

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5221337号  
(P5221337)

(45) 発行日 平成25年6月26日 (2013. 6. 26)

(24) 登録日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/04 (2006. 01)	A 6 1 K 39/04 Z N A
A 6 1 K 31/711 (2006. 01)	A 6 1 K 31/711
A 6 1 P 31/06 (2006. 01)	A 6 1 P 31/06
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 N
G O 1 N 33/569 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 P
請求項の数 21 (全 68 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2008-503980 (P2008-503980)	(73) 特許権者	504369557
(86) (22) 出願日	平成18年3月31日 (2006. 3. 31)		ライデン ユニバーシティ メディカル
(65) 公表番号	特表2008-534583 (P2008-534583A)		センター
(43) 公表日	平成20年8月28日 (2008. 8. 28)		オランダ国 エヌエル - 2333 ゼ
(86) 国際出願番号	PCT/NL2006/050068		ットエイ ライデン、アルビヌスドレーフ
(87) 国際公開番号	W02006/104389		2
(87) 国際公開日	平成18年10月5日 (2006. 10. 5)	(74) 代理人	100088683
審査請求日	平成21年3月3日 (2009. 3. 3)		弁理士 中村 誠
(31) 優先権主張番号	05075748.3	(74) 代理人	100108855
(32) 優先日	平成17年3月31日 (2005. 3. 31)		弁理士 蔵田 昌俊
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100075672
			弁理士 峰 隆司
		(74) 代理人	100109830
			弁理士 福原 淑弘
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ミコバクテリア感染及び結核疾病の診断、予防及び治療のための方法及び手段

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトにおけるミコバクテリア感染に対する免疫応答を誘導するための医薬の製造のための、ポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードする組換え D N A 分子並びにそれらの D N A 及びポリペプチド断片の使用であって、前記ポリペプチドは結核菌休止(DosR)レギュロン配列：Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)から成る群から選択され、前記ポリペプチド断片は少なくとも一つのエピトープを含み、前記 D N A 断片は少なくとも一つのエピトープを含むポリペプチド断片をコードし、前記ポリペプチド断片は少なくとも 18 アミノ酸長を有する使用。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、Rv1733c、Rv2029c及びRv2627cから成る群から選択される、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、結核菌休止レギュロン(DosR)配列Rv1733c、Rv2029c(PfkB)及びRv0080から得られる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

ポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードする組換え D N A 分子並びにそれらのポリペプチド及び D N A 断片を含む、ミコバクテリア感染に対する免疫化のための組成物であって、前記ポリペプチドは結核菌休止(DosR)レギュロン配列：Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)から成る群から選

扱され、前記ポリペプチド断片は少なくとも一つのエピトープを含み、前記DNA断片は少なくとも一つのエピトープを含むポリペプチド断片をコードし、前記ポリペプチド断片は少なくとも18アミノ酸長を有する組成物。

【請求項5】

前記ポリペプチドが、Rv1733c、Rv2029c及びRv2627cから成る群から選択される、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記ポリペプチドが、結核休止レギュロン(DosR)配列Rv1733c、Rv2029c(PfkB)及びRv0080から得られる、請求項4に記載の組成物。

【請求項7】

前記組成物がアジュバントを含む、請求項4～6の何れか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記アジュバントが、ポリI:C、CpG、LPS、脂質A及びそれらの誘導體、IC31、QS21、リポペプチドPam3Cys、細菌のフラゲリン、DDA/MPL、DDA/TDB及び可溶性LAG3から成るアジュバントの群から選択される、請求項7に記載の免疫化のための組成物。

【請求項9】

前記ミコバクテリアのポリペプチドが、結核菌複合体種 ミコバクテリウム・ツベロクロシス(ヒト型結核菌)、ミコバクテリウム・ボビス(ウシ型結核菌)、ミコバクテリウム・ボビスBCG、ミコバクテリウム・アフリカヌム(*M. africanum*)、ミコバクテリウム・カネティー(*M. canetti*)及びミコバクテリウム・マイクロティ(*M. microti*)から選択される、請求項4～8の何れかに記載の免疫化のための組成物。

【請求項10】

前記ポリペプチドをコードする組換えDNA分子が、ベクター及び/又はゲノム中に含まれる、請求項4～9の何れかに記載の免疫化のための組成物。

【請求項11】

前記ポリペプチドをコードする組換えDNA分子が、組換えミコバクテリア中にある、請求項4～10の何れかに記載の免疫化のための組成物。

【請求項12】

前記組換えミコバクテリアがミコバクテリア・ボビス カルメット-ゲラン杆菌(*Bacillus Calmette-Guerin*)(BCG)である、請求項11に記載の組成物。

【請求項13】

前記ポリペプチド断片が合成ペプチドである、請求項4～12の何れかに記載の免疫化のための組成物。

【請求項14】

前記合成ペプチドが18～45のアミノ酸長である、請求項13に記載の免疫化のための組成物。

【請求項15】

抗体又はその断片又はCD40リガンド又はその変異体から選択される、CD40結合分子をさらに含む、請求項4～14の何れかに記載の免疫化のための組成物。

【請求項16】

4-1BBレセプターを刺激することのできる、アゴニストの抗-4-1BB抗体又はその断片をさらに含む、請求項4～15の何れかに記載の免疫化のための組成物。

【請求項17】

前記組成物が、潜伏期に特異的でないミコバクテリア抗原をさらに含む、請求項4～16の何れかに記載の免疫化のための組成物。

【請求項18】

ヒトにおけるミコバクテリア感染に対する免疫応答を誘導するための医薬として使用するための、ポリペプチド又は前記ポリペプチドをコードする組換えDNA分子並びにそれらのDNA及びポリペプチド断片を含む組成物であって、前記ポリペプチドは結核休止(DosR)レギュロン配列：Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(Nar

10

20

30

40

50

K2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)から成る群から選択され、前記ポリペプチド断片は少なくとも一つのエピトープを含み、前記DNA断片は少なくとも一つのエピトープを含むポリペプチド断片をコードし、前記ポリペプチド断片は少なくとも18アミノ酸長を有する組成物。

【請求項19】

以下の工程を含む、ミコバクテリア感染を判定する方法：

a)被験者の単離された体液の及び/又は単離された白血球のサンプルを、Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)から成る結核休止レギュロンによってコードされるタンパク質の群から選択される一以上のポリペプチド又はそれらの断片と、インビトロで接触させること、ここにおいて、前記断片は少なくとも一つのエピトープを含み、前記ポリペプチド断片は少なくとも18アミノ酸長を有する；及び、

b)ミコバクテリア感染を示す、抗体の前記ポリペプチド又はそれら断片への結合によって、体液性免疫応答を検出すること；及び/又は、

c)特異的増殖及び/又はサイトカイン産生及び/又は細胞外もしくは細胞内活性化マーカーの発現によって、細胞性免疫を検出すること；及び、

d)前記サンプルがミコバクテリアに感染しているかどうかを、前記b)及び/又はc)の結果に基づいて判定すること。

【請求項20】

前記ポリペプチドが、Rv1733c、Rv2029c、Rv2627c及びRv0080から成る群から選択される、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

請求項1～3で定義された一以上のポリペプチド及び前記ポリペプチドに結合する抗体をアッセイ及び定量化するための試薬を含む、請求項19又は20に記載の判定方法を実行するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は医薬の分野に関し、詳細には、特に結核菌によって引き起こされた感染に対する、ミコバクテリアの疾病の診断、予防及び治療に関する。また、本発明は、ワクチン接種の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

結核(TB)は、控えめ見積もってTBによる死者が毎分4人、毎年2百万に相当すると推定される、世界的な健康に対する大きな脅威である。世界の人口の1/3が、潜在的に結核菌に感染していると推定されている。ほとんどの場合が活性なTBに起因するこの莫大な潜在性結核の蓄積は、TBのコントロールを達成する主要な障壁を表す。

【0003】

潜在性結核菌感染が、TBを排除する試みを複雑にするには幾つかの理由がある。第一に、接触追跡及び潜在性感染の治療は、ほとんどの人間がツベルクリン皮膚検査で陰性である設定においてのみ達成でき、これは、TBの発生率が既に低い工業国における場合である。そのような設定であっても、潜在性結核菌感染の治療のために用いられる現在可能な措置の有効性は限られている。これは、治療固守が低いということや抗生物質耐性株の蔓延という明らかな問題とは別に、休眠結核菌が、インビトロで証明されたように(1,2)桿菌の複製に対してのみ殺菌性であるリファンピン及びイソニアジドのような通常使用される薬物に対して高い耐性を有するという知見に関連させることができる。結核菌が潜伏の間に非複製を持続するという考えは、結核菌の遺伝子型が多年の潜伏期間中にほとんど変化しない一方、活発な疾病期間におけるDNAパターンの変化率が非常に高いという知見によって支持される(3,4)。第二に、TBに対して現在唯一利用可能なワクチン、ウシ型結核菌カルメット-گران杆菌(BCG)は、潜在性結核菌感染の確立を防がない。BCGは、地理

10

20

30

40

50

的な領域によって異なり、また、恐らく環境的なミコバクテリアに対する曝露レベルに依存する、再活性化TBに対しての高度に可変するレベルの防御を与える(5)。改善されたワクチンの開発に向けられた最近の試みは、結核菌の感染が起こる前に投与されることを意図され、急性の原発性感染の動物モデルにおいて評価されている、主に予防的なワクチンに焦点を合わせている。それらの予防的なワクチン候補は、慢性的又は潜在性の感染の何れかを模倣する動物モデルを用いる曝露設定後において用いられた場合、無効であるか又は有害でさえあった(6-8)。反対に、既に潜在的に感染した個体に安全に投与でき、TBの再活性化を防ぐ曝露後ワクチンは、結核菌による潜在性感染が人口の大多数に存在するような風土性の高い地域においてそれを適用できるという直接的な利点を有する。そのようなワクチンに含まれる抗原は、潜在性感染期の結核菌桿菌を認識及び排除できる防御性の免疫応答を増強するものである。

10

#### 【0004】

CD4 T細胞は、結核菌感染をコントロール及び維持するのに重要な役割を果たす。しかし、それに関連する詳細なメカニズム及び潜在性TBを認識する標的抗原の大部分は分かっていない(9)。近年まで、潜伏の間の結核菌の代謝における差動的な(differential)遺伝子発現及び変化に取り組む研究はわずかであった。潜伏の維持に関する特異的なヒト宿主免疫応答を分析する研究はさらにわずかであった。現在までに、よく特徴付けられた結核菌タンパク質が一つだけ、潜伏期に重要であると思われることが確認された(10)。このタンパク質HspX (Rv2031c又はAcr)は、ヒト肉芽腫における潜在性感染に付随する環境ストレスの代用として用いられるインビトロ条件で、低酸素の間、強く上方制御される(11)。この熱ショックタンパク質に対する細胞性免疫応答が、潜在的に感染した個体において、例えば保護された状態に付随して観察され、一方、活性なTB疾病を有する個人においてこの抗原に対する抗体が発見された(12, 13)。

20

#### 【0005】

さらなる潜伏時同伴抗原の同定は、成功した曝露後ワクチンの開発のために有益である。幾つかの研究は、潜伏時の自然な状態を模倣するよう開発されたインビトロ及びインビボのモデルを用いて、結核菌感染の持続的な状態に焦点をあてている。第一に、Wayneらは、漸進的に減少させた酸素圧力(tensions)下で結核菌を増殖させることによって、潜伏時のインビトロモデルを確立し、これは、非複製持続(NRP)と命名された桿菌の可逆的な増殖停止をもたらした(14)。他は、結核菌の代謝変化を研究するために、一定の低酸素培養条件を用いた(11, 15, 16)。さらに、Voskuilらは、低用量の酸化窒素の存在中で培養したときの結核菌の発現プロファイルを、他は潜伏中の桿菌が遭遇し、Th1免疫の発生と同時に発生するインビトロ条件(19)で研究した。Voskuilらは、全ゲノムDNAマイクロアレイを用いて、結核菌の48遺伝子のセットが一貫して上方制御されたことを観察し、潜伏時のインビトロモデルの3つ全てで、すなわちNRPの間、一定の低酸素と低用量の酸化窒素曝露の間で観察された(17)。結核菌がインビトロでの活性化されたマウスのマクロファージ中で増殖されたとき、このいわゆる休止状態のレギュロンの遺伝子もまた上方制御されることが発見された(18)。慢性的に感染したマウス及びTB患者の肺においても、結核菌の転写パターンは、NRPの特徴を示した(19, 20)。これは、TB疾病の過程の間、桿菌の分集団は低酸素状態及び酸化窒素の低濃度に遭遇し、非複製状態に順応するということを示唆している。休止状態に関連するタンパク質が潜在性感染への移行過程で誘導されられると思われ、また、潜伏中に結核菌が休止状態に関連するタンパク質を発現する可能性が高いと思われる。このレギュロンによってコードされる推定上のタンパク質のほとんどの機能は未知である。この特許明細書において、我々は、潜在性抗原として休止状態のレギュロンの遺伝子によってコードされるタンパク質について言及する。

30

40

#### 【0006】

休止状態の(DosR)レギュロン遺伝子の発見に基づいて、検出目的及び防御又は治療的な免疫化及び/又はワクチン接種目的のための、コードされるタンパク質潜在的な抗原としての使用は、GB 0116385.6 / US2004/0241826に記載されている。さらに、WO 0179274及びUS2004/0057963は、ミコバクテリアの感染の潜伏期に特異的に誘導されるポリペプ

50

チドを用いて、潜在性結核菌感染に対する免疫応答を誘導することを目標とした方法及び組成物を提供している。その中のポリペプチドは、45の休止状態のレギュロン遺伝子のプールから選択され、これは、上述のインビトロモデルにおいて潜伏の間に上方制御される。免疫化の目的のために提示された抗原の一つは、HspX (Rv2031c又はAcr)であり、アルファクリスタリン相同体をコードし、US2004/0146933において、診断及び免疫化の目的のために有用であると記載されている。

【0007】

その文献が、インビトロモデル及び潜伏時のマウスモデルを使用しているために、NRP / 休止状態(DosR)レギュロンがコードするタンパク質が、有意な免疫応答を誘導するために、ヒトにおける感染の潜伏時の間に、結核菌によって十分に高いレベルで実際に発現されるかどうかは現在のところ不明である。また、潜伏時又は休止状態のレギュロンからの推定上の抗原が、十分に免疫原性であるかどうか、及び、それらの推定上の潜在性抗原及び/又はエピトープに対する免疫が、動物における潜在性の又は新しく獲得されたミコバクテリア感染に対して防御を提供するのに実際に関連しているか否かも不明である。特に、48の休止状態/潜伏時のレギュロンがコードする推定上の抗原が、実際のヒト結核菌潜在性感染の間に最も関連しているかも現在のところ分かっていない。

10

【0008】

潜在性ミコバクテリア感染を有する個体において免疫応答を誘発するために、例えば医薬組成物又はワクチンにおいて、全48の推定上の潜在性抗原を併用することは、実効可能でないか又は望ましくなく、また効率的でもない。それらが十分なレベルで発現されないために、或いは、それらが潜在的に感染した動物の免疫系に認識されるために十分な(ドミナントな)細胞毒性のT細胞(CTL)又はTヘルパー(Th)エピトープを含まないために、同定された推定上の潜在性抗原の多くは、免疫応答の誘発において有効ではない。

20

【発明の概要】

【0009】

本発明によって解決されるべき問題は、48の既知の推定上の潜在性抗原から最適な選択を提供すること、並びに、潜在性のミコバクテリア感染を有する健康な個体において、インビボ免疫応答を実際に誘発することができる抗原のみを選択することである。本発明は、上記で議論した問題に、インビボで抗原及び/又はエピトープを付随するミコバクテリア潜伏に対するドミナントなヒト免疫応答を生体外で同定することによって取り組み、それによって、潜在性ミコバクテリア感染に対する検出及び免疫化のための新規の方法及び組成物を提供する。それらの組成物は、潜在性ミコバクテリア感染を経験している動物において、インビボでの免疫応答を実際に誘発することができる潜伏時の抗原のみを含み、より好ましくは、潜在的に感染した個体によって優先的に認識され、活性なミコバクテリア感染を有する個体において、又は結核(TB)を患っている患者のような、ミコバクテリアが引き起こす疾病症状を有する個体において、認識されないか、又は極めて少ない程度で認識される抗原のみを含む。本発明は、当該分野で既知の少なくとも48の結核菌の潜在性抗原の群から選択されるドミナントな抗原及び/又はエピトープの狭いサブセットを同定することにより、この目的を達成する。

30

【0010】

驚くべきことに、本発明で同定されたほとんどの好ましい抗原は、従来文献において今までに最も研究され適用されていた推定上の潜在性抗原；主に、Rv2031c(HspX/acr)及びRv0569；とは異なっている。本発明は、従来刊行物、特許及び特許出願において選択され適用された好ましい推定上の潜在性抗原から離れることを教示し、本発明の狭いサブセットは既知の例から除かれることを示す。本明細書による潜在性抗原の特徴的で小さいサブセットは、推定上の潜在性抗原の既知のグループからの目的にかなった選択である。本発明による抗原及び/又はエピトープは、推定上の抗原のグループの大規模な分析後に選択された。従来文献における推定上の抗原が研究室の条件下のインビトロモデルにおいて及びマウスモデルにおいて同定された一方、本発明は、それらの抗原が、潜在性ミコバクテリア感染による通常的环境下のインビボにおける免疫応答を作動的に誘発することが実際

40

50

にでき、健康な個体又はTB疾病を患っている患者においては誘発しないか又はより低い範囲で誘発するものを開示している。

【発明の詳細な説明】

【0011】

本発明は、脊椎動物、好ましくは哺乳類におけるミコバクテリア感染、特に潜在性ミコバクテリア感染に対する免疫応答を誘導するための方法及び組成物を提供し、該方法は、ミコバクテリア感染を有する脊椎動物においてインビボ免疫応答を誘発できる、ミコバクテリア NRP/休止状態(DosR)レギュロンがコードするタンパク質を含むポリペプチドの群から選択される一以上のポリペプチド又はその断片の源を含む組成物を、該脊椎動物に投与する工程を含む。

10

【0012】

ここにおいてミコバクテリア感染という用語は、新たに感染しまだ症状を示していない、潜在的に感染した哺乳類、及び、活発な結核のようなミコバクテリアが引き起こす疾病及び症状を患っている脊椎動物の何れをも含むように意図される。好ましくは、結核疾病の発達を防ぐため、本発明によって治療されるミコバクテリア感染は潜在性感染である。本発明の方法は、(多)薬剤耐性TBによるかよらないTB患者の抗生物質治療の間又はその後の付随的な治療として有利に適用され；及び、健康であるが曝露された個人に、好ましくは、以前にBCGでワクチン接種されたTB風土国の子供に独占されずに、有利に適用される。

【0013】

20

本発明は、潜在性ミコバクテリア感染に向けられる方法及び組成物を提供するが、予防的なワクチン及び/又はミコバクテリアに対する多重フェーズワクチンのような、非潜在性感染に対する免疫応答を誘発することを目的としたポリペプチド又はエピトープを含む組成物と、当業者によって容易に組み合わせられることもできる。

【0014】

潜在性ミコバクテリア感染は、ここにおいて、桿菌が生存したままであるが、非複製状態でゆっくりと複製又は持続している感染の段階を指し、TBにおいて典型的に観察されるような活発な壊死性疾病を引き起こさない、器官又は組織内に局在化した障害に要約することができる。潜伏期は、宿主の生命の残りの間に存在可能であり、或いは、該感染は、例えば、宿主の免疫を減少させる期間又は他の(ミコ)バクテリア又はHIV-1のよう

30

なウイルス感染又は癌の治療及び他の免疫抑制性の状態又は治療のような他のストレス要因に対する応答において再活性化し得る。

【0015】

本発明は、これらに限定されないが、(生-弱毒及び/又は組換え)結核菌、ウシ型結核菌(パチルスカルメット-ゲラン(BCG)を含む)、ミコバクテリウム・アフリカヌム、スメグマ菌(*M. smegmatis*)、ライ菌(*M. leprae*)、ミコバクテリウム・バカエ(*M. vaccae*)、ミコバクテリウム・イントラセルラエ(*M. intracellulare*)、鳥型結核菌(*M. avium*) (傍結核性の亜種を含む)、ミコバクテリウム・カネティー、ライ菌、ミコバクテリウム・ミクロティ及びミコバクテリウム・ウルセラヌ(*M. ulcerans*)のような、潜在性ミコバクテリア感染及び関連疾病に対する、1) 予防性の(予防的な)、2) 曝露/感染後又は3) 治療的な/治癒的なワクチンとして使用されるのに適した方法及び組成物を提供する。

40

【0016】

結核菌、ウシ型結核菌(BCG株を含む)、ミコバクテリウム・ミクロティ、ミコバクテリウム・アフリカヌム及びミコバクテリウム・カネティー(即ち、TB複合物に属するミコバクテリア種及び株)は、本発明に従って用いられる、潜在性誘導ポリペプチド又はその断片の最も好ましい源である。

【0017】

本発明の方法及び組成物について、治療され又は診断される脊椎動物は好ましくはヒトであるが、しかし、これらに限定されないが、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ネ

50

コ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ラクダ及び例えばニワトリ、アヒル、シチメンチヨウ及びガチヨウなどの家禽のような、研究室動物及び家畜の全てをも含む。

【0018】

該ポリペプチドの源は、タンパク質、タンパク質及び/又はその断片の消化物であってよく、それは、精製された形態であってよく、又は、粗製組成物、好ましくは細菌の可溶化液、超音波処理又は固定化のような、生物学的起源中に含まれてよい。或いは、該(ポリ)ペプチドは、化学的に合成されてよく、又は、インビトロで酵素的に生成されてもよい。ポリペプチド又はその断片の源は、RNA又はDNAテンプレートからの、該ポリペプチド又はその断片をコードする核酸であってよい。該RNA又はDNA分子は「裸の」DNAであってよく、好ましくは小胞又はリポソームに含まれ、或いは、ベクター中に含まれてもよい。該ベクターは、当該分野で既知の任意の(組換え)DNA又はRNAベクターであってよく、好ましくは、遺伝子がコードする潜在性抗原が、コードされるメッセンジャーの発現及び翻訳を与える調節配列に作動可能に結合されたプラスミドである。該ベクターは、これらに限定されないが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、レトロウイルス、レンチウイルス、改変ワクシニアアンカラウイルス(MVA)又は鶏痘ウイルスのような任意のDNA又はRNAウイルスであってよく、或いは、潜在性エピトープを含むポリペプチドの発現を宿主に与えることのできる任意の他のウイルスベクターであってよい。DNAベクターは、エピソーム複製ベクターのように非組込みであってよく、或いは、ランダム組込みによって又は相同性組込みによって宿主ゲノム中に組込まれてもよい。

【0019】

本発明のポリペプチド又はその断片をコードする遺伝子を含むDNA分子は、任意に、ウイルス又はプラスミドのようなベクター中に包埋され、宿主のゲノム中に組込まれてよい。本発明の好ましい態様において、そのような宿主は、微生物であってよい。好ましくはそのような組換え微生物はミコバクテリアであり、本発明のポリペプチド又はその断片を宿主に送達することができる、例えば、結核菌又はウシ型結核菌の種のものであり、最も好ましくは、ウシ型結核菌バチルスカルメット-ゲラン(BCG)である。組換えBCG及び組換え方法は当該分野では既知であり、例えばWO2004094469に開示されている。そのような組換え微生物は、例えば「Jacobs et al. 1987, Nature, 327(6122):532-5)」に開示されているように、生組換えワクチン及び/又は生弱毒ワクチンとして処方され得る。該ベクターはまた、これらに限定されないが、生弱毒及び/又は組換えの赤痢菌又はサルモネラ菌のような、細菌起源の宿主に含まれることもできる。

【0020】

一つの態様において、本発明は、哺乳類におけるミコバクテリア感染に対する免疫応答を誘導するための方法を提供し、該方法は、Rv079、Rv0569、Rv0572c、Rv1733c、Rv1738、Rv1813c、Rv1996、Rv2007c(FdxA)、Rv2029c(PfkB)、Rv2030c、Rv2031c(HspX、Acr、16-kDaアルファ結晶性相同体)、Rv2032、Rv2623、Rv2624c、Rv2626c、Rv2627c、Rv2628、Rv3126c、Rv3127、Rv3129、Rv3130c、Rv3131、Rv3132c、Rv3133c(DosR)、Rv3134c、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)及びそれらの類似体又は相同体から成る、ヒトT細胞株におけるIFN- $\gamma$  応答を誘発できるタンパク質をコードするミコバクテリアNRP / 休止状態(DosR)レギュロンを含むポリペプチドの群から選択される一以上のポリペプチド又はその断片の源、及び任意に一以上のアジュバントを、該哺乳類に投与する工程を含む。

【0021】

前記抗原は、感染した個体から産生され、結核菌超音波処理物に接触された短期T細胞株に認識可能である。該T細胞株は、実施例1及び2に記載したようなアッセイにおいて、好ましくは少なくとも $>50$  pg IFN- $\gamma$  /mlのインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ ) 応答を示す。ミコバクテリアの抗原及びNRP / 休止状態(DosR)レギュロンのDNA及びタンパク質配列についてのRv命名法は当該分野で周知であり、例えば「<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>」又は「<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>」(Accession number AL123456)で発見できる。ここで用いるRv命名法は、前記抗原のアミノ酸配列及び前記抗原をコード

10

20

30

40

50

する核酸配列のいずれにも適用することができる。

【0022】

本発明の好ましい態様において、脊椎動物におけるミコバクテリア感染に対する免疫応答を誘導するための方法は、Rv0079、Rv0569、Rv1733c、Rv1738、Rv1813c、Rv1996、Rv207c(FdxA)、Rv2029c(PfkB)、Rv2030c、Rv2031c(HspX、Acr、16-kDaアルファ結晶性相同体)、Rv2032、Rv2626c、Rv2627c、Rv2628、Rv3126c、Rv3129、Rv3130c、Rv3132c、Rv3133c(DosR)、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)及びその相同体又は類似体から成る、潜在性ミコバクテリア感染を有する脊椎動物において免疫応答を誘発できる潜在性抗原を含む、ミコバクテリア NRP / 休止状態(DosR)レギュロン配列の群から選択されるポリペプチド又はその断片の源の投与を含む。潜在性抗原のこの特定のサブセットは、100 > pg IFN / ml を超える潜在性ミコバクテリア感染を有する個体からの、及び、全ミコバクテリア感染個体の少なくとも5、10、20、30、40又は50%における、末梢血においてインターフェロン (IFN ) 応答を誘導することができる。

10

【0023】

本発明の最も好ましい態様において、脊椎動物において、好ましくは潜在性ミコバクテリア感染を患っている個体又はその該感染を取得するリスクのある個体において、免疫応答を誘導する方法が提供され、該方法は、抗原Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)から成る、潜在性ミコバクテリア感染を有する個体において免疫応答を優先的に誘発できるミコバクテリア NRP / 休止状態(DosR)レギュロン配列の群から選択されるポリペプチド又はその断片の源を投与することを含む。前記8つの抗原は、潜在的に感染した個体において優先的に認識され、非感染個体又は疾病症状を引き起こす活発なミコバクテリア感染を有する個体において、IFN- 応答を誘導できないか、又は極めて低い程度で誘導する、ドミナントなエピトープを含む。試験された48の潜在性抗原からの前記抗原は、末梢血単核細胞(PBMC's)において最も高いレベルのIFN- を誘導する。加えて、それらの8抗原は、潜在的感染個体のPBMCにおいては著しいIL-10を誘導することができるが、活発なミコバクテリア結核感染に付随する症状を患っている患者のPBMCにおいては誘導しない。

