

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 510018

(P2003 - 510018A)

(43)公表日 平成15年3月18日(2003.3.18)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/00	H 4 B 0 2 4
		39/04	4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/00		39/385	4 B 0 6 4
39/04		39/39	4 B 0 6 5
39/385		A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 96数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 509760(P2001 - 509760)

(86)(22)出願日 平成12年7月13日(2000.7.13)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月11日(2002.1.11)

(86)国際出願番号 PCT/DK00/00398

(87)国際公開番号 W001/004151

(87)国際公開日 平成13年1月18日(2001.1.18)

(31)優先権主張番号 PA 1999 01020

(32)優先日 平成11年7月13日(1999.7.13)

(33)優先権主張国 デンマーク(DK)

(31)優先権主張番号 60/144,011

(32)優先日 平成11年7月15日(1999.7.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 スタテンス セーラム インスティテュー  
ト

STATENS SERUM INST  
ITUT

デンマーク国、コペンハーゲン エス デ  
ィーケー - 2300、アルティレリベイ 5

(72)発明者 アンデルセン、ペーター

デンマーク、ディークー - 2700 ブロンシ  
ヨ、スパレホルムヴェイ 47

(72)発明者 スクジョ、リッケ

デンマーク、ディークー - 2640 ヘデハウ  
ゼン、エル.エー.リングス ヴァンゲ 17

(74)代理人 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マイコバクテリウム・ツベルクローシス esat - 6 遺伝子ファミリーベースの結核ワクチン及  
び診断法

(57)【要約】

この発明は、esat-6遺伝子のメンバーによってエンコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチドフラグメントに関する。esat-6遺伝子ファミリーのメンバーは、小さなタンパク質をエンコードする遺伝子として定義され、そのような2つの遺伝子は、ゲノム上に互いに隣合って配置されており、少なくとも1つの遺伝子産物がRv3874、Rv3875又はRv0288のいずれかと少なくとも15%同一のアミノ酸配列を有する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 esat-6遺伝子ファミリーのメンバーによってエンコードされるアミノ酸配列からなるか、又はesat-6遺伝子ファミリーのメンバーによってエンコードされるポリペプチドフラグメントと少なくとも70%の配列同一性を有し、同時にesat-6遺伝子ファミリーのメンバーによってエンコードされるポリペプチドフラグメントに免疫学的に等価なアミノ酸類似体からなり、但しRv0287、Rv0288、Rv1037c、Rv1038c、Rv1197、Rv1198、Rv1792、Rv1793、Rv2346c、Rv2347c、Rv3019c、Rv3619c、Rv3620c、Rv3874及びRv3875からなる群からは選択されない、実質的に純粋なポリペプチドフラグメント。

【請求項2】 SEQ ID NOs: 7、13、15、17、19、21、23、25、27、29 又は31に示すようなアミノ酸配列からなるか、又はSEQ ID NOs: 7、13、15、17、19、21、23、25、27、29 及び31からなる群から選択されるポリペプチドフラグメントと少なくとも70%の配列同一性を有し、同時にSEQ ID NOs: 7、13、15、17、19、21、23、25、27、29 及び31からなる群から選択されるポリペプチドフラグメントに免疫学的に等価なアミノ酸配列類似体からなる実質的に純粋なポリペプチドフラグメント。

【請求項3】 SEQ ID NOs: 7、13、15、17、19、21、23、25、27、29 又は31に示すアミノ酸配列のT-細胞エピトープからなるか、又はアミノ酸配列のT-細胞エピトープと少なくとも70%の配列同一性を有し、同時に該ポリペプチドフラグメントに免疫学的に等価な実質的に純粋なポリペプチドフラグメント。

【請求項4】 本質的に純粋な形態である前記請求項のいずれかによるポリペプチドフラグメント。

【請求項5】 少なくとも7アミノ酸残基、例えば少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも22、少なくとも24及び少なくとも30アミノ酸残基長を有する前記請求項のいずれかによるポリペプチドフラグメント。

【請求項6】 いずれのシグナル配列も有しない前記請求項のいずれかによるポリペプチドフラグメント。

【請求項7】 配列同一性が少なくとも80%、例えば少なくとも85%、少な

くとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%及び少なくとも 99.5%である前記請求のいずれかによるポリペプチドフラグメント。

【請求項 8】 前記請求項のいずれかによる少なくとも 1つのポリペプチドフラグメント及び少なくとも 1つの融合パートナーからなる融合ポリペプチド。

【請求項 9】 融合パートナーが、請求項 1～7のいずれかに定義されるポリペプチドフラグメント、及び結核複合体に属する細菌由来の別のポリペプチドフラグメント、例えばESAT-6又はその少なくとも1つのT-細胞エпитープ、TB10.4又はその少なくとも1つのT-細胞エпитープ、及びMPT59又はその少なくとも1つのT-細胞エпитープからなる群から選択される請求項 8 による融合ポリペプチド。

