溶出した。画分はＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析し、タンパク質濃度は$OD_{280}$で見積もった。タンパク質を含む画分をプールし、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ緩衝液（ｐＨ８．５）に透析した。
【０２４３】
最後に、それぞれＢＣＡ［Ｐｉｅｒｃｅ、オランダ］及びＬＡＬ［Ｅｎｄｏｓａｆｅ，Ｃｈａｒｌｅｓｔｏｎ、合衆国］試験でタンパク質濃度及びＬＰＳ含量を決定した。
【０２４４】
実施例３Ａ：ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ１９Ｂ、ＣＦＰ２２Ａ、ＣＦＰ２３Ａ、ＣＦＰ２３Ｂ、ＣＦＰ２５Ａ、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ３０Ａ、ＣｗＰ３２及びＣＦＰ５０の同定ＣＦＰ１６及びＣＦＰ１９Ｂの同定
ＳＴ－ＣＦは、８０％飽和の硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後に８Ｍユレアで洗浄した。最終濃度がそれぞれ０．５％（ｗ／ｖ）と５％（ｖ／ｖ）になるようにＣＨＡＰＳとグリセロールを加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞［ＢｉｏＲａｄ］に塗布した。ロトフォル細胞は、０．５％ＣＨＡＰＳ（ｗ／ｖ）、５％グリセロール（ｖ／ｖ）、３％バイオリット３／５（ｖ／ｖ）及び１％バイオリット４／６（ｖ／ｖ）［ＢｉｏＲａｄ］を含む８Ｍユレア緩衝液で平衡化した。

等電点フォーカスは、３～６のｐＨ勾配で行った。画分を、銀染色した１０～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析した。同様のバンドパターンを有する両分をプールし、最終容量が１～３ｍｌになるように、３ｋＤａのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機［Ａｍｉｃｏｎ］でＰＢＳを用いて３回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のＳＤＳを加え、タンパク質溶液を５分煮沸し、電気勾配下の１６％ポリアクリルアミドのマトリクスでプレップ細胞［Ｂｉｏｒａｄ］についてさらに分離した。ＰＶＤＦ膜への転移後に、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離したバンドのウェル含有画分をＮ－末端シークエンス用に選択した。

【０２４５】

ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ２３Ａ及びＣＦＰ２３Ｂの単離

ＳＴ－ＣＦは、８０％飽和の硫酸アンモニウムで沈殿させ、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）に再溶解し、２５ｍＭピペラジン－ＨＣｌ（ｐＨ５．５）に３回透析し、ＦＰＬＣシステム［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］に接続したカラムでＰＢＥ９４［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］のマトリクスについての等電点クロマトグラフィーに付した。カラムは２５ｍＭピペラジン－ＨＣｌ（ｐＨ５．５）で平衡化し、溶出を１０％ＰＢ７４－ＨＣｌ（ｐＨ４．０）［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］を用いて行った。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、最終容量が１～３ｍｌになるように３ｋＤａのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機［Ａｍｉｃｏｎ］でＰＢＳを用いて３回洗浄し、上記のようにしてプレップ細胞で分離した。

【０２４６】

ＣＦＰ２２Ａの同定

ＳＴ－ＣＦを限外ろ過で約１０倍に濃縮し、８０％飽和でタンパク質を沈殿させ、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）に再溶解し、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）に３回透析した。Ｒｎａｓｅ（０．２ｍｇ／ｍｌ，ＱＵＩＡＧＥＮ）とＤＮａｓｅ（０．２ｍｇ／ｍｌ，Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）で透析したＳＴ－ＣＦ５．１ｍｌを６時間処理し、ソルバル（Ｓｏｒｖａｌｌ）チューブ［Ｕｌｔｒａｃｒｉｍｐ　０３９８７，ＤｕＰｏｎｔ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ］内のＰＢＳ（ｐＨ７．４）中４８％シヨ糖（ｗ／ｖ）６．４ｍｌの上部に置き、１０℃、２５７，３００ｘ$g_{gax}$２０時間、超遠心分離した。ペレットは、２００μｌの２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－１９２ｍＭグリシン、０．１％　ＳＤＳ（ｐＨ８．３）に再溶解した。

【０２４７】

ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ２５Ａ、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ３０Ａ及びＣＦＰ５０の同定

ＣＦＰ２７、ＣＦＰ３０Ａ及びＣＦＰ５０については限外ろ過でＳＴ－ＣＦを約１０倍に濃縮し、４５～５５％飽和の硫酸アンモニウム沈殿を行った。タンパク質は、５０ｍＭリン酸ナトリウム、１．５ｍＭ硫酸アンモニウム（ｐＨ８．５）に再溶解し、Ａｆｆｉ－Ｔゲルカラム［Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃ］でのチオフィル吸着クロマトグラフィーに付した。タンパク質は、１．５から０Ｍに低下する硫酸アンモニウムの勾配で溶出した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで同様のバンドパターンを有する画分をプールし、ＦＰＬＣシステム［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］に接続したＭｏｎｏ　Ｑ　ＨＲ　５／５カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）で平衡化し、０～１ＭのＮａＣｌ勾配で溶出した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離したバンドのウェル含有画分を選択した。

【０２４８】

ＣＦＰ７とＣＦＰ２５Ａは、以下の点を変えるほかは上記のようにして得られた：限外ろ過でＳＴ－ＣＦを約１０倍に濃縮し、８０％飽和でタンパク質を沈殿させ、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）に再溶解し、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）に３回透析した。１．５Ｍの濃度まで硫酸アンモニウムを加え、ＳＴ－ＣＦタンパク質をＡｆｆｉ　Ｔ－ゲルカラムにロードした。Ａｆｆｉ　Ｔ－ゲルカラムとアニオン交換からの溶出は、上記のようにして行った。

【０２４９】

ＣＷＰ３２の単離

熱処理したＨ３７Ｒｖは、Ｓｏｒｅｎｓｅｎらが記載（１９９５）しているように、細胞下画分にサブ分画した。細胞壁画分は、８Ｍユレア、０．２％（ｗ／ｖ）Ｎ－オクチルβ－$_{D}$グルコピラノシド［Ｓｉｇｍａ］及び５％（ｖ／ｖ）グリセロールに再懸濁し、同じ緩衝液で平衡化したロトフォル等電点細胞［ＢｉｏＲａｄ］にタンパク質溶液を塗布した。等電点フォーカスは、３～６のｐＨ勾配で行った。画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析し、分離したバンドのウェル含有画分をプールし、ＰＶＤＦ膜への転移後にＮ－末端シーケンシングに付した。

【０２５０】

Ｎ－末端シーケンシング

ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ１９Ｂ、ＣＦＰ２２Ａ、ＣＦＰ２３Ａ、ＣＦＰ２３Ｂ、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ３０Ａ、ＣＷＰ３２及びＣＦＰ５０を含む画分は、トリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥ後にＰＶＤＦ膜にブロットした［Ｐｌｏｕｇら、１９８９］。関連するバンドを切り出し、プロサイス４９４シークエンサー［Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］でＮ－末端アミノ酸シークエンス解析に付した。ＣＦＰ２５Ａを含む画分を、２－ＤＥＰＡＧＥ（一次で等電点フォーカス、二次でトリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥ）後にＰＶＤＦ膜にブロットした。関連するスポットを切り出し、上記のようにシークエンスした。

【０２５１】

以下のＮ－末端配列が得られた：

【０２５２】

【表１５】

| | | |
|---|---|---|
| CFP7A: | AEDVRAEIVA SVLEVVVNEG DQIDKGDVVV LLESMYMEIP VLAEAAGTVS | (SEQ ID NO: 81) |
| CFP8A: | DPVDDAFIAKLNTAG | (SEQ ID NO: 73) |
| CFP8B: | DPVDAIINLDNYGX | (SEQ ID NO: 74) |
| CFP16: | AKLSTDELLDAFKEM | (SEQ ID NO: 79) |
| CFP19: | TTSPDPYAALPKLPS | (SEQ ID NO: 82) |
| CFP19B: | DPAXAPDVPTAAQLT | (SEQ ID NO: 80) |
| CFP22A: | TEYEGPKTKF HALMQ | (SEQ ID NO: 83) |
| CFP23A: | VIQ/AGMVT/GHIHXVAG | (SEQ ID NO: 76) |
| CFP23B: | AEMKXFKNAIVQEID | (SEQ ID NO: 75) |
| CFP25A: | AIEVSVLRVF TDSDG | (SEQ ID NO: 78) |
| CWP32: | TNIVVLIKQVPDTWS | (SEQ ID NO: 77) |
| CFP27: | TTIVALKYPG GVVMA | (SEQ ID NO: 84) |
| CFP30A: | SFPYFISPEX AMRE | (SEQ ID NO: 85) |
| CFP50: | THYDVVVLGA GPGGY | (SEQ ID NO: 86) |

【０２５３】

サンガーデータベースでのＮ－末端ホモロジー検索及び相当する遺伝子の固定

各タンパク質由来のＮ－末端アミノ酸配列は、サンガーの結核菌データベース：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ．ｐｒｏｊｅｃｔｓ．ｍ－ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ／ＴＢ－ｂｌａｓｔ－ｓｅｒｖｅｒ．のブラストプログラムを用いるホモロジー検索に用いた。

【０２５４】

ＣＦＰ２３Ｂ、ＣＦＰ２３Ａ及びＣＦＰ１９Ｂについては、サンガーのデータベースで類似性が見出されなかった。これは、検索を行ったときにシークエンスされていた結核菌

ゲノムは７０％にすぎないという事実のためである。これらのタンパク質をエンコードする遺伝子は、シークエンスデータがいまだ利用できない残りの３０％のゲノムに含まれているであろう。

【０２５５】

ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ１９Ｂ、ＣＦＰ２２Ａ、ＣＦＰ２５Ａ、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ３０Ａ、ＣｗＰ３２及びＣＦＰ５０については、以下の情報が得られた。

【０２５６】

ＣＦＰ７Ａ：ＣＦＰ７Ａの決定された５０アミノ酸のうち、９８％同一な配列がコスミドｃｓＣＹ０７Ｄ１（ｃｏｎｔｉｇ　２５６）に見出された：スコア＝２２６（１００．４ビット）、イクスペクト（ｅｘｐｅｃｔ）＝１．４ｅ－２４、Ｐ＝１．４ｅ－２４、同一性＝４９／５０（９８％）、陽性＝４９／５０（９８％）、フレーム（ｆｒａｍｅ）＝１。

【０２５７】

【表１６】

```
問 (Query)    : 1      AEDVRAEIVASVLEVVVNEGDQIDKGDVVVLLESMYMEIPVLAEAAGTVS 50
                       AEDVRAEIVASVLEVVVNEGDQIDKGDVVVLLESM MEIPVLAEAAGTVS
対象 (subject) : 257679 AEDVRAEIVASVLEVVVNEGDQIDKGDVVVLLESMKMEIPVLAEAAGTVS 257530
```

(SEQ ID NOs: 127, 128, 及び 129)

【０２５８】

同一性は、理論ＭＷがＣＦＰ７Ａの７３０５．９Ｄａ及びｐＩ　３．７６２に相当する７１アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内で見出される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められた分子量は、７ｋＤａである。

【０２５９】

ＣＦＰ８Ａ：１５個のＮ－末端アミノ酸に８０％が同一な配列が、ｃｏｎｔｉｇ　ＴＢ＿１８８４に見出された。培養ろ液から精製したタンパク質由来の決定されたＮ－末端た配列は、３２番目のアミノ酸で開始する。これにより、ＭＷ　９７００Ｄａ及びｐＩ　３．７２の理論値に相当する９８アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。これは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められる約８ｋＤａのＭＷに一致する。全長タンパク質は、ＭＷ　１２９８９Ｄａ及びｐＩ　４．３８の理論値を有する。

【０２６０】

ＣＦＰ８Ｂ：１４個のＮ－末端アミノ酸に７１％同一な配列が、ｃｏｎｔｉｇ　ＴＢ＿６５３に見出された。しかし、最初のＮ－末端配列データを注意深く再評価することにより、タンパク質の同一性が確認された。培養ろ液から精製したタンパク質の決定されたＮ－末端配列は、２９番目のアミノ酸で開始する。これにより、ＭＷ　８３３７Ｄａ及びｐＩ　４．２３の理論値に相当する８２アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。これは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥで認められる約８ｋＤａのＭＷに一致する。アミノ酸配列解析により、培養ろ液に見出された成熟タンパク質から切断されたシグナルペプチドの存在することが予測される。

【０２６１】

ＣＦＰ１６：１５個のＮ－末端アミノ酸配列は、コスミドＭＴＣＹ２０Ｈ１に見られる配列と１００％同一であることが分かった。

【０２６２】

同一性は、１３４４０．４Ｄａ及びｐＩ　４．５９のＣＦＰ１６の理論ＭＷに相当する１３０アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで認められた分子量は、１６ｋＤａである。

【０２６３】

ＣＦＰ１９：１５個のＮ－末端アミノ酸配列は、コスミドＭＴＣＹ２７０に見られる配列と１００％同一であることが分かった。

【０２６４】

同一性は、１８６３３．９Ｄａ及びｐＩ　５．４１のＣＦＰ１９の理論ＭＷに相当する１７６アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで認められた分子量は、１９ｋＤａである。

【０２６５】

ＣＦＰＡ２２Ａ：１５個のＮ－末端アミノ酸配列は、コスミドＭＴＣＹ１Ａ６に見られる配列と１００％同一であることが分かった。
同一性は、２０４４１．９Ｄａ及びｐＩ　４．７３のＣＦＰ２２Ａの理論ＭＷに相当する１８１アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで認められた分子量は、２２ｋＤａである。

【０２６６】

ＣＦＰＡ２５Ａ：１５個のＮ－末端アミノ酸配列は、ｃｏｎｔｉｇ　２５５に見られる配列と１００％同一であることが分かった。

【０２６７】

同一性は、２４５７４．３Ｄａ及びｐＩ　４．９５のＣＦＰ２５Ａの理論ＭＷに相当する２２８アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで認められた分子量は、２５ｋＤａである。

【０２６８】

ＣＦＰＡ２７：１５個のＮ－末端アミノ酸配列は、コスミドＭＴＣＹ２６１に見られる配列と１００％同一であることが分かった。

【０２６９】

同一性は、２９１アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。
培養ろ液から精製したタンパク質の決定されたＮ－末端配列は、５８番目のアミノ酸で開始する。これにより、２４４２２．４Ｄａの理論分子量、４．６４の理論ｐＩに相当する２３３アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。

【０２７０】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで認められた分子量は、２７ｋＤａである。

【０２７１】

ＣＦＰＡ３０Ａ：ＣＦＰ３０Ａで決定された１３個のアミノ酸について、１００％同一な配列がコスミドＭＴＣＹ２６１に見出された。

【０２７２】

同一性は、２６８８１．０Ｄａ及びｐＩ　５．４１のＣＦＰ３０Ａの理論ＭＷに相当する２４８アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで認められた分子量は、３０ｋＤａである。

【０２７３】

ＣＷＰ３２：１５個のＮ－末端アミノ酸配列は、ｃｏｎｔｉｇ　２８１に見られる配列と１００％同一であることが分かった。同一性は、２８０８３Ｄａ及びｐＩ　４．５６３のＣＷＰ３２の理論ＭＷに相当する２６６アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出された。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで認められた分子量は、３２ｋＤａである。

【０２７４】

ＣＦＰ５０：１５個のＮ－末端アミノ酸配列は、ＭＴＶ０３８．０６に見られる配列と１００％同一であることが分かった。同一性は、４９２４４Ｄａ及びｐＩ　５．６６のＣＦＰ５０の理論ＭＷに相当する４６４アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで認められた分子量は、５０ｋＤａである。

【０２７５】

ＣＦＰ１９ＡとＣＦＰ２３の同定のためのＥＭＬデータベースでのホモロジー検索の使用

ＴＦＡＳＴＡアルゴリズムを用いる、２つの初期に同定された高度に免疫応答性のＳＴ

－ＣＦタンパク質のアミノ酸配列とのＥＭＢＬデータベース（ＢｉｏｂａｓｅのＧＣＧパッケージを使用、Ａｒｈｕｓ－ＤＫ）でのホモロジー検索により、これらのタンパク質（ＣＦＰ２１とＣＦＰ２５、実施例３）が、真菌のクチナーゼホモログの群に属することが示された。これらのうちで、もっとも相同な配列は、コスミドＭＴＣＹ１３Ｅ１２に見らる２つの結核菌配列であった。まず、ＭＴＣＹ１３Ｅ１２．０４は、ＣＦＰ２５とＣＦＰ２１に、それぞれ４６％及び５０％同一である。次に、ＭＴＣＹ１３Ｅ．１２．０５も、ＣＦＰ２５とＣＦＰ２１に４６％及び５０％同一である。２つのタンパク質は、１８４残基を重複させて６２．５％の同一なアミノ酸を共有する。強力なＴ－細胞抗原ＣＦＰ２１とＣＦＰ２５に高度なホモロジーに基づくと、ＣＦＰ１９ＡとＣＦＰ２３は、それぞれ新規なＴ－細胞抗原であるものと考えられる。