20

【0024】

本発明の方法において用いられるそれらの最も好ましいポリペプチドは、前記ミコバクテリア NRP / 休止状態(DosR)レギュロン配列 Rv1733c及びRv2029c(PfkB)及びRv2627cである。試験した全48のポリペプチドの、Rv1733c及びRv2029c(PfkB)及びRv0080は、それらの個体から得られたPBMCにおけるIFN- 及び / 又はIL-10の誘導によって決定されたように、潜在性ミコバクテリア感染を有する個体において免疫応答を誘発することが最も頻りに検出された。

30

【0025】

本発明の他の側面において、本発明は、潜在性ミコバクテリア感染を有する個体において免疫応答を誘発することができるミコバクテリア NRP / 休止状態(DosR)レギュロン配列のポリペプチド又はその断片の源を含む組成物を提供する。好ましくは、ミコバクテリア感染及び誘導された疾病に対して免疫化するための本発明の組成物は、Rv0079、Rv0569、Rv0572c、Rv1733c、Rv1738、Rv1813c、Rv1996、Rv2007c(FdxA)、Rv2029c(PfkB)、Rv2030c、Rv2031c(HspX、Acr、16-kDaアルファ結晶性相同体)、Rv2032、Rv2623、Rv2624c、Rv2626c、Rv2627c、Rv2628、Rv3126c、Rv3127、Rv3129、Rv3130c、Rv3131、Rv3132c、Rv3133c(DosR)、Rv3134c、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)及びそれらの類似体又は相同体から成る、ヒトT-細胞株においてIFN 応答を誘発できるタンパク質をコードするミコバクテリア NRP / (DosR)レギュロンを含むポリペプチドの群から選択される一以上のポリペプチド又はその断片の源を含み、及び任意に少なくとも一つのアジュバントを含む。

40

【0026】

相同体又は類似体はここにおいて、上記のポリペプチドをコードする天然の結核菌NRP / 休止状態(DosR)レギュロンと少なくとも70%、80、90、95、98又は99%のアミノ酸配列

50

の同一性を有し、少なくとも該結核菌ポリペプチドによって得られる免疫応答をなお誘発できるペプチドを含むように理解される。相同体又は類似体は、置換、挿入、欠失、及びさらなるN-又はC-末端アミノ酸、又は安定性、溶解性及び免疫原性を増大するための化学的部分を含み得る。

【 0 0 2 7 】

本発明のポリペプチド抗原の断片は、少なくともエピトープを含む断片であると理解される。それ故、該断片は、該ポリペプチド抗原の配列から少なくとも4, 5, 6, 7又は8の隣接するアミノ酸を含む。より好ましくは、該断片は、少なくともT細胞エピトープを含み、即ち、該ポリペプチド抗原の配列から少なくとも8, 9, 10, 11, 12, 13, 又は14の隣接するアミノ酸を含む。さらにより好ましくは、該断片は、CTL及びTヘルパーエピトープの両方を含む。しかしながら最も好ましくは、該断片は、抗原提示細胞による処理を必要とするペプチドであり、即ち、該断片は、少なくとも約18アミノ酸長を有し、その18アミノ酸は、前記ポリペプチド抗原の隣接する配列では必ずしもない。

10

【 0 0 2 8 】

さらに好ましくは、本発明の組成物は、Rv0079、Rv0569、Rv1733c、Rv1738、Rv1813c、Rv1996、Rv2007c(FdxA)、Rv2029c(PfkB)、Rv2030c、Rv2031c(HspX、Acr、16-kDaアルファ結晶性相同体)、Rv2032、Rv2626c、Rv2627c、Rv2628、Rv3126c、Rv3129、Rv3130c、Rv3132c、Rv3133c(DosR)、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)から成る、ミコバクテリア潜在的感染個体において免疫応答性を誘発できる潜在性抗原を含むミコバクテリア NRP /休止状態(DosR)レギュロン配列の群から選択されるポリペプチド又はその断片の源を含む。前記抗原及び組成物は、ミコバクテリア感染を有する個体の末梢血単核細胞(PBMC's)においてIFN 応答を誘導できる。

20

【 0 0 2 9 】

さらに好ましい態様において、本発明の組成物は、潜在性ミコバクテリア感染を有する個体において免疫応答を優先的に誘発できる、ミコバクテリア NRP /休止状態(DosR)レギュロン配列の源を含み、該抗原はRv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarK)の一以上から選択される。Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX) ポリペプチドは、試験された他の48のミコバクテリアNRP /休止状態(DosR)レギュロンポリペプチドと比較して、PBMCにおけるIFN 生産の面で、潜在性感染を有する個体において強力な応答を誘導することができる。前記抗原はまた、潜在的に感染した患者のPBMCにおけるIL-10産生を刺激することができ、該IL-10誘導は、活発なミコバクテリア感染及び/又はTB疾病症状を有する患者のPBMCにおいては観察されないか、又は極めて低い程度で観察される。

30

【 0 0 3 0 】

他の態様において、本発明の組成物は、ミコバクテリア NRP /休止状態(DosR)レギュロン配列Rv1733c及び/又はRv2029c及び/又はRv2627cから得られるポリペプチド又はその断片の源を少なくとも含み、それは、アッセイされたポリペプチドをコードする全NRP /休止状態(DosR)レギュロンからの、潜在性感染個体において最も頻繁に認識される抗原である。

40

【 0 0 3 1 】

ポリペプチド又はその断片をコードするNRP /休止状態(DosR)レギュロンを含む、本発明の免疫化のための組成物は、好ましくは少なくとも一つの賦形剤を含む。賦形剤は当該薬学分野において周知であり、例えば「Remington's pharmaceutical sciences, Mack Publishing, 1995」のようなテキストブックに見出すことができる。本発明の免疫化のための組成物は、好ましくは、少なくとも一つのアジュバントを含み得る。アジュバントは、ワクチン接種の分野で既知の任意のアジュバントを含んでよく、「Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 2004」のようなテキストブックを用いて選択できる。

【 0 0 3 2 】

50

アジュバントは、最も好ましくは以下のアジュバントの一覧から選択される：陽イオン性(抗菌性)ペプチド及びこれらに限定されないが、ポリ(I:C)、CpGモチーフ、LPS、脂質A、リポペプチドPam3Cys及び細菌性フラゲリン又はその一部のような、Toll様レセプター(TLR)リガンド、及び化学的修飾を有するそれらの誘導体。本発明の方法及び組成物において使用される他の好ましいアジュバントは、生菌又は死菌BCGとの混合物、前記潜在性抗原又はその一部との免疫グロブリン複合体、IC31 (www.intercell.comから ; WO03047602)、QS21/MPL (US2003095974)、DDA/MPL (WO2005004911)、DA/TDB (WO2005004911; Holten-Andersen et al, 2004 Infect Immun. 2004 Mar;72(3):1608-17.)及び溶解性LAG3 (CD223) (www.Immunotep.comから ; US2002192195)である。

【 0 0 3 3 】

本発明に従う免疫化のための方法及び組成物は、CTL応答を増強し、それによって本発明の方法及び組成物の治療的効果を増強するための、CD40結合分子の使用及び/又は添加をさらに含み得る。CD40結合分子の使用はWO 99/61065に開示されており、参照によって本明細書に援用される。該CD40結合分子は好ましくは抗体又はその断片又はCD40 リガンド又はその変異体であり、別に添加されてよく、又は本発明の組成物中に含まれてもよい。

【 0 0 3 4 】

本発明の免疫化のための方法及び組成物は、アゴニストの抗-4-1BB抗体又はその断片、又は4-1BBレセプターと相互作用できる他の分子の使用及び/又は添加をさらに含み得る。4-1BBレセプターアゴニストの抗体及び分子の使用はWO 03/084999に開示されており、参照によって本明細書に援用される。4-1BBアゴニストの抗体は、4-1BB及び/又はCD40レセプターを作動する(triggering)/刺激することを介してCTL免疫を増強するために、さらなるCD40結合分子と共に又はそれなしで使用される。4-1BB結合分子又は抗体は、別に加えられてもよく、又は本発明の組成物中に含まれてもよい。

【 0 0 3 5 】

本発明のポリペプチドは、免疫化の目的のために、これに限定されないが、破傷風毒素/類毒素、ジフテリア毒素/類毒素又は他のキャリア分子のようなタンパク質と融合されてもよい。本発明のポリペプチドは、参考文献「Rapp UK and Kaufmann SH, Int Immunol. 2004 Apr;16(4):597-605; Zigel U, Infect Immun. 2001 Jun;69(6):4164-7」に開示されたような免疫優性ペプチドのキャリアとしての組換え内在性(マウス)gp96 (GRP94)のような熱ショックタンパク質と、或いは、Hsp70 (Triebel et al; WO954464)との融合タンパク質と有利に融合されることもできる。

【 0 0 3 6 】

本発明の免疫化のための方法及び組成物は、好ましくは、ドミナントCTL又はThエピトープを含み、そのペプチドが18~45のアミノ酸長である、本発明のポリペプチドから得られるポリペプチド断片の使用を含む。配列中のCTL又はThエピトープの存在は、HLA\_BIND、SYFPEITHI、NetMHC及びTEPITOPE 2000 (参考文献 43, 44, 45, 46, 47及び48)のよう一般に知られているバイオインフォマティクスツールを用いて、又は標準的な実験を用いて実験的に(Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience 2004)、当業者によって発見されることができる。

【 0 0 3 7 】

18~45のアミノ酸の長さを有する本発明のペプチドは、WO 02/070006に開示されているように、優れた免疫原性の性質を与えることが観察されている。ペプチドは、有利に化学的に合成されることができ、任意に(部分的に)重複することができ、及び/又はTLRリガンド、ペプチド又はタンパク質のような他の分子と結合することもできる。またペプチドは、PCT/NL03/00929及び「Welters et al. (Vaccine. 2004 Dec 2;23(3):305-11)」におけるように、融合して合成タンパク質を形成することもできる。安定性を上昇させるため及び/又はペプチドの生分解性を減少させるために、該ペプチドのアミノ末端又はカルボキシ末端に化学的部分又はさらなる(改変された又はD-)アミノ酸を追加することも有益であり得る。改善するために、免疫原性/免疫刺激部分(例えば脂質)が結合されても

10

20

30

40

50

よい。該ペプチドの溶解性を増強するために、帯電したか又は極性のアミノ酸の添加を、溶解性を増強しインピボでの安定性を上昇させるために用いることができる。

【 0 0 3 8 】

さらに他の態様において、本発明の免疫応答又は免疫化を誘発するための組成物は、潜伏期に特異的ではないミコバクテリア抗原をさらに含む。そのような抗原は、感染の過程の他の時期に有利に高特異性である。免疫化目的のために、潜在性ミコバクテリア感染に対する免疫応答を誘発することのみに向けられず、感染した哺乳類において疾病の症状を引き起こす活発なミコバクテリア感染に向けられた免疫応答を誘発することもできる組成物を提供することは有益である。そのような方法において及びそのような組成物について、感染過程の様々な時期におけるミコバクテリアに対する保護性免疫を組合せることは有用であり、それによってより良い全体的な保護を与えることができる。それ故、免疫応答を誘発できる潜在性特異的抗原を含む本発明の組成物は、これらに限定されないが、結核菌抗原 ESAT-6 (Rv3875)、Ag85A(FbpA/MPT59、Rv3804c)、Ag85B(Rv1886c)、Ag85C(Rv3803c)、CFP10(Rv3874)、TB10.3(Rv3019c)、TB10.4(Rv0288)、MPT64(Rv1980c)、MPT32(Rv1860)及びMPT57(Rv3418c)のような活発な感染において免疫応答を誘発することが知られているミコバクテリア抗原と組合されてよい。

10

【 0 0 3 9 】

さらに他の態様において、本発明の潜在性特異的抗原及び組成物は、潜在性ミコバクテリア感染を診断するための方法及び試薬を提供するために用いられる。本発明の被験者において潜在性又は持続性ミコバクテリア感染、特に潜在性感染を診断する方法は、次の工程を含む：

20

- a) 該被験者の体液及び/又は細胞（特に白血球）のサンプルを、任意に単離して、Rv0079、Rv0569、Rv1733c、Rv1738、Rv1813c、Rv1996、Rv2007c(FdxA)、Rv2029c(PfkB)、Rv2030c、Rv2031c(HspX、Acr、16-kDaアルファ結晶性相同体)、Rv2032、Rv2626c、Rv2627c、Rv2628、Rv3126c、Rv3129、Rv3130c、Rv3132c、Rv3133c(DosR)、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)から成るミコバクテリア NRP /休止状態(DosR)レギュロン配列の群から選択される一以上のポリペプチド又はその断片と接触させること；及び、
- b) ミコバクテリア感染を示す増殖又はサイトカイン産生によって測定して前記ポリペプチドに対する免疫応答を検出すること。

【 0 0 4 0 】

30

診断方法は、最も好ましくは、該ポリペプチドRv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)の少なくとも一以上を含む。他の好ましい態様において該診断方法は、Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c及びRv0080ポリペプチド、又はそれらの断片に対する免疫応答の検出を含み、それらはここでアッセイされた全ての潜在性抗原の潜在性ミコバクテリア感染においてもっとも頻繁に検出される抗原である。

【 0 0 4 1 】

本明細書において体液は、尿、唾液、精液、涙、リンパ液を含むことを意味し、最も好ましくは血球を含めた血液である。血液サンプルからPBMCが得られ、一般的な既知の技術を用いて培養される。診断方法の感度及び特異性を上昇させるため、いくつかの潜在性特異的抗原の組合せ検出が極めて好ましく、特に好ましい態様において、該方法はRv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c及びRv0080抗原に対する免疫応答の検出を含む。本方法はまた、感染過程の活発期に特異的なもののような、ミコバクテリア感染の潜伏期に特異的ではない、当該分野で既知の他の抗原の検出と組合されてもよい。結核菌の場合、それらの抗原は、これらに限定されないが、ESAT-6 (Rv3875)、Ag85A (FbpA/MPT59、Rv3804c)、Ag85B (Rv1886c)、Ag85C(Rv3803c)、CFP10 (Rv3874)、TB10.3 (Rv3019c)、TB10.4 (Rv0288)、MPT64 (Rv1980c)、MPT32 (Rv1860)及びMPT57 (Rv3418c)で構成され得る。

40

【 0 0 4 2 】

本発明はさらに、上記の診断方法を実行するための診断キットを提供し、該キットは、本発明の一以上のポリペプチド又はその断片を含み、及び任意に、前記ポリペプチドに結

50

合する抗体のアッセイ及び定量化のため或いは細胞性免疫応答の測定のための試薬を含む。そのような試薬は、好ましくは、例えばこれらに限定されないがELISA又はマルチプレックスCBAアッセイのような抗原の結合の検出のために必要な試薬、或いは、ここで提供される実施例において用いられるような、IFN- $\gamma$ 及び/又はIL-10応答を検出するための試薬を含む。ミコバクテリア感染を検出するためのポリペプチド又はその断片は、タンパク質/ペプチド(マイクロ-)アレイ又はマイクロタイター/ウェルプレートのような固体担体に都合よく接着されてもよい。

#### 【0043】

本発明はさらに、ポリペプチドRv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)を含む潜在性特異的抗原及び/又はエピトープからの好ましい断片を含む。それらのペプチドは、好ましくは、免疫応答を誘発するための、及び本発明の診断目的のための方法及び組成物中で用いられ、好ましくは18~45アミノ酸長であり、以下の配列：VDEPAPPARAIADAALAALG(配列番号1)又は図13、14、15及び16で同定され開示されるB細胞及びT細胞のエピトープの一つを含むかそれから成る。

#### 【0044】

##### 定義

アミノ酸配列同一性は、二つの(ポリ)ペプチド配列が、例えばデフォルトパラメータを用いるプログラムGAP又はBESTFITによって至適に整列された場合、他で定義したような少なくともある割合の配列同一性を共有することを意味する。GAPは、マッチの数を最大にし、ギャップの数を最小にするように2つの配列をそれらの全長にかけて整列させるために、Needleman and Wunsch グローバル・アライメント・アルゴリズムを使用する。一般に、GAPデフォルトパラメータは、ギャップ創造ペナルティ=8及びギャップ拡大ペナルティ=2を用いる。タンパク質については、該デフォルト・スコアリング・マトリクスは、ブロサム(Blosum)62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919)である。配列のアライメント及び配列同一性割合のスコアは、GCGウィスコンシン・パッケージ、バージョン10.3 (Accelrys Inc. (9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, USA) から入手可能) のようなコンピュータプログラムを用いて決定できる。或いは、類似度又は同一性の割合は、FASTA、BLASTなどのようなデータベースをサーチすることによって決定することもできる。

#### 【0045】

レギュロンは、真核生物において、単一のレギュレーター遺伝子の制御下にある遺伝子の非隣接のグループからなる遺伝子ユニットである。細菌においてレギュロンは、多面的な制御ドメインの相互作用に關与する全体的な制御系であり、一つ又はいくつかのオペロンから成る。結核菌におけるNRP /休止状態(DosR)レギュロンは、DosR転写制御因子(Rv3133c)の制御下にあり、表2に一覧表記された、「Voskuil et al. (J. Exp. Med. 2003, 198(5):705-13)」中に開示される少なくとも48配列を含む。

#### 【0046】

本明細書で用いる被験者という用語は、生きた多細胞脊椎動物生物体、ヒト及び非ヒト哺乳類を含むカテゴリーを指す。被験者という用語は、ヒト及び動物又は実験対象の両方を含む。

#### 【0047】

本明細書において抗原は、分子の性質、又はその断片であり、哺乳類において免疫応答を誘導することができるものである。該用語は、免疫原ならびに、抗原性又は抗原性の決定基又はエピトープをつかさどる領域を含む。抗原は、細胞性(T細胞)又は体液性(抗体)免疫応答の形成を誘導できる、化学的又は生化学的な構造、決定基、抗原又はそれらの一部である。

#### 【0048】

インビボ又はインビトロの免疫応答は、本明細書で提供される方法のうちの一つによって決定及び/又はモニターされ得るが、当業者には既知で明らかな例えば「Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience 2004」に見出すことができる他の多くの方法

10

20

30

40

50

によっても決定及び/又はモニターされることができる。細胞性免疫応答は、IFN- 又はIL-10のような関連するサイトカインの、現在又は以前に(病原性)ミコバクテリアに感染したか又はこれに限定されないがポリペプチドで免疫化された哺乳類から取り出したリンパ球からの放出の誘導(又はその中の増殖の誘導)によって決定できる。細胞増殖をモニターするために、該細胞は、放射活性の標識チミジンでパルスされてよく、又は、(フロー)サイトメーター中又は顕微鏡下で計数されることができる。サイトカインの誘導は、これに限定されないが、ELISA又はElispotアッセイのような種々の免疫化学方法によってモニターされることもできる。インビトロの細胞性応答は、健康な被験者又はミコバクテリア感染哺乳類に由来するT細胞株の使用によって測定されることもでき、ここで、該T細胞株は、生菌及び/又は死菌、弱毒化又は組換えのミコバクテリア、潜在性ミコバクテリア又はそれらに由来するかそれらから得られる選択された抗原のいずれかで駆動される。

10

## 【0049】

ワクチン又は免疫原性組成物という用語は、哺乳類における特異的な免疫応答を刺激するために有用な組成物を記載するためにここで用いられ、任意に、特定のタイプの免疫応答、好ましくはCTL又はTh応答を増強するか方向付けるために、アジュバント及び他の活性成分を含む。

## 【0050】

潜在性特異的ポリペプチド又は抗原は、その活性又は対数増殖期よりもその休眠又は定常期にあるミコバクテリアによってより高いレベルで(又は排他的に)発現され、そして結核菌は、NRP /休止状態(DosR)レギュロンによってコードされ得る(Voskuil et al, 2003)。

20

## 【0051】

TST陽性個体は、陽性マントークス(Mantoux)試験(>5 mm硬化)を有する哺乳類、又は、精製タンパク質誘导体PPD(=ツベルクリン)がIFN- の放出によって測定される陽性インビトロリコール応答を誘導し、これによって、潜在性ミコバクテリア感染を有するかもしれない個体、即ち、(病原性の)ミコバクテリア、例えば、結核菌で感染されたが、結核(TB)のような(活発な)疾病の徴候を示さない被験者を含むように解される。TB患者は、(病原性)ミコバクテリアの培養又は顕微鏡的に証明されたそれによる感染を有する個体、及び/又は、臨床的にTBと診断され、抗-TB化学療法に応答性である個体であると解される。TBの培養、顕微鏡及び臨床的診断は、当該分野の何れの医師にも周知である。

30

## 【0052】

核酸配列は、該第一の核酸配列が該第二の核酸配列と機能的な関係に置かれた場合に、第二の核酸配列と作動可能に結合される。例えば、プロモーターがコーディング配列の転写又は発現に影響する場合に、該プロモーターは該コーディング配列に作動可能に結合される。一般に、作動可能に結合されたDNA配列は、2つのタンパク質コーディング領域を連結することが必要な場合、同じリーディングフレーム中で隣接される。

## 【0053】

本明細書で用いられるベクターとは、宿主細胞中に導入され、それによって形質転換宿主細胞を生成するような核酸分子を指す。ベクターは、複製開始点のような、宿主細胞中でそれが複製することを可能にする核酸配列を含み得る。ベクターは、例えば、プラスミド、ファージミド、ファージ、コスミド、ウイルス、レトロウイルス、エピソーム又は転移因子であってよい。またベクターは、一以上の選択(抗生物質耐性)マーカー遺伝子又は視覚的(例えば、GFP、免疫タグ)マーカー遺伝子並びに当該分野で既知の他の遺伝子要素を含んでもよい。

40

## 【0054】

タンパク質、ペプチド及びポリペプチドは、そのアルファ炭素が、一つのアミノ酸のアルファ炭素のカルボキシル基ともう一つのアミノ酸のアルファ炭素のアミノ基との間の縮合反応によって形成されたペプチド結合を介して結合した、アミノ酸の直鎖状ポリマー鎖(典型的にはLアミノ酸)である。該鎖の一端における末端アミノ酸(即ち、アミノ末端)は、遊離アミノ基を有し、該鎖の他の末端における末端アミノ酸(即ち、カルボキシ末

50

端)は遊離のカルボキシル基を有する。そのような、アミノ末端(N-末端)という用語は、該ペプチドのアミノ末端におけるアミノ酸の遊離のアルファアミノ基を指し、或いは、該ペプチド内の任意の他の位置におけるアミノ酸のアルファアミノ基(ペプチド結合に参与する場合、イミノ基)を指す。カルボキシ末端(C-末端)という用語は、ペプチドのカルボキシ末端におけるアミノ酸の遊離のカルボキシル基を指し、或いは、該ペプチド内の任意の他の位置におけるアミノ酸のカルボキシル基を指す。

【0055】

合成ポリペプチドは、インビトロで、ペプチド結合を形成するための有機化学のツールを用いて、アミノ酸を特定の順番で連結することによって形成されたポリペプチドを指す。典型的には、ペプチドを構成するアミノ酸は、アミノ末端から開始して、該ペプチドのカルボキシ末端に向かって増加するような順番で番号を付けられる。

10

【実施例】

【0056】

材料及び方法

試験被験者

試験は、20人のTB患者、23人の健康なツベルクリン皮膚試験(TST)陽性個体及び21人の健康な非感染コントロールを含んだ。我々の第一の目的が、新規の潜在性抗原に対するT細胞応答をスクリーニングすることであったために、認識が最も起こりそうな結核菌感染期を仮定しなかった。それ故、TB患者及びTST転換者という異質な組を試験被験者として選択した。

20

【0057】

20人のTB患者のうち11人は、2週間から6ヶ月(平均2.5ヶ月)の間治療された活発なTB疾病を有し、9人は、血液採取の前に4-63年間(平均間隔29年)治療されTBが治癒した個体である。11人の患者は肺性であり、9人は肺外TBであった。血液採取時点の平均年齢は、46歳(範囲17-75)であり、14人が男性であった。9人の患者はオランダ人であり、3人は北アフリカ人であり、6人はアフリカ人であり、3人はアジア系であった。HIVの危険因子を有する患者はいなかった。

【0058】

23人のTST陽性の人は全員健康であり、非-BCGワクチン接種であり、実証されたTST結果10mm硬変を有する個体であり、大部分はスミア陽性肺性TB(n=14)の事例と接触後である。平均年齢は37歳(範囲21~63)であり、14人は男性であった。全員オランダ人であった。12人から、TST転換後6ヶ月以内に血液が抜かれ、そのうち5人のみが潜在性TB感染のためのイソニアジドで治療された。残りの11人のTST陽性個体において、転換と血液採取の間の平均間隔は6年(2~12年の範囲)であった。それらの遠隔性TST転換者(converters)の2人のみが、イソニアジドを受けた。この記述の時点までに、TST転換後4.9年の平均期間の後に活発なTB疾病を発達させたTST陽性個体はなかった。このグループのほとんどの個体は、潜在的に感染した個体とみなされ、活発なTB疾病の発達に対する天然の防御をあるレベルで示す。

30

【0059】

コントロールグループとして、21人の健康な、非BCGワクチン接種個体が試験された。健康なコントロールのうち、TBへの既知の曝露を有する者はいなかった。それらはいずれもTST陰性(n=18;残りの他はTSTを行わなかった)であり、又は、IFN- $\gamma$ のためのELISPOTにより(21)結核菌特異的タンパク質、ESAT-6及びCFP-10に対する陰性が試験された。全てのコントロールは平均年齢30歳(範囲22~44歳)のオランダ人であり、7人が男性であった。

40

【0060】

書面による告知に基づく同意が得られた後に、ヘパリン処置チューブを用いて、標準静脈穿刺によって血液サンプルを全ての試験被験者から得た。続いて、フィコール密度勾配を用いてPBMCを単離し、先に記載されたように(22)液体窒素中で保管した。試験プロトコール(P207/99)は、ライデン大学医学センターの治験審査委員会によって承認された。

50

## 【 0 0 6 1 】

## 結核菌抗原及びペプチド

この試験のために、結核菌H37Rvを堅いスクリーキャップを持つチューブ中で24時間増殖し、収集し、先に記載されたように(16)溶解した。さらに低酸素ライセートと称されるこのライセートをアセトンで沈殿させ、PBSで透析した。この低酸素培養物の培養濾液を、セントリプレップ濃縮機で濃縮した。結果として生じた標本のタンパク質濃度をBCA試験(Pierce, Rockford, Illinois)によって測定した。該低酸素のライセート及び低酸素の培養物濾液は、スターテン(Statens)血清研究所(Copenhagen, Denmark)によって提供された。標準通気研究室条件下で培養された結核菌のライセートは、国立公衆衛生及び環境研究所(Bilthoven, the Netherlands)によって提供された。