【請求項 10】 融合パートナーが、DnaK、GroEL、ウレアーゼ、グルタミンシンターゼ、プロリンリッチ複合体、L-アラニンデヒドロゲナーゼ、ホスフェート結合タンパク質、Ag 85複合体、HBHA (ヘパリン結合血球凝集素)、MPT51、スーパーオキシドジスムターゼ、19 kDaリポプロテイン、 $\alpha$ -クリスタリン、GroES及びMPT59からなる群から選択される請求項 8 による融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 11】 ポリペプチドの自己アジュバント作用を可能にするよう脂質化される前記請求項のいずれかによるポリペプチド。

【請求項 12】 医薬として用いるための前記請求項のいずれかによる実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項 13】 動物においてマイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコバクテリウム・アフリカヌム又はマイコバクテリウム・ボビスによって起こされる結核に対する診断又はワクチン接種用医薬組成物の製造における前記請求項のいずれかによる実質的に純粋なポリペプチドの使用。

【請求項 14】 請求項 1～11のいずれかによるポリペプチドからなる免疫組成物。

【請求項15】 さらに免疫学的かつ医薬的に許容される担体、ビヒクル又はアジュバントからなる請求項14による免疫組成物。

【請求項16】 担体が、ポリペプチドが疎水性の非共有相互作用により結合するプラスチックのようなポリマー、例えばポリスチレン、ポリペプチドが共有結合する多糖及びポリペプチドのようなポリマー、例えばウシ血清アルブミン、オバルブミン又はキーホールリンペットヘモシアニンからなる群から選択され；ビヒクルが希釈剤及び懸濁剤からなる群から選択され；かつアジュバントがジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDA)、Quil A、ポリI:C、フロイントの不完全アジュバント、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12、モノホスホリルリポドA (MPL) 及びムラミルジペプチド(MDP)からなる群から選択される請求項15による免疫組成物。

【請求項17】 少なくとも2つの異なるポリペプチドフラグメントからなり、異なるポリペプチドフラグメントがそれぞれ請求項1～11のいずれかによるポリペプチドである請求項14～16のいずれかによる免疫組成物。

【請求項18】 3～20個の異なるポリペプチドフラグメントからなり、異なるポリペプチドフラグメントそれぞれが請求項1～11のいずれかである請求項17による免疫組成物。

【請求項19】 ワクチンの形態である請求項14～18のいずれかによる免疫組成物。

【請求項20】 皮膚試験試薬の形態である請求項14～18のいずれかによる免疫組成物。

【請求項21】 請求項1～11のいずれかによるポリペプチドをエンコードするDNA配列からなるDNAフラグメントの少なくとも1つのコピーが、微生物がポリペプチドを発現し、任意に分泌し得るように微生物ゲノムに導入されている非病原性微生物を有効成分として含むことからなる、結核複合体に属するマイコバクテリアによって引き起こされる結核に対する、ヒトを含む動物の免疫化用ワクチン。

【請求項22】 微生物が細菌である請求項21によるワクチン。

【請求項23】 細菌が、マイコバクテリウム、サルモネラ、シュードモナ

ス及びエシェリキアの属からなる群から選択される請求項22によるワクチン。

【請求項24】 微生物が、マイコバクテリウム・ボビスBCG、例えばマイコバクテリウム・ボビスBCG株: Danish 1331である請求項23によるワクチン。

【請求項25】 請求項1～11のいずれかによるポリペプチドをエンコードするDNAフラグメントの少なくとも2つのコピーが、微生物のゲノム中に導入される請求項21～24のいずれかによるワクチン。

【請求項26】 コピー数が少なくとも5である請求項25によるワクチン

。

【請求項27】 検出手段と任意に組み合わせさせた、請求項1～11のいずれかによるポリペプチドからなる、ヒトを含む動物における結核診断用組成物。

【請求項28】 1) esat-6遺伝子ファミリーメンバーである核酸配列からなり、

2) 少なくとも10ヌクレオチド長を有し、かつSEQ ID NOs: 6、12、14、16、18、20、22、24、26、28又は30に開示されるヌクレオチド又はそれに対する相補配列を有する核酸フラグメントと適度なストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

単離形態の核酸フラグメント。

【請求項29】 DNAフラグメントである請求項28による核酸フラグメント。

【請求項30】 医薬として用いるための請求項28又は29による核酸フラグメント。

【請求項31】 マイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコバクテリウム・アフリカヌム又はマイコバクテリウム・ボビスによって起こされる結核に対する診断又はワクチン接種用の医薬組成物の製造における請求項28又は29による核酸フラグメントの使用。

【請求項32】 ワクチンを投与したヒトを含む動物によって抗原をインビボで発現させ、発現される抗原の量が、ヒトを含む動物における結核複合体のマイコバクテリア感染に対する耐性を実質的に増大するのに有効な、請求項28又は29による核酸フラグメントからなるワクチン。

【請求項33】 請求項28～29による核酸フラグメントからなる複製可能な発現ベクター。

【請求項34】 ウイルス、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド及びミニ染色体からなる群から選択される請求項33によるベクター。