【０２７６】

最初の読み枠は、２５４アミノ酸のタンパク質をエンコードし、最初の２６アミノ酸は、タンパク質の細胞外の位置を強く示す仮想のリーダーペプチドを構成している。したがって、成熟タンパク質は、２３１４９．０Ｄａの理論ＭＷと５．８０のｐＩに相当する２２８アミノ酸の長さである。このタンパク質を、ＣＦＰ２３と命名する。

【０２７７】

二番目の読み枠は、２３１アミノ酸のタンパク質をエンコードし、最初の４４アミノ酸は、タンパク質の細胞外の位置を強く示す仮想のリーダーペプチドを構成している。したがって、成熟タンパク質は、１９０２０．３Ｄａの理論ＭＷと７．０３のｐＩに相当する１８７アミノ酸の長さである。このタンパク質を、ＣＦＰ１９Ａと命名する。

【０２７８】

両タンパク質での仮想リーダーペプチドの存在（及び、それによるＳＴ－ＣＦでのそれらの存在）は、エクスパシー（Ｅｘｐａｓｙ）分子生物サーバー（ｈｔｔｐ：／／ｅｘｐａｓｙ．ｈｃｕｇｅ．ｃｈ／ｗｗｗ／ｔｏｏｌｓ．ｈｔｍｌ）のシグナルＰプログラムを用いる理論シークエンス解析で確認される。

【０２７９】

ＥＭＢＬデータベースでのＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ１９Ａ、ＣＦＰ１９Ｂ、ＣＦＰ２２Ａ、ＣＦＰ２３、ＣＰ２５Ａ、ＣＦ２７、ＣＦＰ３０Ａ、ＣＷＰ３２及びＣＦＰ５０とのホモロジー検索

相同なタンパク質を見出し、抗原に最終的な機能的役割を果たさせるために、ＴＦＡＳＴＡアルゴリズムを用いるＥＭＢＬ及びＧｅｎｂａｎｋデータベースでのホモロジー索に個々の抗原の翻訳遺伝子由来のアミノ酸配列を用いた。

【０２８０】

ＣＦＰ７Ａ：ＣＦＰ７Ａは、仮想上（ｈｙｐｏｔｈｅｔｉｃａｌ）、メタノコッカス・ジャナスチ（Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｊａｎｎａｓｃｈｉｉ）タンパク質（１１６２１９９－１１７５３４１塩基由来のメタノコッカス・ジャナスチ）と４４％の同一性及び７０％の類似性、ならびにビー・ステアロサーモフィラス（Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）のピルベートカルボキシラーゼのＣ－末端の一部、及びストレプトコッカス（Ｓｔｅｒｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）変異体のビオチンカルボキシル担体タンパク質と４３％と３８％の同一性及び６８％と６４％の類似性を有する。

【０２８１】

ＣＦＰ７Ａは、この場合にわずかに修飾されたビオチン結合部位モチーフについて共通のＥＡＭＫＭ配列（ＥＳＭＫＭで３４～３８アミノ酸残基）を含む。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ後にストレプトアビジンに結合したアルカリホスファターゼとインキュベーションし、ニトロセルロースに転移することにより、天然のＣＦＰ７Ａがビオチニル化されたことが立証された。

【０２８２】

ＣＦＰ１６：ＲｐＩＬ遺伝子、１３０アミノ酸、マイコバクテリア・ボビス５０ｓリボソームタンパク質Ｌ７／Ｌ１２と同一（受託Ｎｏ　Ｐ３７３８１）。

【０２８３】

ＣＦＰ１９：ＣＦＰ１９は、１５０アミノ酸重複して、大腸菌ペクチンストレアーゼホモログ（ｙｂｈＣ遺伝子）と４７％同一で、５５％類似している。

【０２８４】

ＣＦＰ１９Ａ：ＣＦＰ１９Ａは、異なる真菌種由来の幾つかのクチナーゼと３８～４５％の同一性を有する。

【０２８５】

さらに、ＣＦＰ１９ＡはＣＦＰ２５と４６％の同一性と６１％の類似性、ならびにＣＦＰ２１と５０％の同一性と６４％の類似性を有する（両タンパク質は、ＳＴ－ＣＦから初期に単離される）。

【０２８６】

ＣＦＰ１９Ｂ：ホモロジーは、見られない。

【０２８７】

ＣＦＰ２２Ａ：ホモロジーは、見られない。

【０２８８】

ＣＦＰ２３：ＣＦＰ２３は、異なる真菌種由来の幾つかのクチナーゼと３８～４６％の同一性を有する。

【０２８９】

さらに、ＣＦＰ２３はＣＦＰ２５と４６％の同一性と６１％の類似性、ならびにＣＦＰ２１と５０％の同一性と６３％の類似性を有する（両タンパク質は、ＳＴ－ＣＦから初期に単離される）。

【０２９０】

ＣＦＰ２５Ａ：ＣＦＰ２５Ａは、推測上、結核菌のチミジレートシンセターゼと２４１アミノ酸重複して９５％の同一性を有する（４５０アミノ酸、受託番号ｐ２８１７６）。

【０２９１】

ＣＦＰ２７：ＣＦＰ２７は、仮定上、らい菌（Ｍ．ｌｅｐｒａｅ）タンパク質と８１％の同一性、及びロドコッカス（Ｒｈｏｄｏｃｏｃｃｕｓ）種のプロテアソームβ－タイプサブユニット２（ｐｒｃｂ（２）遺伝子）と６４％の同一性ならびに７８％の類似性を有する。

【０２９２】

ＣＦＰ３０Ａ：ＣＦＰ３０Ａは、ロドコッカスのプロテアソームα－タイプ１サブユニットと６７％の同一性を有する。

【０２９３】

ＣＷＰ３２：ＣＷＰ３２のＮ－末端配列は、らい菌の配列ＭＬＣＢ６３７．０３と１００％同一である。

【０２９４】

ＣＦＰ５０：ＣＦＰ５０のＮ－末端配列は、推測上、らい菌由来のリポアミドデヒドロゲナーゼと１００％同一である（受託４１５１８３）。

【０２９５】

ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ１Ａ９Ａ、ＣＦＰ２２Ａ、ＣＦＰ２３、ＦＰ２５Ａ、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ３０Ａ、ＣＷＰ３２及びＣＦＰ５０をエンコードする遺伝子のクローニング

ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ１９Ａ、ＣＦＰ２２Ａ、ＣＦＰ２３、ＣＦＰ２５Ａ、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ３０Ａ、ＣＷＰ３２及びＣＦＰ５０をエンコードする遺伝子は、大腸菌で組換えタンパク質を発現するように、特異的な遺伝子プライマーとのＰＣＲ増幅で発現ベクターｐＭＣＴ６に全てクローンした。

【０２９６】

ＰＣＲ反応物は、１０ｍｌの反応容量に４つの各ヌクレオチド２５０ｍＭ［Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ］、ＢＳＡ ０．５ｍｇ／ｍｌ［ＩｇＧ ｔｅｃｈｎｌｏｇｙ］、１％ ＤＭＳＯ［Ｍｅｒｃｋ］、各プライマー５ｐｍｏｌ及びＴａｑ＋ＤＮＡポリメラーゼ０．５ユニット［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］を加えた１ｘ低塩Ｔａｑ＋緩衝液［

Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］に結核菌の染色体ＤＮＡ　１０ｎｇを含むものであった。反応は、最初に２５秒間９４℃に加熱し、サーモサイクラー装置［Ｉｄａｈｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ］を用いて１０秒間９４℃、１０秒間５５℃及び９０秒間７２℃のプログラムを３０サイクル行った。

【０２９７】

次いで、ＤＮＡフラグメントを１％アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピンーＸ　スピンカラム［Ｃｏｓｔａｒ］で精製し、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ　ＩＩ＋ーＴベクター［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］にクローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミドＤＮＡを調製し、適切な制限酵素で消化し、発現ベクターｐＭＣＴ６（発現されるタンパク質のＮー末端に加えられる８個のヒスチジン残基とフレームを合わせた）にサブクローンした。得られたクローンは、この後、シーケナーゼＤＮＡシーケンシングキットバージョン１．０［Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐ．、合衆国］を用いるスーパーコイルＤＮＡ用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー［モデル３７３Ａ、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシークエンスにより、シークエンスした。遺伝子の両鎖をシークエンスした。

【０２９８】

個々の抗原のクローニングには、以下の特異的な遺伝子プライマーを用いた：

<u>ＣＦＰ７Ａ</u>：ｃｆｐ７Ａのクローニングに用いたプライマー

【０２９９】

【表１７】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-79: | AAGAGTAGATCTATGATGGCCGAGGATGTTCGCG | (SEQ ID NO: 95) |
| OPBR-80: | CGGCGACGACGGATCCTACCGCGTCGG | (SEQ ID NO: 96) |

ＯＰＢＲー７９及びＯＰＢＲー８０は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＢａｍＨＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３００】

<u>ＣＦＰ８Ａ</u>：ｃｆｐ８Ａのクローニングに用いたプライマー：

【０３０１】

【表１８】

| | | |
|---|---|---|
| CFP8A-F: | CTGAGATCTATGAACCTACGGCGCC | (SEQ ID NO: 154) |
| CFP8A-R: | CTCCCATGGTACCCTAGGACCCGGGCAGCCCCGGC | (SEQ ID NO: 155) |

ＣＦＰ８ＡーＦ及びＣＦＰ８ＡーＲは、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３０２】

<u>ＣＦＰ８Ｂ</u>：ｃｆｐ８Ｂのクローニングに用いたプライマー：

【０３０３】

【表１９】

| | | |
|---|---|---|
| CFP8B-F: | CTGAGATCTATGAGGCTGTCGTTGACCGC | (SEQ ID NO: 156) |
| CFP8B-R: | CTCCCCGGGCTTAATAGTTGTTGCAGGAGC | (SEQ ID NO: 157) |

ＣＦＰ８ＢーＦ及びＣＦＰ８ＢーＲは、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＳｍａＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３０４】

<u>ＣＦＰ１６</u>：ｃｆｐ１６のクローニングに用いたプライマー：

【０３０５】

【表２０】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-104: | CCGGGAGATCTATGGCAAAGCTCTCCACCGACG | (SEQ ID NOs: 111 and 130) |
| OPBR-105: | CGCTGGGCAGAGCTACTTGACGGTGACGGTGG | (SEQ ID NOs: 112 and 131) |

ＯＰＢＲ－１０４及びＯＰＢＲ－１０５は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３０６】

ＣＦＰ１９：ｃｆｐ１９のクローニングに用いたプライマー：

【０３０７】

【表２１】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-96: | GAGGAAGATCTATGACAACTTCACCCGACCCG | (SEQ ID NO: 107) |
| OPBR-97. | CATGAAGCCATGGCCCGCAGGCTGCATG | (SEQ ID NO: 108) |

ＯＰＢＲ－９６及びＯＰＢＲ－９７は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３０８】

ＣＦＰ１９Ａ：ｃｆｐ１９Ａのクローニングに用いたプライマー：

【０３０９】

【表２２】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-88: | CCCCCCAGATCTGCACCACCGGCATCGGCGGGC | (SEQ ID NO: 99) |
| OPBR-89. | GCGGCGGATCCGTTGCTTAGCCGG | (SEQ ID NO: 100) |

ＯＰＢＲ－８８及びＯＰＢＲ－８９は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＢａｍＨＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３１０】

ＣＦＰ２２Ａ：ｃｆｐ２２Ａのクローニングに用いたプライマー：

【０３１１】

【表２３】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-90: | CCGGCTGAGATCTATGACAGAATACGAAGGGC | (SEQ ID NO: 101) |
| OPBR-91: | CCCCGCCAGGGAACTAGAGGCGGC | (SEQ ID NO: 102) |

ＯＰＢＲ－９０及びＯＰＢＲ－９１は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３１２】

ＣＦＰ２３：ｃｆｐ２３のクローニングに用いたプライマー：

【０３１３】

【表２４】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-86: | CCTTGGGAGATCTTTGGACCCCGGTTGC | (SEQ ID NO: 97) |
| OPBR-87: | GACGAGATCTTATGGGCTTACTGAC | (SEQ ID NO: 98) |

ＯＰＢＲ－８６及びＯＰＢＲ－８７は、ともにｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ部位を生じる。

【０３１４】

ＣＦＰ２５Ａ：ｃｆｐ２５Ａのクローニングに用いたプライマー：

【０３１５】

【表２５】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-106: | GGCCCAGATCTATGGCCATTGAGGTTTCGGTGTTGC | (SEQ ID NO: 113) |
| OPBR-107: | CGCCGTGTTGCATGGCAGCGCTGAGC | (SEQ ID NO: 114) |

ＯＰＢＲ－１０６及びＯＰＢＲ－１０７は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３１６】

ＣＦＰ２７：ｃｆｐ２７のクローニングに用いたプライマー：

【０３１７】

【表２６】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-92: | CTGCCGAGATCTACCACCATTGTCGCGCTGAAATACCC | (SEQ ID NO: 103) |
| OPBR-93: | CGCCATGGCCTTACGCGCCAACTCG | (SEQ ID NO: 104) |

ＯＰＢＲ－９２及びＯＰＢＲ－９３は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３１８】

ＣＦＰ３０Ａ：ｃｆｐ３０Ａのクローニングに用いたプライマー：

【０３１９】

【表２７】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-94: | GGCGGAGATCTGTGAGTTTTCCGTATTTCATC | (SEQ ID NO: 105) |
| OPBR-95: | CGCGTCGAGCCATGGTTAGGCGCAG | (SEQ ID NO: 106) |

ＯＰＢＲ－９４及びＯＰＢＲ－９５は、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３２０】

ＣＷＰ３２：ｃｗｐ３２のクローニングに用いたプライマー：

【０３２１】

【表２８】

| | | |
|---|---|---|
| CWP32-F: | GCTTAGATCTATGATTTTTCTGGGCAACCAGGTA | (SEQ ID NO: 158) |
| CWP32-R: | GCTTCCATGGGCGAGGCACAGGCGTGGGAA | (SEQ ID NO: 159) |

ＣＷＰ３２－Ｆ及びＣＷＰ３２－Ｒは、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３２２】

ＣＦＰ５０：ｃｆｐ５０のクローニングに用いたプライマー：

【０３２３】

【表２９】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-100: | GGCCGAGATCTGTGACCCACTATGACGTCGTCG | (SEQ ID NO: 109) |
| OPBR-101: | GGCGCCCATGGTCAGAAATTGATCATGTGGCCAA | (SEQ ID NO: 110) |

ＯＰＢＲ－１００及びＯＰＢＲ－１０１は、ｐＭＣＴ６でのクローニンクに用いられるＢｇｌＩＩ及びＮｃｏＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３２４】

ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ１９Ａ、ＣＦＰ２２Ａ、ＣＦＰ２３、ＣＦＰ２５Ａ、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ３０Ａ、ＣＷＰ３２及びＣＦＰ５０の組換えタンパク質の発現／精製

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。各タンパク質について、アンピシリン１００μｇ／ｍｌを含有するＬＢ－培地１１を、組換えｐＭＴＣ６プラスミドを有するＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞の一晩培養液１０ｍｌに接種した。培養は、ＯＤ$_{６００}$４～０．６の密度に達するまで３７℃で振盪した。この後、最終濃度か１ｍＭになるようにＩＰＴＧを加え、さらに４～１６時間、培養した。細胞を回収して１ｘ超音波処理緩衝液＋８Ｍユレアに再懸濁し、パルス間で３０秒停止して、５ｘ３０秒、超音波処理した。

【０３２５】

遠心分離後、再懸濁したタロン樹脂［Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，ＰａｌｏＡｌｔｏ、合衆国］を２５ｍｌ含むカラムに溶解物を用いた。製品に記載されているようにしてカラムを洗浄し、溶出した。

【０３２６】

溶出後、全画分（各１．５ｍｌ）を、マイティ・スモール［Ｈｏｅｆｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、合衆国］システムを用いるＳＤＳ－ＰＡＧＥでの分析に付し、タンパク質濃度を２８０ｎｍで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）中の３Ｍユレアに透析した。透析したタンパク質は、６ｍｌのＲｅｓｏｕｒｃｅ－ＱカラムをＦＰＬＣ［Ｐｈａｒｍａｃｉａ、スウェーデン］でさらに精製し、０～１ＭのＮａＣｌの線状勾配で溶出した。画分はＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析し、タンパク質濃度はＯＤ$_{２８０}$で予測した。タンパク質含有画分をプールし、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ緩衝液（ｐＨ８．５）に透析した。