10

## 【 0 0 6 2 】

組換えタンパク質を結核菌(表I)の休止状態レギュロンからの25の最も上方制御された遺伝子から調製した。遺伝子をPCRで増幅し、N-末端ヒスチジンタグを含む細菌発現ベクター中でGateway Technology (Invitrogen, San Diego, CA)によってクローン化した。該タンパク質を大腸菌B株BL21(DE3)中で過剰発現させ、先に開示されたように(23)精製した。正しい配列が発現されたことを確認するため、全ての挿入断片をシークエンスした。サイズ及び純度を、ゲル電気泳動及び抗His抗体によるウェスタンブロッティングにより調べた。残留エンドトキシンレベルは、カプトガニ(Limulus)アメーバ様細胞ライセート試験(BioWhittaker, Walkersville, MD)によって評価したとき50 I.U./mg タンパク質より低かった。

20

## 【 0 0 6 3 】

潜在性抗原Rv1733c、Rv2029c、Rv2627c及びRv2628からの20の合成ペプチドを、それぞれ20アミノ酸(aa)長、10 aa重複及び前記潜在性抗原の完全なaa配列にまたがって調製した(22)。溶解性を改善するために、全てのペプチドの配列を、C-末端において2つのリジン残基によって伸長した。PBMCの最適な使用のために、それぞれ4~5ペプチドを有し、また、それぞれ個々のペプチドが2つの異なるプールに存在する、9つのペプチドのプールを作成することを選んだ。この方法は、抗原特異的T細胞によって認識される、プール内の特異的なペプチドの同定を可能にした。

## 【 0 0 6 4 】

## T細胞株

HspXに反応することが分かっている2人のTB患者及び2人のTST陽性個体から得たPBMCを用いて、低酸素条件下で増殖された結核菌のライセート(n=4)又は培養濾液(n=4)の何れかに対して、8つの長期T細胞株を作成した。比較のために、3人のTB患者及び1人のTST陽性個体からのPBMCを結核菌のライセートで刺激することによって作成した4つのさらなる結核菌-特異的T細胞株を、標準的な通気の実験室条件下で培養した。T細胞株は、先の開示(24)の通りに作成した。要するに、PBMCを上記で特定された5 µg/ml抗原の存在下で、24ウェルプレート(Nunc, Roskilde, Denmark)中で、 $1 \times 10^6$  細胞/ウェルでインキュベートした。6日後、25 U/mlのインターロイキン-2 (Cetus, Amsterdam, The Netherlands)を加え、培養をさらに2~3週間継続した。T細胞を凍結し、使用まで液体窒素中で保管した。

30

40

## 【 0 0 6 5 】

## T細胞増殖アッセイ

T細胞( $5 \times 10^4$ /ウェル)を、抗原提示細胞( $1.5 \times 10^4$ /ウェル)として、自家性の又はHLA-D Rが一致した照射されたPBMCと共に、三通り、96ウェルの平底マイクロタイタープレート(NUNC)中、抗原の存在下又は非存在下で培養した。10%のプールされたヒト血清、40 U/mlのペニシリン及び40 µg/mlのストレプトマイシンを補充したイスコーブ(Iscoves)改変DMEM(Gibco, Paisley, Scotland)を標準培養培地として用いた。表Iに示した全部で25の組換え潜在性抗原を、最終濃度0.33 µM、標準結核菌ライセート、1 µg/mlの濃度の該低酸素のライセート及び培養物濾液で試験した。マイトジェンPHA (2 µg/ml)をポジティブコントロールとして用いた。37 °C及び5% CO<sub>2</sub>での3日間の培養の後、IFN-γの検出のため

50

に上清(三通り毎にプールされた50 µl/ウェル)を集め、及びT細胞の増殖を [<sup>3</sup>H]チミジン取込みによって先に開示されたように(22)測定した。増殖は刺激(stimulation)指数として表現され、刺激ウェルにおける毎分のカウントとして算出され、非刺激ウェルにおける毎分のカウントで割り算される。刺激指数 4が陽性応答として事前に定義された。

#### 【0066】

##### リンパ球刺激アッセイ

PBMC( $1.5 \times 10^5$ /ウェル)を三通り、96-ウェルの丸底マイクロタイタープレート中で、37、5% CO<sub>2</sub>で、潜在性抗原の存在下又は非存在下で、標準培養培地で培養した。全ての実験を通して同じ抗原及び同じバッチを使用した。Rv1733cバッチの不足のために、この抗原のための試験被験者の数を17人の健康なコントロール、18人のTST+個体及び16人のTB患者に限定した。6日目、IFN- の検出のために上清を収集し(75 µl/ウェル、三通りについてプールした)、T細胞の増殖を他で(22)開示されたように測定した。

#### 【0067】

##### IFN- 検出

該上清中のIFN- 濃度をELISA (U-CyTech, Utrecht, The Netherlands)により測定した。該アッセイの検出限界は20 pg IFN- /mlであった。ELISAサンプルは二つ組で試験した。非刺激培養物の平均値を、刺激培養物の平均値から減算した。陽性応答を、刺激されたT細胞株の上清においてIFN- レベル 50 pg/mlとして、及び、PBMC培養物からにおいて100 pg/mlとして、予め定義した。

#### 【0068】

##### 多発性(Multiplex)サイトカイン検出

培養物上清におけるIFN、TNF、IL-10、IL-5、IL-4及びIL-2のレベルを、ひとつのサンプルにおいて多数のサイトカインの同時検出を可能にする、ヒトTh1/Th2 サイトカイン(BD Biosciences)のためのCytometric Bead Array (CBA)キットを用いて測定した。アッセイは、製造者の説明書に従って行った。

#### 【0069】

##### CFSE標識されたPBMCの増殖

PBMCを解凍し、PBS/0.5% BSA (37 )中に $10 \times 10^6$  cell/mlで再懸濁した。CFSEを最終濃度5 µMで加え、37 で10分間、暗中でインキュベートした。インキュベーション後、FCS (10%)を加え、細胞をPBS/0.5% BSA中で2回洗浄した。標識されたPBMC( $1 \times 10^6$  cell/well)を24ウェルプレート上で、標準培養培地で、PPD (5 µg/ml)、Rv1733c組換えタンパク質(20 µg/ml)、Rv1733cペプチドプール(ペプチド当たり10 µg/ml)、PHA (2 µg/ml)の何れかの存在下で、又は培地のみで培養した。6日後、細胞をPBS/0.1% BSAで洗浄し、CD4で染色し、続いて、CD4陽性細胞の増殖を、フローサイトメーターを用いたCFSE希釈の測定によって評価した。

#### 【0070】

##### 統計学的分析

各研究グループにおける応答者の割合を比較するため、カイ二乗試験を用いた。半(Median) IFN- 応答を、全3つの研究グループを比較するためにクルスカール-ウォリス(Kruskal-Wallis)試験を用いて、非パラメトリカル(non-parametrically)に評価し、二つのグループを比較する場合に、マン-ホイットニーU検定法をhoc 試験後に用いた。本研究の第一の目的が潜在的な免疫原性の潜在性抗原の初期スクリーニングであるために、ボンフェローニコレクションを適用しなかった。TST陽性個体がTB患者よりも一般によく25潜在性抗原を認識するという過程を試験するために非パラメトリックなフリードマン試験(ランクによる分散)を適用した。<0.05のA P値は、投擲的に有意であると見なした。統計分析のために、ウィンドウズ(登録商標)用のSPSS 10.0を用いた。

#### 【0071】

##### 実施例 1

##### 免疫原性潜在性抗原の選択

抗原を、NRP、酸素制限の間及び低用量酸化窒素曝露の間に誘導されることが発見され

10

20

30

40

50

た(17)、48遺伝子(表2)から成る、近年同定された結核菌の休止状態レギュロンから選択した。それらの遺伝子のほとんどが、機能が未知の仮定上のオープンリーディングフレームであるため、このポストゲノムの抗原探索のための遺伝子の選択は、タンパク質の機能に基づくことはできない。それ故、我々は、遺伝子をそれらの誘導レベルに基づいて選択することを選んだ。この目的のために、潜伏時の3つの異なるインビトロモデルにおいて、「Voskuil et al.」によって観察されたような折り畳みに基づいて、平均折り畳み(mean fold)誘導をそれぞれ個々の遺伝子について算出した(17)。48の候補遺伝子のデータから、25の最も強力に誘導する遺伝子が、組換えタンパク質のクローニングと発現のために選択された(表1; 図7i及び図8i)。それらの仮定上のタンパク質は続いて、サイズがかなり異なっている(9~74 kDa)潜在性抗原を直接比較することを可能にするために、等しいモル濃度で試験した。25の抗原は全て、結核菌超音波処理で作成した短期T細胞株により認識される。

#### 【0072】

それらの仮定上の潜在性抗原の免疫原性の初期評価のために、長期T細胞株を、ライセート(n=4)又は低酸素条件下で増殖させた結核菌の培養濾液(n=4)又は標準的な通気条件下のもの(n=4)の何れかに対して作成し、また、特異性をT細胞増殖アッセイによって確認した。重要なことに、全25の潜在性抗原は、試験された12のT細胞株の少なくとも1つによって認識され、(IFN- $\gamma$  > 50 pg/ml)、20抗原は少なくとも4つのT細胞株によって認識された(図1)。潜在性抗原HspX (Rv2031c)及びRv2032は、試験されたT細胞株の75%によって最も頻繁に認識され、半IFN- $\gamma$  レベルがそれぞれの応答株で507及び129 pg/mlであった。ほとんどの潜在性抗原は、低酸素のライセートによって産生されたT細胞株によって、並びに、低酸素の培養濾液に対して産生されたものによって、認識され、潜在性抗原もまた、培養濾液中において、細胞外に発見できるということを示した。これは、Rv0569、Rv2623及びRv2626cタンパク質が、低酸素条件下で増殖された結核菌の培養濾液に存在したということを示す先の研究(16)を確認する。標準的なライセート特異的T細胞株は、低酸素ライセート特異的T細胞株がしたのと等しく潜在性抗原に対して応答した(図1)。この発見は、細菌が、定常増殖期の間に収集された場合、定義された低酸素条件下で培養された場合よりもより低い範囲であるにもかかわらず、潜在性抗原が、標準的に通気された培養において結核菌によって発現されるという(25)近年の観察と一致する。T細胞株の産生のために用いた標準的な通気の結核菌ライセートのウェスタンブロット分析は、この製剤における潜在性抗原 HspXの存在を確認した(データは示さず)。増殖データ(データは示さず)からの同様の結果は、潜在性抗原に対するT細胞株の応答性を確認した。この第一の探索スクリーニングは、全25の新規のミコバクテリア潜在性抗原が細胞性免疫応答を潜在的に誘発できることを証明した。

#### 【0073】

##### 実施例2

結核菌潜在性抗原に対する応答におけるPBMCによるインターフェロン- $\gamma$  産生

続いて、該25の潜在性抗原を、20人のTB患者、23人のTST陽性の健康な個体及び21人の未感染のコントロール被験者のPBMCによるIFN- $\gamma$  産生の誘導について試験した。それぞれの個々の潜在性抗原について、グループ当たりの応答(IFN- $\gamma$  > 100 pg/ml)試験被験者の割合を算出した(表1)。我々は、20人のTB患者及び23人のTST陽性個体を合わせて、全43人の結核菌感染個体の応答者の割合も算出した。後者の分析は、19の潜在性抗原が、感染個体の過半数(56%)によって認識されるRv1733cと共に、結核菌感染個体の少なくとも5%によって認識されることを示した。残りの試験された6つの抗原、Rv0572c、Rv2623、Rv2624c、Rv3127、Rv3131、Rv3134cは、結核菌感染個体によって認識されないか、又は極めてわずかにしか認識されなかった。増殖データを分析したとき、同様の認識プロフィールが見出された(示さず)。

## 【表1】

表1 潜在性抗原の免疫原性<sup>a</sup>

Rv no.	遺伝子	産物	応答者(%) <sup>b</sup>			
			HC (n=21)	TB (n=20)	TST+ (n=23)	
Rv0079		HP	14	10	26	10
Rv0569		CHP	-	5	22	
Rv0572c		HP	10	5	-	
Rv1733c		膜貫通可能タンパク質	41	50	61	
Rv1738		CHP	-	11	13	
Rv1813c		CHP	14	15	17	
Rv1996		CHP	14	11	4	
Rv2007c	<i>fdxA</i>	概然的フェレドキシン A	-	-	9	
Rv2029c	<i>pfkB</i>	概然的ホスホフルクトキナーゼ B	29	25	61*	
Rv2030c		CHP	14	15	26	
Rv2031c	<i>hspX</i>	熱ショックタンパク質 HspX	5	20	-*	
Rv2032	<i>acg</i>	CHP Acg	14	20	30	20
Rv2623	<i>TB31.7</i>	CHP TB31.7	-	-	-	
Rv2624c		CHP	-	-	-	
Rv2626c		CHP	14	10	30	
Rv2627c		CHP	38	30	52	
Rv2628		HP	10	16	35	
Rv3126c		HP	19	10	30	
Rv3127		CHP	-	-	4	
Rv3129		CHP	19	21	35	
Rv3130c		CHP	-	-	13	
Rv3131		CHP	-	-	4	30
Rv3132c	<i>devS</i>	センサーヒスチジンキナーゼ	24	15	17	
Rv3133c	<i>dosR</i>	転写性制御タンパク質	14	32	30	
Rv3134c		CHP	-	-	4	

a 略語:HC、健康なコントロール; TB、TB患者; TST+、ツベルクリン皮膚試験陽性個体; HP、仮定タンパク質; CHP、保存された仮定タンパク質。

注釈は、<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>から

b  $\geq 100$  pg/ml の IFN- $\gamma$  応答は陽性とみなした。 -、被験者の何れも応答せず

\*  $P < .05$ 、TB患者とTST+個体を比較する  $\chi^2$  試験

40

## 【0074】

25のもっとも強力に誘導されるDosR遺伝子に加えて、48 DosR遺伝子の全体のグループが、まだ試験されていない残りの23のTB潜在性抗原を含む、INF 産生について再び試験された。全てのDosR遺伝子は、上記と同様の方法で試験され、結果を図7ii及び8iiに示した。下のパネルから、Rv1733c、Rv2029c、Rv2627c及びRv2628に加えて、強力なINF 産生を生じるさらなる4つの抗原：Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)が、潜在的なワクチン候補として選択されることができるとは明らかである。

## 【0075】

実施例3

潜在性抗原に異なる応答をするTB患者及びTST陽性個体

50

TB患者及びTST転換者のグループにおける半(median)IFN- 応答を、各潜在性抗原について測定した。25の潜在性抗原をひとつのグループと見なすと、半IFN- 応答は、TB患者よりも、結核菌に潜在的に感染したとみなされるTST陽性個体において一貫して有意に高かった ( $P < 0.01$ ; フリードマン試験)。抗原認識におけるこの相違をさらに分析するため、我々は、IFN- 応答と各潜在性抗原の間の比と、同じ個体における低酸素結核菌ライセートにたいする総応答を算出した。この分析は、T細胞の普遍的な応答性において起こり得る個体間変動を矯正する。上記のフリードマン分析が繰り返し、それらの比の中央値 (medians) を比較すると、潜在性抗原がTST陽性個体によって優先的に認識されるということが確認された ( $P < 0.01$ )。

【0076】

10

それぞれ個々の潜在性抗原について、TST陽性個体のグループとTB患者のグループにおける応答者の割合を比較した場合、ほとんど全ての潜在性抗原が、TB患者に比べてTST陽性個体においてより大きい割合で認識されることがわかった (表1)。しかしながら、この傾向は、Rv2029cについてのみ有意であり ( $P = 0.02$ )、これはTST陽性個体の61%及びTB患者の25%によって認識された。

【0077】

潜在性抗原の数及び認識される特異的な抗原の何れも、個体間で応答プロフィールが異なった (図2)。TST陽性個体は試験された25の潜在性抗原のうち4つの中央値を認識し、対照的にTB患者は、わずか一つの潜在性抗原の中央値を認識した。

【0078】

20

図8に、マントー陽性個体によるTB潜在性抗原の認識の頻度の概要が与えられる。25のTB潜在性抗原の第一の系列について、全ての抗原が等しく認識されるわけではないことが分かった (コ克蘭のQ検定、 $P < .001$ )。その見解に基づいて、我々は、第一系列のうち少なくとも50%の認識の潜在性抗原：Rv1733c、Rv2029c (PfkB)、Rv2627c及びRv2628を選択し、同様の特徴を有する23のTB潜在性抗原：Rv0080、Rv1737c (NarK2)、Rv1735c及びRv1736c (NarX) を第二系列から選択した。それらの8つの抗原は、個々の抗原、又はそれらの断片として、診断及びワクチン接種の目的に最も適したTB潜在性抗原の特異的なサブセットを提供するが、しかし最も好ましくはRv1733c、Rv2029c、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c (NarK2)、Rv1735c及びRv1736c (NarX) から成る群から選択される1、2、3、4、5、6、7又は8つ全部のDosR遺伝子産物の組合せで用いられる。

【0079】

30

#### 実施例4

##### 頻繁に認識される潜在性抗原に対するインターフェロン- 応答

潜在性抗原、即ちRv1733c、Rv2029c、Rv2627c及びRv2628は、潜在的に感染した個体に優先的に広く認識され、IFN- 産生によって測定される最も強いTh1応答を誘導する。夫々の試験グループについて、それらの4抗原に対するIFN- 応答を図3に示す。TST陽性個体のグループにおける、Rv1733c、Rv2029c、Rv2627c及びRv2628に反応しての半IFN- 産生は、それぞれ213、281、107及び51 pg/mlであった。反対に、それらの4つの抗原に対するより低いIFN- 応答がTB患者において見られ、夫々の中央値は98、16、 $< 10$ 及び $< 10$  pg/mlであった。このIFN- 応答における相違は、抗原Rv2029cについて統計的に有意であった ( $P = 0.03$ ) (図3)。

40

【0080】

驚くべきことに、一つの潜在性抗原、Rv2031cは、TST転換者よりもTB患者によって、より頻繁に有意に認識される ( $IFN-g > 100$  pg/ml) ( $P = 0.02$ ) (表1)。しかしながら、2つのグループの間のIFN- 産生を直接比較して定量分析を行った場合、統計的に有意な相違は見出せなかった。興味深いことに、Rv2031c (20 ~ 100 pg/mlのIFN- レベル) に対して少なくともいくらかの応答を示すTST転換者は、全て最近のTST転換であり ( $< 6$ ヶ月)、従って、結核菌に最近、曝露されたものである。

【0081】

我々が試験した他の興味深い潜在性抗原、Rv3133c/dosRは、結核菌の低酸素応答を仲介

50

する転写要因として作用することが示された(15,26,27)。近年、Rv3133c/dosR突然変異株が試験された；これはモルモットにおける病理学的な変化及び細菌の負荷量の減少を示したが、しかし、インビトロでヒト単球における結核菌の侵入、生存及び増殖を変化させなかった(28)。我々の試験において、Rv3133cは、約1/3のTST陽性個体及びTB患者によって認識され、その応答者間の半IFN- 応答は、それぞれ227及び145 pg/mlであった。

#### 【0082】

図9(オイラー図)において、IFN 応答における重複が、全ての個々の抗原が評価された被験者について、第一系列の最も良い4つのTB潜在性抗原について表れた：マントー陽性個体の82.4%が、以下の潜在性抗原：Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c及びRv2628の一以上に応答する。Rv1733c及びRv2627cの組合せは最も頻繁に認識され、Rv2029c(PfkB)及び/又はRv2628の値が追加されることなく、この現象の主な原因であった。Rv2029c(PfkB)は、マントー陽性の間で最も頻繁に認識される(70.6%)TB潜在性抗原である。それらの抗原の組合せ、好ましくはRv0080、Rv1735c、Rv1736c及び/又はRv1737cの組合せは、診断試験のために及び潜伏時及び/又は多段階のワクチン組成物のために極めて適しており、好ましいものである。

#### 【0083】

図12において、膜貫通らせん体の予測が、TB潜在性抗原Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c、及びRv1736c(NarX)について示されている。該予測は、「TMHMM 2.0 Server. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. 2001. J Mol Biol. 305(3):567-80 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)」を用いて行った。表3及び4の予測データMHCクラスI及びIIエピトープと、表5のインビトロデータとの組合せにおいて、この分析は、TB抗原に対するCD8T細胞の応答が、それらの抗原が分泌されるか又は膜結合されるという事実にかわりなく検出可能であることを証明する(Klein MR et al., HLA-B\*35-restricted CD8 T cell epitope in Mycobacterium tuberculosis Rv2903c. 2002 Infect Immun. 70(2):981-4)。

#### 【0084】

##### 実施例5

##### 健康なコントロールによる潜在性抗原の認識

幾分予想外なことに、25の潜在性抗原の16が、健康な個体の少数のT細胞によって認識されるが(表1)、しかし、その免疫応答の強度は結核菌感染個体におけるものより一般的に低い。全ての健康な非BCGワクチン接種のコントロールがTST陰性であり、また、結核菌特異的免疫優性抗原ESAT6及びCFP10に対するインビトロ応答も、このグループでは陰性であったことから(データは示さず)、潜在性抗原に対する観察された応答は、結核菌複合体種による感染によるものではないと結論付けられた。しかしながら、21人の健康なコントロールのうちの10人(48%)が、低酸素結核菌ライセートに著しく応答し、その応答者間の半IFN- 応答は563 pg/mlであった(図3及び4)。この発見は、環境のミコバクテリアへの以前の曝露の結果としてのミコバクテリアの抗原に対するT細胞のクロス反応性と矛盾しない。潜在性抗原に対する応答が、主として低酸素結核菌ライセートに強く応答する健康なコントロールのグループにおいて観察されたために(図4)、それらの応答は、クロス反応性環境ミコバクテリアへの以前の曝露を反映している可能性が高い。Rv1733cのみが、低酸素結核菌ライセートに強く応答しない健康なコントロールによって時折認識され、その半IFN- は41 pg/mlであり、ミコバクテリア抗原以外の抗原に対するクロス反応性の可能性を示唆した。

#### 【0085】

##### 実施例6

##### Rv1733cのペプチドに対する応答における、CFSE標識PBMCの増殖

潜在性抗原によるタンパク質特異的活性化を確認するために、最も頻繁に認識される抗原、Rv1733cのペプチド特異的増殖を測定した。Rv1733cに応答することが知られているT

10

20

30

40

50

S T陽性個体及び健康なコントロールからのPBMCをCFSE標識し、Rv1733cの組換えタンパク質又はペプチドプールによって刺激した。6日後、細胞をCD4について染色し、CD4 T細胞の増殖を、フローサイトメーターを用いて評価した。PPD及びRv1733c組換えタンパク質による刺激はいずれも、CD4+ T細胞の増殖を強く誘導した。また、幾つかのRv1733cのペプチドプールは、特にペプチド16を含むプールにおいて、CD4+ T細胞の増殖を誘導することができた。これは、TST陽性個体からのPBMCについての図5に示す。このHLAタイプのドナー(DRB1\*15)のためのRv1733cのエピトープのコンピュータ予測は、結果として、可能性のある幾つかのエピトープの発見をもたらし、その二つはペプチド16に位置し(VDEPAPPARAIADAALAALG及びVDEPAPPARAIADAALAALG)、ペプチド16に応答するCD4 T細胞の観察された増殖と一致する。Rv1733cのペプチドもまた、Rv1733cの組換えタンパク質に対して応答する健康なコントロールのPBMCを用いたCD4細胞の増殖を誘導し、これは、この応答が抗原特異的であることを示す。

#### 【0086】

T細胞エピトープを含む配列として原出願において言及されたRv1733cのペプチド-16に加えて、以下のさらなるT及びB細胞エピトープ及びペプチドが、選択されたTB潜在性抗原において決定された：表3及び表4において、全ての予測されたHLAクラス-I及び-II制限T細胞エピトープは、それぞれ、第一系列(即ち、Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c及びRv2628)及び第二系列(即ち、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX))の最良の4つのTB潜在性抗原を代表する。9merのアミノ酸配列を表4に載せる。これは、全て既知のHLAクラス-Iスーパータイプ：A1、A2、A3、A24、B7、B8、B27、B44、B58及びB62によって制限された、予測されたCD8 T細胞エピトープを表す。

#### 【0087】

予測は、NetCTL 1.0 Serverを用いて行われ、これは、タンパク質配列中のCD8 Tエピトープを予測する。この方法は、ペプチドMHC結合、プロテアソームのC末端の切断及びTAP輸送効率の予測を組込む。このサーバーは、10 HLAスーパータイプに制限されたCTLエピトープの予測を可能にする。MHC結合及びプロテアソームの切断は、人工的な神経回路網を使用して行われる。TAP輸送効率は、体重マトリクスを用いて予測される。参考文献「Larsen MV et al., 2005. Eur J Immunol 35(8): 2295-303 (www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL)」。

#### 【0088】

20merのアミノ酸配列を、25のHLAクラス-IIアレル：DR1 (DRB1\*0101、\*0102)、DR3 (DRB1\*0301)、DR4、(DRB1\*0401、\*0402、\*0404、\*0405、\*0410、\*0421)、DR7 (DRB1\*0701)、DR8 (DRB1\*0801、\*0802、\*0804、\*0806)、DR11(5) (DRB1\*1101、\*1104、\*1106、\*1107)、DR13(6) (DRB1\*1305、\*1307、\*1307、\*1321)、DR15(2) (DRB1\*1501、\*1502)、及びDRB5\*0101：によって制限された、予測CD4 T細胞エピトープを表す一覧表にした(表4)。この予測は、TEPITOPE 2000 (Vaccinome)を用いて行われた。TEPITOPEは、HLAクラス-IIペプチド結合に基づいたT細胞エピトープ予測モデルであり、タンパク質配列のセットにおいて、HLAクラス-IIリガンド及びエピトープの乱交雑の迅速な同定を可能にする。参考文献「Bian H, Hammer J. Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell epitopes with TEPITOPE. 2004. Methods. 34(4):468-75」。

#### 【0089】

表5において、全20merのペプチドは、20人のPPD陽性ドナーにおける認識について試験されたRv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c及びRv2628から一覧される。細胞は、CFSEで標識され、ペプチド、組換えタンパク質又はコントロールの抗原で刺激される。CD4及びCD8 T細胞の増殖は、フローサイトメーターによって測定され、上清が集められ、マルチプレックスサイトカインアッセイで分析される。

#### 【0090】

赤い表示は、複数のドナーにおいてCD4又はCD8 T細胞の強い増殖(>75%)を与えるペプチドであり、緑のペプチドは、>50-75%増殖を有するペプチドであり、明るい緑のペプチドは>20-50%を有するペプチドである(表5)。同様のデータが、他のTB潜在性抗

10

20

30

40

50

原（即ち、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)）について予期される。

【 0 0 9 1 】

表 6 に、Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)のアミノ酸配列を一覧し、太字及び下線は、それぞれ、直線的な及び高次構造的な予測されたB細胞エピトープを示す。予測はBepiPred 1.0 Serverを用いて行い、これは、隠れたマルコフモデル及び性向(propensity)スケール方法の組み合わせを用いて、直線状B-細胞エピトープの位置を予測する。高次構造のB細胞エピトープは、利用可能な構造及び機能のデータを有する既知の他のタンパク質に対する配列相同性を有するTB潜在性抗原についてのみ予測した(即ち、Rv2029c(PfkB)、Rv1736c(NarX)及びRv1737c(NarK2))。(参考:Larsen, JEP, Lund O, Nielsen M. 2006, Improved method for predicting linear B-cell epitopes (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred>))。