【請求項35】 請求項33又は34による少なくとも1つのベクターを有する形質転換細胞。

【請求項36】 結核複合体に属する細菌、例えばエム.ツベルクローシスボビスBCG細胞である請求項35による形質転換細胞。

【請求項37】 請求項1～11のいずれかによるポリペプチドを発現する請求項35又は36による形質転換細胞。

【請求項38】 検出用手段と任意に組み合わせた、請求項23又は24による核酸フラグメントからなる、ヒトを含む動物での結核の診断用組成物。

【請求項39】 請求項28又は29による核酸フラグメントを、宿主細胞中で複製可能なベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入し、宿主細胞を、ポリペプチドの発現を行うのに十分な条件下、培養培地で培養し、かつ宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収するか、又は、

結核複合体の全マイコバクテリアから、又はその溶解物又はフラクション、例えば細胞壁含有フラクションから、ポリペプチドを単離するか、又は

固相又は液相のペプチド合成によってポリペプチドを合成することからなる、請求項1～11のいずれかによるポリペプチドの産生方法。

【請求項40】 請求項1～11のいずれかによるポリペプチドを調製し、合成又は単離し、かつワクチン用媒体にポリペプチドを可溶化又は分散し、任意に他のエム.ツベルクローシス抗原及び/又は担体、ビヒクル及び/又はアジュバント物質を加えるか、又は

請求項35～36のいずれかによる細胞を培養し、ワクチン用媒体に細胞を移し、かつ担体、ビヒクル及び/又はアジュバント物質を任意に加えることからなる、請求項14～20のいずれかによる免疫組成物の産生方法。

【請求項41】 ヒトを含む動物に、請求項1～11のいずれかによるポリペプチド又は請求項20による免疫組成物を皮内注射することからなり、注射部

位での陽性の皮膚応答が動物が結核を有していることを示し、注射部位での陰性の皮膚応答が動物が結核を有していないことを示す、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコバクテリウム・アフリカヌム又はマイコバクテリウム・ボビスによって動物に起こされる結核の診断方法。

【請求項42】 ヒトを含む動物に、請求項1～11のいずれかによるポリペプチド、請求項19による免疫組成物又は請求項21～26のいずれかによるワクチンを投与することからなる、結核複合体に属するマイコバクテリアによって起こされる結核に対する動物の免疫化方法。

【請求項43】 ポリペプチド、免疫組成物又はワクチンが、非経口(例えば静脈内及び動脈内)、腹膜内、筋肉内、皮下、皮内、経口、頬、舌下、鼻、直腸又は経皮経路によって投与される請求項42による方法。

【請求項44】 動物又はヒト由来の血液試料を提供し、請求項1～11のいずれか1つによるポリペプチドと動物由来の試料を接触させることからなり、血液試料中の単核細胞による少なくとも1つのサイトカインの細胞外相への有意な放出が、動物が感作されていることを示す、結核複合体に属する細菌での動物又はヒトでの過去もしくは現在の感作を診断する方法。

【請求項45】 イムノアッセイで請求項1～11のいずれかによるポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、もしくは該抗体の特異的な結合フラグメント。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****発明の分野**

この発明は、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(Mycobacterium tuberculosis)由来の免疫学的に活性で、新規な幾つかのポリペプチドフラグメント、免疫原性成分としてフラグメントを含むワクチン及び他の免疫組成物、及びポリペプチドの調製方法及び使用に関する。また、この発明は、この発明のポリペプチドフラグメントの調製及びエム・ツベルクローシスでの感染診断に有用なエム・ツベルクローシス由来の新規な核酸フラグメントに関する。

**【0002】****発明の背景**

マイコバクテリウム・ツベルクローシスによって引き起こされるヒトの結核は、WHOによれば年に約300万件の死亡の原因である深刻な全世界的な健康問題である。新しいTB症例の世界的な発生率は最近10年間のあいだ徐々に低下していたが、ここ数年間のこの傾向は、AIDSの出現及びエム・ツベルクローシスの多重薬剤耐性株の発生により、著しく変化した。

臨床上の使用に現在利用可能な唯一のワクチンはBCGで、このワクチンの効力は依然として論議課題である。BCGは一般にTBの動物モデルに高レベルの後天的耐性を誘発するが、発展途上国での幾つかのヒトの試験では、有意な保護を立証できなかった。特に、BCGは合衆国での使用がFDAにより許可されていない。というのは、BCGワクチン接種は、TB感染診断のためのツベルクリン皮膚試験の特異性を損なうためである。

**【0003】**

このため、TBに対して新規かつ改良されたワクチンの開発が緊急の課題となっており、WHOによって極めて高い優先性が示されている。保護マイコバクテリア物質を明らかにするための多くの試みがなされており、1950~1970年に数人の研究者が実験的なワクチン接種後の耐性の増加を報告した。しかし、BCGの効能での特異的な長期間にわたる保護免疫応答の立証は、いまだなされていない。

エム・ツベルクローシスに対する免疫は、3つの基本的な特徴によって特徴付

けられる；1) 生細菌は、効果的に保護免疫応答を誘発する；2) 特異的に感作されたTリンパ球は、この保護を媒介する、及び3) 最も重要な媒介分子はインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )と思われる。