【０３２７】

最後に、タンパク質濃度及びＬＰＳ含量は、それぞれＢＣＡ［Ｐｉｅｒｃｅ、オランダ］及びＬＡＬ［Ｅｎｄｏｓａｆｅ，Ｃｈａｒｌｅｓｔｏｎ、合衆国］試験で決定した。

【０３２８】

<u>実施例３Ｂ</u>：ＣＦＰ７Ｂ、ＣＦＰ１０Ａ、ＣＦＰ１１及びＣＦＰ３０Ｂの同定<u>ＣＦＰ７Ｂの単離</u>

ＳＴ－ＣＦは、８０％飽和の硫酸アンモニウムで沈殿し、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）に再溶解し、２５ｍＭピペラジン－ＨＣｌ（ｐＨ５．５）に３回透析し、ＦＰＬＣシステム［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］に接続したカラムでＰＢＥ９４［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］のマトリクスについての等電点クロマトグラフィーに付した。カラムは２５ｍＭピペラジン－ＨＣｌ（ｐＨ５．５）で平衡化し、１０％ＰＢ７４－ＨＣｌ（ｐＨ４．０）

［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］を用いて溶出を行った。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、最終容量が１～３ｍｌになるように３ｋＤａのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機［Ａｍｉｃｏｎ］でＰＢＳを用いて３回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のＳＤＳを加え、タンパク質溶液を５分煮沸し、１０～２０％ポリアクリルアミドのマトリクス［Ａｎｄｅｒｓｅｎ，Ｐ．及びＨｅｒｏｎ，Ｉ．，１９９３］のマルチエリューター（ＭｕｌｔｉＥｌｕｔｅｒ）［Ｂｉｏｒａｄ］でさらに分離した。ＰＶＤＦ膜への転移後に、１０ｋＤａ以下で分離したバンドのウェル含有画分をＮ－末端シークエンス用に選択した。

【０３２９】

<u>ＣＦＰ１１の単離</u>

ＳＴ－ＣＦは、８０％飽和の硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後に８Ｍユレアで洗浄した。最終濃度がそれぞれ０．５％（ｗ／ｖ）と５％（ｖ／ｖ）になるようにＣＨＡＰＳとグリセロールを加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞［ＢｉｏＲａｄ］に塗布した。０．５％ＣＨＡＰＳ（ｗ／ｖ）、５％グリセロール（ｖ／ｖ）、３％バイオリット３／５（ｖ／ｖ）及び１％バイオリット４／６（ｖ／ｖ）［ＢｉｏＲａｄ］を含む８Ｍユレア緩衝液で、ロトフォル細胞を平衡化した。

【０３３０】

等電点フォーカスは、３～６のｐＨ勾配で行った。銀染色した１０～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥで画分を分析した。ｐＨ５．５～６の勾配で画分をプールし、最終容量が１ｍｌ

になるように、３ｋＤａのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機［Ａｍｉｃｏｎ］でＰＢＳを用いて３回洗浄した。タンパク質調製物３００ｍｇを１０～２０％トリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離し［Ｐｌｏｕｇら、１９８９］、ＰＶＤＦ膜に移してクーマシー染色した。膜のもっとも低い位置で生じたバンドを切り出し、Ｎ－末端シークエンスに付した。

【０３３１】

ＣＦＰ１０ＡとＣＦＰ３０Ｂの単離

ＳＴ－ＣＦは、限外ろ過及び８０％飽和の硫酸アンモニウム沈殿で約１０倍に濃縮した。タンパク質は、５０ｍＭのリン酸ナトリウム、１．５Ｍの硫酸アンモニウム（ｐＨ８．５）に再溶解し、Ａｆｆｉ－Ｔゲルカラム［Ｋｅｍ－Ｅｎ－Ｔｅｃ］でのチオフィル吸着クロマトグラフィーに付した。タンパク質は、１．５から０Ｍに減少する硫酸アンモニウムの勾配で溶出した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで同様のバンドパターンを有する画分をプールし、ＦＰＬＣシステム［Ｐｈａｒｍａｃｉａ］に接続したＭｏｎｏ　Ｑ　ＨＲ　５／５カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）で平衡化し、０～１ＭのＮａＣｌ勾配で溶出した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分離したバンドのウェル含有画分を選択した。

【０３３２】

ＣＦＰ１０ＡとＣＦＰ３０Ｂを含有する画分は、２－ＤＥ　ＰＡＧＥ後にＰＶＤＦ膜にブロットした［Ｐｌｏｕｇら、１９８９］。関連するスポットを切り出し、Ｎ－末端アミノ酸配列の解析に付した。

【０３３３】

Ｎ－末端シーケンシング

Ｎ－末端アミノ酸配列の解析は、プロサイス４９４シークエンサー［Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］で行った。

【０３３４】

以下のＮ－末端配列が得られた：「Ｘ」は、用いたシークエンス法では決定できないアミノ酸を示す。

【０３３５】

【表３０】

| | | |
|---|---|---|
| CFP7B: | PQGTVKWFNAEKGFG | (SEQ ID NO: 168) |
| CFP10A: | NVTVSIPTILRPXXX | (SEQ ID NO: 169) |
| CFP11: | TRFMTDPHAMRDMAG | (SEQ ID NO: 170) |
| CFP30B: | PKRSEYRQGTPNWVD | (SEQ ID NO: 171) |

【０３３６】

サンガーデータベースでのＮ－末端ホモロジー検索及び相当する遺伝子の固定

各タンパク質由来のＮ－末端アミノ酸配列は、サンガーの結核菌ゲノムのデータベース：ｈｔｔｐ／／ｗｗｗ．ｓａｎｇｅｒ．ａｃ．ｕｋ／ｐｒｏｊｅｃｔｓ／ｍ－ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ／ＴＢ－ｂｌａｓｔ－ｓｅｒｖｅｒのブラストプログラムを用いるホモロジー検索に用いた。

【０３３７】

ＣＦＰ１１について１５個のＮ－末端アミノ酸に１００％同一な配列が、ｃｏｎｔｉｇ　ＴＢ＿１３１４に見られた。同一性は、ＭＷ　１０９７７Ｄａ及びｐＩ　５．１４の理論値に相当する９８アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

【０３３８】

この配列も得られたように（結果を示していない）、アミノ酸の１つは、（Ｔｈｒの代わりに）Ａｌａでもよい。このＮ－末端に１００％同一な配列がｃｏｎｔｉｇ　ＴＢ＿６７１及びＭＴＣＩ３６４．０９の座に見出される。

【０３３９】
ＣＦＰ７Ｂについて１５個のＮ－末端アミノ酸に１００％同一な配列が、ＥＭＢＬ受託番号がｚ９５４３６のｃｏｎｔｉｇ　ＴＢ＿２０４４及びＭＴＹ１５Ｃ１０．０４の座に見られた。同一性は、ＭＷ　７２４０Ｄａ及びｐＩ　５．１８の理論値に相当する６７アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

【０３４０】
ＣＦＰ１０Ａについて１２個のＮ－末端アミノ酸に１００％同一な配列が、ＥＭＢＬ受託番号：Ｑ１０６４６及びＺ７３９０２のｃｏｎｔｉｇ　ＴＢ＿７５２及びＣＹ１３０．２０の座に見られた。同一性は、ＭＷ　９５５７Ｄａ及びｐＩ　４．７８の理論値に相当する９３アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

【０３４１】
ＣＦＰ３０Ｂについて１５個のＮ－末端アミノ酸に１００％同一な配列が、ｃｏｎｔｉｇＴＢ＿３３５に見られた。同一性は、ＭＷ　２７３４５Ｄａ及びｐＩ　４．２４の理論値に相当する２６１アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

【０３４２】
サンガーデータベースから選んだ精製抗原のアミノ酸配列を、以下のリストに示す。

【０３４３】
【表３１】

CFP7B (SEQ ID NO: 147)

```
  1  MPQGTVKWFN AEKGFGFIAP EDGSADVFVH YTEIQGTGFR TLEENQKVEF
 51  EIGHSPKGPQ ATGVRSL
```

CFP10A (SEQ ID NO: 141)

```
  1  MNVTVSIPTI LRPHTGGQKS VSASGDTLGA VISDLEANYS GISERLMDPS
 51  SPGKLHRFVN IYVNDEDVRF SGGLATAIAD GDSVTILPAV AGG
```

CFP11 protein sequence (SEQ ID NO: 143)

```
  1  MATRFMTDPH AMRDMAGRFE VHAQTVEDEA RRMWASAQNI SGAGWSGMAE
 51  ATSLDTMAQM NQAFRNIVNM LHGVRDGLVR DANNYEQQEQ ASQQILSS
```

CFP30B (SEQ ID NO: 145)

```
  1  MPKRSEYRQG TPNWVDLQTT DQSAAKKFYT SLFGWGYDDN PVPGGGGVYS
 51  MATLNGEAVA AIAPMPPGAP EGMPPIWNTY IAVDDVDAVV DKVVPGGGQV
101  MMPAFDIGDA GRMSFITDPT GAAVGLWQAN RHIGATLVNE TGTLIWNELL
151  TDKPDLALAF YEAVVGLTHS SMEIAAGQNY RVLKAGDAEV GGCMEPPMPG
201  VPNHWHVYFA VDDADATAAK AAAAGGQVIA EPADIPSVGR FAVLSDPQGA
251  IFSVLKPAPQ Q
```

【０３４４】
ＣＦＰ７Ｂ、ＣＦＰ１０Ａ、ＣＦＰ１１及びＣＦＰ３０Ｂをエンコードする遺伝子のクローニング

ＰＣＲ反応物は、１０ｍｌの反応容量に４つの各ヌクレオチド２５０ｍＭ［Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ］、ＢＳＡ ０．５ｍｇ／ｍｌ［ＩｇＧ ｔｅｃｈｎｌｏｇｙ］、１％ ＤＭＳＯ［Ｍｅｒｃｋ］、各プライマー５ｐｍｏｌ及びＴａｑ＋ＤＮＡポリメラーゼ０．５ユニット［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］を加えた１ｘ低塩Ｔａｑ＋緩衝液［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］に結核菌の染色体ＤＮＡ １０ｎｇを含むものであった。反応物は、最初に２５秒間９４℃に加熱し、サーモサイクラー装置［Ｉｄａｈｏ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ］を用いて１０秒間９４℃、１０秒間５５℃及び９０秒間７２℃のプログラムを３０サイクル行った。

【０３４５】

次いで、ＤＮＡフラグメントを１％アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピンーＸ スピンカラム［Ｃｏｓｔａｒ］で精製し、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ ＳＫ ＩＩ＋ーＴベクター［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］にクローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミドＤＮＡを調製し、適切な制限酵素で消化し、発現ベクターｐＭＣＴ６（発現されるタンパク質のＮー末端に加えられる８個のヒスチジン残基とフレームを合わせた）にサブクローンした。得られたクローンは、この後、シーケナーゼＤＮＡシーケンシングキットバージョン１．０［Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ．、合衆国］を用いるスーパーコイルＤＮＡ用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー［モデル３７３Ａ、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイタルシークエンスにより、シークエンスした。遺伝子の両鎖をシークエンスした。

【０３４６】

個々の抗原のクローニングには、以下の特異的な遺伝子プライマーを用いた：

ＣＦＰ７Ｂ：ｃｆＩＢのクローニングに用いたプライマー

【０３４７】

【表３２】

| | | |
|---|---|---|
| CFP7B-F: | CTGAGATCTAGAATGCCACAGGGAACTGTG | (SEQ ID NO: 160 |
| CFP7B-R: | TCTCCCGGGGGTAACTCAGAGCGAGCGGAC | (SEQ ID NO: 161 |

ＣＦＰ７ＢーＦ及びＣＦＰ７ＢーＲは、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＳｍａＩ部位をそれぞれ生じる。

ＣＦＰ１０Ａ：ｃｆｐ１０Ａのクローニングに用いたプライマー：

【０３４８】

【表３３】

| | | |
|---|---|---|
| CFP10A-F: | CTGAGATCTATGAACGTCACCGTATCC | (SEQ ID NO: 162) |
| CFP10A-R: | TCTCCCGGGGCTCACCCACCGGCCACG | (SEQ ID NO: 163) |

ＣＦＰ１０ＡーＦ及びＣＦＰ１０ＡーＲは、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＳｍａＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３４９】

ＣＦＰ１１：ｃｆｐ１１のクローニングに用いたプライマー：

【０３５０】

【表３４】

| | | |
|---|---|---|
| CFP11-F: | CTGAGATCTATGGCAACACGTTTTATGACG | (SEQ ID NO: 164) |
| CFP11-R: | CTCCCCGGGTTAGCTGCTGAGGATCTGCTH | (SEQ ID NO: 165) |

ＣＦＰ１１ーＦ及びＣＦＰ１１ーＲは、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＳｍａＩ部位をそれぞれ生じる。

【０３５１】
ＣＦＰ３０Ｂ：ｃｆｐ３０Ｂのクローニングに用いたプライマー：
【０３５２】
【表３５】

| | | |
|---|---|---|
| CFP30B-F: | CTGAAGATCTATGCCCAAGAGAAGCGAATAC | (SEQ ID NO: 166) |
| CFP30B -R: | CGGCAGCTGCTAGCATTCTCCGAATCTGCCG | (SEQ ID NO: 167) |

ＣＦＰ３０Ｂ－Ｆ及びＣＦＰ３０Ｂ－Ｒは、ｐＭＣＴ６でのクローニングに用いられるＢｇｌＩＩ及びＰｖｕＩＩ部位をそれぞれ生じる。
【０３５３】
ＣＦＰ７Ｂ、ＣＦＰ１０Ａ、ＣＦＰ１１、ＣＦＰ３０Ｂの組換えタンパク質の発現／精製
組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。アンピシリン１００μｇ／ｍｌを含有するＬＢ－培地１１を、組換えｐＭＴＣ６プラスミドを有するＸＬ－１　Ｂｌｕｅ細胞の一晩培養液１０ｍｌに接種した。培養は、$ＯＤ_{６００}$が０．５の密度に達するまで３７℃で振盪した。この後、最終濃度が１ｍＭになるようにＩＰＴＧを加え、さらに４時間、培養した。細胞を回収して１ｘ超音波処理緩衝液＋８Ｍユレアに再懸濁し、パルス間で３０秒停止して、５ｘ３０秒、超音波処理した。
【０３５４】
遠心分離後、再懸濁したタロン樹脂［Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，ＰａｌｏＡｌｔｏ、合衆国］を２５ｍｌ含むカラムに溶解物を用いた。製品に記載されているようにしてカラムを洗浄し、溶出した。
【０３５５】
溶出後、全画分（各１．５ｍｌ）を、マイティ・スモール［Ｈｏｅｆｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、合衆国］システムを用いるＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析に付し、タンパク質濃度を２８０ｎｍで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）中の３Ｍユレアに透析した。透析したタンパク質は、６ｍｌのＲｅｓｏｕｒｃｅ－ＱカラムをＦＰＬＣ［Ｐｈａｒｍａｃｉａ、スウェーデン］でさらに精製し、０～１ＭのＮａＣｌの線状勾配で溶出した。画分はＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析し、タンパク質濃度は$ＯＤ_{２８０}$で予測した。タンパク質含有画分をプールし、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ緩衝液（ｐＨ８．５）に透析した。
【０３５６】
最後に、タンパク質濃度及びＬＰＳ含量は、それぞれＢＣＡ［Ｐｉｅｒｃｅ、オランダ］及びＬＡＬ［Ｅｎｄｏｓａｆｅ，Ｃｈａｒｌｅｓｔｏｎ、合衆国］試験で測定した。
【０３５７】
実施例４：ＣＦＰ２６（ＭＰＴ５１）発現遺伝子のクローニングプローブの合成及びデザイン
オリゴヌクレオチドプライマーは、ＤＮＡシンセサイザー［Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｒｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，Ｃａ，ＡＢＩ－３９１，ＰＣＲモード］で自動合成し、脱阻害し、エタノール沈殿で精製した。
【０３５８】
Ｏｈａｒａら（１９９５）により記載されているｍｐｂ５１のヌクレオチド配列に基づいて、３つのオリゴヌクレオチドを合成した（表３）。オリゴヌクレオチドは、５’末端と３’末端にＥｃｏＲＩ制限酵素部位を含むように設計し、後者によってサブクローニングを可能にした。
【０３５９】
ＭＰＴ５１のヌクレオチド配列（図５及びＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１）に基づいて、さらに４つのオリゴヌクレオチドを合成した。ＰＣＲ研究にはプライマーの４つの組み合わせを用いた。