10

【 0 0 9 2 】

#### 実施例 7

潜在性抗原への応答における他のサイトカインの産生

ELISA(実施例 1 ~ 6)によるIFN $\gamma$ に加えて、他の一連のサイトカインを組換え抗原で刺激したPBMCの6日目の上清中で測定した。TB患者(n = 10)及びマントー陽性個体(n = 10)のPBMCを、組換えタンパク質Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、HspX (Rv2031c)、Rv2032、Rv2626c、Rv2627c、Rv2628、Rv3129、ESAT-6及びCFP10で刺激し、及びさらに陽性コントロールとして、結核菌の低酸素ライセートで刺激した(図 6)。IFN $\gamma$ についてのCBAデータは、ELISAによって行われた観察を確証した。TNF $\alpha$ 及びIL-5応答は、明白なゆがみなしで両方のグループで見出された。IL-2及びIL-4について極めて乏しい応答が検出された;また、何らかの検出可能な応答があった場合、それらはTB患者において観察された。興味深いことに、潜在性抗原の多くについて、著しいIL-10応答がマントー陽性において観察され、TB患者では観察されなかった(図 6)。

20

【表 2 - 1】

表2

結核菌 <i>DosR</i> レギュロン (AL123456)			
H37Rv	遺伝子	サイズ (aa.)	説明
Rv0079		273	仮定タンパク質
Rv0080		152	保存仮定タンパク質
Rv0081		114	概然的転写性制御タンパク質
Rv0569		88	保存仮定タンパク質
Rv0570	<i>nrdZ</i>	692	概然的リボヌクレオシド-ニリン酸レダクターゼ
Rv0571c		443	保存仮定タンパク質
Rv0572c		113	仮定タンパク質
Rv0573c		463	保存仮定タンパク質
Rv574c		380	保存仮定タンパク質
Rv1733c		210	概然的保存膜貫通タンパク質
Rv1734c		80	保存仮定タンパク質
Rv1735c		165	仮定膜タンパク質
Rv1736c	<i>narX</i>	652	概然的硝酸レダクターゼ
Rv1737c	<i>narK2</i>	395	可能な (POSSIBLE) 硝酸/亜硝酸トランスポーター
Rv1738		94	保存仮定タンパク質
Rv1812c		400	概然的デヒドロゲナーゼ
Rv1813c		143	保存仮定タンパク質
Rv1996		317	保存仮定タンパク質 - USPA
Rv1997	<i>ctpF</i>	905	概然的金属カチオントランスポーターP-タイプ ATP 分解酵素 A
Rv1998		258	保存仮定タンパク質
Rv2003c		285	保存仮定タンパク質
Rv2004c		498	保存仮定タンパク質
Rv2005c		295	保存仮定タンパク質 - USPA
Rv2006	<i>otsB1</i>	1327	概然的トレハロース-6-ホスフェートホスファターゼ
Rv2007c	<i>fdxA</i>	114	概然的フェレドキシン
Rv2028c		279	保存仮定タンパク質 - USPA
Rv2029c	<i>pfkB</i>	339	概然的ホスホヘキソキナーゼ
Rv2030c		681	保存仮定タンパク質
Rv2031c	<i>acr</i>	144	熱ショックタンパク質 X (アルファ-クリスタリンホモログ)
Rv2032	<i>acg</i>	331	保存仮定タンパク質
Rv2623	<i>TB31.7</i>	297	保存仮定タンパク質 - USPA
Rv2624c		272	保存仮定タンパク質 - USPA
Rv2625c		393	概然的保存膜貫通タンパク質

10

20

30

40

【表 2 - 2】

Rv2626c		143	保存仮定タンパク質
Rv2627c		413	保存仮定タンパク質
Rv2628		120	仮定タンパク質
Rv2629		374	保存仮定タンパク質
Rv2630		179	仮定タンパク質
Rv2631		432	保存仮定タンパク質
Rv3126c		104	仮定タンパク質
Rv3127		344	保存仮定タンパク質
Rv3128c		337	保存仮定タンパク質
Rv3129		110	保存仮定タンパク質
Rv3130c		463	保存仮定タンパク質
Rv3131		332	保存仮定タンパク質
Rv3132c		578	二成分センサーヒスチジンキナーゼ
Rv3133c	<i>dosR</i>	217	二成分転写性制御タンパク質
Rv3134c		268	保存仮定タンパク質 - USPA

## 実施例 8

曝露前（即ち、予防的な）TBワクチンについて、前臨床のTBワクチン試験が、低投与量エアロゾル感染誘発モデル (Williams et al. 2005, Tuberculosis (Edinb). 2005; 85(1-2):29-38) を含む、関連するマウス、モルモット及び非ヒト霊長類モデル (Brandt et al. Infect. Immun. 2000; 68(2): 791-795; Olsen et al. Infect. Immun. 2004; 72(10):6148-50; Langermans et al. Vaccine 2005; 23(21):2740-50) における進行性のスクリーニング及び試験を含むことは、TB分野で一般的に承認されている。曝露後（即ち、治療上の）TB患者については、現存の動物モデルはヒトTB疾病を部分的にのみ模倣し (McMurray, Clin. Infect. Dis. 2000; 30 Suppl 3:S210-2)、ヒトへの推定は不明確である。TBワクチン開発の分野における現在の考えは、新規のTBワクチンを用いて、BCGによって誘導された免疫応答を追加免疫することに向けられている（例えば、McShane et al. Nat Med. 2004; 10(11):1240-4; Orme Tuberculosis (Edinb). 2005; 85(1-2):13-7）。しかしながら、免疫応答の追加免疫は、BCGが最初の場所において応答を初回抗原刺激した場合にのみ達成される。

## 【 0 0 9 3 】

現在使用されるTBワクチンは、ウシ型結核菌BCGである。BCGは、若年の子供を播種性の及び重篤な形態のTB疾病から守るが、しかし、成人におけるほとんどの流行性で伝染性の形態の肺性TBに対しては保護できない。BCGの失敗を説明する多くの仮説が提案された。特に、BCGに対する免疫応答は、環境的なミコバクテリアへの曝露によって影響される (Fine PE, 1995 Lancet. 346:1339-45)。本発明は、より良い代替を提供する。皮膚におけるワクチン接種の間にBCGが遭遇する条件は、結核桿菌が免疫能力のある宿主において、主として肺における免疫肉芽種において、持続する間に遭遇する条件とは異なる。結論として、対応する免疫認識プロフィールを含む抗原発現プロフィールが異なる。我々は、BCGワクチン接種はTB潜在性抗原に対する免疫応答を誘導しないことを見出した：BCGワクチン接種された健康な被験者の血液サンプル(PBMC)をインビトロで試験したとき、TBに曝露された個体と比較して、TB潜在性抗原に対して極めて乏しい免疫応答が観察された (ES AT-6及びCFP10への応答についてインビトロ陽性) (図 10)。この断面積比較からの知見は、HspXの(HLA-A2及び-DR3トランスジェニック)マウスにおいて並びにBCGによるワクチン接種された通常の純系のマウスにおける他のTB潜在性抗原について実証された (図 11)。

## 【 0 0 9 4 】

免疫優性のTB潜在性抗原がヒトにおけるTBに対する天然の免疫部分として標的にされ、また、現在のBCGワクチン接種方法によっては標的にされないために、それらは治療的なTBワクチンの最も見込みのある候補を代表する。(注意として、TB潜在性抗原はいずれもRD抗原ではなく、BCGには含まれていない(Behr et al. 1999))。BCGのインビトロ発現プロファイリングは、NarX/K2を除いた全てのTB潜在性抗原の発現が可能であることを明らかにした。従って、BCGが原理的にはインビトロでTB潜在性抗原を発現することができるにも関わらず、それはDosRレギュロンをコードする抗原の発現のための適切な条件に遭遇しないことが明らかである。本発明は、組成物及び/又はワクチン、又は組換え(BCG)ミコバクテリア中で発現され及び/又はその上に示されるための代替物における使用のための、Rv1733c、Rv2029c(PfkB)、Rv2627c、Rv2628、Rv0080、Rv1737c(NarK2)、Rv1735c及びRv1736c(NarX)から成る群から選択され、最も好ましくはRv1733c、Rv2029c、Rv2627c及びRv0080から選択される、インビボでより有効なDosR潜在性抗原を提供する。本発明はまた、それらのDosR抗原内のT及び/又はB細胞のためのエピトープを提供する。

【表3-1-1】

表3-1 Rv1733cにおける予測スーパータイプHLAクラス-Iエピトープ

スーパータイプ	ID	Pos.	予測エピトープ配列	親和性	組合せスコア
A1	Rv1733c	67	VQDSRSHVY	0.30	2.30
A1	Rv1733c	143	WVDSAGQLV	0.15	1.10
A2	Rv1733c	170	GLWLSVAAV	0.41	1.10
A2	Rv1733c	165	ALAALGLWL	0.41	1.07
A2	Rv1733c	143	WVDSAGQLV	0.38	1.03
A2	Rv1733c	46	MLLAVTVSL	0.36	1.01
A2	Rv1733c	181	ALLALTRAI	0.39	0.97
A2	Rv1733c	66	AVQDSRSHV	0.31	0.88
A2	Rv1733c	111	ITVPARWVW	0.26	0.76
A3	Rv1733c	11	ATMITFRLR	0.55	1.72
A3	Rv1733c	23	RTILRVFSR	0.44	1.42
A3	Rv1733c	19	RLPCRTILR	0.29	1.04
A3	Rv1733c	127	EVNAKPGTK	0.24	0.82
A3	Rv1733c	100	TTATSAPPR	0.23	0.78
A24	Rv1733c	197	SWQHDIDSL	0.65	1.05
A24	Rv1733c	198	WQHDIDSLF	0.58	1.03
A24	Rv1733c	46	MLLAVTVSL	0.63	1.02
A24	Rv1733c	142	IWVDSAGQL	0.58	0.96
A24	Rv1733c	51	TVSLLTIPF	0.47	0.87
A24	Rv1733c	21	PCRTILRVF	0.54	0.86
A24	Rv1733c	161	IADAALAAL	0.51	0.84
A24	Rv1733c	12	TMITFRLRL	0.49	0.83
A24	Rv1733c	47	LLAVTVSLL	0.52	0.83
A24	Rv1733c	40	RLEAVVMLL	0.49	0.82

10

20

30

40

【表 3 - 1 - 2】

A24	Rv1733c	8	REGATMITF	0.43	0.78
B7	Rv1733c	153	EPAPPARAI	0.66	1.89
B7	Rv1733c	59	FAAAAGTAV	0.59	1.70
B7	Rv1733c	17	RLRLPCRTI	0.49	1.43
B7	Rv1733c	177	AVAGALLAL	0.46	1.39
B7	Rv1733c	105	APPRTKITV	0.41	1.22
B7	Rv1733c	175	VAAVAGALL	0.38	1.19
B7	Rv1733c	6	RDREGATMI	0.36	1.13
B7	Rv1733c	174	SVAAVAGAL	0.32	0.99
B7	Rv1733c	103	TSAPPRTKI	0.30	0.96
B7	Rv1733c	80	QTRHPATAT	0.34	0.92
B8	Rv1733c	21	PCRTILRVF	0.34	1.78
B8	Rv1733c	114	PARWVVNGI	0.18	0.99
B27	Rv1733c	70	SRSHVYAHQ	0.25	1.30
B27	Rv1733c	26	LRVFSRNPL	0.19	1.09
B27	Rv1733c	158	ARAIADAAL	0.17	1.00
B44	Rv1733c	8	REGATMITF	0.20	1.56
B44	Rv1733c	126	GEVNAKPGT	0.13	0.88
B58	Rv1733c	135	KSGDRVGIW	0.78	2.76
B58	Rv1733c	111	ITVPARWVV	0.52	1.92
B58	Rv1733c	164	AALAALGLW	0.36	1.30
B58	Rv1733c	103	TSAPPRTKI	0.27	1.07
B58	Rv1733c	109	TKITVPARW	0.21	0.83
B62	Rv1733c	198	WQHDIDSLF	0.58	1.73
B62	Rv1733c	67	VQDSRSHVY	0.51	1.56
B62	Rv1733c	190	LIRVRNASW	0.31	0.95
B62	Rv1733c	51	TVSLLTIPF	0.27	0.91
B62	Rv1733c	170	GLWLSVAAV	0.27	0.81
B62	Rv1733c	46	MLLAVTVSL	0.24	0.76

10

20

30

【表 3 - 2 - 1】

表3-2 Rv2029cにおける予測スーパータイプ HLA クラス-I エピトープ

スーパータイプ	ID	Pos.	予測エピトープ配列	親和性	組合せスコア
A1	Rv2029c	319	PTEVGQDQY	0.52	3.69
A1	Rv2029c	1	MTEPAAWDE	0.21	1.32
A2	Rv2029c	117	VLPGPSLTV	0.54	1.41
A2	Rv2029c	182	GLQHISSGV	0.46	1.19
A2	Rv2029c	296	LLTPGTAAC	0.44	1.07
A2	Rv2029c	221	LIDRGRAEV	0.33	0.89
A2	Rv2029c	82	LLGDAGVPF	0.26	0.83
A2	Rv2029c	208	LLTEPEQLA	0.32	0.82
A2	Rv2029c	60	VLGGCSTAL	0.28	0.80
A2	Rv2029c	67	ALFPAGGST	0.32	0.75
A3	Rv2029c	104	TVNESRTAK	0.66	2.07
A3	Rv2029c	186	ISSGVFLK	0.34	1.14
A3	Rv2029c	101	ESFTVNESR	0.25	0.92
A3	Rv2029c	236	SQGALLATR	0.25	0.89
A3	Rv2029c	275	LSRGWSLIK	0.25	0.88
A3	Rv2029c	154	GVAADYYQR	0.25	0.80
A3	Rv2029c	269	AAITVGLSR	0.22	0.80
A24	Rv2029c	279	WSLIKSVRL	0.67	1.07
A24	Rv2029c	143	AFVVASGSL	0.65	1.05
A24	Rv2029c	44	RYDPGGGGI	0.64	1.00
A24	Rv2029c	158	DYYQRVADI	0.62	0.98
A24	Rv2029c	267	MVAAITVGL	0.57	0.94
A24	Rv2029c	115	RFVLPGPSL	0.55	0.93
A24	Rv2029c	87	GVPFRVIPI	0.58	0.92
A24	Rv2029c	192	LLKASVREL	0.52	0.85
A24	Rv2029c	242	ATRHASHRF	0.44	0.84
A24	Rv2029c	226	RAEVVVVSL	0.50	0.83
A24	Rv2029c	82	LLGDAGVPF	0.45	0.83
A24	Rv2029c	108	SRTAKQYRF	0.41	0.79
A24	Rv2029c	304	CNRDDVERF	0.45	0.75
B7	Rv2029c	11	KPRIITLTM	0.66	1.93
B7	Rv2029c	253	IPMTAVSGV	0.45	1.35
B7	Rv2029c	115	RFVLPGPSL	0.34	1.12
B7	Rv2029c	95	IAASTRESF	0.33	1.06
B7	Rv2029c	136	RGAAASAAF	0.31	1.05
B7	Rv2029c	166	ICRRSSTPL	0.31	1.00
B7	Rv2029c	226	RAEVVVVSL	0.29	0.97
B7	Rv2029c	138	AAASAAFVV	0.25	0.83
B7	Rv2029c	224	RGRAEVVVV	0.25	0.79
B7	Rv2029c	196	SVRELRECV	0.24	0.79
B7	Rv2029c	250	FSSIPMTAV	0.23	0.75
B8	Rv2029c	9	EGKPRIITL	0.35	1.83
B8	Rv2029c	192	LLKASVREL	0.31	1.63
B8	Rv2029c	166	ICRRSSTPL	0.20	1.11
B8	Rv2029c	110	TAKQYRFVL	0.19	1.07
B8	Rv2029c	242	ATRHASHRF	0.16	0.98

10

20

30

40

【表 3 - 2 - 2】

B8	Rv2029c	222	IDRGRAEVV	0.14	0.76	
B27	Rv2029c	108	SRTAKQYRF	0.46	2.48	
B27	Rv2029c	168	RRSSTPLIL	0.28	1.57	
B27	Rv2029c	305	NRDDVERFF	0.21	1.25	
B27	Rv2029c	225	GRAEVVVVS	0.16	0.76	
B27	Rv2029c	161	QRVADICRR	0.12	0.75	
B44	Rv2029c	106	NESRTAKQY	0.15	1.30	
B44	Rv2029c	313	FELAAEPTTE	0.18	1.13	10
B44	Rv2029c	100	RESFTVNES	0.16	0.98	
B44	Rv2029c	227	AEVVVVSLG	0.14	0.91	
B44	Rv2029c	201	RECVGSELL	0.11	0.88	
B44	Rv2029c	320	TEVGQDQYV	0.10	0.77	
B58	Rv2029c	271	ITVGLSRGW	0.74	2.62	
B58	Rv2029c	321	EVGQDQYVW	0.50	1.81	
B58	Rv2029c	109	RTAKQYRFV	0.25	0.90	
B58	Rv2029c	15	ITLTMNPAL	0.23	0.89	
B58	Rv2029c	242	ATRHASHRF	0.18	0.87	
B58	Rv2029c	232	VSLGSQ GAL	0.19	0.79	
B62	Rv2029c	183	LQHISSGVF	0.57	1.61	20
B62	Rv2029c	82	LLGDAGVPF	0.51	1.52	
B62	Rv2029c	240	LLATRHASH	0.34	0.94	
B62	Rv2029c	37	KMRCGAPRY	0.24	0.86	
B62	Rv2029c	61	LGGCSTALF	0.26	0.84	
B62	Rv2029c	136	RGAAASAAF	0.25	0.83	
B62	Rv2029c	60	VLGGCSTAL	0.24	0.75	

【表 3 - 3 - 1】

表3-3 Rv2627c における予測スーパータイプ HLA クラス-I エピトープ

スーパータイプ	ID	Pos.	予測エピトープ配列	親和性	組合せスコア
A1	Rv2627c	35	YVAQSWRDY	0.16	1.28
A1	Rv2627c	127	VKDRRRSFY	0.13	1.14
A1	Rv2627c	157	SYTANNREY	0.09	0.90
A1	Rv2627c	92	EVAAGLEFY	0.09	0.85
A1	Rv2627c	2	ASSASDGTH	0.11	0.77
A2	Rv2627c	29	FMHTGLYVA	0.51	1.29
A2	Rv2627c	271	SLGGYIASL	0.46	1.25
A2	Rv2627c	320	KMAEPIGRM	0.40	1.10
A2	Rv2627c	275	YIASLVASL	0.35	0.98
A2	Rv2627c	43	YLGQQPDKL	0.34	0.94
A2	Rv2627c	286	GLACAILGV	0.36	0.94
A2	Rv2627c	282	SLEEGLACA	0.37	0.89
A2	Rv2627c	245	AVWDIRRL	0.26	0.78
A3	Rv2627c	398	QSGLLDAPR	0.42	1.35
A3	Rv2627c	8	GHERSAFR	0.39	1.27
A3	Rv2627c	212	PVLPMHGPR	0.37	1.27
A3	Rv2627c	243	AQAVWDIRR	0.38	1.22
A3	Rv2627c	312	KDPRRHTVK	0.37	1.21
A3	Rv2627c	192	DLAVFRAWK	0.36	1.14
A3	Rv2627c	69	IVLLGLKAR	0.32	1.05
A3	Rv2627c	92	EVAAGLEFY	0.26	0.98
A3	Rv2627c	100	YGNRRWLEK	0.28	0.91
A3	Rv2627c	194	AVFRAWKLH	0.30	0.90
A3	Rv2627c	33	GLYVAQSWR	0.26	0.88
A3	Rv2627c	189	APLDLAVFR	0.24	0.87
A24	Rv2627c	374	WYPGGHTGF	0.87	1.43
A24	Rv2627c	345	IYAGIADRL	0.80	1.24
A24	Rv2627c	157	SYTANNREY	0.70	1.22
A24	Rv2627c	104	RWLEKPSGF	0.70	1.21
A24	Rv2627c	64	AFRDEIVLL	0.65	1.05
A24	Rv2627c	135	YRIFFD SGF	0.58	1.02
A24	Rv2627c	105	WLEKPSGFF	0.58	1.02
A24	Rv2627c	188	RAPLDLAVF	0.55	1.00
A24	Rv2627c	383	FQSRPVRRF	0.61	0.98
A24	Rv2627c	329	ISPLSLTPL	0.60	0.95
A24	Rv2627c	291	ILGVPVADL	0.59	0.95
A24	Rv2627c	98	EFYGNRRWL	0.58	0.92
A24	Rv2627c	199	WKLHDELGL	0.57	0.90
A24	Rv2627c	264	LIGLNGLSL	0.56	0.89
A24	Rv2627c	131	RRSFYRIF	0.45	0.86
A24	Rv2627c	130	RRRSFYRIF	0.46	0.86
A24	Rv2627c	216	MHGPRGQGL	0.58	0.85
A24	Rv2627c	26	MGPFMHTGL	0.52	0.85
A24	Rv2627c	193	LAVFRAWKL	0.51	0.85
A24	Rv2627c	14	AFRLSPPVL	0.49	0.84
A24	Rv2627c	111	GFFAQPPPL	0.52	0.83

10

20

30

40

【表 3 - 3 - 2】

A24	Rv2627c	275	YIASLVASL	0.49	0.82	
A24	Rv2627c	170	RHPEPRPWL	0.48	0.81	
A24	Rv2627c	324	PIGRMISPL	0.49	0.79	
A24	Rv2627c	57	TIALAAQAF	0.48	0.78	
A24	Rv2627c	89	ISQEVAAGL	0.46	0.78	
A24	Rv2627c	21	VLSGAMGPF	0.44	0.76	
A24	Rv2627c	366	HWGKPEIVW	0.46	0.76	
B7	Rv2627c	355	HPREQVTRL	0.63	1.87	10
B7	Rv2627c	78	RPVSNHRVF	0.57	1.82	
B7	Rv2627c	313	DPRRHTVKM	0.53	1.56	
B7	Rv2627c	18	SPPVLSGAM	0.48	1.44	
B7	Rv2627c	55	RPTIALAAQ	0.42	1.22	
B7	Rv2627c	170	RHPEPRPWL	0.36	1.17	
B7	Rv2627c	404	APRTQRDRS	0.44	1.13	
B7	Rv2627c	388	VRRFVQAAL	0.34	1.09	
B7	Rv2627c	338	VPMPGRFIY	0.29	1.04	
B7	Rv2627c	386	RPVRRFVQA	0.34	1.03	
B7	Rv2627c	50	KLPIARPTI	0.32	1.00	
B7	Rv2627c	393	QAALEQSGL	0.31	0.97	20
B7	Rv2627c	126	KVKDRRRSF	0.29	0.95	
B7	Rv2627c	173	EPRPWLVCV	0.29	0.90	
B7	Rv2627c	275	YIASLVASL	0.26	0.88	
B7	Rv2627c	188	RAPLDLAVF	0.23	0.87	
B7	Rv2627c	294	VPVADLIEL	0.26	0.85	
B7	Rv2627c	36	VAQSWRDYL	0.25	0.82	
B7	Rv2627c	244	QAVWDIRRL	0.22	0.76	
B7	Rv2627c	197	RAWKLHDEL	0.21	0.75	
B8	Rv2627c	355	HPREQVTRL	0.25	1.34	
B8	Rv2627c	367	WGKPEIVWY	0.22	1.28	
B8	Rv2627c	173	EPRPWLVCV	0.24	1.26	30
B8	Rv2627c	64	AFRDEIVLL	0.22	1.24	
B8	Rv2627c	126	KVKDRRRSF	0.21	1.17	
B8	Rv2627c	248	DIRLLSWI	0.19	0.95	
B8	Rv2627c	130	RRRSFYRIF	0.15	0.93	
B8	Rv2627c	14	AFRLSPPVL	0.15	0.88	
B8	Rv2627c	161	NNREYALLL	0.14	0.85	
B8	Rv2627c	387	PVRRFVQAA	0.17	0.83	
B8	Rv2627c	388	VRRFVQAAL	0.14	0.83	
B8	Rv2627c	275	YIASLVASL	0.14	0.81	
B8	Rv2627c	105	WLEKPSGFF	0.12	0.78	
B8	Rv2627c	89	ISQEVAAGL	0.13	0.78	40
B8	Rv2627c	341	PGRFIYAGI	0.14	0.76	
B27	Rv2627c	131	RRSFYRIFF	0.51	2.75	
B27	Rv2627c	130	RRRSFYRIF	0.46	2.50	
B27	Rv2627c	304	GRHCGLRHK	0.42	2.21	
B27	Rv2627c	76	ARRPVSNHR	0.31	1.74	
B27	Rv2627c	326	GRMISPLSL	0.31	1.70	
B27	Rv2627c	389	RRFVQAALE	0.34	1.61	
B27	Rv2627c	388	VRRFVQAAL	0.29	1.60	

【表 3 - 3 - 3】

B27	Rv2627c	250	RRLLSWIRS	0.29	1.35	
B27	Rv2627c	315	RRHTVKMAE	0.27	1.25	
B27	Rv2627c	135	YRIFFDSEGF	0.17	1.06	
B27	Rv2627c	103	RRWLEKPSG	0.17	0.88	
B27	Rv2627c	361	TRLWEHWGK	0.15	0.79	
B27	Rv2627c	187	GRAPLDLAV	0.14	0.79	
B44	Rv2627c	91	QEVAAGLEF	0.29	2.22	
B44	Rv2627c	97	LEFYGNRRW	0.26	1.89	10
B44	Rv2627c	284	EEGLACAIL	0.16	1.20	
B44	Rv2627c	259	QEEESLIGL	0.14	1.11	
B44	Rv2627c	364	WEHWGKPEI	0.14	1.10	
B44	Rv2627c	86	FERISQEVA	0.13	0.91	
B44	Rv2627c	148	GEPGSQRWL	0.12	0.88	
B44	Rv2627c	67	DEIVLLGLK	0.11	0.86	
B58	Rv2627c	32	TGLYVAQSW	0.39	1.42	
B58	Rv2627c	147	PGEPSQRW	0.36	1.34	
B58	Rv2627c	239	VHGTAQAVW	0.29	1.08	
B58	Rv2627c	366	HWGKPEIVW	0.26	1.02	
B58	Rv2627c	89	ISQEVAAGL	0.23	0.94	20
B58	Rv2627c	241	GTAQAVWDI	0.25	0.92	
B58	Rv2627c	97	LEFYGNRRW	0.21	0.86	
B58	Rv2627c	359	QVTRLWEHW	0.22	0.82	
B58	Rv2627c	169	LRHPEPRPW	0.20	0.80	
B58	Rv2627c	247	WDIRLLSW	0.18	0.75	
B62	Rv2627c	35	YVAQSWRDY	0.50	1.49	
B62	Rv2627c	105	WLEKPSGFF	0.47	1.41	
B62	Rv2627c	126	KVKDRRRSF	0.42	1.24	
B62	Rv2627c	222	QGLPKGAVF	0.42	1.22	
B62	Rv2627c	383	FQSRPVRFF	0.38	1.10	
B62	Rv2627c	367	WGKPEIVWY	0.31	1.02	30
B62	Rv2627c	21	VLSGAMGPF	0.31	0.97	
B62	Rv2627c	267	LNGLSLGGY	0.28	0.87	
B62	Rv2627c	57	TIALAAQAF	0.28	0.85	
B62	Rv2627c	135	YRIFFDSEGF	0.23	0.83	
B62	Rv2627c	45	GQQPKLPI	0.28	0.82	
B62	Rv2627c	374	WYPGGHTGF	0.21	0.78	