エム・ツベルクローシスは、新しい結核(TB)ワクチンの形成を潜在的に示す幾つかのタンパク質を保持し、ならびに分泌する。数年のあいだ、主な努力は、TBに対する新しいワクチンの開発のため新しい保護抗原を同定することに向けられた。候補分子の研究は、最初は分裂細菌から放出されるタンパク質に焦点を絞った。幾つかの分子が、このマイコバクテリアタンパク質画分から同定され、特徴付けられた。培養液由来のある低分子質量タンパク質、ESAT-6は、結核(TB)患者由来のヒト末梢血液単核細胞(PBMC)の刺激に使用される際に特別な潜在性のIFN- $\gamma$ インデューサーであることが見出された(Ravnら、1999)。

#### 【0004】

エム・ツベルクローシスゲノムの全シーケンシングにより、幾つかの重要な知見がもたらされた。興味深い内容は、効力のあるT-細胞抗原ESAT-6は別の低質量タンパク質(CFP10)とともに転写されるという知見であった。これらの2つのタンパク質をエンコードする遺伝子は、言い換えれば、同じオペロンに位置するマイコバクテリアゲノム上で互いに隣合うことが見出され、同じプロモーターで制御された。2つの遺伝子は、約40%の配列同一性を有する。アミノ酸レベルでは、配列同一性は約15%であった。タンパク質は、大きさとpIがほぼ同じであった。

#### 【0005】

推定上の幾つかのオープンリーディングフレーム(ORF)とともに、これらの2つの分子は、esat-6遺伝子ファミリーと称されるものを構成している(Coleら、1998, Berthetら、1998)。このファミリーの遺伝子は全て、低質量タンパク質をエンコードしており、これらはESAT-6及びCFP10のようにオペロン様構造に位置している。ファミリーは、最初にColeら(1998)により以下の言葉：「おそらくはSec-独立の手法で分泌される、効力のあるT-細胞抗原ESAT-6は、多重遺伝子ファミリーのメンバーでエンコードされている。遺伝子の関連試験は、輸送体として作用しうる大きなATP-加水分解性膜タンパク質をエンコードする遺伝子を含む幾つかの同じく組織化されたオペロンを示している」で記載され、その後、Berthet

ら(1998)によって、以下:「esat-6との弱い類似性を共有する幾つかの遺伝子は、エム・ツベルクローシスのゲノムシーケンシング計画中に先に同定された。これらの遺伝子は互いに35%未満の配列類似性を共有するが、それらは全て約100アミノ酸の小さなポリペプチドを潜在的にコードしているので、esat-6遺伝子ファミリーに分類された。これらの遺伝子は全てオペロン様構造に組織化され、PE及びPPEファミリーの反復タンパク質をエンコードする遺伝子によって頻繁に先行される」のように記載された。

#### 【0006】

もっとも初期段階でのエム・ツベルクローシスの診断は、疾患の有効な治療に重要である。エム・ツベルクローシス感染を決定付ける現在の診断アッセイは高価で、大きな労働力を要する。世界の一部では、エム・ツベルクローシスに暴露された大多数の患者は胸部x-線を受け、唾液試料から細菌をインビトロで培養する試みがなされている。診断アッセイとしてのX-線は無感覚で、極めて進行した段階でしか感染を同定できない。エム・ツベルクローシスの培養は、診断ツールとしても理想的ではない。なぜなら、細菌は体外で不完全かつゆっくり成長し、このため偽陰性の試験結果を生じ、結果を得るまでに数週間を要するからである。世界の第三国で用いられる安価なアッセイは、標準的なツベルクリン皮膚試験である。それはエム・ツベルクローシス感染個体をエム・ボビス(*M. bovis*)BCGのワクチン接種個体と区別できず、そのためにエム・ツベルクローシスに関連した細菌株でのワクチン接種(BCGワクチン接種)を受けるか、又は子供時代に受けた地域世界で使用できないため、感染の検出において少しも理想的ではない。

#### 【0007】

##### 発明の要約

最も広い観点において、この発明は、esat-6遺伝子ファミリーのメンバーによってエンコードされるアミノ酸配列からなるか、又はesat-6遺伝子ファミリーのメンバーによってエンコードされるポリペプチドフラグメントと少なくとも70%の配列同一性を有し、同時にesat-6遺伝子ファミリーのメンバーによってエンコードされるポリペプチドフラグメントに免疫学的に等価なアミノ酸類似体からなる、実質的に純粋なポリペプチドフラグメントに関する。esat-6遺伝子ファミリ

一のメンバーは、小さなタンパク質をエンコードする遺伝子として定義され、2つのかかる遺伝子はゲノム上で互いに隣合って配置され、遺伝子産物の少なくとも1つはRv3874、Rv3875又はRv0288のいずれかと少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を有する。現在、以下の遺伝子がesat-6遺伝子ファミリーのメンバーである：Rv0287、Rv0288、Rv1036c、Rv1037c、Rv1038c、Rv1197、Rv1198、Rv1792、Rv1793、Rv2346c、Rv2347c、Rv2348c、Rv2653c、Rv2654c、Rv3019c、Rv3020c、Rv3444c、Rv3445c、Rv3619c、Rv3620c、Rv3874、Rv3875、Rv3890c、Rv3891c、Rv3904c及びRv3905c。