【０３６０】
ＤＮＡクローニングとＰＣＲ技術
ＤＮＡの調製と処理には、標準的な方法を用いた［Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９］。遺伝子ｍｐｔ５１は、前述のとおりポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術を用いて結核菌Ｈ３７Ｒｖの染色体ＤＮＡからクローンした［ＯｅｔｔｉｎｇｅｒとＡｎｄｅｒｓｅｎ、１９９４］。ＰＣＲ産物は、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ＋［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］にクローンした。
【０３６１】
ｍｐｔ５１のクローニング
遺伝子、つまりＭＰＴ５１のシグナル配列とシャインダルガノ領域は、ＰＣＲ技術を用いてｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ＋に９５２ｂｐ及び８１５ｂｐの２つのフラグメントとしてクローンし、ｐＴＯ５２及びｐＴＯ５３とした。
【０３６２】
ＤＮＡシーケンシング
ＭＰＴ５１のシャインダルガノ配列、シグナルペプチド配列及び構造遺伝子を含む９５２ｂｐの結核菌Ｈ３７Ｒｖ　ＰＣＲフラグメントがクローンされたヌクレオチド配列ｐＴＯ５２及びＭＰＴ５１の構造遺伝子を含む８１５ｂｐのＰＣＲフラグメントがクローンされたヌクレオチド配列ｐＴＯ５３は、シーケナーゼＤＮＡシーケンシングキットバージョン１．０［Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｒｐ．，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ，ＯＨ］を用いてスーパーコイルＤＮＡ用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー［モデル３７３Ａ、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシークエンスにより決定した。ＤＮＡの両鎖をシークエンスした。
【０３６３】
ｐＴＯ５２とｐＴＯ５３のヌクレオチド配列及び推測されるアミノ酸配列は、図５に示す。ＤＮＡ配列は、４５～４７の位置のＡＴＧコドンで開始し、９４２～９４４の位置の終止コドン（ＴＡＡ）で終わるオープンリーディングフレームを含んだ。最初の３３コドンのヌクレオチド配列は、シグナル配列をエンコードしているものと推測された。精製ＭＰＴ５１［Ｎａｇａｉら、１９９１］の公知のＮ－末端アミノ酸配列（Ａｌａ－Ｐｒｏ－Ｔｙｒ－Ｇｌｕ－Ａｓｎ）及びシグナルペプチドの特徴に基づくと、シグナルペプチダーゼ認識配列（Ａｌａ－Ｘ－Ａｌａ）［ｖｏｎ　Ｈｅｉｊｎｅ，１９８４］は、１４４位置の成熟タンパク質のＮ－末端領域の前に位置しているものと考えられる。したがって、結核菌Ｈ３７Ｒｖ由来のＭＰＴ５１をエンコードする構造遺伝子ｍｐｔ５１は、図５に示す配列の１４４～９４５の位置に位置していることが分かった。ｍｔ５１のヌクレオチド配列は、Ｏｈａｒａら（１９９５）により記載されているＭＰＢ５１のヌクレオチド配列と比較してヌクレオチドが１つ異なった（図５）。ｍｐｔ５１の７８０の位置では、グアニンをアデニンに置換していることが分かった。推定されるアミノ酸配列によれば、この変化は最初の位置のコドンで生じ、アミノ酸をアラニンからスレオニンに変える。したがって、ｍｐｔ５１は８０１ｂｐからなること、及び推定されるアミノ酸配列は、分子量が２７，８４２の２６６残基を含むこと、ＭＰＴ５１はＭＰＢ５１と９９．８％の同一性を示すことが結論づけられる。
【０３６４】
ｍｐｔ５１のサブクローニング
ＭＰＴ５１をエンコードする遺伝子のコード領域のみが発現されるように、ＥｃｏＲＩ部位をｍｐｔ５１の最初のコドンの５’に隣り合うように設計し、３’末端の停止コドンの直後に挿入した。
【０３６５】
組換えプラスミドｐＴＯ５３のＤＮＡは、ＥｃｏＲＩ部位で切断した。アガロースゲルから８１５ｂｐのフラグメントを精製し、ｐＭＡＬ－ｃＲ１発現ベクター［Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ］のＥｃｏＲＩ部位にサブクローンし、ｐＴＯ５４とした。

融合遺伝子を含有するベクターＤＮＡは、ＤＮＡ操作の標準的な方法で大腸菌ＸＬ－１Ｂｌｕｅの形質転換に用いた。

【０３６６】

融合遺伝子のエンドポイントは、ＤＮＡシーケンシングの項に記載したようにジデオキシ鎖末端法で決定した。ＤＮＡの両鎖をシークエンスした。

【０３６７】

rＭＰＴ５１の調整及び精製

組換え抗原は、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓの指示にしたがって調製した。要約すると、アンピシリン５０μｇ／ｍｌ及びテトラサイクリン１２．５μｇ／ｍｌを含むルリアーベルタニ培地にｐＴＯ５４プラスミドを有する大腸菌のシングルコロニーを接種し、２ｘ１０$^{8}$細胞／ｍｌまで３７℃で成長させた。次いで、最終濃度が０．３ｍＭになるようにイソプロピルーβ－Ｄ－チオガラクトシド（ＩＰＴＧ）を加え、さらに２時間成長させた。新しいカラム緩衝液（Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ　２０ｍＭ（ｐＨ７．４）、ＮａＣｌ　２００ｍＭ、ＥＤＴＡ　１ｍＭ、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）１ｍＭ）にペレット化した細菌を－２０℃で一晩置き、４℃で溶かした後、３０分氷上でリゾチーム１ｍｇ／ｍｌとインキュベーションし、超音波処理（２０秒間隔、１０秒間２０回）した。４℃で３０分、９，０００ｘｇで遠心分離後、マルトース結合タンパク質－ＭＰＴ５１融合タンパク質（ＭＰＢ－ｒＭＰＴ５１）を、アミロース樹脂カラムのアフィニティクロマトグラフィーで粗抽出物から精製した。ＭＰＢ－ｒＭＰＴ５１は、アミロースに結合する。カラムを何度も洗浄した後、融合タンパク質をマルトース１０ｍＭで溶出した。アリコートの画分を１０％　ＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析した。重要な融合タンパク質を含む画分をプールし、生理食塩水に何度も透析した。

【０３６８】

タンパク質濃度は、Ｐｉｅｒｃｅ［Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ］のＢＣＡ法で測定した。

【０３６９】

【表３６】

表3.　mpt51ヌクレオチド[a]の配列

| 方向及びオリゴヌクレオチド | 配列 (5'→3') | 位置[b] (ヌクレオチド) |
|---|---|---|
| センス | | |
| MPT51-1 | CTCGAATTCGCCGGGTGCACACAG (SEQ ID NO: 28) | 6 - 21 (SEQ ID NO: 41) |
| MPT51-3 | CTCGAATTCGCCCCATACGAGAAC (SEQ ID NO: 29) | 143 - 158 (SEQ ID NO: 41) |
| MPT51-5 | GTGTATCTGCTGGAC (SEQ ID NO: 30) | 228 - 242 (SEQ ID NO: 41) |
| MPT51-7 | CCGACTGGCTGGCCG (SEQ ID NO: 31) | 418 - 432 (SEQ ID NO: 41) |
| アンチセンス | | |
| MPT51-2 | GAGGAATTCGCTTAGCGGATCGCA (SEQ ID NO: 32) | 946 - 932 (SEQ ID NO: 41) |
| MPT51-4 | CCCACATTCCGTTGG (SEQ ID NO: 33) | 642 - 628 (SEQ ID NO: 41) |
| MPT51-6 | GTCCAGCAGATACAC (SEQ ID NO: 34) | 242 - 228 (SEQ ID NO: 41) |

[a]　オリゴヌクレオチドＭＰＴ５１－１及びＭＰＴ５１－２、ＭＰＢ５１のヌクレオチド配列［Ｏｈａｒａら、１９９５］から構築した。他のオリゴヌクレオチドは、この研究で報告したｍｐｔ５１から得られるヌクレオチド配列に基づいて構築した。下線のヌクレオチド（ｎｔ）は、ＭＰＢ／Ｔ５１のヌクレオチド配列には含まれない。

【０３７０】

[b]　示している位置は、プライマーの下線を付していない部分であって、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１に示すヌクレオチド配列に相当する。

【０３７１】

発現ベクターｐＭＳＴ２４でのｍｐｔ５１のクローニング

ＰＣＲフラグメントは、ＭＰＴ５１－ＦとＭＰＴ５１－Ｒのプライマーの組み合わせを用いてｐＴＯ５２から産生した（表４）。ＢａｍＨＩ部位は、ＭＰＴ５１をエンコードする遺伝子のコード領域のみが発現されるようにｍｐｔ５１の最初のコドンの５’に隣接して設計し、３’末端の停止コドンの直後にＮｃｏＩ部位を導入した。

【０３７２】

ＰＣＲ産物は、ＢａｍＨＩ及びＮｃｏＩ部位で切断した。８１１ｂｐのフラグメントをアガロースゲルから精製し、ｐＭＳＴ２４発現ベクターのＢａｍＨＩ部位及びＮｃｏＩ部位にサブクローンし、ｐＴＯ８６とした。ＤＮＡ操作の標準的な方法で、融合遺伝子を含有するベクターＤＮＡを大腸菌ＸＬ－１　Ｂｌｕｅの形質転換に用いた。

【０３７３】

完全な融合遺伝子のヌクレオチド配列は、ＤＮＡシーケンシングの項に記載したようにジデオキシ鎖末端法で決定した。ＤＮＡの両鎖をシークエンスした。

【０３７４】

ｒＭＰＴ５１の調整及び精製

組換え抗原は、アンピシリン５０μｇ／ｍｌ及びテトラサイクリン１２．５μｇ／ｍｌを含むルリアーベルタニ培地に接種したプラスミドｐＴＯ８６を有する大腸菌のシングルコロニーから調製し、２ｘ１０$^{8}$細胞／ｍｌまで３７℃で成長させた。

【０３７５】

次いで、最終濃度が１ｍＭになるようにイソプロピル－β－Ｄ－チオガラクトシド（ＩＰＴＧ）を加え、さらに2時間成長させた。ＢＣ　１００／２０緩衝液（ＫＣｌ１００ｍＭ、イミダゾール２０ｍＭ、Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　２０ｍＭ（ｐＨ７．９）、グリセロール２０％）にペレット化した細菌を再懸濁した。細胞は、超音波処理（２０秒間隔、１０秒間２０回）で破壊した。４℃で３０分、９，０００ｘｇで遠心分離後、不溶物を８Ｍユレアを有するＢＣ　１００／２０緩衝液に再懸濁し、超音波処理し、上記のように遠心分離した。６ｘＨｉｓ　ｔａｇ－ＭＰＴ５１融合タンパク質（Ｈｉｓ－ｒＭＰＴ５１）は、Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂カラム［Ｑｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ、ドイツ］でのアフィニティクロマトグラフィーで精製した。Ｈｉｓ－ｒＭＰＴ５１は、Ｎｉ－ＮＴＡに結合する。カラムを何度も洗浄した後、８Ｍユレアを有するＢＣ　１００／４０緩衝液（ＫＣｌ　１００ｍＭ、イミダゾール４０ｍＭ、Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　２０ｍＭ（ｐＨ７．９）、グリセロール２０％）及び８Ｍユレアを有するＢＣ　１０００／４０緩衝液（ＫＣｌ　１０００ｍＭ、イミダゾール４０ｍＭ、Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　２０ｍＭ（ｐＨ７．９）、グリセロール２０％）で融合タンパク質を溶出した。Ｈｉｓ－ｒＭＰＴ５１は、Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ　１０ｍＭ（ｐＨ８．５）、３Ｍユレアに透析し、０～１ＭのＮａＣｌの線状勾配でＴｒｉｓ／ＨＣｌ　１０ｍＭ（ｐＨ８．５）、３Ｍユレアを用いるアニオン交換カラム（Ｍｏｎｏ　Ｑ）でタンパク質高速液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）［Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｕｐｐｓａｌａ，スウェーデン］を用いて精製した。ｒＭＰＴ５１含有画分をプールし、次いで使用前にＨｅｐｅｓ　２５ｍＭ（ｐＨ８．０）に透析した。

【０３７６】

タンパク質濃度は、Ｐｉｅｒｃｅ［Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ］のＢＣＡ法で測定した。リポポリサッカライド（ＬＰＳ）含量はリムルス変形細胞溶解試験（ＬＡＬ）で決定した。ｒＭＰＴ５１は０．００４ｎｇ／μｇ未満であった。この濃度は、細胞活性に影響がなかった。

【０３７７】

【表３７】

表4. *mpt51*オリゴヌクレオチドの配列

| 方向及び オリゴヌクレオチド | 配列 (5' → 3') | 位置 (nt) |
|---|---|---|
| センス | | |
| MPT51-F | CTCGGATCCTGCCCCATACGAGAACCTG | 139 - 156 |
| アンチセンス | | |
| MPT51-R | CTCCCATGGTTAGCGGATCGCACCG | 939 - 924 |

【０３７８】

実施例４Ａ：ＥＳＡＴ６－ＭＰＴ５９及びＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ６ハイブリッドのクローニング

ＥＳＡＴ６－ＭＰＴ５９及びＭＰＴ９－ＥＳＡＴ６－Ａ融合物のバックグランド

ＥＳＡＴ－６は免疫原性であるが、免疫化の際に一貫した結果を得るために補助するのは比較的難しいことが、幾つかの研究により立証されている。抗原での免疫化後にＥＳＡＴ－６の生体外認識を見出すことは、結核菌に対する免疫記憶を回復するあいだに見出される抗原の強力な認識と比較すると非常に困難である。切断型（ｔｒｕｎｃａｔｅｄ ｖｅｒｓｉｏｎ）のＳＴ－ＣＦに見られるＥＳＡＴ－６は、１～１５アミノ酸か欠失されている。欠損は、Ｃ５７ＢＬ／６ｊマウスで認識される主要なＴ－細胞エピトープを含む［Ｂｒａｎｄｔら、１９９６］。この結果、ＥＳＡＴ－６は、ＳＴＣＦでＮ－末端処理されているか、又はタンパク質加水分解で分解される。

【０３７９】

免疫原としてＥＳＡＴ－６を最適化するために、ＥＳＡＴ－６と別の主要なＴ細胞抗原ＭＰＴ５９の融合遺伝子が構築された。２つの異なる構築物、ＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ－６（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１７２）及びＥＳＡＴ－６－ＭＰＴ５９（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１７３）がつくられた。最初のハイブリッドで、ＥＳＡＴ－６はＭＰＴ５９によりＮ－末端が保護され、後者では、２つの優勢なＴ－細胞抗原の融合で相乗効果の生じることが推測される。

【０３８０】

ＥＳＡＴ６－ＭＰＴ５９及びＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ６ハイブリッドをエンコードする遺伝子は、ハイブリッドタンパク質を大腸菌で組換え発現するように、特異的な遺伝子プライマーでのＰＣＲ増幅により発現ベクターｐＭＣＴ６にクローンした。

【０３８１】

ＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ６ハイブリッドの構築

クローニングは、３工程で行った。最初に、ハイブリッドの２成分をエンコードする遺伝子、ＥＳＡＴ６及びＭＰＴ５９を以下のプライマー構築物を用いてＰＣＲ増幅した。

ＥＳＡＴ６：

【０３８２】

【表３８】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-4: | GGCGCCGGCAAGCTTGCCATGACAGAGCAGCAGTGG | (SEQ ID NO: 132) |
| OPBR-28: | CGAACTCGCCGGATCCCGTGTTTCGC | (SEQ ID NO: 133) |

ＯＰＢＲ－４及びＯＰＢＲ－２８は、それぞれＨｉｎｄＩＩＩ及びＢａｍＨＩ部位を生じる。

【０３８３】
ＭＰＴ５９：
【０３８４】
【表３９】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-48: | GGCAACCGCGAGATCTTTCTCCCGGCCGGGGC | (SEQ ID NO: 134) |
| OPBR-3: | GGCAAGCTTGCCGGCGCCTAACGAACT | (SEQ ID NO: 135) |