【表 3 - 4】

表3-4 Rv2628 における予測スーパータイプ HLA クラス-II エピトープ

スーパータイプ	ID	Pos.	予測エピトープ配列	親和性	組合せスコア
A1	Rv2628	55	VTDRSHDGR	0.10	0.77
A1	Rv2628	98	RIGDWPAAY	0.07	0.76
A2	Rv2628	88	PLADELARA	0.38	0.95
A2	Rv2628	79	WLSELGTQS	0.35	0.75
A3	Rv2628	58	RSHDGRTAR	0.47	1.57
A3	Rv2628	98	RIGDWPAAY	0.32	1.21
A3	Rv2628	35	AMMNLAIWH	0.40	1.19
A3	Rv2628	50	ATIIYQVTDR	0.32	1.11
A3	Rv2628	55	VTDRSHDGR	0.27	0.88
A3	Rv2628	38	NLAIWHPRK	0.25	0.84
A24	Rv2628	31	VHQEAMMNL	0.61	0.99
B7	Rv2628	5	RPRHSGIRA	0.70	1.95
B7	Rv2628	43	HPRKVQSAT	0.63	1.70
B7	Rv2628	64	TARVPGDEI	0.31	0.89
B8	Rv2628	31	VHQEAMMNL	0.17	0.95
B8	Rv2628	44	PRKVQSATI	0.16	0.88
B27	Rv2628	24	GRIGRWGVH	0.43	2.13
B27	Rv2628	27	GRWGVHQEA	0.39	2.02
B27	Rv2628	45	RKVQSATIIY	0.29	1.67
B44	Rv2628	109	GEHLSVEIA	0.17	1.19
B44	Rv2628	81	SELGTQSPL	0.10	0.82
B58	Rv2628	72	ITSTVSGWL	0.42	1.60
B58	Rv2628	11	IRAVGPYAW	0.38	1.46
B62	Rv2628	98	RIGDWPAAY	0.45	1.40
B62	Rv2628	3	TQRPRHSGI	0.39	1.11
B62	Rv2628	45	RKVQSATIIY	0.26	0.91

10

20

30

【表 3 - 5】

表3-5 Rv0080cにおける予測スーパータイプ HLA クラス-I エピトープ

スーパータイプ	ID	Pos.	予測エピトープ配列	親和性	組合せスコア
A2	Rv0080	120	LLHPWVNMA	0.45	1.11
A2	Rv0080	45	AIRPVNHLV	0.35	0.96
A2	Rv0080	100	VVTGLATEV	0.30	0.85
A3	Rv0080	53	VVDGRVIGR	0.33	1.06
A3	Rv0080	108	VSDPEQVAR	0.23	0.78
A24	Rv0080	96	GWSVVVTGL	0.77	1.20
A24	Rv0080	116	RYQRLHPW	0.80	1.17
A24	Rv0080	30	SVDHGRVVF	0.40	0.78
B7	Rv0080	35	RVVFTRAAL	0.61	1.79
B7	Rv0080	38	FTRAALPAI	0.49	1.39
B7	Rv0080	9	SPQSAREVV	0.46	1.39
B7	Rv0080	2	SPGSRRASP	0.30	0.83
B7	Rv0080	121	LHPWVNMMAM	0.23	0.76
B8	Rv0080	38	FTRAALPAI	0.21	1.03
B8	Rv0080	19	LDRDEAMRL	0.16	0.88
B27	Rv0080	6	RRASPQSAR	0.54	2.79
B27	Rv0080	56	GRVIGRTRL	0.46	2.42
B27	Rv0080	92	RRRTGWSVV	0.43	2.25
B27	Rv0080	93	RRTGWSVVV	0.31	1.65
B27	Rv0080	115	ARYQRLHP	0.16	0.80
B44	Rv0080	14	REVVELDRD	0.15	0.98
B44	Rv0080	137	PEIVTGIRI	0.12	0.88
B58	Rv0080	74	SSADAGVVV	0.29	1.11

10

20

【表 3 - 6 - 1】

表3-6 Rv1735cにおける予測スーパータイプ HLA クラス-I エピトープ

スーパータイプ	ID	Pos.	予測エピトープ配列	親和性	組合せスコア
A1	Rv1735c	57	VVHRVPLRY	0.08	0.83
A2	Rv1735c	117	MLHHLAATI	0.44	1.19
A2	Rv1735c	68	TLWSVVFPL	0.42	1.18
A2	Rv1735c	43	WLIPPLVAA	0.46	1.15
A2	Rv1735c	16	EMADAPMAI	0.40	1.07
A2	Rv1735c	108	AVWTITFVA	0.35	0.93
A2	Rv1735c	87	GLAAHLPIV	0.35	0.93
A2	Rv1735c	77	GMYGVGAYR	0.29	0.87
A2	Rv1735c	7	TVLAGAHIV	0.29	0.81
A2	Rv1735c	28	GLVAGASVV	0.29	0.80
A2	Rv1735c	104	WVALAVWTI	0.31	0.80
A2	Rv1735c	136	GAADDTHAI	0.28	0.79
A2	Rv1735c	106	ALAVWTITF	0.22	0.76
A3	Rv1735c	57	VVHRVPLRY	0.25	0.99
A3	Rv1735c	112	ITFVAMLHH	0.34	0.98
A3	Rv1735c	77	GMYGVGAYR	0.27	0.98
A3	Rv1735c	71	SVVFPLGMY	0.21	0.88
A3	Rv1735c	35	VVFWAFGPW	0.24	0.86
A3	Rv1735c	47	PLVAASIWK	0.26	0.85
A24	Rv1735c	78	MYGVGAYRL	0.84	1.30
A24	Rv1735c	151	SFDHQVRAF	0.78	1.29
A24	Rv1735c	32	GASVVFVAF	0.71	1.19
A24	Rv1735c	113	TFVAMLHHL	0.68	1.09
A24	Rv1735c	110	WTITFVAML	0.67	1.04
A24	Rv1735c	64	RYEATLWSV	0.67	1.03
A24	Rv1735c	21	PMAIVTSGL	0.66	1.02
A24	Rv1735c	109	VWTITFVAM	0.63	0.97
A24	Rv1735c	104	WVALAVWTI	0.66	0.96
A24	Rv1735c	106	ALAVWTITF	0.52	0.95
A24	Rv1735c	37	FWAFGPWLI	0.65	0.93
A24	Rv1735c	93	PIVESIGEF	0.52	0.92
A24	Rv1735c	29	LVAGASVVF	0.48	0.90
A24	Rv1735c	90	AHLPIVESI	0.54	0.88
A24	Rv1735c	36	VFWAFGPWL	0.55	0.86
A24	Rv1735c	144	IICRPPRSF	0.51	0.85
A24	Rv1735c	73	VFPLGMYGV	0.53	0.85
A24	Rv1735c	53	IWKHVVHRV	0.49	0.80
A24	Rv1735c	80	GVGAYRLGL	0.46	0.75
B7	Rv1735c	45	IPPLVAASI	0.63	1.84
B7	Rv1735c	61	VPLRYEATL	0.39	1.23
B7	Rv1735c	104	WVALAVWTI	0.40	1.16
B7	Rv1735c	157	RAFRRNQPM	0.34	1.09
B7	Rv1735c	60	RVPLRYEAT	0.29	0.78
B7	Rv1735c	115	VAMLHHLAA	0.28	0.77

10

20

30

40

【表3 - 6 - 2】

B8	Rv1735c	53	IWKHVVHRV	0.26	1.37
B8	Rv1735c	110	WTITFVAML	0.13	0.75
B27	Rv1735c	84	YRLGLAAHL	0.28	1.56
B44	Rv1735c	99	GEFEGWVAL	0.12	0.95
B44	Rv1735c	15	VEMADAPMA	0.13	0.89
B44	Rv1735c	101	FEGWVALAV	0.13	0.87
B44	Rv1735c	65	YEATLWSVV	0.11	0.79
B58	Rv1735c	30	VAGASVVFV	0.59	2.16
B58	Rv1735c	96	ESIGEFEGW	0.59	2.09
B58	Rv1735c	35	VVFWAFGPW	0.31	1.24
B58	Rv1735c	102	EGWVALAVW	0.31	1.12
B58	Rv1735c	112	ITFVAMLHH	0.24	0.82
B58	Rv1735c	157	RAFRRNQPM	0.19	0.80
B58	Rv1735c	127	RSGRSSHAI	0.19	0.77
B62	Rv1735c	29	LVAGASVVF	0.43	1.32
B62	Rv1735c	106	ALAVWTITF	0.39	1.24
B62	Rv1735c	76	LGMYGVGAY	0.31	1.01
B62	Rv1735c	71	SVVFPLGMY	0.29	1.00
B62	Rv1735c	144	IICRPPRSF	0.28	0.87
B62	Rv1735c	43	WLIPPLVAA	0.28	0.76

10

20

【表3 - 7 - 1】

表3-7 Rv1736c(NarX)における予測スーパータイプ HLA クラス-I エピトープ

スーパータイプ	ID	Pos.	予測エピトープ配列	親和性	組合せスコア
A1	Rv1736c	448	WTRSSQLY	0.53	3.83
A1	Rv1736c	591	LMAEAPLYY	0.23	1.81
A1	Rv1736c	260	QCASVLLTY	0.18	1.45
A1	Rv1736c	224	MTSFYDWYA	0.20	1.40
A1	Rv1736c	223	VMTSFYDWY	0.17	1.37
A1	Rv1736c	561	GSGVVGAY	0.17	1.35
A1	Rv1736c	536	TTVNDKVMY	0.17	1.35
A1	Rv1736c	622	FSAPIGYLF	0.16	1.21
A1	Rv1736c	516	LAGVTLLIY	0.11	1.02
A1	Rv1736c	442	RYDKFGWTT	0.14	1.00
A1	Rv1736c	620	HAFSAPIGY	0.09	0.89
A1	Rv1736c	106	GAAFSWYTY	0.08	0.82
A1	Rv1736c	395	ALTEAALPY	0.08	0.77
A2	Rv1736c	416	MMGELFWTV	0.61	1.56
A2	Rv1736c	494	GLSEGAYHV	0.58	1.49
A2	Rv1736c	611	ALWPFTRLV	0.56	1.46
A2	Rv1736c	365	VVLEFAATV	0.43	1.15
A2	Rv1736c	596	PLYYQIHVL	0.40	1.07
A2	Rv1736c	505	VVLGSIAGI	0.42	1.05

30

40

【表 3 - 7 - 2】

A2	Rv1736c	204	AMSMVSHAA	0.41	1.04	
A2	Rv1736c	381	LLSGYRVPI	0.38	1.03	
A2	Rv1736c	466	PMFHFGILV	0.38	1.01	
A2	Rv1736c	515	TLAGVTLII	0.36	1.00	
A2	Rv1736c	427	YVTMTIVAV	0.38	0.99	
A2	Rv1736c	415	DMMGELFWT	0.43	0.99	
A2	Rv1736c	603	VLIGLALFA	0.41	0.95	
A2	Rv1736c	399	AALPYAHTV	0.34	0.94	10
A2	Rv1736c	226	SFYDWYADL	0.32	0.93	
A2	Rv1736c	304	PLTAATRYV	0.35	0.92	
A2	Rv1736c	322	TLYLTYWTA	0.32	0.86	
A2	Rv1736c	54	KVVRSTHGV	0.30	0.85	
A2	Rv1736c	362	FLPVVLEFA	0.34	0.83	
A2	Rv1736c	544	YLVLVAAIV	0.29	0.82	
A2	Rv1736c	420	LFWTVVPYV	0.28	0.79	
A2	Rv1736c	283	HIDGPAADL	0.26	0.78	
A2	Rv1736c	591	LMAEAPLYY	0.22	0.78	
A2	Rv1736c	391	ALCNALTEA	0.29	0.78	
A3	Rv1736c	454	QLYESRLLR	0.51	1.65	20
A3	Rv1736c	628	YLFYPIIY	0.41	1.48	
A3	Rv1736c	623	SAPIGYLFR	0.44	1.37	
A3	Rv1736c	128	LVEMYREAK	0.42	1.36	
A3	Rv1736c	434	AVGSWWRYR	0.41	1.31	
A3	Rv1736c	564	VVGEAYNYR	0.40	1.30	
A3	Rv1736c	90	SVGPDRPEY	0.32	1.19	
A3	Rv1736c	625	PIGYLFRPY	0.34	1.16	
A3	Rv1736c	631	RPYIIYRSR	0.33	1.14	
A3	Rv1736c	432	IVAVGSWWR	0.35	1.13	
A3	Rv1736c	519	VTLLIYRRR	0.34	1.10	
A3	Rv1736c	580	RSVWVLQPR	0.33	1.08	30
A3	Rv1736c	419	ELFWTVVPY	0.28	1.08	
A3	Rv1736c	2	TVTPRTGSR	0.27	0.95	
A3	Rv1736c	395	ALTEAALPY	0.23	0.95	
A3	Rv1736c	32	RTVTRRGGR	0.29	0.95	
A3	Rv1736c	372	TVDPEAGR	0.25	0.91	
A3	Rv1736c	112	YTYSPTRVR	0.26	0.90	
A3	Rv1736c	275	GTAEELLAH	0.31	0.89	
A3	Rv1736c	518	GVTLLIYRR	0.24	0.88	
A3	Rv1736c	536	TTVNDKVMY	0.23	0.88	
A3	Rv1736c	451	RSSQLYESR	0.26	0.87	40
A3	Rv1736c	157	RRYQRARGK	0.26	0.83	
A3	Rv1736c	371	ATVDPEAGR	0.21	0.80	
A3	Rv1736c	310	RYVDTFDLR	0.21	0.77	
A3	Rv1736c	9	SRIEELLAR	0.21	0.76	
A24	Rv1736c	384	GYRVPIAAL	0.84	1.30	
A24	Rv1736c	499	AYHVQAVVL	0.82	1.28	

【表 3 - 7 - 3】

A24	Rv1736c	131	MYREAKARL	0.82	1.27	
A24	Rv1736c	438	WWRURYDKF	0.82	1.27	
A24	Rv1736c	361	DFLPVVLEF	0.76	1.26	
A24	Rv1736c	614	PFTRLVHAF	0.79	1.23	
A24	Rv1736c	597	LYYQIHVLI	0.79	1.22	
A24	Rv1736c	543	MYLVLVAAI	0.81	1.22	
A24	Rv1736c	226	SFYDWYADL	0.76	1.21	
A24	Rv1736c	627	GYLFRPYII	0.77	1.19	10
A24	Rv1736c	570	NYRETVSVW	0.74	1.17	
A24	Rv1736c	455	LYESRLMRI	0.76	1.17	
A24	Rv1736c	258	VWQCASVLL	0.76	1.16	
A24	Rv1736c	447	GWTRSSQL	0.71	1.11	
A24	Rv1736c	607	LALFALWPF	0.71	1.10	
A24	Rv1736c	440	RYRYDKFGW	0.72	1.06	
A24	Rv1736c	602	HVLIGLALF	0.60	1.06	
A24	Rv1736c	621	AFSAPIGYL	0.67	1.05	
A24	Rv1736c	577	VWFRSVWVL	0.63	1.03	
A24	Rv1736c	402	PYAHTVAAV	0.64	0.98	20
A24	Rv1736c	610	FALWPFTRL	0.61	0.98	
A24	Rv1736c	583	WVLQPRGDL	0.60	0.95	
A24	Rv1736c	571	YRETVSVWF	0.54	0.95	
A24	Rv1736c	111	WYTYSPTRV	0.60	0.94	
A24	Rv1736c	191	YGPDRVAGF	0.58	0.94	
A24	Rv1736c	219	LIGGVMTSF	0.53	0.93	
A24	Rv1736c	601	IHVLIIGLAL	0.58	0.93	
A24	Rv1736c	604	LIGLALFAL	0.63	0.93	
A24	Rv1736c	599	YQIHVLIGL	0.56	0.91	
A24	Rv1736c	222	GVMTSFYDW	0.56	0.90	
A24	Rv1736c	460	LLRIASPMF	0.50	0.90	30
A24	Rv1736c	266	LTYPNSRQL	0.54	0.89	
A24	Rv1736c	547	LVAIVAGL	0.54	0.89	
A24	Rv1736c	291	LLGRTVSEL	0.53	0.86	
A24	Rv1736c	596	PLYYYQIHVL	0.53	0.84	
A24	Rv1736c	634	IIYRSREEL	0.50	0.84	
A24	Rv1736c	622	FSAPIGYLF	0.51	0.83	
A24	Rv1736c	467	MFHFGILVV	0.51	0.82	
A24	Rv1736c	635	IYRSREELV	0.54	0.82	
A24	Rv1736c	120	RHPYARGVL	0.54	0.81	
A24	Rv1736c	13	ELLARSGRF	0.44	0.80	
A24	Rv1736c	462	RIASPMFHF	0.46	0.78	40
A24	Rv1736c	513	ITTLAGVTL	0.46	0.78	
A24	Rv1736c	468	FHFGILVVI	0.47	0.77	
A24	Rv1736c	424	VVPYVTMTI	0.46	0.76	
A24	Rv1736c	422	WTVVPYVTM	0.52	0.76	
A24	Rv1736c	73	YVKDDIITW	0.44	0.76	
B7	Rv1736c	401	LPYAHTVAA	0.53	1.55	

【表 3 - 7 - 4】

B7	Rv1736c	103	CPRGAAFSW	0.46	1.40	
B7	Rv1736c	485	IPQSWTQAA	0.46	1.33	
B7	Rv1736c	425	VPYVTMTIV	0.42	1.29	
B7	Rv1736c	161	RARGKGGLV	0.41	1.21	
B7	Rv1736c	200	SPIPAMSMV	0.39	1.19	
B7	Rv1736c	583	WVLQPRGDL	0.35	1.12	
B7	Rv1736c	121	HPYARGVLV	0.36	1.10	
B7	Rv1736c	530	GPVFMATTV	0.36	1.09	10
B7	Rv1736c	465	SPMFHFGIL	0.34	1.08	
B7	Rv1736c	15	LARSGRFFI	0.37	1.07	
B7	Rv1736c	180	IAAAHVHTI	0.33	1.05	
B7	Rv1736c	424	VVPYVTMTI	0.32	1.02	
B7	Rv1736c	610	FALWPFTRL	0.31	1.01	
B7	Rv1736c	552	VAGLGATAL	0.29	0.96	
B7	Rv1736c	120	RHPYARGVL	0.31	0.93	
B7	Rv1736c	257	VVWQCASVL	0.28	0.92	
B7	Rv1736c	152	DPRRRRRYQ	0.33	0.92	
B7	Rv1736c	374	DPEAGRLL	0.28	0.89	
B7	Rv1736c	525	RRRTRGPVF	0.25	0.88	20
B7	Rv1736c	202	IPAMSMVSH	0.32	0.87	
B7	Rv1736c	199	FSPIPAMSM	0.29	0.85	
B7	Rv1736c	363	LPVVLEFAA	0.28	0.84	
B7	Rv1736c	47	RDRWSHDKV	0.27	0.83	
B7	Rv1736c	644	LTRPRRRGW	0.26	0.79	
B7	Rv1736c	631	RPYIIYRSR	0.23	0.78	
B8	Rv1736c	123	YARGVLVEM	0.27	1.43	
B8	Rv1736c	438	WWRYYDKF	0.23	1.27	
B8	Rv1736c	539	NDKVMYLVL	0.21	1.10	
B8	Rv1736c	163	RGKGGLVRV	0.19	1.05	
B8	Rv1736c	377	AGRLLSGY	0.17	0.99	30
B8	Rv1736c	131	MYREAKARL	0.16	0.94	
B8	Rv1736c	614	PFTRLVHAF	0.16	0.91	
B8	Rv1736c	524	YRRRTRGPV	0.17	0.86	
B8	Rv1736c	384	GYRVPIAAL	0.14	0.86	
B8	Rv1736c	596	PLYQQIHVL	0.15	0.83	
B8	Rv1736c	191	YGPDRVAGF	0.14	0.81	
B8	Rv1736c	73	YVKDDIITW	0.13	0.80	
B8	Rv1736c	599	YQIHVLIGL	0.13	0.78	
B8	Rv1736c	354	PPRGETPDF	0.13	0.77	
B8	Rv1736c	636	YRSREELVL	0.12	0.75	40
B27	Rv1736c	157	RRYQRARGK	0.63	3.16	
B27	Rv1736c	319	GRATLYLTY	0.52	2.82	
B27	Rv1736c	525	RRRTRGPVF	0.42	2.23	
B27	Rv1736c	155	RRRRYQRAR	0.39	2.02	
B27	Rv1736c	379	RRLLSGYRV	0.34	1.79	
B27	Rv1736c	526	RRTRGPVFM	0.33	1.77	

【表 3 - 7 - 5】

B27	Rv1736c	293	GRTVSELRR	0.29	1.59	
B27	Rv1736c	104	PRGAAFSWY	0.26	1.51	
B27	Rv1736c	160	QRARGKGGI	0.26	1.41	
B27	Rv1736c	19	GRFFIPGEI	0.24	1.34	
B27	Rv1736c	9	SRIEELLAR	0.22	1.21	
B27	Rv1736c	571	YRETVSVWF	0.20	1.21	
B27	Rv1736c	378	GRRLSGYR	0.22	1.19	
B27	Rv1736c	333	TRNRGREML	0.19	1.07	10
B27	Rv1736c	124	ARGVLVEMY	0.16	1.03	
B27	Rv1736c	309	TRYVDTFDL	0.17	1.03	
B27	Rv1736c	335	NRGREMLAF	0.16	0.97	
B27	Rv1736c	154	RRRRRYQRA	0.17	0.93	
B27	Rv1736c	153	PRRRRYQOR	0.14	0.83	
B27	Rv1736c	156	RRRYQRARG	0.17	0.82	
B27	Rv1736c	461	LRIASPMFH	0.16	0.80	
B27	Rv1736c	300	RRADPLTAA	0.14	0.80	
B27	Rv1736c	162	ARGKGLVLR	0.13	0.80	
B27	Rv1736c	36	RRGGRDGDV	0.13	0.76	
B44	Rv1736c	566	GEAYNYRET	0.19	1.27	20
B44	Rv1736c	177	TEMIAAAHV	0.15	1.18	
B44	Rv1736c	338	REMLAFAQT	0.16	1.11	
B44	Rv1736c	572	RETVSVWFR	0.14	1.06	
B44	Rv1736c	129	VEMYREAKA	0.14	1.01	
B44	Rv1736c	297	SELRRADPL	0.13	0.95	
B44	Rv1736c	12	EELLARSGR	0.13	0.94	
B44	Rv1736c	277	AEELLAHID	0.14	0.86	
B44	Rv1736c	418	GELFWTVVP	0.12	0.81	
B44	Rv1736c	81	WETQETDYP	0.12	0.81	
B44	Rv1736c	174	AEATEMIAA	0.12	0.81	
B44	Rv1736c	640	EELVLTRPR	0.10	0.79	30
B44	Rv1736c	367	LEFAATVDP	0.11	0.78	
B58	Rv1736c	644	LTRPRRRGW	0.69	2.46	
B58	Rv1736c	430	MTIVAVGSW	0.66	2.33	
B58	Rv1736c	481	IGLVIPQSW	0.61	2.20	
B58	Rv1736c	575	VSVWFRSVW	0.56	2.10	
B58	Rv1736c	320	RATLYLTYW	0.56	2.10	
B58	Rv1736c	622	FSAPIGYLF	0.54	2.00	
B58	Rv1736c	247	DVPESGDWW	0.50	1.77	
B58	Rv1736c	431	TIVAVGSWW	0.46	1.66	
B58	Rv1736c	165	KGGLVRVSW	0.43	1.61	40
B58	Rv1736c	138	RLGDPVAAW	0.39	1.51	
B58	Rv1736c	246	TDVPESGDW	0.42	1.50	
B58	Rv1736c	620	HAFSAPIGY	0.32	1.37	
B58	Rv1736c	62	VNCTGSCSW	0.33	1.26	
B58	Rv1736c	448	WTTRSSQLY	0.28	1.21	
B58	Rv1736c	222	GVMTSFYDW	0.27	1.06	

【表 3 - 7 - 6】

B58	Rv1736c	412	RTGDMMGEL	0.27	0.99	
B58	Rv1736c	561	GSGVVGEAY	0.23	0.98	
B58	Rv1736c	591	LMAEAPLYY	0.21	0.97	
B58	Rv1736c	251	SGDWWDVVW	0.24	0.96	
B58	Rv1736c	208	VSHAAGSRF	0.23	0.94	
B58	Rv1736c	513	ITTLAGVTL	0.23	0.94	
B58	Rv1736c	266	LTYPNSRQL	0.22	0.92	
B58	Rv1736c	605	IGLALFALW	0.24	0.89	10
B58	Rv1736c	414	GDMMGELFW	0.25	0.88	
B58	Rv1736c	433	VAVGSWWRY	0.16	0.81	
B62	Rv1736c	628	YLFPHYIY	0.49	1.50	
B62	Rv1736c	339	EMLAFAQTY	0.45	1.41	
B62	Rv1736c	460	LLRIASPMF	0.43	1.31	
B62	Rv1736c	419	ELFWTVVPY	0.41	1.28	
B62	Rv1736c	591	LMAEAPLYY	0.40	1.27	
B62	Rv1736c	219	LIGGVMTSF	0.40	1.24	
B62	Rv1736c	316	DLRGRATLY	0.39	1.22	
B62	Rv1736c	448	WTRSSQLY	0.38	1.20	
B62	Rv1736c	395	ALTEAALPY	0.35	1.16	20
B62	Rv1736c	191	YGPDRVAGF	0.38	1.12	
B62	Rv1736c	138	RLGDPVAAW	0.37	1.11	
B62	Rv1736c	14	LLARSGRFF	0.37	1.08	
B62	Rv1736c	622	FSAPIGYLF	0.36	1.07	
B62	Rv1736c	599	YQIHVLIGL	0.35	1.03	
B62	Rv1736c	563	GVVGEAYNY	0.31	1.03	
B62	Rv1736c	561	GSGVVGEAY	0.32	1.02	
B62	Rv1736c	90	SVGPDRPEY	0.28	0.95	
B62	Rv1736c	101	RGCPRGAAF	0.32	0.94	
B62	Rv1736c	590	DLMAEAPLY	0.29	0.90	30
B62	Rv1736c	106	GAAFSWYTY	0.24	0.87	
B62	Rv1736c	344	AQTYRSTDV	0.28	0.85	
B62	Rv1736c	223	VMTSFYDWY	0.23	0.83	
B62	Rv1736c	234	LPVASPQVF	0.24	0.83	
B62	Rv1736c	13	ELLARSGRF	0.23	0.80	
B62	Rv1736c	453	SQLYESRLL	0.27	0.78	
B62	Rv1736c	220	IGGVMTSFY	0.25	0.78	
B62	Rv1736c	38	GGRDGDVIFY	0.21	0.77	
B62	Rv1736c	584	VLQPRGDLM	0.26	0.77	
B62	Rv1736c	73	YVKDDIITW	0.24	0.76	
B62	Rv1736c	620	HAFSAPIGY	0.20	0.76	40
B62	Rv1736c	516	LAGVTLIIY	0.20	0.75	