これらのタンパク質は、マクロファージ食胞の細胞内環境に関連し得る重要なマイコバクテリアの特異的な機能を有している。さらに、それらは、実施例1、3a及び3bに記載するように、高い免疫学的効力を示す。したがって、それらは、TBに対するワクチン又はTB用の診断調製物の有用な候補として提案される。これらのタンパク質をエンコードする遺伝子は、TBに対するDNAワクチンの成分として提案される。

#### 【0008】

##### 発明の詳細な開示

この明細書及び請求の範囲において、用語「ポリペプチドフラグメント」又はその変形は、少なくとも2アミノ酸残基、多くて10アミノ酸残基の短いペプチド、オリゴペプチド(11~100アミノ酸残基)及びより長いペプチドを意味する。ポリペプチドフラグメントは、グリコシル化により、脂質化により、あるいは置換基からなることにより化学的に修飾されていてもよい。

この明細書において、用語「実質的に純粋なポリペプチドフラグメント」は、自然に結合する他のポリペプチド物質を多くて5重量%含むポリペプチド調製物を意味する(他のポリペプチド物質についてはより低い%、例えば多くて4%、多くて3%、多くて2%、多くて1%及び多くて1/2%が好ましい)。実質的に純粋なポリペプチドは、少なくとも96%純粋、つまりポリペプチドが調製物中の全ポリペプチド物質の少なくとも96重量%を構成することが好ましい。%は高い方が好ましく、例えば少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99,25%、少なくとも99,5%及び少なくとも99,75%である。ポリペプチドフラグ

メントは「本質的に純粋な形態」、つまりポリペプチドフラグメントが自然に結合するいずれかの他の抗原、つまり結核複合体に属する細菌由来のいずれかの他の抗原を本質的に有しないことが好ましい。これは、後述する非マイコバクテリア宿主細胞における組換え手段によりポリペプチドフラグメントを調製することによって、又は固相もしくは液相ペプチド合成の周知方法、例えばMerrifieldにより記載される方法あるいはその変形でポリペプチドフラグメントを合成することによって、行うことができる。

#### 【0009】

「結核複合体」はその通常の意味を有する。つまり、TBを引起すマイコバクテリア複合体には、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコバクテリウム・ボビス、マイコバクテリウム・ボビスBCG及びマイコバクテリウム・アフリカヌム(*Mycobacterium africanum*)がある。

用語「毒性マイコバクテリア」によれば、ヒトを含む哺乳動物で結核疾患を引起し得る細菌と理解される。毒性マイコバクテリアの例は、エム・ツベルクローシス、エム・アフリカヌム及びエム・ボビスである。

用語「TB患者」によれば、毒性マイコバクテリアでの感染が培養又は顕微鏡学的に明らかにされた個体、及び/又はTBと臨床的に診断された個体及び抗-TB化学療法に感受性の個体と理解される。TBの培養、顕微鏡及び臨床的な診断は、当業者に周知である。

用語「PPD陽性個体」によれば、マンロー試験が陽性の個体又はPPDが末梢血液単核細胞(PBMC)もしくは血液全体からの少なくとも1,000pg/mlのINF- $\gamma$ の放出によって測定される回収反応(recall reaction)のインビトロでの増加を誘発する個体と理解される。誘発は、約 $1.0 \sim 2.5 \times 10^5$  PBMCからなる懸濁液に2.5~5  $\mu$ gのPPD/mlを加えて行われる。INF- $\gamma$ の放出は、懸濁液にPPDを添加してから5日後に回収される上清中のINF- $\gamma$ を、PPDを加えないINF- $\gamma$ の放出と比較した測定によって評価される。

#### 【0010】

用語「遅延型過敏反応」によれば、ポリペプチドの注射後又は皮膚への塗布後に誘発されるT-細胞介在性炎症反応が理解される。この炎症反応は、ポリペプチ

ドの注射又は塗布から72～96時間後に現れる。

用語「IFN- $\gamma$ 」によれば、インターフェロン-ガンマが理解される。

この明細書をとおして特記しない限り、用語「包含する」、又は「含む」もしくは「からなる」のようなその変形は、記述した要素又は完全体又は要素もしくは完全体の群の包括を意味するが、いずれかの他の要素又は完全体又は要素もしくは完全体の群を排除するものではないものと理解されるであろう。

#### 【0011】

用語「配列同一性」は、同じ長さの2つのアミノ酸配列間又は同じ長さの2つのヌクレオチド配列間のホモロジーの程度の定量的な測定を示す。比較される2つの配列が等しい長さではない場合、可能な限り最も良く適合するように配列を配置しなければならない。配列同一性は、