ＯＰＢＲ－４８及びＯＰＢＲ－３は、それぞれＢｇｌＩＩ及びＨｉｎｄＩＩＩを生じる。さらに、ＯＰＢＲ－３は、ＭＰＴ５９の停止コドンを欠失している。
【０３８５】
ＰＣＲ反応物は、１０μｌの反応容量に４つの各ヌクレオチド２５０ｍＭ［Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ］、ＢＳＡ ０．５ｍｇ／ｍｌ［ＩｇＧ ｔｅｃｈｎｌｏｇｙ］、１％ ＤＭＳＯ［Ｍｅｒｃｋ］、各プライマー５ｐｍｏｌ及びＴａｑ＋ＤＮＡポリメラーゼ０．５ユニット［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］を加えた１ｘ低塩Ｔａｑ＋緩衝液［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］に結核菌の染色体ＤＮＡ １０ｎｇを含むものであった。反応物は、最初に２５秒間９４℃に加熱し、サーモサイクラー装置［Ｉｄａｈｏ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ］を用いて１０秒間９４℃、１０秒間５５℃及び９０秒間７２℃のプログラムを３０サイクル行った。
【０３８６】
次いで、ＤＮＡフラグメントを１％アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピンーＸ スピンカラム［Ｃｏｓｔａｒ］で精製した。２つのＰＣＲフラグメントをＨｉｎｄＩＩＩで消化し、結合した。ＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ６をエンコードする結合したＰＣＲフラグメントのＰＣＲ増幅は、プライマーＯＰＢＲ－４８及びＯＰＢＲ－２８を用いて行った。ＰＣＲ反応は最初に２５秒間９４℃に加熱し、３０秒間９４℃、３０秒間５５℃及び９０秒間７２℃のプログラムを３０サイクル行った。得られたＰＣＲフラグメントをＢｇｌＩＩとＢａｍＨＩで消化し、発現ベクターｐＭＣＴ６にクローン（発現されるハイブリッドタンパク質のＮ－末端に加えられる８個のヒスチジンとフレームを合わせた）した。得られたクローンは、この後シーケナーゼＤＮＡシーケンシングキットバージョン１．０［Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ．、合衆国］を用いるスーパーコイルＤＮＡ用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー［モデル３７３Ａ、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ］と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシークエンスによりシークエンスした。ＤＮＡの両鎖をシークエンスした。
【０３８７】
ＥＳＡＴ６－ＭＰＴ５９ハイブリッドの構築
ＥＳＡＴ６－ＭＰＴ５９ハイブリッドの構築は、ハイブリッドＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ６に記載しているようにして行った。構築及びクローニングに用いたプライマーは、以下のとおりであった：
ＥＳＡＴ６：
【０３８８】
【表４０】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-75: | GGACCCAGATCTATGACAGAGCAGCAGTGG | (SEQ ID NO: 136) |
| OPBR-76: | CCGGCAGCCCCGGCCGGGAGAAAAGCTTTGCGAACATCCCAGTGACG | (SEQ ID NO: 137) |

ＯＰＢＲ－７５及びＯＰＢＲ－７６は、それぞれＢｇｌＩＩ及びＨｉｎｄＩＨ部位を生じる。
【０３８９】
さらに、ＯＰＢＲ－７６は、ＥＳＡＴ６の停止コドンを欠失している。
【０３９０】

ＭＰＴ５９：
【０３９１】
【表４１】

| | | |
|---|---|---|
| OPBR-77: | GTTCGCAAAGCTTTTCTCCCGGCCGGGGCTGCCGGTCGAGTACC | (SEQ ID NO: 138) |
| OPBR-18: | CCTTCGGTGGATCCCGTCAG | (SEQ ID NO: 139) |

ＯＰＢＲ－７７及びＯＰＢＲ－１８は、それぞれＨｉｎｄＩＩＩ及びＢａｍＨＩ部位を生じる。
【０３９２】
ＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ６及びＥＳＡＴ６－ＭＰＴ５９ハイブリッドタンパク質の発現／精製
組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。各タンパク質について、アンピシリン１００μｇ／ｍｌを含有するＬＢ－培地１１を、組換えｐＭＴＣ６プラスミドを有するＸＬ－１Ｂｌｕｅ細胞の一晩培養液１０ｍｌに接種した。培養は、$OD_{600}$が０．４～０．６の密度に達するまで３７℃で振盪した。
【０３９３】
この後、最終濃度が１ｍＭになるようにＩＰＴＧを加え、さらに４～１６時間、培養した。
【０３９４】
細胞を回収して１ｘ超音波処理緩衝液＋８Ｍユレアに再懸濁し、パルスの間に３０秒停止して、５ｘ３０秒、超音波処理した。
【０３９５】
遠心分離後、再懸濁したタロン樹脂［Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，ＰａｌｏＡｌｔｏ、合衆国］を２５ｍｌ含むカラムに溶解物を用いた。製品に記載されているようにカラムを洗浄し、溶出した。
【０３９６】
溶出後、全画分（各１．５ｍｌ）を、マイティ・スモール［Ｈｏｅｆｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、合衆国］システムを用いるＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析に付し、タンパク質濃度を２８０ｎｍで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５）中の３Ｍユレアに透析した。透析したタンパク質は、６ｍｌのＲｅｓｏｕｒｃｅ－Ｑカラムを用いてＦＰＬＣ［Ｐｈａｒｍａｃｉａ、スウェーデン］でさらに精製し、０～１ＭのＮａＣｌの線状勾配で溶出した。画分はＳＤＳ－ＰＡＧＥで分析し、タンパク質濃度は$OD_{280}$で予測した。タンパク質含有両分をプールし、２５ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ緩衝液（ｐＨ８．５）に透析した。
【０３９７】
最後に、タンパク質濃度及びＬＰＳ含量を、それぞれＢＣＡ［Ｐｉｅｒｃｅ、オランダ］及びＬＡＬ［Ｅｎｄｏｓａｆｅ，Ｃｈａｒｌｅｓｔｏｎ、合衆国］試験で測定した。
【０３９８】
ＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ６融合タンパク質の生物活性は、実施例６Ａに記載する。
【０３９９】
実施例５：２ＤＥシステムでの精製抗原のマッピング
精製抗原を特徴づけるために、二次元電気泳動（２ＤＥ）参照システムで、それらをマッピングした。これは、等電点フォーカス、次いでポリアクリルアミドゲル電気泳動での大きさにしたがった分別で分離されるＳＴ－ＣＦタンパク質を含む銀染色ゲルからなる。２ＤＥは、Ｈｏｃｈｓｔｒａｓｓｅｒら（１９８９）にしたがって行った。ＳＴ－ＣＦ８５μｇは、両性電解質のバイオリット４－６（２部）とバイオリット５－７（３部）［ＢｉｏＲａｄ］を含む等電点フォーカスチューブにアプライした。一次元は、ユレア、界面活性剤ＣＨＡＰＳ及び還元剤ＤＴＴの存在下、１８時間４００Ｖ及び２時間８００Ｖでア

クリルアミド／ピペラジンジアクリルアミドチューブゲルで行った。１０～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥの二次元は１８時間１００Ｖで行い、銀染色した。２ＤＥ参照ゲルでのＣＦＰ７、ＣＦＰ７Ａ、ＣＦＰ７Ｂ、ＣＦＰ８Ａ、ＣＦＰ８Ｂ、ＣＦＰ９、ＣＦＰ１１、ＣＦＰ１６、ＣＦＰ１７、ＣＦＰ１９、ＣＦＰ２０、ＣＦＰ２１、ＣＦＰ２２、ＣＦＰ２５、ＣＦＰ２７、ＣＦＰ２８、ＣＦＰ２９、ＣＦＰ３０Ａ、ＣＦＰ５０及びＭＰＴ５１の同定は、精製抗原を用いるか、用いないで、ＳＴ－ＣＦとの精製抗原のスポットパターンを比較して行った。分析用２ＤＥソフトウエアシステム［Ｐｈｏｒｅｔｉｘ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，英国］を用いて、スポットを図６で同定した。ＭＰＴ５１とＣＦＰ２９の位置は、Ｍａｂの抗ＣＦＰ２９及びＨＢＴ４を用いる２ＤＥゲルのウェスタンブロットで確認した。

【０４００】

実施例６：精製抗原の生物活性ＴＢ感染マウスモデルでのＩＦＮ－γの誘導

ＴＢに対する免疫記憶マウスモデル（実施例１に記載）での精製抗原の認識を研究した。表５に示す結果は、３つの実験について代表的な結果である。

【０４０１】

非常に高度なＩＦＮ－γの応答は、ＳＴ－ＣＦとほぼ同じレベルの高さでＣＦＰ１７とＣＦＰ２１の２つの抗原により誘導された。

【０４０２】

【表４２】

表5

天然抗原での刺激後に結核菌で再感染させた後で単離した C57BL/6J マウス由来の脾臓記憶エフェクター細胞からのIFN-γの放出

| 抗原[a] | IFN-γ (pg/ml)[b] |
|---|---|
| ST-CF | 12564 |
| CFP7 | ND[d] |
| CFP9 | ND |
| CFP17 | 9251 |
| CFP20 | 2368 |
| CFP21 | 10732 |
| CFP22 + CFP25[c] | 5342 |
| CFP26 (MPT51) | ND |
| CFP28 | 2818 |
| CFP29 | 3700 |

[a]　ＳＴ－ＣＦは５μｇ／ｍｌの濃度で試験し、個々の抗原は２μｇ／ｍｌの濃度で試験した。

【０４０３】

[b]　再試験から４日後に、３匹のマウス由来の細胞のプールを試験した。
結果は、デュプリケート値の平均として示す。デュプリケート培養の差は、平均の１５％未満である。抗原なしで培養した培養液のＩＦＮ－γ放出は、３９０ｐｇ／ｍｌであった

。
【０４０４】
[c] ＣＦＰ２２及びＣＦＰ２５のプールを試験した。
【０４０５】
[d] ＮＤ、測定不能
【０４０６】
ＴＢ感染したモルモットでの皮膚反応試験
精製タンパク質の皮膚活性試験は、結核菌に感染したモルモットで試験した。
【０４０７】
ＰＢＳ ０．２ｍｌ中に１ｘ１０$^{4}$ＣＦＵの結核菌Ｈ３７Ｒｖで耳の静脈を通して一群のモルモットを感染させた。４週間後に皮膚試験を行い、注射から２４時間後に紅斑の直径を測定した。
【０４０８】
表６及び６ａから分かるように、全抗原が、顕著な遅延型過度感作（ＤＴＨ）反応を誘導した。
【０４０９】
【表４３】

表6

天然抗原での刺激後に、1x10$^{4}$ CFUの結核菌に感染したモルモットでのDTH紅斑の直径

| 抗原[a] | 皮膚反応 (mm)[b] |
|---|---|
| 対照 | 2.00 |
| PPD[c] | 15.40 (0.53) |
| CFP7 | ND[e] |
| CFP9 | ND |
| CFP17 | 11.25 (0.84) |
| CFP20 | 8.88 (0.13) |
| CFP21 | 12.44 (0.79) |
| CFP22 + CFP25[d] | 9.19 (3.10) |
| CFP26 (MPT51) | ND |
| CFP28 | 2.90 (1.28) |
| CFP29 | 6.63 (0.88) |

示した値は、４匹の動物の紅斑直径の平均である。ＳＥＭは括弧に示す。ＰＰＤとＣＦＰ２９については、値は、１０匹の動物の紅斑直径の平均である。
【０４１０】
[a] 抗原は、ＣＦＰ２９を０．８μｇの濃度で試験した以外は、０．１μｇの濃度で試験した。
【０４１１】
[b] 皮膚反応は、皮内注射から２４時間後の紅斑をｍｍで測定する。

【０４１２】
[c] ＰＰＤ１０ＴＵを用いた。
【０４１３】
[d] ＣＦＰ２２とＣＦＰ２５のプールを試験した。
【０４１４】
[e] ＮＤ、測定不能
【０４１５】
これらの分析とともに、同定された抗原の多くは生物活性が高く、異なる動物モデルでのＴＢ感染のあいだに認識されることが示された。
【０４１６】
【表４４】

表6a

1x10$^4$ CFUの結核菌に感染した異系交配モルモットでの組換え抗原のDTH紅斑の直径

| 抗原[a] | 皮膚反応 (mm)[b] | |
|---|---|---|
| 対照 | 2.9 | (0.3) |
| PPD[c] | 14.5 | (1.0) |
| CFP 7a | 13.6 | (1.4) |
| CFP 17 | 6.8 | (1.9) |
| CFP 20 | 6.4 | (1.4) |
| CFP 21 | 5.3 | (0.7) |
| CFP 25 | 10.8 | (0.8) |
| CFP 29 | 7.4 | (2.2) |
| MPT 51 | 4.9 | (1.1) |

対照、ＰＰＤとＣＦＰ２９については、値は、８匹の動物の紅斑直径の平均である。
【０４１７】
[a] 抗原は、１．０μｇの濃度で試験した。
【０４１８】
[b] 皮膚反応試験は、皮内注射から２４時間後の紅斑をｍｍで測定する。
【０４１９】
[c] ＰＰＤ　１０ＴＵを用いた。
【０４２０】
精製組換え抗原の生物活性
ＴＢ感染したマウスモデルでのインターフェロン－γの誘導
一次感染：８～１２週齢のメスのマウスＣ５７ＢＬ／６ｊ（Ｈ－２$^{b}$）、ＣＢＡ／Ｊ（Ｈ－２$^{k}$）、ＤＢＡ．２（Ｈ－２$^{d}$）及びＡ．ＳＷ（Ｈ－２$^{s}$）［Ｂｏｍｈｏｌｔｅｇａａｒｄ，Ｒｙ］は、側方（ｌａｔｅｒａｌ）の尾の静脈を介して、０．１ｍｌ容量のＰＢＳに懸濁した結核菌５ｘ１０$^{4}$の接種物で静脈感染させた。感染から１４日後に動物を屠殺し、脾臓細胞を単離し、組換え抗原の認識について試験した。
【０４２１】
表７から分かるように、組換え抗原ｒＣＦＰ７Ａ、ｒＣＦＰ１７、ｒＣＦＰ２１、ｒＣ

ＦＰ２５及びｒＣＦＰ２９は、全てＳＴ－ＣＦに匹敵するレベルでマウスの少なくとも２つの種で認識された。ｒＭＰＴ５１とｒＣＦＰ７は、ＳＴ－ＣＦの刺激後に検出された応答のわずか１／３に相当するレベルで、それぞれ１又は２つの種で認識されるにすぎなかった。抗原ｒＣＦＰ２０とｒＣＦＰ２２は、いずれも４つのマウスの種のいずれによっても認識されなかった。

【０４２２】

記憶応答：８～１２週齢のメスのマウスＣ５７ＢＬ／６ｊ（Ｈ－２$^{b}$）［Ｂｏｍｈｏｌｔｅｇａａｒｄ，Ｒｙ］は、側方の尾の静脈を介して、０．１ｍｌ容量のＰＢＳに懸濁した結核菌５ｘ１０$^{4}$の接種物で静脈感染させた。感染から１ヵ月後に、飲料水中のイソニアジド［Ｍｅｒｃｋ ａｎｄ Ｃｏ．，Ｒａｈｗａｙ，ＮＪ］及びリファブチン（ｒｉｆａｂｕｔｉｎ）［Ｆａｒｍａｔａｌｉａ Ｃａｒｌｏ Ｅｒｂａ，ミラノ、イタリア］でマウスを２ヶ月間、処理した。実験に用いる前に、マウスを４～６ヵ月間休養させた。免疫記憶の回復研究のために、１ｘ１０$^{5}$細菌の接種物で動物を静脈感染させ、感染から４日後に屠殺した。脾臓細胞を単離し、組換え抗原の認識について試験した。

【０４２３】

表８から明らかであるように、ｒＣＦＰ１７、ｒＣＦＰ２１及びｒＣＦＰ２５での刺激後のＩＦＮ－γの放出は、ＳＴ－ＣＦで刺激した脾臓細胞で見られるのと同じレベルだった。ｒＣＦＰ７、ｒＣＦＰ７Ａ及びｒＣＦＰ２９での刺激は、全てＳＴ－ＣＦで見られた応答の１／３に満たないＩＦＮ－γを生じた。ｒＣＦＰ２２は、ＩＦＮ－γ産生細胞により認識されなかった。抗原のいずれも、天然のマウスでのＩＦＮ－γの放出を刺激しなかった。さらに、抗原のいずれも細胞培養液に毒性でなかった。

【０４２４】

【表４５】

表7 TB一次感染でのT細胞の応答

| 名称 | c57BL/6J(H2$^{b}$) | DBA.2(H2$^{d}$) | CBA/J(H2$^{k}$) | A.SW(H2$^{s}$) |
|---|---|---|---|---|
| rCFP7 | + | + | − | − |
| rCFP7A | +++ | +++ | +++ | + |
| rCFP17 | +++ | + | +++ | + |
| rCFP20 | − | − | − | − |
| rCFP21 | +++ | +++ | +++ | + |
| rCFP22 | − | − | − | − |
| rCFP25 | +++ | ++ | +++ | + |
| rCFP29 | +++ | +++ | +++ | ++ |
| rMPT51 | + | − | − | − |