【表 3 - 8 - 1】

表3-8 Rv1737c (NarK2)における予測スーパータイプ HLA クラス-I エピトープ

スーパータイプ	ID	Pos.	予測エピトープ配列	親和性	組合せスコア
A1	Rv1737c	355	TYDPVDNDY	0.50	3.66
A1	Rv1737c	372	ATALVACTY	0.31	2.37
A1	Rv1737c	207	VTWEMSFY	0.20	1.63
A1	Rv1737c	89	GVAATMGSY	0.18	1.44
A1	Rv1737c	64	LTDRFGGRA	0.20	1.35
A1	Rv1737c	265	LSDRIAPRH	0.16	1.06
A1	Rv1737c	211	MSFLYAIVF	0.12	0.99
A1	Rv1737c	146	LSAFFTPRF	0.11	0.98
A1	Rv1737c	298	WSAATFITL	0.09	0.77
A1	Rv1737c	224	AFSNYLPTY	0.07	0.77
A2	Rv1737c	108	GVAGTIFAV	0.53	1.33
A2	Rv1737c	228	YLPTYITTI	0.50	1.33
A2	Rv1737c	9	VLATWISVV	0.49	1.29
A2	Rv1737c	368	LLLVATALV	0.40	1.07
A2	Rv1737c	283	ALLAFAAAL	0.36	1.01
A2	Rv1737c	159	GLFTTHAIV	0.37	1.00
A2	Rv1737c	342	GLGGYFPPL	0.32	0.91
A2	Rv1737c	351	VMGATYDPV	0.37	0.90
A2	Rv1737c	51	ILVGALGRI	0.32	0.90
A2	Rv1737c	82	ILPVLAVGV	0.32	0.89
A2	Rv1737c	93	TMGSYALLV	0.31	0.86
A2	Rv1737c	363	YTVGLLLLV	0.31	0.84
A2	Rv1737c	264	WLSDRIAPR	0.28	0.83
A2	Rv1737c	101	VFFGLFLGV	0.28	0.81
A2	Rv1737c	213	FLYAIVFGG	0.35	0.78
A2	Rv1737c	313	GTGGVFAWV	0.28	0.78
A2	Rv1737c	140	GMVGTALSA	0.29	0.77
A2	Rv1737c	16	VVNFVAWNL	0.27	0.75
A2	Rv1737c	78	TLASILPVL	0.25	0.75
A3	Rv1737c	316	GVFAVVARR	0.43	1.45
A3	Rv1737c	145	ALSAFFTPR	0.39	1.33
A3	Rv1737c	378	CTYTALHAR	0.35	1.20
A3	Rv1737c	372	ATALVACTY	0.31	1.17
A3	Rv1737c	175	AVVAMVVLRL	0.31	1.02
A3	Rv1737c	179	MVVLRDAPY	0.22	0.93
A3	Rv1737c	217	IVFGGFVAF	0.21	0.88
A3	Rv1737c	112	TIFAVGIPF	0.20	0.82
A3	Rv1737c	117	GIPFANNWY	0.18	0.79
A3	Rv1737c	24	LIGPLSTSY	0.17	0.76
A24	Rv1737c	214	LYAIVFGGF	0.86	1.39
A24	Rv1737c	124	WYQPARRGF	0.87	1.38
A24	Rv1737c	231	TYITTIYGF	0.83	1.37
A24	Rv1737c	149	FFTPRFVRW	0.81	1.25
A24	Rv1737c	153	RFVRWFGLF	0.75	1.19

10

20

30

40

【表 3 - 8 - 2】

A24	Rv1737c	355	TYDPVDNDY	0.62	1.11	
A24	Rv1737c	221	GFVAFSNYL	0.72	1.11	
A24	Rv1737c	362	DYTVGLLLL	0.71	1.10	
A24	Rv1737c	97	YALLVFFGL	0.69	1.10	
A24	Rv1737c	141	MVGTALSAF	0.70	1.09	
A24	Rv1737c	150	FTPRFVRF	0.69	1.07	
A24	Rv1737c	98	ALLVFFGLF	0.62	1.05	
A24	Rv1737c	279	LAGTALLAF	0.59	1.03	10
A24	Rv1737c	298	WSAATFITL	0.64	1.02	
A24	Rv1737c	302	TFITLAVCL	0.65	1.02	
A24	Rv1737c	106	FLGVAGTIF	0.61	1.01	
A24	Rv1737c	217	IVFGGFVAF	0.55	1.00	
A24	Rv1737c	131	GFSTGVFGM	0.62	0.97	
A24	Rv1737c	375	LVACTYTAL	0.59	0.97	
A24	Rv1737c	11	ATWISVVNF	0.54	0.95	
A24	Rv1737c	14	ISVVNFVAW	0.59	0.94	
A24	Rv1737c	367	LLLLVATAL	0.58	0.94	
A24	Rv1737c	105	LFLGVAGTI	0.59	0.94	
A24	Rv1737c	16	VVNFVAWNL	0.58	0.90	20
A24	Rv1737c	12	TWISVVNF	0.57	0.90	
A24	Rv1737c	271	PRHVVLASL	0.54	0.89	
A24	Rv1737c	95	GSYALLVFF	0.54	0.88	
A24	Rv1737c	146	LSAFFTPRF	0.48	0.88	
A24	Rv1737c	268	RIAPRHVVL	0.50	0.85	
A24	Rv1737c	224	AFSNYLPTY	0.42	0.84	
A24	Rv1737c	228	YLPTYITTI	0.51	0.83	
A24	Rv1737c	180	VVLRDAPYF	0.45	0.81	
A24	Rv1737c	71	RAMLIAVTL	0.46	0.79	
A24	Rv1737c	205	LPVTWEMSF	0.41	0.78	30
A24	Rv1737c	20	WAWNLIGPL	0.46	0.78	
A24	Rv1737c	67	RFGGRAMLI	0.51	0.77	
A24	Rv1737c	283	ALLAFAAAL	0.45	0.77	
A24	Rv1737c	94	MGSYALLVF	0.47	0.77	
A24	Rv1737c	211	MSFLYAIVF	0.44	0.76	
A24	Rv1737c	99	LLVFFGLFL	0.44	0.76	
A24	Rv1737c	187	YFRPNADPV	0.51	0.76	
A24	Rv1737c	48	ATPILVGAL	0.48	0.76	
B7	Rv1737c	325	APAASVGSV	0.57	1.64	
B7	Rv1737c	245	GARTAGFAL	0.51	1.58	
B7	Rv1737c	276	LASLAGTAL	0.49	1.48	40
B7	Rv1737c	168	AAALASTAV	0.52	1.46	
B7	Rv1737c	126	QPARRGFST	0.51	1.38	
B7	Rv1737c	257	LARPVGWL	0.45	1.35	
B7	Rv1737c	347	FPPLVMGAT	0.51	1.35	
B7	Rv1737c	196	LPRLKAAAR	0.43	1.28	
B7	Rv1737c	375	LVACTYTAL	0.39	1.26	

【表 3 - 8 - 3】

B7	Rv1737c	71	RAMLIAVTL	0.37	1.20	
B7	Rv1737c	171	LASTAVVAM	0.39	1.20	
B7	Rv1737c	205	LPVTWEMSF	0.35	1.19	
B7	Rv1737c	270	APRHVVLAS	0.44	1.10	
B7	Rv1737c	268	RIAPRHVVV	0.34	1.09	
B7	Rv1737c	83	LPVLAVGVA	0.36	1.04	
B7	Rv1737c	193	DPVLPRLKA	0.33	0.98	
B7	Rv1737c	65	TDRFGGRAM	0.33	0.94	10
B7	Rv1737c	56	LGRIVTGPL	0.27	0.90	
B7	Rv1737c	320	WVARRAPAA	0.32	0.88	
B7	Rv1737c	292	QPPPEVWSA	0.29	0.86	
B7	Rv1737c	2	RGQAANLVL	0.26	0.85	
B7	Rv1737c	86	LAVGVAATM	0.25	0.81	
B7	Rv1737c	318	FAWVARRAP	0.27	0.76	
B8	Rv1737c	124	WYQPARRGF	0.16	0.97	
B8	Rv1737c	187	YFRPNADPV	0.18	0.93	
B8	Rv1737c	56	LGRIVTGPL	0.14	0.83	
B8	Rv1737c	271	PRHVVLASL	0.14	0.80	20
B27	Rv1737c	66	DRFGGRAML	0.43	2.27	
B27	Rv1737c	129	RRGFSTGVF	0.37	2.05	
B27	Rv1737c	203	ARLPVTWEM	0.23	1.27	
B27	Rv1737c	152	PRFVRWFGL	0.22	1.21	
B27	Rv1737c	322	ARRAPAASV	0.17	0.96	
B27	Rv1737c	197	PRLKAAARL	0.15	0.90	
B27	Rv1737c	271	PRHVVLASL	0.13	0.80	
B44	Rv1737c	295	PEVWSAATF	0.34	2.42	
B44	Rv1737c	209	WEMSFLYAI	0.16	1.13	
B58	Rv1737c	14	ISVVNFVAW	0.75	2.72	
B58	Rv1737c	207	VTWEMSFLY	0.62	2.40	30
B58	Rv1737c	116	VGI PFANNW	0.60	2.18	
B58	Rv1737c	290	ALQPPPEVW	0.48	1.83	
B58	Rv1737c	256	VLARPVGGW	0.46	1.73	
B58	Rv1737c	60	VTGPLTDRF	0.37	1.41	
B58	Rv1737c	312	VGTGGVFAW	0.37	1.39	
B58	Rv1737c	39	SSAEASLLV	0.35	1.32	
B58	Rv1737c	201	AAARLPVTW	0.35	1.31	
B58	Rv1737c	133	STGVFGMG	0.27	0.95	
B58	Rv1737c	30	TSYARDMSL	0.22	0.90	
B58	Rv1737c	211	MSFLYAIVF	0.18	0.80	
B58	Rv1737c	11	ATWISVVNF	0.16	0.75	40
B62	Rv1737c	24	LIGPLSTSY	0.55	1.66	
B62	Rv1737c	106	FLGVAGTIF	0.50	1.45	
B62	Rv1737c	89	GVAATMGSY	0.45	1.39	
B62	Rv1737c	179	MVVLRDAPY	0.41	1.31	
B62	Rv1737c	217	IVFGGFVAF	0.42	1.31	
B62	Rv1737c	207	VTWEMSFLY	0.35	1.15	

【表 3 - 8 - 4】

B62	Rv1737c	124	WYQPARRGF	0.37	1.13
B62	Rv1737c	290	ALQPPPEVW	0.35	1.06
B62	Rv1737c	112	TIFAVGIPF	0.32	1.04
B62	Rv1737c	98	ALLVFFGLF	0.29	0.94
B62	Rv1737c	229	LPTYITTIY	0.27	0.91
B62	Rv1737c	372	ATALVACTY	0.22	0.81
B62	Rv1737c	367	LLLLVATAL	0.26	0.81
B62	Rv1737c	310	LGVGTGGVF	0.24	0.79
B62	Rv1737c	141	MVGTALSAF	0.26	0.78
B62	Rv1737c	220	GGFVAFSNY	0.22	0.78
B62	Rv1737c	95	GSYALLVFF	0.24	0.76
B62	Rv1737c	283	ALLAFAAAL	0.24	0.76

10

20

【 表 4 - 1 - 1 】

表4-1 免疫優性 TB 潜在性抗原における予測 HLA クラス-II 制限 T 細胞エпитープ

HLA	Rv1733c (210 aa.)	Rv2029c (339 aa.)	Rv2627c (413 aa.)
DR1	44 VVMLLAVTVSLLTIPFAAAA	17 LTMNPALDITTSVDVVRPTE	15 FRLSPVLSGAMGPFMHTGL
DRB1*0101	58 WVNVNGIERSGEVNAKPGTKS	178 VHVLGGCSTALFPAGGSTGS	178 LVCVHGTEMGRAPLDLAVFR
DRB1*0102	135 ILIRVRNASWQHDI DLSL FCT	207 LRGAAAASAAAFVVASGSLPPG	207 LNI VMPVLP MHGPRGQGLPK
	267 ILIRVRNASWQHDI DLSL FCT	249 VVSLSGQGALLATRASHRF	249 IRRLLSWIRSQEEESLI GLN
	279 ILIRVRNASWQHDI DLSL FCT	264 MVAAITVGLSRGWSLIKSVR	264 LIGLNGLSLGGYIASLVASL
DR3	44 VVMLLAVTVSLLTIPFAAAA	319 WSLIKSVRLGNAAGAAMLIT	319 VKMAEPIGRMISPLSLTPLV
DRB1*0301	117 WVNVNGIERSGEVNAKPGTKS	337 LVPMPGRFIIYAGIADRLVHP	337 LVPMPGRFIIYAGIADRLVHP
	189 ILIRVRNASWQHDI DLSL FCT	388 VRRFVQAALEQSGLLDAPRT	388 VRRFVQAALEQSGLLDAPRT
DR4	44 VVMLLAVTVSLLTIPFAAAA	15 VRPTEKMRGAPRYDPPGGG	15 FRLSPVLSGAMGPFMHTGL
DRB1*0401	189 ILIRVRNASWQHDI DLSL FCT	70 LLGDAGVFRVPIPIAASTRE	70 VLLGLKARRPVSNHRVFERI
DRB1*0402		137 YRFVLPGPSLTVAEQEQCLD	137 IFFDSGFTPHGPEPGSQRWL
DRB1*0404		174 LILDTSGGGLQHISGVSFLL	205 LGLNIVMPVLP MHGPRGQGL
DRB1*0405		285 VRLGNAAGAAMLITPGTAAC	319 VKMAEPIGRMISPLSLTPLV
DRB1*0410			
DRB1*0421			
DR7	26 LRVFSRNPLVRGTDRL EAVV	15 FRVIPIAASTRESFTVNESR	15 FRLSPVLSGAMGPFMHTGL
DRB1*0701	44 VVMLLAVTVSLLTIPFAAAA	205 LRGAAAASAAAFVVASGSLPPG	205 LGLNIVMPVLP MHGPRGQGL
	143 WVDSAGQLVDEPAPPARAIA	249 VVSLSGQGALLATRASHRF	249 IRRLLSWIRSQEEESLI GLN
	183 LALTRAILIRVRNASWQHDI	325 MVAAITVGLSRGWSLIKSVR	325 IGRMISPLSLTPLVMPGGRF
DR8	14 ITFRLRLPCRTILRVFSRNP		
DRB1*0801	26 LRVFSRNPLVRGTDRL EAVV		
DRB1*0802	189 ILIRVRNASWQHDI DLSL FCT		
DRB1*0804			
		15 LTMNPALDITTSVDVVRPTE	15 FRLSPVLSGAMGPFMHTGL
		198 VVASGSLPPGVAADYYQRVA	198 WKLHDELGLNIVMPVLP MHG
		275 MVAAITVGLSRGWSLIKSVR	275 YIASLVASLEEGACAILGV
		15 VRPTEKMRGAPRYDPPGGG	15 FRLSPVLSGAMGPFMHTGL
		67 FRVIPIAASTRESFTVNESR	67 IVLLGLKARRPVSNHRVFER
		195 YRFVLPGPSLTVAEQEQCLD	195 VFRAWKLDHDELGLNIVMPV
		299 FLKASVRELRECVGSELLT	299 LRHKDPRRHTVKMAEPIGRM

10

20

30

40

【表 4 - 1 - 2】

DRB1*0806			221 229	LIDRGRAEVVVSLGSQGAL VVVSLGSQGALLATRHASH	337	LVPMPGRFIYAGIADRLVHP
DR11(5)	14	ITFRLRLPCRTILRVFSRNP	17	LTMNPALDITTSVDVVRPTE	15	FRLSPPVLSGAMGPFMHTGL
DRB1*1101	35	VRGTDRLAEAVVMLLAVTVSL	32	VRPTEKMRGAPRYDPPGGG	67	IVLLGLKARRPVSNSHRVFER
DRB1*1104	44	VVMLLAVTVSLLTIPFAAAA	90	FRVIPIAASTRESFTVNESR	195	VFRWKLHDELGLNIVMPVL
DRB1*1106	117	WVNGIERSGEVNAKPGTKS	114	YRFVLPGPSLTVAEQEQLD	205	LGLNIVMPVLPMHGPRGQGL
DRB1*1107	189	ILIRVRNASWQHDIDSLFCT	229	VVVVSLGSQGALLATRHASH	246	VWDIRRLLSWIRSQEEESLI
			268	VAAITVGLSRGWSLIKSVRL	319	VKMAEPIGRMISPLSLTPLV
DR13(6)	14	ITFRLRLPCRTILRVFSRNP	32	VRPTEKMRGAPRYDPPGGG	15	FRLSPPVLSGAMGPFMHTGL
DRB1*1305	35	VRGTDRLAEAVVMLLAVTVSL	90	FRVIPIAASTRESFTVNESR	67	IVLLGLKARRPVSNSHRVFER
DRB1*1307	44	VVMLLAVTVSLLTIPFAAAA	114	YRFVLPGPSLTVAEQEQLD	195	VFRWKLHDELGLNIVMPVL
DRB1*1311	117	WVNGIERSGEVNAKPGTKS	229	VVVVSLGSQGALLATRHASH	205	LGLNIVMPVLPMHGPRGQGL
DRB1*1321	182	LLALTRAILIRVRNASWQHD	268	VAAITVGLSRGWSLIKSVRL	210	VMPVLPMHGPRGQGLPKGAV
					246	VWDIRRLLSWIRSQEEESLI
					319	VKMAEPIGRMISPLSLTPLV
					344	FIYAGIADRLVHPREQVTRL
DR15(2)	14	ITFRLRLPCRTILRVFSRNP	117	VLPGPSLTVAEQEQLDELRL	193	LAVFRWKLHDELGLNIVMP
DRB1*1501	26	LRVFSRNPVLRGTDRLAEAVV	309	VERFFELAAEPTVEVGQDQYV	264	LIGLNGLSLGGYIASLVASL
DRB1*1502	35	VRGTDRLAEAVVMLLAVTVSL	137	YRIFFDSGFTPHGPEPGSQR	337	LVPMPGRFIYAGIADRLVHP
	189	ILIRVRNASWQHDIDSLFCT			372	IVWYPPGGHTGFFQSRPVRRF
					388	VRRFVQAALAEQSGLLDAPRT
DRB5*0101			47	IVHVLGGCSTALFPAGGSTG	15	FRLSPPVLSGAMGPFMHTGL
			90	FRVIPIAASTRESFTVNESR	67	IVLLGLKARRPVSNSHRVFER
			114	YRFVLPGPSLTVAEQEQLD	124	VRKVKDRRRSFYRIFFDSEGF
			160	YQRVADICRRSSTPLILDTS	155	WLSYTANNREYALLLRHPEP
			183	LQHISSGVFLKASVRELRE	249	IRRLLSWIRSQEEESLIGLN
			229	VVVVSLGSQGALLATRHASH	319	VKMAEPIGRMISPLSLTPLV
					337	LVPMPGRFIYAGIADRLVHP

注：結果は TEPITOPE 2000, Vaccine で作成した (Bian H, Hammer J. 2004, Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell エピトープ with TEPITOPE. Methods. 34(4):468-75)。

10

20

30

40

【 表 4 - 2 - 1 】

表4-2 免疫優性 TB 潜在性抗原における予測 HLA クラス-II 制限 T 細胞エピートープ

HLA	Rv0080c (152 aa.)	Rv1735c (165 aa.)	Rv1737c (395 aa.)
DR1	25 MRLIASVDHGRVVFTRAALP	6 ITVLAGAHIVEMADAPMAIV	1 MRGQAANLVLATWISVVNFW
DRB1*0101	100 VVTGLATEVSDPEQVARYQR	78 MYGVGAYRLLGLAAHLPIVES	16 VVFVWAWNLIGPLSTSYARD
DRB1*0102	13 VVAIEPEIVTGIRIVADSRT	104 WVALAVWTTITFVAMLHLLAA	46 LLVATPILLVGGALGRIVTGPL
	2 2	114 FVAMLHLLAATIGRSGRSSH	73 MLIAVTLASILPVLAVGVAA
DR3	52 LVVDGRVIGRTRLTAKVSV	24 IVTSGLVAGASVVFVAFGPPW	73 MLIAVTLASILPVLAVGVAA
DRB1*0301	127 MAMDTVVAIEPEIVTGIRIV	63 LRYEATLWSVVFPLGMYGVG	88 VGVAATMGSYALLVFFGLFL
	133 VAIEPEIVTGIRIVADSRT		137 FGMGVGTALSAFFTPRFVR
			180 VVLRDAPYFRPNADPVLPR
			213 FLYALVFGGFVAFSNYLLPTY
			264 WLSDDRIAPRHVVLASIAGTA
			350 LVMGATYDPPVDNDYTVGLLL
DR4	25 MRLIASVDHGRVVFTRAALP	61 VPLRYEATLWSVVFPLGMYG	1 MRGQAANLVLATWISVVNFW
DRB1*0401	101 VTGLATEVSDPEQVARYQRL	92 LPVIESIGEFEGWVALAVWT	26 IGPLSTSYARDMSLSSAEAS
DRB1*0402	121 LHPWVNMMAMDTVVAIEPEIV	104 WVALAVWTTITFVAMLHLLAA	73 MLIAVTLASILPVLAVGVAA
DRB1*0404			87 AVGVAATMGSYALLVFFGLF
DRB1*0405			139 MGVGTALSAFFTPRFVRWF
DRB1*0410			154 WFGLETTTHAIVAAALASTAV
DRB1*0421			176 VVAMVVLRDAPYFRPNADPV
			213 FLYALVFGGFVAFSNYLLPTY
			236 IYGFSTVDAGARTAGFALAA
			303 FITLAVCLGVGTGGVFAWVA
			367 LLLLVATALVACTYTTALHAR

10

20

30

40

【表 4 - 2 - 2】

DR7 DRB1*0701	46	IRPVNHLVVDGRVIGRTRLT	71 84 104	WSVFFPLGMYGVGAYRIGLA YRLGLAAHLPIVESIGEFEG WVALAVWTITFFVAMLHLLAA	8 16 82 97 158 209 228	LVLATWISVVNFWAWNLI GP VVNFWAWNLI GP LSTSYARD ILPVLAVGVAATMGSYALLV YALLVFFGLEFLGVAGTIFAV FGLFTTHAI VAAALASTAVV WEMSEFLYAI VFGGFVAFSNI YLPTYITTIYGFSTVDAGAR
DR8 DRB1*0801 DRB1*0802 DRB1*0804 DRB1*0806	25 58 70 114	MRLIASVDHGRVVFTRRAALP VIGRTRLTAKVSVAVRSSAD VAVRSSADAGVVVAYEADDL VARYQRLLHPWVNMMAMDTVV	44 57 76 104 144	LIPPLVAASIWKHVVHRVPL VVHRVPLRYEATLWSVVFPL LGMYGVGAYRIGLAAHLPIV WVALAVWTITFFVAMLHLLAA IICRPPRSFDHQVRAFRRNQ	68 125 137 150 176 195 256 269 303 320	FGRAMLIAVTLASILPVLA YQPARRGFSTGVFGMGVGT FGMGVGTALS AFFT PRFVR FTPRFVRWFGLFTTHAI VAA VVAMVVL RDAPYFRPNADPV VLPRLLKAAARLPVTWEMSFL VLARPVGGWLS DRIAPRHVV IAPRHVVLASLAGTALLAFA FITLAVCLGVGTGGVFAWVA WVARRAPAASVGSVTGIVAA
DR11(5) DRB1*1101 DRB1*1104 DRB1*1106 DRB1*1107	25 46 58 114	MRLIASVDHGRVVFTRRAALP IRPVNHLVVDGRVIGRTRLT VIGRTRLTAKVSVAVRSSAD VARYQRLLHPWVNMMAMDTVV	48 63 86 104 114	LVAASIWKHVVHRVPLRYEA LRYEATLWSVVFPLGMYGVG LGLAAHLPIVESIGEFEGWV WVALAVWTITFFVAMLHLLAA FVAMLHLLAATIGRSGRSSH	22 46 73 88 102 137 176 199 251 303 368	WNLI GP LSTSYARDMSLSSA LVATPILV GALGRIVTGP L T MLIAVTLASILPV LAVGVAA VGVAATMGSYALLVFFGLEFL FFGLFLGVAGTIFAVGIPFA FGMGVGTALS AFFT PRFVR VVAMVVL RDAPYFRPNADPV LKAAARLPVTWEMSFLYAI V FALAAV LARPVGGWLS DRIA FITLAVCLGVGTGGVFAWVA LLL VATALVACTY TALHARE

10

20

30

40

【表 4 - 2 - 3】

DR13(6)	25	MRLIASVDHGRVVFTRAALP	48	LVAASIWKHVHVRVPLRYEA	22	WNLIPLSTSYARDMSLSSA
DRB1*1305	46	IRPVNHLVVDGRVIGRTRLT	63	LRYEATLWSVVFPLGMYGVG	46	LVAATPILVVGALGRIVTGPLT
DRB1*1307	114	VARYQRLLHPWVNMMAMDTVV	104	WVALAVWTITTFVAMLHHLAA	73	MLIAVTLASILPVLAVGVAA
DRB1*1311					88	VGVAATMGSYALLVFFGLFL
DRB1*1321					102	FFGLFLGVAGTIFAVGIPFA
					115	YQPARRGFSTGVFGMGVGT
					139	MGMVGTALSAAFFTPRFVRF
					154	FVRWFGLFTTHAIVAAALAS
					176	VVAMVLRDAPYFRPNADPV
					199	LKAAARLPVTWEMSFLYAIV
					213	FLYAVFGGFVAFSNYLPTY
					251	FALAAVLARPVGGWLSDRIA
					303	FITLAVCLGVGTGGVFAWVA
					368	LLLAVATALVACTYTALHARE
DR15(2)	46	IRPVNHLVVDGRVIGRTRLT	63	LRYEATLWSVVFPLGMYGVG	8	LVLATWISVVNFAWNLIQP
DRB1*1501	58	VIGRTRLTAKVSVAVRSSAD			73	MLIAVTLASILPVLAVGVAA
DRB1*1502	81	VVAYEADDLDPPRRRTGWSVV			94	MGSYALLVFFGLFLGVAGTI
	114	VARYQRLLHPWVNMMAMDTVV			154	FVRWFGLFTTHAIVAAALAS
	133	VAIEPEIVTGIRIVADSRTP			199	LKAAARLPVTWEMSFLYAIV
					222	FVAFSNYLPTYITTIYGFST
DRB5*0101	25	MRLIASVDHGRVVFTRAALP	78	MYGVGAYRLLGLAAHLPIVES	22	WNLIPLSTSYARDMSLSSA
			104	WVALAVWTITTFVAMLHHLAA	106	FLGVAGTIFAVGIPFANNWY
					239	FSTVDAGARTAGFALAAVLA
					251	FALAAVLARPVGGWLSDRIA
					367	LLLAVATALVACTYTALHAR

注：結果は TEPITOPE 2000, Vaccinome で作成した  
(Bian H, Hammer J. 2004, Discovery of promiscuous HLA-II-restricted T cell エピトープ with TEPITOPE. Methods. 34(4):468-75)。