#### 【数1】

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

[ $N_{dif}$  は、配置した際の2つの配列における非同一残基の全数であり、 $N_{ref}$  は配列の1つにおける残基数である]として算出できる。つまり、DNA配列AGTCAGTCは、配列 AATCAATC ( $N_{dif}=2$  及び  $N_{ref}=8$ )と75%の同一性を有するであろう。ギャップは、非同一の特定残基として計測し、つまりDNA配列AGTGTCは、DNA配列AGTCAGTC ( $N_{dif}=2$  及び  $N_{ref}=8$ )と75%の配列同一性を有するであろう。配列同一性は、あるいは、BLASTプログラム、例えばBLASTPプログラム(Pearson W.R及びD.J. Lipman (1988) PNAS USA 85:2444-2448) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST))により算出することができる。発明の1つの観点において、アライメントは、[http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) で入手可能なX. Huang 及びW. Millerら(Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357)によって記載されるデフォルトパラメータで世界的なアラインアルゴリズムを用いて行われる。

#### 【0012】

配列同一性について最も好ましい最少%は、少なくとも80%、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくと

も98%、少なくとも99%及び少なくとも99.5%である。

ここに示されるエム・ツベルクローシス抗原は、ここに具体的に示される1以上のDNA配列に実質的に相同のDNA配列でエンコードされる変異型を含む。ここで用いられる配列同一性は、適度なストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNA配列を意味する。適切で適度なストリンジェントな条件には、5X SSC、0.5% SDS、1.0 mM EDTA (pH 8.0)溶液での予備洗浄；50~60 で、5X SSC一晩、又は交差種のホモロジーの場合には、45 、0.5XSSCでのハイブリダイズ；次いで、0.1% SDS 含有の2X、0.5X 及び 0.2X SSCそれぞれでの 65 で 20分の2回の洗浄が含まれる。このようなハイブリダイズ化DNA配列も、ハイブリダイズ化DNA配列によってエンコードされる免疫原性ポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列のように、コード縮重により、この発明の範囲内である。

#### 【0013】

このように、各ポリペプチドフラグメントは、特定のアミノ酸及び核酸配列によって特徴づけることができる。このような配列には、かかる核酸及びポリペプチド配列が核酸配列における1以上のヌクレオチドの置換、挿入、付加及び/又は欠失によって修飾され、組換えポリペプチドに1以上のアミノ酸残基の置換、挿入、付加又は欠失を引起す組換え法によって産生される類似体及び変異型が含まれるものと理解されるであろう。

用語ヌクレオチドを以下に用いる際、幾つかの目的には、それはDNA、RNA、PNA 又は LNAとして同じく理解され得る。しかし、当業者が理解するように、明らかな制限が課される。PNA又はLNAは、DNAの代わりに用いることができる。PNAは、極めて動的なハイブリダイゼーションプロファイルを示すことが分かっている (PNAはNielsen P Eら、1991, Science 254: 1497-1500に記載)。LNA (Locked Nucleic Acids)は、ビスクロヌクレオシドモノマーを含む、最近導入されたオリゴヌクレオチド類似体である (Koshkinら、1998, 54, 3607-3630; Nielsen, N.K.ら、J. Am. Chem. Soc 1998, 120, 5458-5463)。

#### 【0014】

esat-6遺伝子ファミリーは、以下の基準a)~c)を満たす遺伝子からなる：

a) 小さなタンパク質をコードする遺伝子；

- b) ゲノム上で互いに隣合って配置している少なくとも2つのかかる遺伝子；
- c) 基準b)の遺伝子産物の少なくとも1つは、Rv3874 (SEQ ID NO: 1)、Rv3875 (SEQ ID NO: 2)又はRv0288 (SEQ ID NO: 3)のいずれかと少なくとも15%のアミノ酸配列同一性を有する。

esat-6 ファミリーに関する共通特性の1つは、遺伝子のタンパク質生成物の大きさが小さいことである。これに関し、小さいタンパク質は約80アミノ酸、例えば約90アミノ酸、約100アミノ酸、約110アミノ酸、約120アミノ酸、約130アミノ酸、約140アミノ酸又は約150アミノ酸である。

これらのタンパク質は重要なマイコバクテリアの特異的な機能を有しており、その機能がマクロファージ食胞の細胞内環境に関連し、これらの分子の発現が細胞内成長中の特定の感染段階で同時にアップレギュレートされ得ることを示唆している。このアップレギュレーションは、このタンパク質ファミリーの高い抗原性を説明できる可能性がある。基準c)のアミノ酸配列同一性は15%以上、例えば20%以上、例えば25%、30%以上又は35%以上ですらあることが好ましい。

#### 【0015】

現在、以下の遺伝子が上記の基準a)～c)を満たし、この結果esat-6遺伝子ファミリーメンバーが同定されている(表1参照)：

Rv0287、Rv0288 (TB10.4)、Rv1036c、Rv1037c、Rv1038c、Rv1197、Rv1198、Rv1792、Rv1793、Rv2346c、Rv2347c、Rv2348c、Rv2653c、Rv2654c、Rv3019c、Rv3020c、Rv3444c、Rv3445c、Rv3619c、Rv3620c、Rv3874 (CFP10)、Rv3875 (ESAT-6)、Rv3890c、Rv3891c、Rv3904c及びRv3905c。