結核菌に対する免疫記憶の回復のあいだのマウスのＩＦＮ－γの放出

－：応答なし、＋：ＳＴ－ＣＦの１／３、＋＋：ＳＴ－ＣＦの２／３、＋＋＋：ＳＴ－ＣＦレベル

【０４２５】

【表４６】

表８ 免疫記憶動物でのＴ細胞の応答

| 名称 | 免疫記憶 |
|---|---|
| rCFP7 | + |
| rCFP7A | ++ |
| rCFP17 | +++ |
| rCFP21 | +++ |
| rCFP22 | − |
| rCFP29 | + |
| rCFP25 | +++ |
| rMPT51 | + |

結核菌の一次感染から１４日後のマウスのＩＦＮ－γの放出
－：応答なし、＋：ＳＴ－ＣＦの１／３、＋＋：ＳＴ－ＣＦの２／３、＋＋＋：ＳＴ－ＣＦレベル

【０４２６】

ヒトＴＢ患者及びＢＣＧ予防接種を受けたヒトでのインターフェロン－γの誘導ヒトドナー：ＰＢＭＣは、ＴＢ患者への暴露が知られていない健康なＢＣＧ予防接種を受けたドナーから、及び結核菌感染が培養又は顕微鏡で分かった患者から得た。血液サンプルは、診断から１～４ヶ月後にＴＢ患者から得た。

【０４２７】

リンパ球調製及び細胞培養：ＰＢＭＣは、リンホプレップ（Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ）［Ｎｙｃｏｍｅｄ、オスロ、ノルウェー］でヘパリン化した血液を勾配遠心分離により用時に単離した。細胞は、完全培地：ストレプトマイシン４０μｇ／ｍｌ、ペニシリン４０Ｕ／ｍｌ及びグルタミン０．０４ｍＭ／ｍｌ［全てＧｉｂｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｐａｉｓｌｅｙ，スコットランド］及び１０％の通常のヒトＡＢＯ血清（ＮＨＳ）［ｌｏｃａｌ ｂｌｏｏｄ ｂａｎｋ］を補足したＲＰＭＩ １６４０［Ｇｉｂｃｏ，Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，Ｎ．Ｙ．］で再懸濁した。細胞数と生存度は、トリパンブルー染色で測定した。培養は、マイクロタイタープレート［Ｎｕｎｃ，Ｒｏｓｋｉｌｄｅ，デンマーク］で２００μｌ中の２．５ｘ１０$^{5}$ ＰＢＭＣを用いて行い、最終濃度５μｇ／ｍｌで、抗原なし、ＳＴ－ＣＦ、ＰＰＤ（２．５μｇ／ｍｌ）；ｒＣＦＰ７、ｒＣＦＰ７Ａ、ｒＣＦＰ１７、ｒＣＦＰ２０、ｒＣＦＰ２１、ｒＣＦＰ２２、ｒＣＦＰ２５、ｒＣＦＰ２６、ｒＣＦＰ２９で刺激した。フィトヘマグルチニン１μｇ／ｍｌ［ＰＨＡ，Ｄｉｆｃｏ ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｄｅｒｔｏｉｔ，ＭＩ．］は、ポジティブコントロールとして用いた。サイトカインの検出のために、培養から５日後に上清を回収してプールし、－８０℃で使用するまで保存した。

【０４２８】

サイトカイン分析：インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）は、市場で入手可能なｍＡｂのペア［Ｅｎｄｏｇｅｎ］を用いる標準的なＥＬＩＳＡ技法で測定し、使用の指示に従って用いた。組換えＩＦＮ－γ［Ｇｉｂｃｏ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ］は、標準として用いた。アッセイについての検出レベルは、５０ｐｇ／ｍｌだった。デュプリケートのウェル間の変化は、平均の１０％を超えなかった。９人の個々のドナーの応答を表９に示す。

【０４２９】

表９から明らかであるように、ＩＦＮ－γの高レベルな放出は、幾つかの組換え抗原で刺激した後に得られる。ｒＣＦＰ７ａ及びｒＣＦＰ１７は、ほぼ全てのドナーでＳＴ－ＣＦに匹敵する応答を生じる。ｒＣＦＰ７は、ＢＣＧ予防接種した健康なドナーにより、おっとも強力に認識されるようである。ｒＣＦＰ２１、ｒＣＦＰ２５、ｒＣＦＰ２６及びｒＣＦＰ２９は、各群での中間的な応答と合わさった現象を生じるが、ｒＣＦＰ２０及びｒＣＦＰ２２により生じる応答は低い。

【０４３０】

表９．７人のＢＣＧ予防接種者及び組換え抗原を有する７人のＴＢ患者由来のヒト血液細胞の刺激から得られる結果の平均値。ＳＥ値は、各抗原について示す。

【０４３１】

ＳＴ－ＣＦ及びマイコバクテリウム・アビウム培養ろ液は、比較用に示す。

【０４３２】

【表４７】

対照、健常者、BCG予防接種者、公知のTB暴露なし

| ドナー： | no ag | PHA | PPD | STCF | CFP7 | CFP17 | CFP7A | CFP20 | CFP21 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 9564 | 6774 | 3966 | 7034 | 69 | 1799 | 58 | 152 |
| 2 | 48 | 12486 | 6603 | 8067 | 3146 | 10044 | 5267 | 29 | 6149 |
| 3 | 190 | 11929 | 10000 | 8299 | 8015 | 11563 | 8641 | 437 | 3194 |
| 4 | 10 | 21029 | 4106 | 3537 | 1323 | 1939 | 5211 | 1 | 284 |
| 5 | 1 | 18750 | 14209 | 13027 | 17725 | 8038 | 19002 | 1 | 3008 |

診断から1～4ヵ月後のTB患者

| | no ag | PHA | PPD | STCF | CFP7 | CFP17 | CFP7A | CFP20 | CFP21 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | 9 | 8973 | 5096 | 6145 | 852 | 4250 | 4019 | 284 | 1131 |
| 7 | 1 | 12413 | 6281 | 3393 | 168 | 6375 | 4505 | 11 | 4335 |
| 8 | 4 | 11915 | 7671 | 7375 | 104 | 2753 | 3356 | 119 | 407 |
| 9 | 32 | 22130 | 16417 | 17213 | 8450 | 9783 | 16319 | 91 | 5957 |

【０４３３】

実施例６Ａ

４群の６～８週齢のメスのＣ５７Ｂｌ／６Ｊマウス［Ｂｏｍｈｏｌｔｅｇａａｒｄ，デンマーク］を、以下のワクチン組成物で尾の基部に皮下で免疫化した。

【０４３４】

１群：ＥＳＡＴ－６／ＤＤＡ（２５０μｇ）１０μｇ
２群：ＭＰＴ５９／ＤＤＡ（２５０μｇ）１０μｇ
３群：ＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ－６／ＤＤＡ（２５０μｇ）１０μｇ
４群：アジュバント対照群：ＮａＣｌ中のＤＤＡ（２５０μｇ）

【０４３５】

動物は、０．２ｍｌの容量で注射した。最初の注射から２週間後及び二回目の注射から３週間後に、マウスの背の上部をわずかにブースターに付した。

【０４３６】

最後の免疫化から１週間後にマウスを交配させ、血液細胞を単離した。関連する抗原で生体外で刺激した際の培養上清へのＩＦＮ－γの放出により、誘導される免疫応答をモニターした（下記の表参照）。

【０４３７】
【表４８】

| 免疫原 10 μg/服用 | 再刺激用[a]：生体外でのＡｇ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 抗原なし | ST-CF | ESAT-6 | MPT59 |
| ESAT-6 | 219 ± 219 | 569 ± 569 | 835 ± 633 | - |
| MPT59 | 0 | 802 ± 182 | - | 5647 ± 159 |
| ハイブリッド：MPT59-ESAT-6 | 127 ± 127 | 7453 ± 581 | 15133 ± 861 | 16363 ± 1002 |

ａ） 血液細胞は、最後の免疫化から１週間後に単離し、抗原の刺激（５μｇ／ｍｌ）から７２時間後にＩＦＮ－γの放出（ｐｇ／ｍｌ）を測定した。
【０４３８】
示した値は、３匹のマウスからプールした細胞について行ったトリプリケートの平均±ＳＥＭである。
【０４３９】
ｂ） 測定せず
【０４４０】
実験は、ハイブリッドでの免疫化が、単一抗原での免疫化後より強力にＥＳＡＴ－６及びＭＰＴ５９を認識するＴ細胞を刺激していることを立証している。特に、ＥＳＡＴ－６の認識は、ＭＰＴ５９－ＥＳＡＴ－６ハイブリッドでの免疫化で促進された。ＤＤＡで免疫化した対照のマウスでのＩＦＮ－γの放出は、１０００ｐｇ／ｍｌを超えなかった。
【０４４１】
実施例６Ｂ
組換え抗原は、マウスでのサブユニットワクチンとして個々に試験した。１１群の６～８週齢のメスのＣ５７Ｂｌ／６Ｊマウス［Ｂｏｍｈｏｌｔｅｇａａｒｄ，デンマーク］を、以下のワクチン組成物で尾の基部に皮下で免疫化した。
【０４４２】
１群：ＣＦＰ７　１０μｇ
２群：ＣＦＰ１７　１０μｇ
３群：ＣＦＰ２１　１０μｇ
４群：ＣＦＰ２２　１０μｇ
５群：ＣＦＰ２５　１０μｇ
６群：ＣＦＰ２９　１０μｇ
７群：ＭＰＴ５１　１０μｇ
８群：ＳＴ－ＣＦ　５０μｇ
９群：アジュバント対照群
１０群：ＢＣＧ　２．５ｘ１０$^{5}$／ｍｌ，０．２ｍｌ
１１群：対照群：未処理
【０４４３】
全てのサブユニットワクチンは、アジュバントとしてＤＤＡとともに与えた。動物は、０．２ｍｌの容量で予防接種した。最初の注射から２週間後、及び二回目の注射から３週間後に、１～９群の背の上部をわずかにブースターに付した。最後の注射から１週間後にマウスを交配させ、血液細胞を単離した。相同なタンパク質で生体外で刺激された際の培養上清へのＩＦＮ－γの放出により、誘導される免疫応答をモニターした。
【０４４４】
最後の免疫化から６週間後に、生存能力のある結核菌５ｘ１０$^{6}$／ｍｌを有するエアロゾルにマウスを付した。感染から６週間後にマウスを屠殺し、感染したマウスの肺及び脾臓で生存している細菌数を、７Ｈ１１プレートで３連続希釈した器官のホモジネートをプ

レートして測定した。コロニーは、インキュベーションから２～３週間後に計測した。防護効率は、関連する５群のマウスから得られる数の幾何学上（ｇｅｏｍｅｔｒｉｃ）の平均と、関連する対照の群の５匹のマウスから得られる数の幾何学上の平均の$\mathrm{log}_{10}$値の違いとして示す。

【０４４５】

実験の結果は、以下の表に示す。

【０４４６】

【表４９】

ST-CF 及び 7 個のサブユニットワクチンのマウスでの免疫原性及び防護効率

| サブユニット ワクチン | 免疫原性 | 防護効率 |
|---|---|---|
| ST-CF | +++ | +++ |
| CFP7 | ++ | − |
| CFP17 | +++ | +++ |
| CFP21 | +++ | ++ |
| CFP22 | − | − |
| CFP25 | +++ | +++ |
| CFP29 | +++ | +++ |
| MPT51 | +++ | ++ |

＋＋＋　強力な免疫原性／高防護（ＢＣＧレベル）

＋＋　中間的な免疫原性／中間的な防護－　認識せず／防護せず

【０４４７】

この結果、高レベルの防護を誘導する幾つかのタンパク質が同定された。これらのうちＣＦＰ１７、ＣＦＰ２５及びＣＦＰ２９の３つは、ＳＴ－ＣＦ及びＢＣＧと同様の防護レベルを生じるが、２つのタンパク質ＣＦＰ２１とＭＰＴ５１は、ＢＣＧとＳＴ－ＣＦレベルの約２／３の防護を誘導する。ＣＦＰ７及びＣＦＰ２２の２つのタンパク質は、マウスモデルで防護を誘導しなかった。

【０４４８】

実施例７：ｃｆｐ７、ｃｆｐ９、ｍｐｔ５１、ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂならびにｃｆｐ７ａ、ｃｆｐ７ｂ、ｃｆｐ１０ａ、ｃｆｐ１７、ｃｆｐ２０、ｃｆｐ２１、ｃｆｐ２２、ｃｆｐ２２ａ、ｃｆｐ２３、ｃｆｐ２５及びｃｆｐ２５ａの種の分布異なるマイコバクテリア種でのｃｆｐ７、ｃｆｐ９、ｍｐｔ５１、ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄｌ１－ｏｒ９ｂの存在

結核菌－複合体に属する種及び他のマイコバクテリアでのｃｆｐ７、ｃｆｐ９、ｍｐｔ５１、ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂ遺伝子の分布を決定するために、ＰＣＲ及び／又はサザンブロッティングを用いた。用いた細菌株は、表１０に挙げている。ゲノムＤＮＡは、前述のようにマイコバクテリア細胞から調製した［Ａｎｄｅｒｓｅｎら、１９９２］。

【０４４９】

ＰＣＲ分析は、結核菌－複合体に属する種及び他のマイコバクテリアでのｃｆｐ７、ｃｆｐ９及びｍｐｔ５１遺伝子の分布を決定するために用いた。用いた細菌株は、表１０に挙げている。ＰＣＲは、前述のようにマイコバクテリア細胞から調製したゲノムＤＮＡについて行った［Ａｎｄｅｒｓｅｎら、１９９２］。

【０４５０】

用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、ＤＮＡシンセサイザーで自動合成し［Ａｐｐ

ｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｒｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ，ＡＢＩ－３９１，ＰＣＲモード］、脱阻害し、エタノール沈殿で精製した。分析に用いたプライマーは、表１１に示す。

【０４５１】

ＰＣＲ増幅は、染色体２０ｎｇを、マスターミックス（各オリゴヌクレオチドプライマー０．５μＭ、ＢＳＡ［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］０．２５μＭ、低塩緩衝液（２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ　８．８）、ＫＣｌ　１０ｍＭ、（$NH_4$）$_2$$SO_4$１０ｍＭ、$MgSO_4$２ｍＭ及びＴｒｉｔｏｎ　Ｘ－１０００．１％）［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］、各デオキシヌクレオシド三リン酸０．２５ｍＭ及びＴａｑ　Ｐｌｕｓ　Ｌｏｎｇ　ＤＮＡポリメラーゼ［Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ］０．５Ｕ））と混合して、サーマル反応機［Ｒａｐｉｄ　Ｃｙｃｌｅｒ，Ｉｄａｈｏ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｄａｈｏ］で行った。最終容量は、１０μｌとした（示した濃度は、全て最終容量での濃度である）。予備変性は、３０秒間９４℃で行った。変性３０秒間９４℃、アニーリング３０秒間５５℃及び伸長１分間７２℃で、３０サイクル行った。

【０４５２】

以下のプライマーの組み合わせも用いた（増幅した産物の長さを括弧で示す）。

ｍｐｔ５１：ＭｐＴ５１－３及びＭＰＴ５１－２（８２０ｂｐ）、ＭＰＴ５１－３及びＭＰＴ５１－６（１０８ｂｐ）、ＭＰＴ５１－５及びＭＰＴ５１－４（４１５ｂｐ）、ＭＰＴ５１－７及びＭＰＴ５１－４（３２５ｂｐ）ｃｆｐ７：ｐＶＦ１及びＰＶＲ１（２７４ｂｐ）、ｐＶＦ１及びＰＶＲ２（１９７ｂｐ）、ｐＶＦ３及びＰＶＲ１（３０２ｂｐ）、ｐＶＦ３及びＰＶＲ２（１２５ｂｐ）

ｃｆｐ９：ｓｔＲ３及びｓｔＦ１（３５１ｂｐ）

【０４５３】

【表５０】

# 表10.この実施例で用いたマイコバクテリア株

| 種及び株 | | 由来 |
|---|---|---|
| 1. *M. tuberculosis* | H37Rv (ATCC 27294) | ATCC[a] |
| 2. | | ATCC |
| 3. | | A. Lazlo, Ottawa, Canada から入手 |
| 4. *M. bovis* BCG substrain: Danish 1331 | | SSI[b] |
| 5. | | SSI[c] |
| 6. | | SSI[c] |
| 7. | | SSI[c] |
| 8. | | SSI[c] |
| 9. | | SSI[c] |
| 10. | | WHO[e] |
| 11. *M. bovis* MNC 27 | | SSI[c] |
| 12. *M. africanum* | | Danish の患者より単離 |
| 13. *M. leprae* (アルマジロ由来) | | J. M. Colston, London, UK から入手 |
| 14. *M. avium* (ATCC 15769) | | ATCC |
| 15. *M. kansasii* (ATCC 12478) | | ATCC |
| 16. *M. marinum* (ATCC 927) | | ATCC |
| 17. *M. scrofulaceum* (ATCC 19275) | | ATCC |
| 18. *M. intercellulare* (ATCC 15985) | | ATCC |
| 19. *M. fortuitum* (ATCC 6841) | | ATCC |
| 20. *M. xenopi* | | Danish の患者より単離 |
| 21. *M. flavescens* | | Danish の患者より単離 |
| 22. *M. szulgai* | | Danish の患者より単離 |
| 23. *M. terrae* | | SSI[c] |
| 24. *E. coli* | | SSI[d] |
| 25. *S. aureus* | | SSI[d] |