10

20

30

40

【表 5 - 1】

表5. TB 潜在性抗原の 20-mer ペプチドの認識

ペプチド	Rv1733c	start	end	CD4			CD8		
				>20-50 %	>50-75 %	>75 %	>20-50 %	>50-75 %	>75 %
1	MIATRDREGATMITFRLRLK	1	20						
2	ATMITFRLRLPCRTILRVFSK	11	30						
3	PCRTILRVFSRNPLVRGTD	21	40						
4	RNPLVRGTDREAVVMLLAVK	31	50						
5	LEAVVMLLAVTVSLLTIPFAK	41	60						
6	TVSLLTIPFAAAAGTAVQDSK	51	70						
7	AAAGTAVQDSRSHVYAHQAQK	61	80						
8	RSHVYAHQAQTRHPATATVIK	71	90						
9	TRHPATATVIDHEGVIDSNTK	81	100						
10	DHEGVIDSNTTATSAPPRTKK	91	110						
11	TATSAPPRTKITVPARWVNK	101	120						
12	ITVPARWVNGIERSGEVNAK	111	130						
13	GIERSGEVNAKPGTKSGDRVK	121	140						
14	KPGTKSGDRVGIWVDSAGQLK	131	150						
15	GIWVDSAGQLVDEPAPPARAK	141	160						
16	VDEPAPPARAIADAALAALGK	151	170						
17	IADAALAALGLWLSVAAVAGK	161	180						
18	LWLSVAAVAGALLALTRAILK	171	190						
19	ALLALTRAILIRVNASWQHKK	181	200						
20	IRVNASWQHIDISLDFCTQRK	191	210						

10

20

	Rv2029c	start	end	CD4			CD8		
				>20-50 %	>50-75 %	>75 %	>20-50 %	>50-75 %	>75 %
1	MTEPAAWDEGKPRIITLTMNKK	1	20						
2	KPRIITLTMNPALDITTSVDK	11	30						
3	PALDITTSVDVVRPTEKMRCK	21	40						
4	VVRPTEKMRCGAPRYDPGGGK	31	50						
5	GAPRYDPGGGINVARIVHVK	41	60						
6	GINVARIVHVLGGCSTALFPK	51	70						
7	LGGCSTALFPAGGSTGSLLMK	61	80						
8	AGGSTGSLLMALLGDAGVPFK	71	90						
9	ALLGDAGVPFRVIPIAASRCK	81	100						
10	RVIPIAASRSTFTVNESRTCK	91	110						
11	ESFTVNESRTAKQYRFVLPK	101	120						
12	AKQYRFVLPGPSLTVAEQEQK	111	130						
13	PSLTVAEQEQCLDELRGAAAK	121	140						
14	CLDELRGAAASAAFVVASGSK	131	150						
15	SAAFVVASGSLPPGVAADYYK	141	160						
16	LPPGVAADYYQRVADICRRSK	151	170						
17	QRVADICRRSSTPLILDTSK	161	180						
18	STPLILDTSGGGLQHISSGVK	171	190						
19	GGLQHISSGVFLLKASVRELK	181	200						
20	FLLKASVRELRECVGSELLTK	191	210						
21	RECVGSELLTEPEQLAAAEK	201	220						

30

40

【表 5 - 2】

22	EPEQLAAAHHELIDRGRAEVVKK	211	230						
23	LIDRGRAEVVVVSLGSQGALKK	221	240						
24	VVSLGSQGALLATRHASHRFKK	231	250						
25	LATRHASHRFSSIPMTAVSGKK	241	260						
26	SSIPMTAVSGVGAGDAMVAAK	251	270						
27	VGAGDAMVAAITVGLSRGWSK	261	280						
28	ITVGLSRGWSLIKSVRLGNAK	271	290						
29	LIKSVRLGNAAGAAMLLTPGKK	281	300						
30	AGAAMLLTPGTAAACNRDDVEK	291	310						
31	TAAACNRDDVERFFELAAEPTK	301	320						
32	RFELAAEPTVEVGQDQYVWHK	311	330						
33	TEVGQDQYVWHPIVNPEASPK	318	339						

10

	Rv2627c	start	end	CD4			CD8		
				>20-50 %	>50-75 %	>75 %	>20-50 %	>50-75 %	>75 %
1	MASSASDGTHERSAFRLSPPKK	1	20						
2	ERSAFRLSPPVLSGAMGPFMKK	11	30						
3	VLSGAMGPFMHTGLYVAQSWKK	21	40						
4	HTGLYVAQSWRDYLGQOPDKKK	31	50						
5	RDYLGQOPDKLPIARPTIALKK	41	60						
6	LPIARPTIALAAQAFRDEIVKK	51	70						
7	AAQAFRDEIVLLGLKARRPVKK	61	80						
8	LLGLKARRPVSNHRVFERISK	71	90						
9	SNHRVFERISQEVAAGLEFYKK	81	100						
10	QEVAAGLEFYGNRRWLEKPSK	91	110						
11	GNRRWLEKPSGFFAQPPPLTK	101	120						
12	GFFAQPPPLTEVAVRKVKDRK	111	130						
13	EVAVRKVKDRRRSFYRIFFDK	121	140						
14	RRSFYRIFFDGFTPHPGEPK	131	150						
15	SGFTPHPGEPGSQRWLSYTK	141	160						
16	GSQRWLSYTANNREYALLLRK	151	170						
17	NNREYALLLRHPEPRPWLVC	161	180						
18	HPEPRPWLVCVHGTEMGRAPK	171	190						
19	VHGTEMGRAPLDLAVFRAWKK	181	200						
20	LDLAVFRAWKLHDELGLNIVK	191	210						
21	LHDELGLNIVMPVLPMHGPRK	201	220						
22	MPVLPMHGPRGQGLPKGAVFK	211	230						
23	GQGLPKGAVFPGEDVLDVHKK	221	240						
24	PGEDVLDVHGTAQAVWDIRK	231	250						
25	GTAQAVWDIRLLSWIRSQEK	241	260						
26	RLLSWIRSQEEESLIGLNGLK	251	270						
27	EESLIGLNGLSLGGYIASLVK	261	280						
28	SLGGYIASLVASLEEGLACAK	271	290						
29	ASLEEGLACAILGVPVADLIK	281	300						
30	ILGVPVADLIELLGRHCGLRK	291	310						
31	ELLGRHCGLRHKPRRHTVKK	301	320						
32	HKPRRHTVKMAEPIGRMISK	311	330						
33	MAEPIGRMISPLSLTPLVPMK	321	340						

20

30

40

【表 5 - 3】

34	PLSLTPLVMPGGRFIYAGIAKK	331	350						
35	PGRFIYAGIADRLVHPREQVKK	341	360						
36	DRLVHPREQVTRLWEHWGKPKK	351	370						
37	TRLWEHWGKPEIVWYPGGHTKK	361	380						
38	EIVWYPGGHTGFFQSRPVRRKK	371	390						
39	GFFQSRPVRRFVQAALEQSGKK	381	400						
40	FVQAALEQSGLLDAPRTQRDCK	391	410						
41	AALEQSGLLDAPRTQRDRSAKK	394	413						

	Rv2628c	start	end	CD4			CD8		
				>20-50 %	>50-75 %	>75 %	>20-50 %	>50-75 %	>75 %
1	MSTQRPRHSGIRAVGPYAWAKK	1	20						
2	IRAVGPYAWAGRCGRIGRWGKK	11	30						
3	GRCGRIGRWGVHQEAMMNLAKK	21	40						
4	VHQEAMMNLAIWHPRKVQSACK	31	50						
5	IWHPRKVQSATIQVTDRSHKK	41	60						
6	TIYQVTDRSHDGR TARVPGDKK	51	70						
7	DGR TARVPGDEITSTVSGWLKK	61	80						
8	EITSTVSGWLSELGTQSPLAKK	71	90						
9	SELGTQSPLADELARAVRIGKK	81	100						
10	DELARAVRIGDWPAAAYAIGEKK	91	110						
11	DWPAAAYAIGEHL SVEIAVAVKK	101	120						

10

20

【表 6 - 1】

表6. TB 潜在性抗原における予測された直線的及び高次構造的な B-細胞エピートープ

Rv1733c

1 - MIATTRDREG ATMITFRLRL PCRTILRVFS RNPLVRGTDR LEAVVMLLAV TVSLLTIPFA  
61 - AAAGTAVQDS RSHVYAHQAQ TRHPATATVI DHEGVIDSNT TATSAPPRTK ITVPARWVVN  
121 - GIERSGEVNA KPGTKSGDRV GIWVDSAGQL VDEPAPPARA IADAALAALG LWLSVAAVAG  
181 - ALLALTRAIL IRVRNASWQH DIDSLECTQR

30

Rv2029c (PfkB)

1 - MTEPAWDEG KPRIITLTMN PALDITTSVD VVRPTEKMRC GAPRYDPGGG GINVARIVHV  
61 - LGGCSTALFP AGGSTGSLM ALLGDAGVPF RVIPIAASTR ESFTVNESRT AKQYRFVLP  
121 - PSLTVAEQEQ CLDELRGAAA SAAFVVASGS LPPGVAADYY QRVADICRRS STPLILDTS  
181 - GGLQHISGVL FLLKASVREL RECVGSELLT EPEQLAAAHE LIDRGRAEVV VVSLGSQAL  
241 - LATRHASHRF SSIPMTAVSG VGAGDAMVAA ITVGLSRGWS LIKSVRLGNA AGAAMLLTPG  
301 - TAACNRDDVE RFFELAAEPT EVGQDQYVWH PIVNPEASP

40

## 【表 6 - 2】

## Rv2627c

1 - MASSASDGTH ERSAFRLSPP VLSGAMGPFM HTGLYVAQSW RDYLGQQPDK LPIARPTIAL  
 61 - AAQAFRDEIV LLGLKARRPV SNHRVFERIS QEVAAGLEFY GNRRWLEKPS GFFAQPPPLT  
 121 - EVAVRKVKDR RRSFYRIFFD SGFTPHPGEP GSQRWLSYTA NNREYALLLR HPEPRPWLVC

181 - VHGTEMGRAP LDLAVFRAWK LHDELGLNIV MPVLPMHGPR GQGLPKGAVF PGEDVLDDVH  
 241 - GTAQAVWDIR RLLSWIRSQE EESLIGLNGL SLGGYIASLV ASLEEGLACA ILGVPVADLI  
 301 - ELLGRHCGLR HKDPRRHVK MAEPIGRMIS PLSLTPLVPM PGRFIYAGIA DRLVHPREQV  
 361 - TRLWEHWGKP EIVWYPGGHT GFFQSRPVRR FVQAALEQSG LLDAPRTQRD RSA

10

## Rv2628

1 - MSTQRPRHSG IRAVGPYAWA GRCGRIGRWG VHQEAMNLA IWHPRKVQSA TIYQVTDRSH  
 61 - DGRTARVPGD EITSTVSGWL SELGTQSPLA DELARAVRIG DWPAAYAIGE HLSVEIAVAV

## Rv0080

1 - MSPGSRRASP QSAREVVELD RDEAMRLAS VDHGRVVFTR AALPAIRPVN HLVVDGRVIG  
 61 - RTRLTAKVSV AVRSSADAGV VVAYEADDLD PRRRTGWSVV VTGLATEVSD PEQVARYQRL  
 121 - LHPVWNMAMD TVVAIEPEIV TGIRIVADSR TP

20

## Rv1735c

1 - MGATAITVLA GAHIVEMADA PMAIVTSGLV AGASVVFVAF GPWLIPPLVA ASIWKHVVHR  
 61 - VPLRYEATLW SVVFPLMGY VGAYRLGLAA HLPIVESIGE FEGWVALAVW TITFVAMLHH  
 121 - LAATIGRSGR SSHAIGAADD THAIICRPPR SFDHQVRAFR RNQPM

## Rv1736c (NarX)

1 - VTVTPRTGSR IEELLARSGR FFIPGEISAD LRTVTRRGG DGDVIFYRDRW SHDKVVRSTH  
 61 - GVNCTGSCSW KIYVKDDIIT WETQETDYP VGPDRPEYEP RGCPRGAAFS WYTYSPTRVR  
 121 - HPYARGVLVE MYREAKARLG DPVAAWADIQ ADPRRRRRYQ RARGKGLVR VSWAEATEMI  
 181 - AAHVHTIST YGPDRVAGFS PIPAMSMVSH AAGSRFVELI GGVMTSFYDW YADLPVASPQ  
 241 - VFGDQTDVPE SGDWDVWVWQ CASVLLTPN SRQLGTAEEL LAHIDGPAAD LLGRTVSELR  
 301 - RADPLTAATR YVDTFDLGR ATLYLTYWTA GDTRNRGEM LAFAQTYRST DVAPPRGETP  
 361 - DFLPVVLEFA ATVDPEAGR LLSGYRVPIA ALCNALTEAA LPYAHTVA AV CRTGDMMGEL  
 421 - FWTVPYVVTM TIVAVGSWWR YRYDKFGWTT RSSQLYESRL LRIASPMFHF GILVVIVGHG  
 481 - IGLVIPQSWT QAAGLSEGAY HVQAVVLGSI AGITTLAGVT LLIYRRRTRG PVFMATTVND  
 541 - KVMYLVLVAA IVAGLGATAL GSGVVEAYN YRETVSVWFR SVWVLQPRGD LMAEAPLYYQ  
 601 - IHVLIGLALF ALWPFTRLVH AFSAPIGYLF RPYIYRSRE ELVLTRPRRR GW

30

## Rv1737c (NarK2)

1 - MRGQAANLVL ATWISVVNFW AWWLIGPLST SYARDMSLSS AEASLLVATP ILVGALGRIV  
 61 - TGPLTDRFGG RAMLIAVTLA SILPVLAVGV AATMGSYALL VFFGLFLGVA GTIFAVGIPF  
 121 - ANNWYQPARR GFSTGVFGMG MVTALSFAFF TPRFVRWFGL FTTHAIVAAA LASTAVVAMV  
 181 - VLRDAPYFRP NADPVLPRK AAARLPVTWE MSFLYAIVFG GFVAFSNYLP TYITTIYGFS  
 241 - TVDAGARTAG FALAAVLARP VGGWLSDRIA PRHVVLASLA GTALLAFAAA LQPPPEVWSA  
 301 - ATFITLAVCL GVGTTGGVFAW VARRAPAASV GSVTGIVAAA GGLGGYFPPL VMGATYDPVD  
 361 - NDYTVGLLLL VATALVACTY TALHAREPVS EEASR

40

## 【図面の簡単な説明】

【 0 0 9 5 】

【図 1】結核菌潜在性抗原、低酸素結核菌ライセート及び培養物濾液(CF)に应答した長期 T細胞株(n=12)の数。 50 pg/mlのIFN- 应答が陽性とみなされた。線は、低酸素条件下

50

で増殖された結核菌培養物のライセート(n=4) (白抜き) 又はCF(n=4) (濃い網かけ) の何れかでの、或いは、標準的な、通気条件下(n=4)で増殖された結核菌培養物のライセート(薄い網かけ)での、TST+個体(n=2)又はTB患者(n=4)から得られたPBMCを刺激することによって作成された。棒は、各潜在性抗原に应答する株の数を示し、各棒の最高点は、それらの应答株の半IFN- $\gamma$ 産生を示す。

【図2】TST陽性個体(TST+)及びTB患者によって認識された潜在性抗原の数。23のTST+個体及び20人のTB患者のPBMCを、25の結核菌潜在性抗原により刺激した。潜在性抗原は、50 pg/mlのIFN- $\gamma$  産生を誘導する場合に認識されたとみなした。各個体について、認識された潜在性抗原の数を算出した。棒は、潜在性抗原のある数を認識する個体の数を示す。(a) TST+個体。白い棒は、最近のTST転換者の数を示し(合計n=12)、黒い棒は、遠隔性TST転換者の数(合計n=11)を示す。(b) TB患者。白い棒は活発なTB患者の数を示し(合計n=11)、黒い棒は治癒したTB患者の数を示す(合計n=9)。

10

【図3】4つの最もよく認識された結核菌潜在性抗原に対する应答プロフィール。4つの結核菌潜在性抗原、即ち、Rv1733c(a)、Rv2029c(b)、Rv2627c(c)、Rv2628(d)への应答における、健康なコントロール(HC)、TB患者(TB)及びTST陽性個体(TST+)のPBMCによるIFN- $\gamma$ 産生。PBMCはまた、低酸素条件下で増殖された結核菌のライセート(e)又は培養物濾液(f)に対する应答についても評価された。被検グループの中央値は、水平な線で示す。\*, P < .05; \*\*, P < .01; \*\*\*, P < .001。

【図4】結核菌潜在性抗原への健康なコントロール(HC)の应答。(a) 健康な非結核菌感染コントロールは、低酸素-結核菌ライセートに対するそれらの应答に基づいて2つのグループに分けられた。< 100 pg/mlのIFN- $\gamma$  産生を有するHCは、HC<sub>low</sub> (n=11) (白抜きの丸)として分類し、一方、> 100 pg/mlのIFN- $\gamma$  産生を有するHCは、HC<sub>high</sub> (n=10) (黒丸)に分類した。中央値は水平の線により示される。(b) 25の潜在性抗原に対する半IFN- $\gamma$  産生をHC<sub>high</sub> グループ(黒棒)及びHC<sub>low</sub> グループ(白棒)について算出した。示したように、潜在性抗原に対するIFN- $\gamma$  産生は、ほとんど独占的にHC<sub>high</sub> グループ(黒棒)(b)において観察された。このグループの個体は、低酸素-結核菌ライセートに対するそれらの強い应答によって示されるように、環境のミコプラズマに曝露された可能性が高い。

20

【図5】CFSE標識CD4リンパ球の増殖、続いて結核菌Rv1733cのペプチドプールによる刺激。Rv1733cの組換えタンパク質に対する应答が知られているTST+個体のPBMCは、カルボキシ-フルオレセインジアセテート、スクシンイミドエステル(CFSE)で標識され、培養液(a)、PPD(b)、Rv1733c組換えタンパク質(c)又はRv1733c(d-f)のペプチドプールによって刺激された。細胞はCD4で染色され、続いて、フローサイトメーターを用いてCFSE希釈の測定により、CD4陽性細胞の増殖が評価された。

30

【図6】潜在性抗原に対する应答におけるサイトカインプロフィール。TB患者(n=10)及びTST陽性個体(n=10)のPBMCは、表示された潜在性抗原及び低酸素結核菌ライセートによって刺激された。6日後、その上清を収集し、該サイトカインプロフィールを、FACSCaliburフローサイトメーターを用い、Cytometric Bead Array (BD)によって決定した。以下のサイトカインを評価した: TNF (赤)、IL-10 (オレンジ)、IL-5 (黄色)、IL-4 (緑)及びIL-2 (青); 抗原あたりの半サイトカインレベルを各グループについて示した。TB患者と比較して、特にRv1733c、Rv2029c(Pfkb)、Rv2627c、Rv2628及びRv3129について、著しいIL-10 産生がTST陽性において観察された。

40

【図7】全48 DosR 潜在性抗原の免疫原性スクリーニング。

【図8】好ましいTB潜在性抗原の認識の頻度。

【図9】オイラーの図式は、TB潜在性抗原に対する应答の共有を示す。

【図10-1】図D。ヒトにおけるBCGワクチン接種に続く免疫应答。TB潜在性抗原に対するBCGワクチン接種の、個々のIFN- $\gamma$  産生(i)及び中央値IFN- $\gamma$  産生(ii)。結核菌に全く曝露されなかったBCGワクチン接種された個体は、TB潜在性抗原(左)に対して低いIFN- $\gamma$  産生を示したが、TBへの曝露の証拠を有する(即ち、TB特異的抗原ESAT6又はCFP10に対して陽性のインビトロ应答)BCGワクチン接種された個体は、TB潜在性抗原(右)に対して著しいIFN- $\gamma$  産生を有する。

50

【図10-2】図D。ヒトにおけるBCGワクチン接種に続く免疫応答。TB潜在性抗原に対するBCGワクチン接種の、個々のIFN 応答(i)及び中央値IFN 応答(ii)。結核菌に全く曝露されなかったBCGワクチン接種された個体は、TB潜在性抗原(左)に対して低いIFN 産生を示したが、TBへの曝露の証拠を有する(即ち、TB特異的抗原ESAT6又はCFP10に対して陽性のインビトロ応答)BCGワクチン接種された個体は、TB潜在性抗原(右)に対して著しいIFN の産生を有する。

【図11-1】(上部パネルI) HLA-DR3トランスジェニックマウスのBCGによるワクチン接種は、TB潜在性抗原HspX及びそのHLA-DR3制限T細胞エピトープに対して低い免疫応答を誘導するが、Hsp65及びAg85組換えタンパク質及びそれらのHLA-DR3制限エピトープに対して著しい応答が観察される(Geluk et al. PNAS 95:10797-802に開示されているように)

10

【図11-2】(下部パネルii) BALB/cマウスにおける、潜在性TB潜在性抗原に対するIFN 応答。BCGワクチン接種後に、TB潜在性抗原によりインビトロで刺激されたマウス脾細胞は、低いレベルのIFN を産生する。反対に、分泌抗原Ag85Aで刺激された細胞は、著しい量のIFN を産生する(A)。しかしながら、マウスは試験されたTB潜在性抗原に対する免疫応答を起こすことができる：個々のTB潜在性抗原をコードするプラスミドDNAによる3×免疫化の後、脾細胞は著しい量のIFN を産生する(B)。

【図12-a】TB抗原のTMHMM(膜貫通)後確率分析。

【図12-b】TB抗原のTMHMM(膜貫通)後確率分析。

【図12-c】TB抗原のTMHMM(膜貫通)後確率分析。

20

【図12-d】TB抗原のTMHMM(膜貫通)後確率分析。

【図12-e】TB抗原のTMHMM(膜貫通)後確率分析。

【図12-f】TB抗原のTMHMM(膜貫通)後確率分析。

【図12-g】TB抗原のTMHMM(膜貫通)後確率分析。

【図12-h】TB抗原のTMHMM(膜貫通)後確率分析。

【参考文献】

【0096】

1. Wayne, L. G. and H. A. Sramek. 1994. Metronidazole is bactericidal to dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2054-2058.
2. Wayne, L. G. and K. Y. Lin. 1982. Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect. Immun.* 37:1042-1049. 10
3. Lillebaek, T., A. Dirksen, E. Vynnycky, I. Baess, V. O. Thomsen, and A. B. Andersen. 2003. Stability of DNA patterns and evidence of *Mycobacterium tuberculosis* reactivation occurring decades after the initial infection. *J. Infect. Dis.* 188:1032-1039.
4. Warren, R. M., G. D. van der Spuy, M. Richardson, N. Beyers, M. W. Borgdorff, M. A. Behr, and P. D. van Helden. 2002. Calculation of the stability of the IS6110 banding pattern in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease. *J. Clin. Microbiol.* 40:1705-1708. 20
5. Fine, P. E. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 346:1339-1345.
6. Turner, J., E. R. Rhoades, M. Keen, J. T. Belisle, A. A. Frank, and I. M. Orme. 2000. Effective preexposure tuberculosis vaccines fail to protect when they are given in an immunotherapeutic mode. *Infect. Immun.* 68:1706-1709. 30
7. Moreira, A. L., L. Tsenova, M. H. Aman, L. G. Bekker, S. Freeman, B. Mangaliso, U. Schroder, J. Jagirdar, W. N. Rom, M. G. Tovey, V. H. Freedman, and G.

Kaplan. 2002. Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect.Immun.* 70:2100-2107.

8. Repique, C. J., A. Li, F. M. Collins, and S. L. Morris. 2002. DNA immunization in a mouse model of latent tuberculosis: effect of DNA vaccination on reactivation of disease and on reinfection with a secondary challenge. *Infect.Immun.* 70:3318-3323. 10

9. Chan, J. and J. Flynn. 2004. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin.Immunol.* 110:2-12.

10. Cunningham, A. F. and C. L. Spreadbury. 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J.Bacteriol.* 180:801-808. 20

11. Yuan, Y., D. D. Crane, and C. E. Barry, III. 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J.Bacteriol.* 178:4484-4492.

12. Wilkinson, R. J., K. A. Wilkinson, K. A. De Smet, K. Haslov, G. Pasvol, M. Singh, I. Svarcova, and J. Ivanyi. 1998. Human T- and B-cell reactivity to the 16kDa alpha-crystallin protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand.J.Immunol.* 48:403-409. 30

13. Oftung, F., E. Borka, and A. S. Mustafa. 1998. *Mycobacterium tuberculosis* reactive T cell clones from naturally converted PPD-positive healthy subjects: recognition of the *M. tuberculosis* 16-kDa antigen. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* 20:319-325.