実施例1に開示されるように、CFP10、ESAT-6及びTB10.4 (以前はCFP7と命名)は、精製組換え抗原をヒトTB患者由来PBMCの刺激に用いる際に、極めて良好なIFN- $\gamma$ インデューサーである。このような(後述の基準 d) ii)に記載されるような)作用は、このタンパク質がワクチン又は診断組成物の成分としてさらに開発されるべきであるかどうかを決定する前の、重要な最初の試験である。

興味深いことに、組み換え体Rv1793及びこのタンパク質及びRv0287(ともにesat-6遺伝子ファミリーのメンバーである)から誘導される合成ペプチドは、2人のPPD-陽性ドナー由来のPBMCにおいてT-細胞増殖及びIFN- $\gamma$ 産生を刺激した (W098

/53075 及びW098/53076)。

【0016】

この発明の1つの具体例で、esat-6 ファミリーメンバーのタンパク質生成物は、さらに基準 d)を満たすべきである：

d) 少なくとも1つの後述する性質が、陽性であるべきである：

i) それは、 $5 \times 10^4$  個の毒性マイコバクテリアで感染させてから28日後のマウスから回収したT-リンパ球からの少なくとも1,500 pg/mlのIFN- $\gamma$  の放出によって測定される毒性マイコバクテリアでの一次感染中にインビトロの反応を誘発する。誘発は、脾臓から単離した約 $2 \times 10^5$ 個の細胞からなる懸濁液にポリペプチドを加えて行われる。ポリペプチドを加えた結果、濃度は20  $\mu$ g/懸濁液ml未満となり、IFN- $\gamma$  の放出は、懸濁液にポリペプチドを加えてから3日後に回収した上清中のIFN- $\gamma$  の測定により評価できる。

ii) それは、診断から0~6ヶ月後のTB患者、又はPPD陽性個体から回収した末梢血液単核細胞(PBMC)又は全血液から少なくとも500 pg/ml、好ましくは 1,000 pg/mlのIFN- $\gamma$  の放出により測定される回収反応をインビトロで誘発する。誘発は、約 $1.0 \sim 2.5 \times 10^5$ 個のPBMC又は全血液細胞からなる懸濁液に、ポリペプチドを加えて行われる。ポリペプチドを加えた結果、濃度は20  $\mu$ g/懸濁液ml未満となり、IFN- $\gamma$  の放出は、懸濁液にポリペプチドを加えてから5日後に回収した上清中のIFN- $\gamma$  の測定により評価できる。

【0017】

iii) それは、血清がPBSで1:20に希釈され、高くて20  $\mu$ g/mlの濃度でポリペプチドとインキュベートされる際に、ELISA技術又はウエスタンブロットによって測定されるようなTB患者で特異的な抗体反応を誘発し、ELISAで少なくとも0.1のOD又はウエスタンブロットで視覚確認できる反応を誘発する。

iv) それは、臨床的に又は半臨床的(subclinically)に毒性マイコバクテリア感染した個体から回収した末梢血液単核細胞(PBMC)からの少なくとも500pg/mlのIFN- $\gamma$  放出によって測定される陽性のインビトロ反応を誘発する。誘発は、約 $1.0 \sim 2.5 \times 10^5$ 個のPBMCからなる懸濁液に、ポリペプチドを加えて行われる。ポリペプチドを加えた結果、濃度は20  $\mu$ g/懸濁液ml未満となり、IFN- $\gamma$  の放出は、懸

濁液にポリペプチドを加えてから5日後に回収した上清中のIFN- $\gamma$ の測定により評価できる。毒性マイコバクテリアに感染していない個体では、このようなIFN- $\gamma$ の放出を誘発しないことが好ましい。

v) それは、PPD陽性個体から生じるT細胞系からの少なくとも500pg/mlのIFN- $\gamma$ の放出によって測定される陽性のインビトロ反応を誘発する。誘発は、 $1 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mlからなる懸濁液に、ポリペプチドを加えて行われる。ポリペプチドを加えた結果、濃度は20  $\mu$ g/ml未満となり、IFN- $\gamma$ の放出は、懸濁液にポリペプチドを加えてから3~5日後に回収した上清中のIFN- $\gamma$ の測定により評価できる。

【0018】

vi) それは、PPD陽性個体から生じるT細胞系からの少なくとも5の刺激指数(SI)のT-細胞増殖によって測定される陽性のインビトロ反応を誘発する(SI、抗原存在下における分当たりの平均数/無抗原の分当たりの平均数として算出)。誘発は、 $1 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mlからなる懸濁液に、ポリペプチドを加えて行われる。ポリペプチドを加えた結果、濃度は20  $\mu$ g/ml未満となり、IFN- $\gamma$ の放出は、懸濁液にポリペプチドを加えてから3~5日後に回収した上清中のIFN- $\gamma$ の測定により評価できる。

vii) それは、臨床的に又は半臨床的に毒性マイコバクテリア感染した個体に、高くて100  $\mu$ gのポリペプチドの皮膚内注射又は局所塗布パッチで測定される陽性DTH反応を誘発する。陽性反応は、注射又は塗布から72~96時間後に少なくとも10mmの直径を有する。

viii) それは、臨床的に又は半臨床的に毒性マイコバクテリア感染した個体に、高くて100  $\mu$ gのポリペプチドの皮膚内注射又は局所塗布パッチで測定される陽性DTH反応を誘発する。陽性反応は、注射から72~96時間後に少なくとも5mmの直径を有する。毒性マイコバクテリアに明らかに感染した個体にかかる反応を誘発しないことが好ましい。