[a] Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、合衆国

[b] Ｓｔａｔｅｎｓ Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ、コペンハーゲン、デンマーク

[c] Ｓｔａｔｅｎｓ Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ（コペンハーゲン、デンマーク）微生物部の我々のコレクション

[d] Ｓｔａｔｅｎｓ Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ（デンマーク）臨床微生物部

[e] Ｓｔａｔｅｎｓ Ｓｅｒｕｍ Ｉｎｓｔｉｔｕｔ（コペンハーゲン、デンマーク）生物基準のためのＷＨＯ国際研究所

【０４５４】

【表５１】

表11. *mpt51*、*cfp7*及び *cfp9*オリゴヌクレオチドの配列

| 方向及び オリゴヌクレオチド | | 配列 (5'→3')[a] | 位 置[b] (ヌクレオチド) |
|---|---|---|---|
| センス | | | |
| | MPT51-1 | CTCGAATTCGCCGGGTGCACACAG (SEQ ID NO: 28) | 6 - 21 (SEQ ID NO: 41) |
| | MPT51-3 | CTCGAATTCGCCCCATACGAGAAC (SEQ ID NO: 29) | 143 - 158 (SEQ ID NO: 41) |
| | MPT51-5 | GTGTATCTGCTGGAC (SEQ ID NO: 30) | 228 - 242 (SEQ ID NO: 41) |
| | MPT51-7 | CCGACTGGCTGGCCG (SEQ ID NO: 31) | 418 - 432 (SEQ ID NO: 41) |
| | pvR1 | GTACGAGAATTCATGTCGCAAATCATG (SEQ ID NO: 35) | 91 - 105 (SEQ ID NO: 1) |
| | pvR2 | GTACGAGAATTCGAGCTTGGGGTGCCG (SEQ ID NO: 36) | 168 - 181 (SEQ ID NO: 1) |
| | stR3 | CGATTCCAAGCTTGTGGCCGCCGACCCG (SEQ ID NO: 37) | 141 - 155 (SEQ ID NO: 3) |
| アンチセンス | | | |
| | MPT51-2 | GAGGAATTCGCTTAGCGGATCGCA (SEQ ID NO: 32) | 946 - 932 (SEQ ID NO: 41) |
| | MPT51-4 | CCCACATTCCGTTGG (SEQ ID NO: 33) | 642 - 628 (SEQ ID NO: 41) |
| | MPT51-6 | GTCCAGCAGATACAC (SEQ ID NO: 34) | 242 - 228 (SEQ ID NO: 41) |
| | pvF1 | CGTTAGGGATCCTCATCGCCATGGTGTTGG (SEQ ID NO: 38) | 340 - 323 (SEQ ID NO: 1) |
| | pvF3 | CGTTAGGGATCCGGTTCCACTGTGCC (SEQ ID NO: 39) | 268 - 255 (SEQ ID NO: 1) |
| | stF1 | CGTTAGGGATCCTCAGGTCTTTTCGATG (SEQ ID NO: 40) | 467 - 452 (SEQ ID NO: 3) |

)

[a] 下線を付したヌクレオチドは、ｍｐｔ５１、ｃｆｐ７及びｃｆｐ９のヌクレオチド配列に含まれない。

[b] 示している位置は、プライマーの下線を付していない部分であって、ｍｐｔ５１、ｃｆｐ７及びｃｆｐ９のそれぞれについてＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１、１及び３に示すヌクレオチド配列に相当する。

【０４５５】

サザンブロッティングは、以下の点を変えるほかは、前述［Ｏｅｔｔｉｎｇｅｒ及びＡｎｄｅｒｓｅ，１９９４］のようにして行った：ゲノムＤＮＡ　２μｇはＰｖｕＩＩで消化し、０．８％アガロースゲルで電気泳動し、真空転移装置［Ｍｉｌｌｉｂｌｏｔ，ＴＭ－ｖ；Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ｃｏｒｐ．，Ｂｅｄｆｏｒｄ，ＭＡ］を用いてナイロンメンブレン（Ｈｙｂｏｎｄ　Ｎ－プラス；Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ｐｌｃ，Ｌｉｔｔｌｅ　Ｃｈａｌｆｏｎｔ，英国）に移した。ｃｆｐ７、ｃｆｐ９、ｍｐｔ５１、ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｆ３、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂ遺伝子フラグメントは、プラスミドｐＲＶＮ０１、ｐＲＶＮ０２、ｐＴＯ５２、ｐＴＯ８７、ｐＴＯ８８、ｐＴＯ８９、ｐＴＯ９０、ｐＴＯ９１、ｐＴＯ９６又はｐＴＯ９８に表１１及び表２（実施例２ａ）に示すプライマーを用いるＰＣＲにより増幅した。プローブは、改良されたケミルミネッセンスキット［ＥＣＬ；Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ｐｌｃ，Ｌｉｔｔｌｅ　Ｃｈａｌｆｏｎｔ，英国］で放射活性なしで標識した。ハイブリダイゼーション及び検出は、製品に添付されている指示書にしたがって行った。結果を表１２及び１３に要約する。

【０４５６】

【表５２】

表12

PCR及び／又はサザンブロッティングによる*cfp7*、*cfp9*及び*mpt51*遺伝子及びウエスタンブロッティングによるMPT51タンパク質の種内(intraspecies)解析

| | | PCR | | | サザン ブロット | | | ウェスタン ブロット |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 種及び株 | | *cfp7* | *cfp9* | mpt51 | *cfp7* | *cfp9* | mpt51 | MPT51 |
| 1. | *M. tub.* H37Rv | + | + | + | + | + | + | + |
| 2. | *M. tub.* H37Ra | + | + | + | N.D. | N.D. | + | + |
| 3. | *M. tub.* Erdmann | + | + | + | + | + | + | + |
| 4. | *M. bovis* | + | + | + | | | + | + |
| 5. | *M. bovis* BCG Danish 1331 | + | + | + | + | + | + | + |
| 6. | *M. bovis* BCG Japan | + | + | N.D. | + | + | + | N.D. |
| 7. | *M. bovis* BCG Chinese | + | + | N.D. | + | + | N.D. | N.D. |
| 8. | *M. bovis* BCG Canadian | + | + | N.D. | + | + | N.D. | N.D. |
| 9. | *M. bovis* BCG Glaxo | + | + | N.D. | + | + | N.D. | N.D. |
| 10. | *M. bovis* BCG Russia | + | + | N.D. | + | + | N.D. | N.D. |
| 11. | *M. bovis* BCG Pasteur | + | + | N.D. | + | + | N.D. | N.D. |
| 12. | *M. africanum* | + | + | + | + | + | + | + |
| 13. | *M. leprae* | − | − | − | − | − | − | − |
| 14. | *M. avium* | + | + | − | + | + | + | − |
| 15. | *M. kansasii* | + | − | − | + | + | + | − |
| 16. | *M. marinum* | − | (+) | − | + | + | + | − |
| 17. | *M. scrofulaceum* | − | − | − | − | − | − | − |
| 18. | *M. intercellulare* | + | (+) | − | + | + | + | − |
| 19. | *M. fortuitum* | − | − | − | − | − | − | − |
| 20. | *M. flavescens* | + | (+) | − | + | + | + | N.D. |
| 21. | *M. xenopi* | − | − | − | N.D. | N.D. | + | − |
| 22. | *M. szulgai* | (+) | (+) | − | − | + | − | − |
| 23. | *M. terrae* | − | − | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |

＋；陽性反応、－；反応なし、Ｎ．Ｄ．；測定せず

【０４５７】

ｃｆｐ７、ｃｆｐ９及びｍｐｔ５１は、ＢＣＧ及びその環境マイコバクテリア；マイコバクテリウム・アビウム、マイコバクテリウム・カンサシイ（Ｍ．ｋａｎｓａｓｉｉ）、マイコバクテリウム・マリナム（Ｍ．ｍａｒｉｎｕｍ）、マイコバクテリウム・イントラセルラーレ（Ｍ．ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ）及びマイコバクテリウム・フラベッッセンス（Ｍ．ｆｌａｖｅｓｃｅｎｓ）を含む結核菌複合体に見出された。ｃｆｐ９は、さらにマイコバクテリウム・シュルガイ（Ｍ．ｓｚｕｌｇａｉ）に見られ、ｍｐｔ５１は、マイコバクテリウム・ゼノピ（Ｍ．ｘｅｎｏｐｉ）に見出された。

【０４５８】

さらに、異なるマイコバクテリア株由来の培養ろ液中の天然のＭＰＴ５１の存在は、Ｍａｂ　ＨＢＴ４を用いて展開したウェスタンブロッティングで研究した。

【０４５９】

結核菌Ｈ３７Ｒｖ、Ｒａ、Ｅｒｄｍａｎ、マイコバクテリウム・ボビスＡＮ５、マイコバクテリウム・ボビスＢＣＧ亜株ダニシュ１３３１及びマイコバクテリウム・アフリカヌムには、約２６ｋＤａに強力なバンドがある。いずれの他の試験されたマイコバクテリア株にも、バンドは見られなかった。

【０４６０】
【表５３】

表13a

サザンブロッティングによる *rd1-orf2*、*rd1-orf3*、*rd1-orf4*、*rd1-orf5*、*rd1-orf8*、*rd1-orf9a* 及び *rd1-orf9b* 遺伝子の種内解析

| 種及び株 | *rd1-orf2* | *rd1-orf3* | *rd1-orf4* | *rd1-orf5* | *rd1-orf8* | *rd1-orf9a* | *rd1-orf9b* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *1. M. tub.* H37Rv | + | + | + | + | + | + | + |
| *2. M. bovis* | + | + | + | + | N.D. | + | + |
| *3. M. bovis* BCG Danish 1331 | + | - | - | - | N.D. | - | - |
| *4. M. bovis* BCG Japan | + | - | - | - | N.D. | - | - |
| *5. M. avium* | - | - | - | - | N.D. | - | - |
| *6. M. kansasii* | - | - | - | - | N.D. | - | - |
| *7. M. marinum* | + | - | + | - | N.D. | - | - |
| *8. M. scrofulaceum* | + | - | - | - | N.D. | - | - |
| *9. M. intercellulare* | - | - | - | - | N.D. | - | - |
| *10. M. fortuitum* | - | - | - | - | N.D. | - | - |
| *11. M. xenopi* | - | - | - | - | N.D. | - | - |
| *12. M. szulgai* | + | - | - | - | N.D. | - | - |

＋；陽性反応、－；反応なし、Ｎ．Ｄ．；測定せず
【０４６１】
　ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｎ、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｆ５、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂについての陽性の結果は、結核菌及びマイコバクテリウム・ボビス由来のケノムＤＮＡを用いた際にのみ得られ、ｒｄ１－ｏｒｆ４がマイコバクテリウム・マリナムにも見出された以外はマイコバクテリウム・ボビス又は分析された他のマイコバクテリアからも得られなかった。
【０４６２】
　異なるマイコバクテリア種でのｃｆｐ７ａ、ｃｆｐ７ｂ、ｃｆｐ１０ａ、ｃｆｐ１７ｃ、ｃｆｐ２０、ｃｆｐ２１、ｃｆｐ２２、ｃｆｐ２２ａ、ｃｆｐ２３、ｃｆｐ２５及びｃｆｐ２５ａの存在
　サザンブロッティングは、ｒｄ１－ｏｒｆ２、ｒｄ１－ｏｒｎ、ｒｄ１－ｏｒｆ４、ｒｄ１－ｏｒｎ、ｒｄ１－ｏｒｆ８、ｒｄ１－ｏｒｆ９ａ及びｒｄ１－ｏｒｆ９ｂについて記載しているようにして行った。ｃｆｐ７ａ、ｃｆｐ７ｂ、ｃｆｐ１０ａ、ｃｆｐ１７、ｃｆｐ２０、ｃｆｐ２１、ｃｆｐ２２、ｃｆｐ２２ａ、ｃｆｐ２３、ｃｆｐ２５及びｃｆｐ２５ａの遺伝子フラグメントは、個々の遺伝子をエンコードする組換えｐＭＣＴ６プラスミドからＰＣＲにより増幅した。用いたプライマー（クローニングに用いたプライマーと同じ）は、実施例３、３Ａ及び３Ｂに記載する。結果を表１３ｂに要約する。
【０４６３】

【表５４】

表 13b

サザンブロッティングによる *cfp7a*、*cfp7b*、*cfp10a*、*cfp17*、*cfp20*、*cfp21*、*cfp22*、*cfp22a*、*cfp23*、*cfp25* 及び *cfp25a* 遺伝子の種内解析

| 種及び株 | *cfp7a* | *cfp7b* | *cfp10a* | *cfp17* | *cfp20* | *cfp21* | *cfp22* | *cfp22a* | *cfp23* | *cfp25* | *cfp25a* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. *M. tub.* H37Rv | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2. *M. bovis* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 3. *M. bovis* BCG Danish 1331 | + | + | + | + | + | N.D. | + | + | + | + | + |
| 4. *M. bovis* BCG Japan | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5. *M. avium* | + | N.D. | - | + | - | + | + | + | + | + | - |
| 6. *M. kansasii* | - | N.D. | + | - | - | - | + | - | + | - | - |
| 7. *M. marinum* | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8. *M. scrofulaceum* | - | - | + | - | + | + | - | + | + | + | - |
| 9. *M. intercellulare* | + | + | - | + | - | + | + | - | + | + | - |
| 10. *M. fortuitum* | - | N.D. | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 11. *M. xenopi* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 12. *M. szulgai* | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |

＋；陽性反応、－；反応なし、Ｎ．Ｄ．；測定せず

【０４６４】

【表５５】

参照文献リスト

Andersen, P. 及び Heron, I, 1993, J. Immunol. Methods **161**: 29-39.

Andersen, Å. B. *et al.*, 1992, Infect. Immun. **60**: 2317-2323.

Andersen P., 1994, Infect. Immun. **62**: 2536-44.

Andersen P. *et al.*, 1995, J. Immunol. **154**: 3359-72

Barkholt, V. 及び Jensen, A. L., 1989, Anal. Biochem. **177**: 318-322.

Borodovsky, M., 及び J. McIninch. 1993, Computers Chem. **17**: 123-133.

van Dyke M. W. *et al.*, 1992. Gene pp. 99-104.

Gosselin *et al.*, 1992, J. Immunol. **149**: 3477-3481.

Harboe, M. *et al.*, 1996, Infect. Immun. **64**: 16-22.

von Heijne, G., 1984, J. Mol. Biol. **173**: 243-251.

Hochstrasser, D.F. *et al.*, 1988, Anal.Biochem. **173**: 424-435

Köhler, G. 及び Milstein, C., 1975, Nature **256**: 495-497.

Li, H. *et al.*, 1993, Infect. Immun. **61**: 1730-1734.

Lindblad E.B. *et al.*, 1997, Infect. Immun. **65**: 623-629.

Mahairas, G. G. *et al.*, 1996, J. Bacteriol **178**: 1274-1282.

Maniatis T. *et al.*, 1989, "Molecular cloning: a laboratory manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Nagai, S. *et al.*, 1991, Infect. Immun. **59**: 372-382.

Oettinger, T. 及び Andersen, Å. B., 1994, Infect. Immun. **62**: 2058-2064.

Ohara, N. *et al.*, 1995, Scand. J. immunol. **41**: 233-442.

Pal P. G. 及び Horwitz M. A., 1992, Infect. Immun. **60**: 4781-92.

Pearson, W. R. 及び Lipman D. J., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 2444-2448.

Ploug, M. *et al.*, 1989, Anal. Biochem. **181**: 33-39.

Porath, J. *et al.*, 1985, FEBS Lett. **185**: 306-310.

Roberts, A.D. *et al.*, 1995, Immunol. 85: 502-508.

Sørensen, A.L. *et al.*, 1995, Infect. Immun. **63**: 1710-1717.

Theisen, M. *et al.*, 1995, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, **2**: 30-34.

Valdés-Stauber, N. 及び Scherer, S., 1994, Appl. Environ. Microbiol. **60**: 3809-3814.

Valdés-Stauber, N. 及び Scherer, S., 1996, Appl. Environ. Microbiol. **62**: 1283-1286.

Williams, N., 1996, Science **272**: 27.

Young, R. A. *et al.*, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 2583-2587.