14. Wayne, L. G. and L. G. Hayes. 1996. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect.Immun.* 64:2062-2069. 40

15. Sherman, D. R., M. Voskuil, D. Schnappinger, R. Liao, M. I. Harrell, and G. K. Schoolnik. 2001. Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:7534-7539.
16. Rosenkrands, I., R. A. Slayden, J. Crawford, C. Aagaard, C. E. Barry, III, and P. Andersen. 2002. Hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J.Bacteriol.* 184:3485-3491. 10
17. Voskuil, M. I., D. Schnappinger, K. C. Visconti, M. I. Harrell, G. M. Dolganov, D. R. Sherman, and G. K. Schoolnik. 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program. *J.Exp.Med.* 198:705-713.
18. Schnappinger, D., S. Ehrt, M. I. Voskuil, Y. Liu, J. A. Mangan, I. M. Monahan, G. Dolganov, B. Efron, P. D. Butcher, C. Nathan, and G. K. Schoolnik. 2003. Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J.Exp.Med.* 198:693-704. 20
19. Shi, L., Y. J. Jung, S. Tyagi, M. L. Gennaro, and R. J. North. 2003. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a Mycobacterium tuberculosis transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:241-246. 30
20. Timm, J., F. A. Post, L. G. Bekker, G. B. Walther, H. C. Wainwright, R. Manganelli, W. T. Chan, L. Tsenova, B. Gold, I. Smith, G. Kaplan, and J. D. McKinney. 2003. Differential expression of iron-, carbon-, and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:14321-14326. 40

21. Arend, S. M., P. Andersen, K. E. van Meijgaarden, R. L. Skjot, Y. W. Subronto, J. T. van Dissel, and T. H. Ottenhoff. 2000. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J.Infect.Dis.* 181:1850-1854.
22. Arend, S. M., A. Geluk, K. E. van Meijgaarden, J. T. van Dissel, M. Theisen, P. Andersen, and T. H. Ottenhoff. 2000. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect.Immun.* 68:3314-3321. 10
23. Franken, K. L., H. S. Hiemstra, K. E. van Meijgaarden, Y. Subronto, J. den Hartigh, T. H. Ottenhoff, and J. W. Drijfhout. 2000. Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr.Purif.* 18:95-99. 20
24. Ottenhoff, T. H., D. G. Elferink, J. Hermans, and R. R. de Vries. 1985. HLA class II restriction repertoire of antigen-specific T cells. I. The main restriction determinants for antigen presentation are associated with HLA-D/DR and not with DP and DQ. *Hum.Immunol.* 13:105-116. 30
25. Voskuil, M. I., K. C. Visconti, and G. K. Schoolnik. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis.(Edinb.)* 84:218-227.
26. Florczyk, M. A., L. A. McCue, A. Purkayastha, E. Currenti, M. J. Wolin, and K. A. McDonough. 2003. A family of *acr*-coregulated *Mycobacterium tuberculosis* genes shares a common DNA motif and requires Rv3133c (*dosR* or *devR*) for expression. *Infect.Immun.* 71:5332-5343. 40

27. Park, H. D., K. M. Guinn, M. I. Harrell, R. Liao, M. I. Voskuil, M. Tompa, G. K. Schoolnik, and D. R. Sherman. 2003. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol.Microbiol.* 48:833-843.
28. Malhotra, V., D. Sharma, V. D. Ramanathan, H. Shakila, D. K. Saini, S. Chakravorty, T. K. Das, Q. Li, R. F. Silver, P. R. Narayanan, and J. S. Tyagi. 2004. Disruption of response regulator gene, devR, leads to attenuation in virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol.Lett.* 231:237-245. 10
29. Yuan, Y., D. D. Crane, R. M. Simpson, Y. Q. Zhu, M. J. Hickey, D. R. Sherman, and C. E. Barry, III. 1998. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:9578-9583. 20
30. Monahan, I. M., J. Betts, D. K. Banerjee, and P. D. Butcher. 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology* 147:459-471.
31. Florczyk, M. A., L. A. McCue, R. F. Stack, C. R. Hauer, and K. A. McDonough. 2001. Identification and characterization of mycobacterial proteins differentially expressed under standing and shaking culture conditions, including Rv2623 from a novel class of putative ATP-binding proteins. *Infect.Immun.* 69:5777-5785. 30
32. Boon, C., R. Li, R. Qi, and T. Dick. 2001. Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induced in the Wayne dormancy model. *J.Bacteriol.* 183:2672-2676.
33. Boon, C. and T. Dick. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J.Bacteriol.* 184:6760-6767. 40

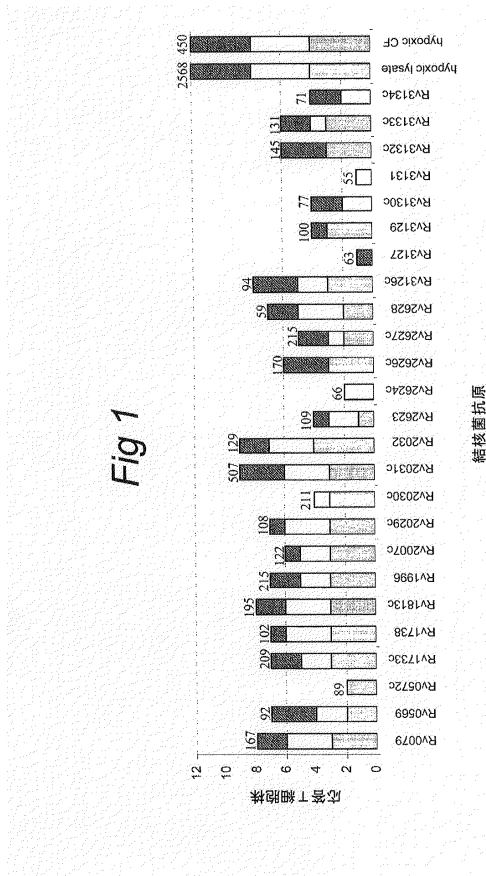
34. Ottenhoff, T. H., F. A. Verreck, E. G. Lichtenauer-Kaligis, M. A. Hoeve, O. Sanal, and J. T. van Dissel. 2002. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat.Genet.* 32:97-105.
35. Flynn, J. L., J. Chan, K. J. Triebold, D. K. Dalton, T. A. Stewart, and B. R. Bloom. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J.Exp.Med.* 178:2249-2254. 10
36. Mayuri, G. Bagchi, T. K. Das, and J. S. Tyagi. 2002. Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR-DevS two-component system, Rv3134c and chaperone alpha-crystallin homologues. *FEMS Microbiol.Lett.* 211:231-237.
37. Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane, and P. M. Small. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284:1520-1523. 20
38. Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Burdick, H. V. Fineberg, and F. Mosteller. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 271:698-702. 30
39. Brandt, L., C. J. Feino, O. A. Weinreich, B. Chilima, P. Hirsch, R. Appelberg, and P. Andersen. 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect.Immun.* 70:672-678.
40. Vekemans, J., M. O. Ota, J. Sillah, K. Fielding, M. R. Alderson, Y. A. Skeiky, W. Dalemans, K. P. McAdam, C. Lienhardt, and A. Marchant. 2004. Immune responses to mycobacterial antigens in the Gambian population: implications for vaccines and immunodiagnostic test design. *Infect.Immun.* 72:381-388. 40

41. Ravn, P., H. Boesen, B. K. Pedersen, and P. Andersen. 1997. Human T cell responses induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J.Immunol.* 158:1949-1955.
42. Lim, A., M. Eleuterio, B. Hutter, B. Murugasu-Oei, and T. Dick. 1999. Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *J.Bacteriol.* 181:2252-2256. 10
43. Parker, K. C., M. A. Bednarek, and J. E. Coligan. 1994. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* 152:163. HLA\_BIND ([http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/))
44. Rammensee, Friede, Stevanovic, MHC ligands and peptide motifs: 1st listing, *Immunogenetics* 41, 178-228, 1995; SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) and Rammensee, Bachmann, Stevanovic:MHC ligands and peptide motifs. *Landes Bioscience* 1997 (International distributor - except North America: Springer Verlag GmbH & Co. KG, Tiergartenstr. 17, D-69121 Heidelberg 20
45. Buus S, Lauemoller SL, Worning P, Kesmir C, Frimurer T, Corbet S, Fomsgaard A, Hilden J, Holm A, Brunak S. Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee' artificial neural network approach, in *Tissue Antigens.*, 62:378-84, 2003; NetMHC (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>) 30
46. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller SL, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O., Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci.*, 12:1007-17, 2003. 40

47. Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach, Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Hvid CS, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O., *Bioinformatics*, 20(9):1388-97, 2004.

48. Sturniolo, T. et al., *Nature Biotechnology* 17, 555-562, 1999, Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA chips and virtual HLA class II matrices; TEPITOPE (<http://www.vaccinome.com/pages/597444/>).

【 図 1 】



【 図 2 】

Fig 2a

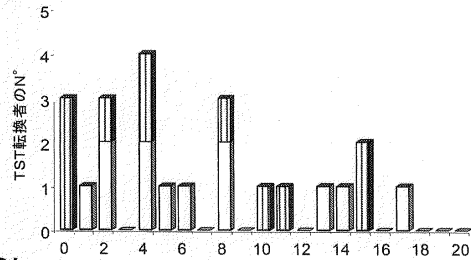
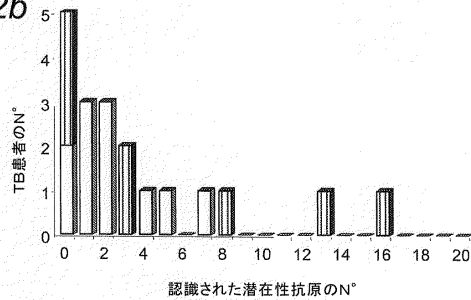
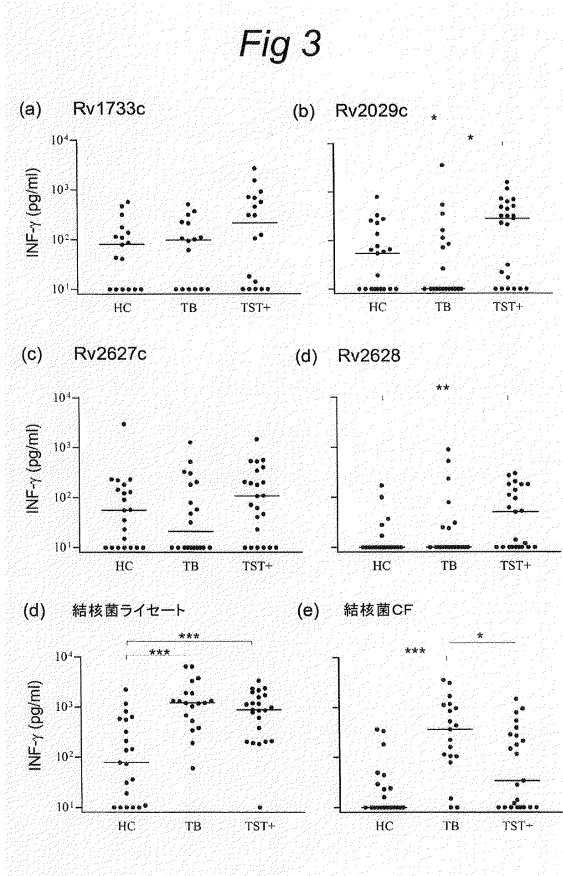


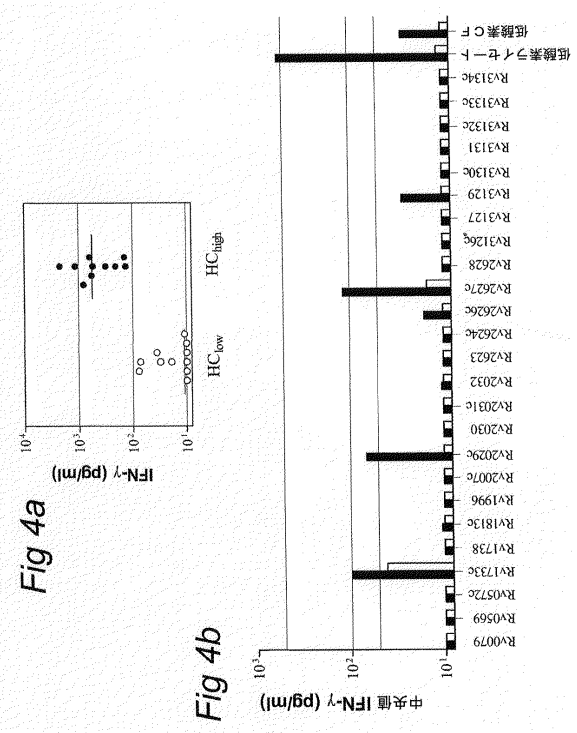
Fig 2b



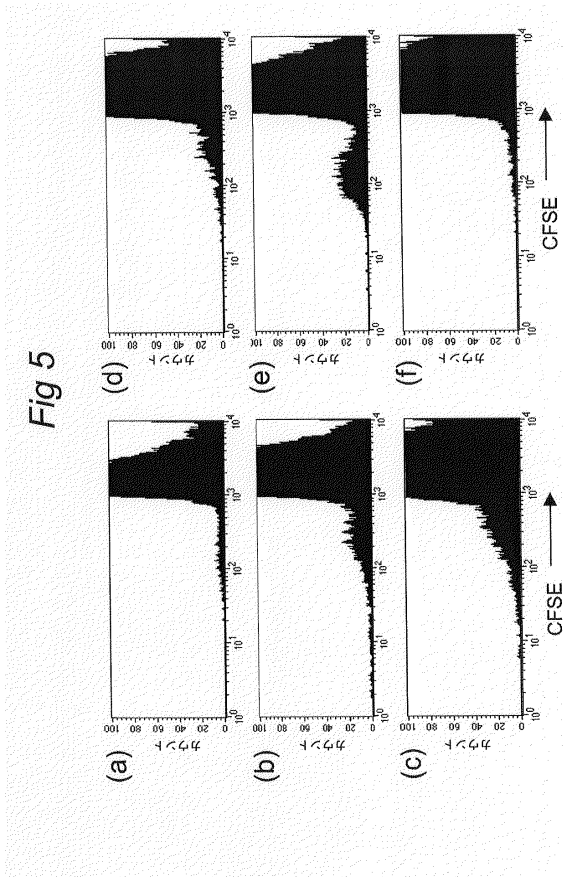
【 図 3 】



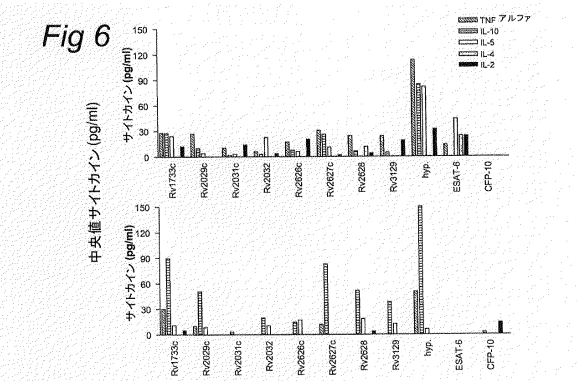
【 図 4 】



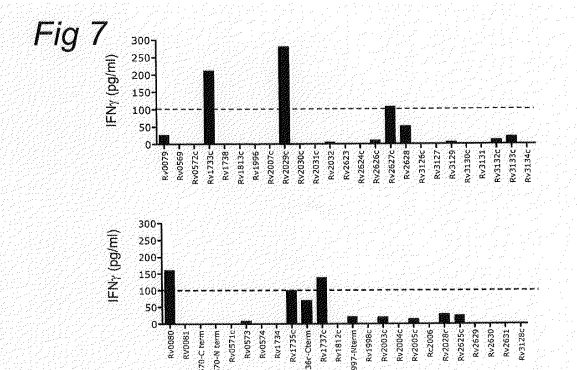
【 図 5 】



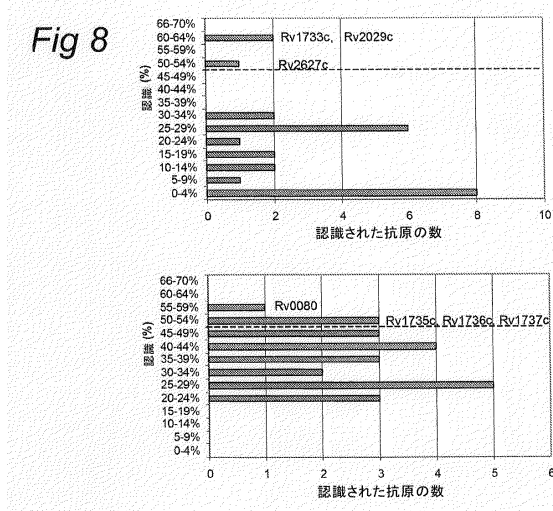
【 図 6 】



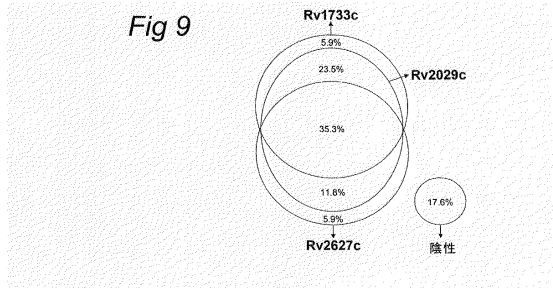
【 図 7 】



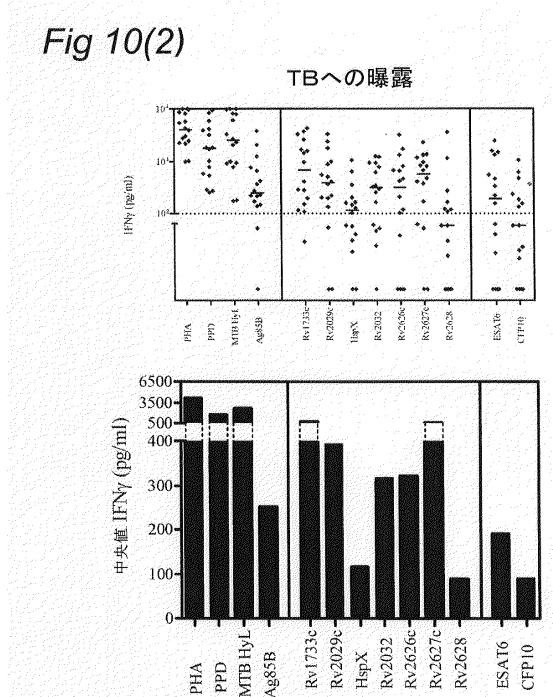
【 図 8 】



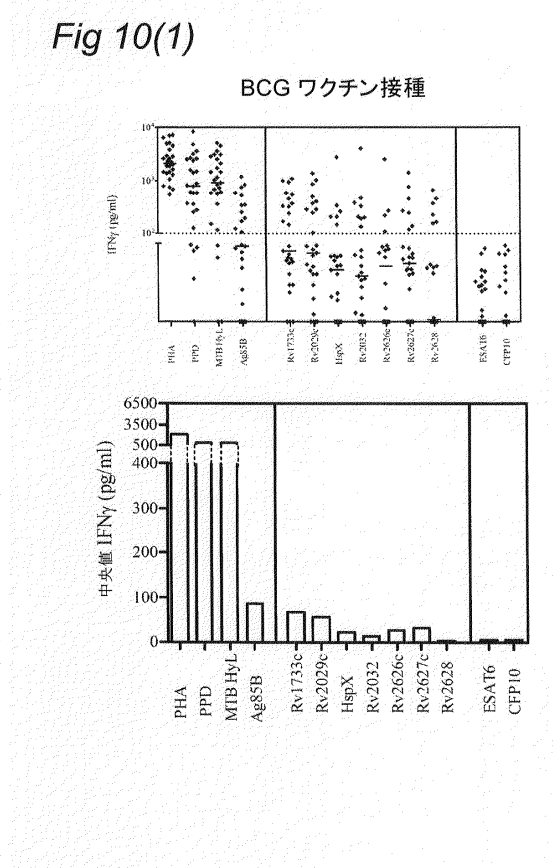
【 図 9 】



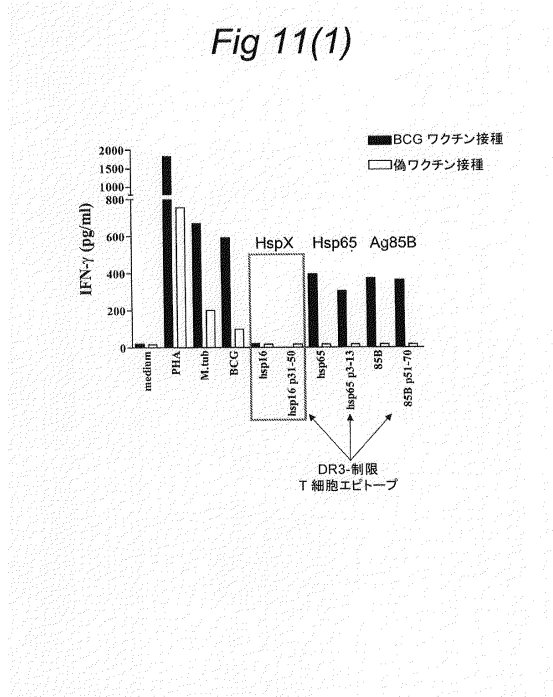
【 図 10 - 2 】



【 図 10 - 1 】

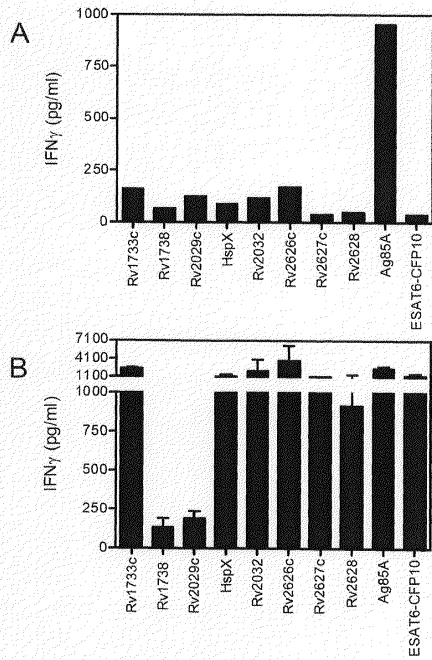


【 図 11 - 1 】



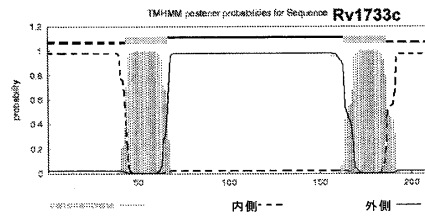
【 11 - 2 】

Fig 11(2)



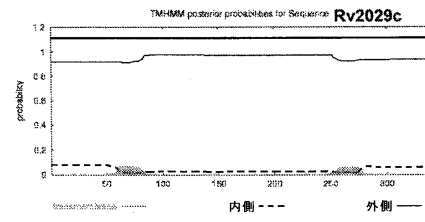
【 12 - a 】

Fig 12a



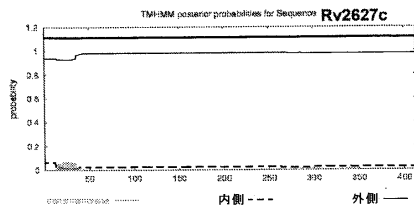
【 12 - b 】

Fig 12b



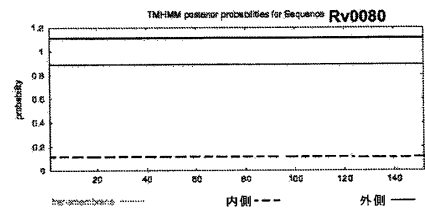
【 12 - c 】

Fig 12c



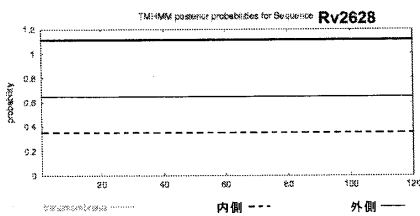
【 12 - e 】

Fig 12e



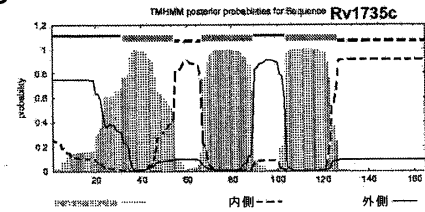
【 12 - d 】

Fig 12d



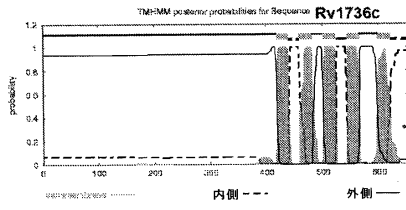
【 12 - f 】

Fig 12f



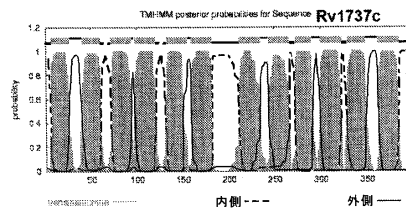
【 図 12 - g 】

Fig 12g



【 図 12 - h 】

Fig 12h



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/569

F

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 クレイン、ミヒール・ロベルト

オランダ国、エヌエル - 1 5 4 4 エムアール、ザーンディーク、ヘンドリック・アンドリエスセン  
ストラート 3 6

(72)発明者 リン、ミン・ヨング

オランダ国、エヌエル - 2 3 3 4 イーエックス・ライデン、ポエルハーベラール 2 3 0

(72)発明者 バン・メイ・ガールデン、クリスタ・エリザベト

オランダ国、エヌエル - 2 6 1 3 シーケー・デルフト、バン・ハッルストラート 1 9

(72)発明者 フランケン、コルネルス・レオナルドゥス・マリア・コレタ

オランダ国、エヌエル - 2 3 1 2 ディーエル・ライデン、ハールレムメルストラート 7 3 エス

(72)発明者 レイテン、エリアネ・マデレイネ・ソフィー

オランダ国、エヌエル - 2 5 9 6 ピーエイチ・デン・ハーグ、ベノールデンホウトセベーク 2  
5 1

(72)発明者 オッテンホフ、トム・ヘンリクス・マリア

オランダ国、エヌエル - 2 3 3 4 ケービー・レイデン、ホウトラール 7 エー

審査官 小松 邦光

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 4 / 0 0 6 9 5 2 (WO, A 1)

Voskuil MI, et al., Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium  
tuberculosis dormancy program, The Journal of Experimental Medicine, 2 0 0 3年 9月  
1日, Vol. 198, No. 5, p. 705-713

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 4

A 6 1 K 3 1 / 7 1 1

A 6 1 P 3 1 / 0 6

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 5 6 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

专利名称(译)	用于诊断, 预防和治疗分枝杆菌感染和结核病的方法和手段		
公开(公告)号	<a href="#">JP5221337B2</a>	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	JP2008503980	申请日	2006-03-31
申请(专利权)人(译)	荷兰莱顿大学医学中心		
当前申请(专利权)人(译)	荷兰莱顿大学医学中心		
[标]发明人	クレインミヒールロベルト リンミンヨング バンメイヤーガールデンクリスタエリザベト フランケンコルネルスレオナルドゥスマリアコレタ レイテンエリアネマデレイネソフィー オッテンホフトムヘンリクスマリア		
发明人	クレイン、ミヒール・ロベルト リン、ミン・ヨング バン・メイヤー・ゲルデン、クリスタ・エリザベト フランケン、コルネルス・レオナルドゥス・マリア・コレタ レイテン、エリアネ・マデレイネ・ソフィー オッテンホフ、トム・ヘンリクス・マリア		
IPC分类号	A61K39/04 A61K31/711 A61P31/06 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5695 A61K39/04		
FI分类号	A61K39/04.ZNA A61K31/711 A61P31/06 G01N33/53.N G01N33/53.P G01N33/569.F		
代理人(译)	中村 誠		
审查员(译)	小松 邦光		
优先权	2005075748 2005-03-31 EP		
其他公开文献	JP2008534583A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明鉴定了可在体内和体外以及哺乳动物中引起免疫应答的分枝杆菌潜伏期相关抗原和/或表位的一个窄子集。本发明提供了用于检测和免疫潜伏分枝杆菌感染的方法和组合物。这些组合物包含能够在经历潜伏分枝杆菌感染的哺乳动物生物体中实际诱导免疫应答的分枝杆菌潜伏抗原。更优选地,潜在感染的组合物包括由个人优先识别的抗原进行,结核分枝杆菌抗原从个体或结核病具有活性分枝杆菌感染(TB)有分枝杆菌诱导的症状或疾病,如感染的患者在个体中不能识别或识别较少的程度。

Rv no.	遺伝子	産物	応答者(%) <sup>a</sup>		
			HC (n=21)	TB (n=20)	TST+ (n=23)
Rv0079		HP	14	10	26
Rv0569		CHP	-	5	22
Rv0572c		HP	10	5	-
Rv1733c		膜貫通可能タンパク質	41	50	61
Rv1738		CHP	-	11	13
Rv1813c		CHP	14	15	17
Rv1996		CHP	14	11	4
Rv2007c	<i>fdxA</i>	概然的フェドキシシン A	-	-	9
Rv2029c	<i>pfkB</i>	概然的ホスホフルクトキナーゼ B	29	25	61*
Rv2030c		CHP	14	15	26
Rv2031c	<i>hspX</i>	熱ショックタンパク質 HspX	5	20	-*
Rv2032	<i>acg</i>	CHP Acg	14	20	30
Rv2623	<i>TB31.7</i>	CHP TB31.7	-	-	-
Rv2624c		CHP	-	-	-
Rv2626c		CHP	14	10	30
Rv2627c		CHP	38	30	52
Rv2628		HP	10	16	35
Rv3126c		HP	19	10	30
Rv3127		CHP	-	-	4
Rv3129		CHP	19	21	35
Rv3130c		CHP	-	-	13
Rv3131		CHP	-	-	4
Rv3132c	<i>devS</i>	センサーヒステジジンキナーゼ	24	15	17
Rv3133c	<i>dosR</i>	転写制御タンパク質	14	32	30
Rv3134c		CHP	-	-	4

<sup>a</sup> 略語: HC、健康なコントロール; TB、TB患者; TST+、ツベルクリン皮膚試験陽性個体; HP、仮定タンパク質; CHP、保存された仮定タンパク質。  
注釈は、<http://genolist.pasteur.fr/TuberculList/>から