【図面の簡単な説明】

【０４６５】

【図１】図１は長期記憶免疫マウスは、結核菌感染に対して非常に有効に防護される。マウスを結核菌に付し、異なる時間のポイントで脾臓を単離した。脾臓リンパ球をＳＴ－ＣＦと生体外で刺激し、ＩＦＮ－γの放出を研究した（パネルＡ）。２群のマウスの脾臓中のＣＦＵ含量は、パネルＢに示す。免疫記憶マウスは１週間以内で感染を制御し、ＳＴ－ＣＦ中の抗原に応じて大量のＩＦＮ－γを産生する。

【図２】図２は免疫防護に関与するＴ細胞は、６～１２及び１７～３８ｋＤａの分子に関

して優勢である。脾臓のＴ細胞は結核菌に付してから４日後に単離し、ＳＴ－ＣＦの狭い分子質量画分で生体外で刺激した。ＩＦＮ－γの放出を研究した。

【図３】図３はｃｆｐ７のヌクレオチド配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）。ＣＦＰ７の推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）は、ヌクレオチド配列の下に従来の一文字のコードで示す。下線を付したイタリックで示す仮想のリボソーム結合部位は、－１０～－３５領域と推定される。太線で示したヌクレオチドは、ＣＦＰ７をエンコードするヌクレオチドである。

【図４】図４はｃｆｐ９のヌクレオチド配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３）。ＣＦＰ９の推定されるアミノ酸配列（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４）は、ヌクレオチド配列の下に従来の一文字のコードで示す。下線を付したイタリックで示す仮想のリボソーム結合部位シャインダルガノ配列は、－１０～－３５領域と推定される。太線で示したヌクレオチドは、ＣＦＰ９をエンコードするヌクレオチドである。ラムダ２６６ファージから得られるヌクレオチド配列は、二重線を付している。

【図５】図５はｍｐｔ５１のヌクレオチド配列。ＭＰＴ５１の推定されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列の下に一文字のコードで示す。シグナルは、イタリックで示す。リボソーム結合部位の可能性がある箇所に、下線を付している。ヌクレオチドの違い及びアミノ酸の違いをＭＰＢ５１のヌクレオチド配列と比較して［Ｏｈａｒａら、１９９５］、７８０の位置に下線を付した。イタリッ示したヌクレオチドは、結核菌Ｈ３７Ｒｖに存在しない。

【図６】図６は２ＤＥ系での精製抗原の位置を決定し、参照ゲルにマッピングした。新たに精製した抗原を丸で囲み、周知のタンパク質の位置も示している。

【図１】

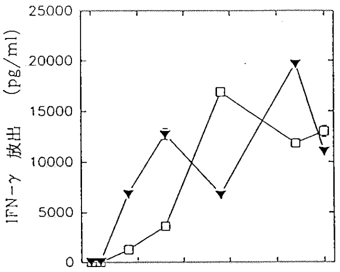


Fig. 1A

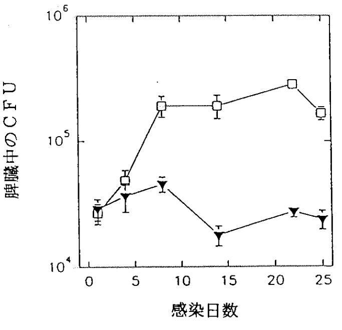


Fig. 1B

【図２】

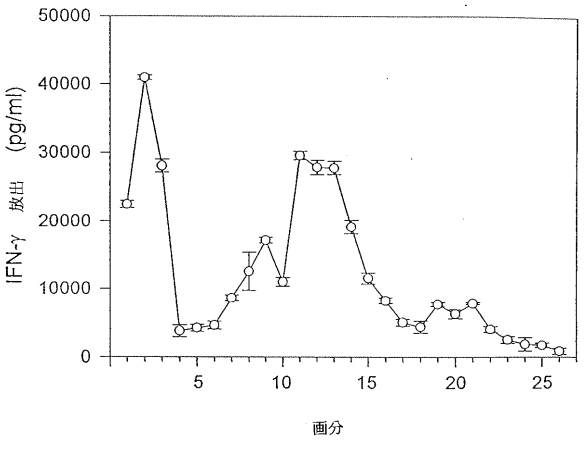


Fig. 2

【図3】

```
1    GGCCGCCGGT ACCTATGTGG CCGCCGATGC TGCGGNCGCG TCGACCTATA CCGGGTTCTG    60
                -35 領域                                -10 領域
61   ATCGAACCCT GCTGACCGAG AGGACTTGTG ATG TCG CAA ATC ATG TAC AAC TAC CCC GCG    120
                    シャイン ダルガノ    M   S   Q   I   M   Y   N   Y   P   A
121  ATG TTG GGT CAC GCC GGG GAT ATG GCC GGA TAT GCC GGC ACG CTG CAG AGC TTG GGT GCC    180
      M   L   G   H   A   G   D   M   A   G   Y   A   G   T   L   Q   S   L   G   A
181  GAG ATC GCC GTG GAG CAG GCC GCG TTG CAG AGT GCG TGG CAG GGC GAT ACC GGG ATC ACG    240
      E   I   A   V   E   Q   A   A   L   Q   S   A   W   Q   G   D   T   G   I   T
241  TAT CAG GCG TGG CAG GCA CAG TGG AAC CAG GCC ATG GAA GAT TTG GTG CGG GCC TAT CAT    300
      Y   Q   A   W   Q   A   Q   W   N   Q   A   M   E   D   L   V   R   Y   H   A
301  GCG ATG TCC AGC ACC CAT GAA GCC AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCC CGC GAC ACC GCC GAA    360
      Y   M   S   S   T   H   E   A   N   T   M   A   M   M   A   R   D   T   A   E
361  GCC GCC AAA TGG GGC GGC TAG    381
      A   A   K   W   G   G   *
```

Fig. 3

【図4】

```
1    GGGTAGCCGG ACCACGGCTG GGCAAAGATG TGCAGGCCGC CATCAAGGCG GTCAAGGCCG    60
        -35 領域
61   GCGACGGCGT CATAAACCCG GACGGCACCT TGTTGGCGGG CCCCGCGGTG CTGACGCCCG    120
                -10 領域
121  ACGAGTACAA CTCCCGGCTG GTG GCC GCC GAC CCG GAG TCC ACC GCG GCG    170
     シャイン ダルガノ       V   A   A   D   P   E   S   T   A   A
171  TTG CCC GAC GGC GCC GGG CTG GTC GTT CTG GAT GGC ACC GTC ACT GCC GAA CTC GAA GCC    230
      L   P   D   G   A   G   L   V   V   L   D   G   T   V   T   A   E   L   E   A
231  GAG GGC TGG GCC AAA GAT CGC ATC CGC GAA CTG CAA GAG CTG CGT AAG TCG ACC GGG CTG    290
      E   G   W   A   K   D   R   I   R   E   L   Q   E   L   R   K   S   T   G   L
291  GAC GTT TCC GAC CGC ATC CGG GTG GTG ATG TCG GTG CCT GCG GAA CGC GAA GAC TGG GCG    350
      D   V   S   D   R   I   R   V   V   M   S   V   P   A   E   R   E   D   W   A
351  CGC ACC CAT CGC GAC CTC ATT GCC GGA GAA ATC TTG GCT ACC GAC TTC GAA TTC GCC GAC    410
      R   T   H   R   D   L   I   A   G   E   I   L   A   T   D   F   E   F   A   D
411  CTC GCC GAT GGT GTG GCC ATC GGC GAC GGC GTG CGG GTA AGC ATC GAA AAG ACC TGA    467
      L   A   D   G   V   A   I   G   D   G   V   R   V   S   I   E   K   T   *
```

Fig. 4

【図5】

```
1    GAATTCGCCGGGTGCACACAGCCTTACACGACGGAGGTGGACACATGAAG    50
                                                  M K
51   GGTCGGTCGGCGCTGCTGCGGGCGCTCTGGATTGCCGCACTGTCATTCGG    100
      G R S A L L R A L W I A A L S F G
101  GTTGGGCGGTGTCGCGGTAGCCGCGGAACCCACCGCCAAGGCCGCCCCAT    150
      L G G V A V A A E P T A K A A P
151  ACGAGAACCTGATGGTGCCGTCGCCCTCGATGGGCCGGGACATCCCGGTG    200
      Y E N L M V P S P S M G R D I P V
201  GCCTTCCTAGCCGGTGGGCCGCACGCGGTGTATCTGCTGGACGCCTTCAA    250
      A F L A G G P H A V Y L L D A F N
251  CGCCGGCCCGGATGTCAGTAACTGGGTCACCGCGGGTAACGCGATGAACA    300
      A G P D V S N W V T A G N A M N
301  CGTTGGCGGGCAAGGGGATTTCGGTGGTGGCACCGGCCGGTGGTGCGTAC    350
      T L A G K G I S V V A P A G G A Y
351  AGCATGTACACCAACTGGGAGCAGGATGGCAGCAAGCAGTGGGACACCTT    400
      S M Y T N W E Q D G S K Q W D T F
401  CTTGTCCGCTGAGCTGCCCGACTGGCTGGCCGCTAACCGGGGCTTGGCCC    450
      L S A E L P D W L A A N R G L A
451  CCGGTGGCCATGCGGCCGTTGGCGCCGCTCAGGGCGGTTACGGGGCGATG    500
      P G G H A A V G A A Q G G Y G A M
501  GCGCTGGCGGCCTTCCACCCCGACCGCTTCGGCTTCGCTGGCTCGATGTC    550
      A L A A F H P D R F G F A G S M S
551  GGGCTTTTTGTACCCGTCGAACACCACCACCAACGGTGCGATCGCGGCGG    600
      G F L Y P S N T T T N G A I A A
601  GCATGCAGCAATTCGGCGGTGTGGACACCAACGGAATGTGGGGAGCACCA    650
      G M Q Q F G G V D T N G M W G A P
651  CAGCTGGGTCGGTGGAAGTGGCACGACCCGTGGGTGCATGCCAGCCTGCT    700
      Q L G R W K W H D P W V H A S L L
701  GGCGCAAAACAACACCCGGGTGTGGGTGTGGAGCCCGACCAACCCGGGAG    750
      A Q N N T R V W V W S P T N P G
751  CCAGCGATCCCGCCGCCATGATCGGCCAAACCGCCGAGGCGATGGGTAAC    800
      A S D P A A M I G Q T A E A M G N
801  AGCCGCATGTTCTACAACCAGTATCGCAGCGTCGGCGGGCACAACGGACA    850
      S R M F Y N Q Y R S V G G H N G H
851  CTTCGACTTCCCAGCCAGCGGTGACAACGGCTGGGGCTCGTGGGCGCCCC    900
      F D F P A S G D N G W G S W A P
901  AGCTGGGCGCTATGTCGGGCGATATCGTCGGTGCGATCCGCTAAGCGAAT    950
      Q L G A M S G D I V G A I R .
951  TC                                                    952
```

Fig. 5

【図6】

ST－CFの2－DE参照マップ

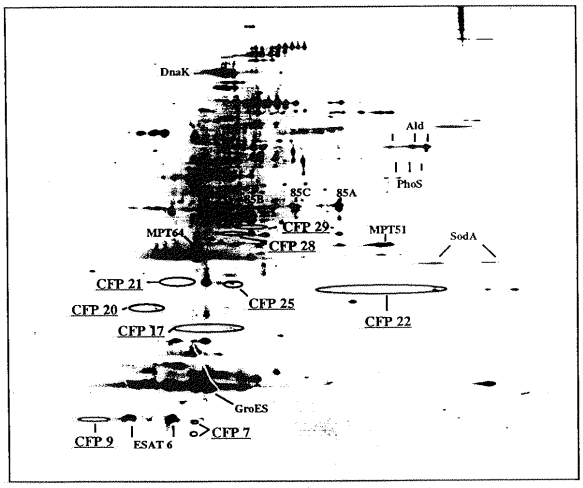


Fig. 6

【配列表】
2008301817000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | FI | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|
| *C12N 1/19* | *(2006.01)* | C12N 1/19 | | |
| *C12N 5/10* | *(2006.01)* | C12N 5/00 | A | |
| *C12P 21/02* | *(2006.01)* | C12P 21/02 | C | |
| *C07K 16/12* | *(2006.01)* | C07K 16/12 | | |
| *A61P 31/06* | *(2006.01)* | A61P 31/06 | | |
| *A61P 37/02* | *(2006.01)* | A61P 37/02 | | |
| *A61K 39/00* | *(2006.01)* | A61K 39/00 | H | |
| *G01N 33/53* | *(2006.01)* | G01N 33/53 | D | |
| *G01N 33/569* | *(2006.01)* | G01N 33/569 | F | |
| *C12P 21/08* | *(2006.01)* | C12P 21/08 | | |

(74)代理人　100103920
弁理士　大崎　勝真
(74)代理人　100124855
弁理士　坪倉　道明
(72)発明者　ペーター・アンデルセン
デンマーク国、ブロンショイ　ディーケイー２７００、リストルプヴェイ　７
(72)発明者　リッケ・ルイース・ビンテル・スクジョト
デンマーク国、フレデリクスベルグ　シー　ディーケイー１８７１、サル　５．、ツアヴァルセンスヴェイ　９
(72)発明者　イーダ・ローゼンクランツ
デンマーク国、コペンハーゲン　オー　ディーケイー２１００、ティーエイチ　１．、ラグンヒルドガード　７０
(72)発明者　カーリン・ヴェルディング
デンマーク国、コペンハーゲン　エヌ　ディーケイー２４００、ティーブイ　３．、ノレブロガード　２２４
(72)発明者　ペータ・ビアク・ラースムセン
デンマーク国、コペンハーゲン　オー　ディーケイー２１００、ルドルフ　ベルグスガード　５
(72)発明者　トマス・エティンガ
デンマーク国、ヘレラップ　ディーケイー２９００、エゲブジェルグ　アレ　１２
(72)発明者　ヴァルタ・フロリオ
デンマーク国、フレデリクスベルグ　シー　ディーケイー１９６４、インゲマンスヴェイ　２１

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA13 BA31 CA02 CA07 DA05 EA02 EA03 EA04 HA01 HA15
4B064 AG27 AG31 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 DA02 DA15
4B065 AA36X AA36Y AA90 AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25 CA45 CA46
4C085 AA03 BA07
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA11 CA40 DA76 DA86 EA31 EA52 FA72 FA74

patsnap

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 来自结核分枝杆菌的核酸片段和多肽片段 | | |
| 公开(公告)号 | JP2008301817A | 公开(公告)日 | 2008-12-18 |
| 申请号 | JP2008131389 | 申请日 | 2008-05-19 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国立血清研究所 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Sutatensu Serumu歌德学院 | | |
| [标]发明人 | ペーターアンデルセン<br>リッケルイースビンテルスクジョト<br>イーダローゼンクランツ<br>カーリンヴェルディング<br>ペータビアクラースムセン<br>トマスエティンガ<br>ヴァルタフロリオ | | |
| 发明人 | ペーター·アンデルセン<br>リッケ·ルイース·ビンテル·スクジョト<br>イーダ·ローゼンクランツ<br>カーリン·ヴェルディング<br>ペータ·ビアク·ラースムセン<br>トマス·エティンガ<br>ヴァルタ·フロリオ | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C07K14/35 C07K19/00 C12N1/21 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/02 C07K16/12 A61P31/06 A61P37/02 A61K39/00 G01N33/53 G01N33/569 C12P21/08 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/04 A61K39/104 A61K39/112 A61P31/04 A61P43/00 C12N15/31 C12Q1/68 | | |
| CPC分类号 | C07K14/35 A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/51 C07K2319/00 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C07K14/35 C07K19/00 C12N1/21 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K16/12 A61P31/06 A61P37/02 A61K39/00.H G01N33/53.D G01N33/569.F C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/16 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA05 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA02 4B064/DA15 4B065/AA36X 4B065/AA36Y 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA07 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 小野 诚<br>金山 贤教<br>Masarushin大崎 | | |
| 优先权 | 199700376 1997-04-02 DK<br>60/044624 1997-04-18 US<br>199701277 1997-11-10 DK<br>60/070488 1998-01-05 US | | |
| 其他公开文献 | JP4544434B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

解决的问题：提供一种新颖的抗原，其有效地作为针对结核分枝杆菌的亚单位疫苗的成分或用作检测结核分枝杆菌感染的诊断组合物的成分。提供了具有源自结核分枝杆菌的几个特定氨基酸序列的A1多肽及其一些免疫活性片段，编码它们的基因，诸如疫苗的免疫组合物和多肽。 包含皮肤测试试剂。 特别地，与各自的非融合蛋白相比，特异性抗原多肽ESAT-6和MPT59的融合具有优异的免疫原性。 [选择图]无

$$\frac{(N_{ref}-N_{dif})100}{N_{ref}}$$