【0019】

i)に記載の性質は、再活性化した記憶T-リンパ球からのIFN- $\gamma$ の放出が2,000 pg/ml、例えば3,000 pg/mlの際にも、充足されるであろう。この発明の別の具体例で、ポリペプチドの免疫学的な作用は、ポリペプチドを加えず、有意な増加は

免疫学的に有効なポリペプチドを示す同様のアッセイからのIFN- $\gamma$ の放出で記載されるようなIFN- $\gamma$ 放出と比較して測定される。この発明の好ましい具体例で、ポリペプチドを加えた結果、濃度は20  $\mu$ g/懸濁液ml未満、例えば15  $\mu$ g、10  $\mu$ g、5  $\mu$ g、3  $\mu$ g、2  $\mu$ g又は1  $\mu$ gポリペプチド/懸濁液mlとなる。

性質i)についてのマウス系統の1つの例は、動物モデルとしてのC57Bl/6jである。当業者に公知であるように、種々の系統が、遺伝学的変化により同じポリペプチドに対する強度を変えて免疫応答と反応しうる。どのマウス系統がどのヒト群で免疫原性反応性の最も良好な予想を生じるかは、現在知られていない。したがって、他のマウス系統、例えばC3H/HeN、CBA (好ましくはCBA/J)、DBA (好ましくはDBA/2J)、A/J、AKR/N、DBA/1J、FVB/N、SJL/N、129/SvJ、C3H/HeJ-Lps又はBALBマウス (好ましくはBALB/cA、BALB/cJ)を試験することが重要である。現在、モルモットモデルやラットモデルのような別の動物モデルで行われる同様の試験が臨床上、予想されることも考えられている。ヒトに対する臨床上の予想を良好に得るためには、いずれかの家畜動物のモデル、例えばウシモデル、ブタモデル、シカモデル、又はいずれかの霊長類モデルが臨床上の予想を与え、この結果動物モデルとして役立つと考えられる。

#### 【0020】

さらに、結核疾患は、幾つかの異なる動物種、例えば牛、霊長類、モルモット、アナグマ、オポッサム及びシカなどにも影響を及ぼしていることに留意すべきである。上述のいずれかのモデルにおいて有効であることが分かっているポリペプチドは、たとえヒトに有効でなくても、動物の治療に重要である可能性がある。

毒性マイコバクテリアに感染してから28日以内のマウスから回収した再活性化Tリンパ球からのIFN- $\gamma$ の放出を測定することが提案される。これは、免疫宿主が保護免疫反応を高める際に、感染マクロファージの初期認識の原因となる特定のT-細胞がIFN- $\gamma$ の産生をとおして強力な殺菌活性を刺激するとの事実起因している(Rook, G.A.W. 1990., Flesch, I.ら、1987)。しかし、他のサイトカインは、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-6、TGF- $\beta$ のように、ポリペプチドに対する免疫応答をモニターする際に関連している可能性がある。通常、1以上

のサイトカインは例えばPCR技術又はELISAを利用して測定されるであろう。特定のポリペプチドによって誘発されるこれらのサイトカインのいずれかの量の有意な増加又は減少がポリペプチドの免疫効力の評価に使用できることは、当業者に高く評価されるであろう。IFN- $\gamma$  をコードする遺伝子が崩壊しているマウスはマイコバクテリア感染を制御できず、広範囲な播種、チーズ様の壊死及び大きなアブセス(abcesse)を伴って極めて迅速に死ぬので、IFN- $\gamma$  反応を誘発するポリペプチドの能力は、保護免疫と最も関連した相関現象であると現在は考えられている(Flynnら、(1993) J.Exp.Med 178: 2249-2254, Cooperら、(1993) J.Exp.Med. 178:2243-2248)。記憶モデルにおける保護免疫の抗原標的に関する情報を得るための特定モデルはLefford (Leffordら(1973) Immunology 25:703) によって最初に開発され、最近の数年に広範囲に使用されている(Orme ら、(1988). Infect .Immun. 140:3589, P.Andersenら、(1995) J.Immunol.154: 3359)。

#### 【 0 0 2 1 】

ii)に記載される性質も、PBMCからのIFN- $\gamma$  の放出が診断から6ヶ月以上、例えば診断から9ヶ月、1年、2年、5年又は10年経つTB患者又はPPD陽性個体から回収したPBMCで測定される際には、満たされるであろう。

IFN- $\gamma$  、ポリペプチド濃度及び他のサイトカインの有意な増加に関する性質 i)についてのコメントは、性質ii)に等しく関連している。

iii)に記載される性質は、特にELISAが以下のように行われるならば、満たされるであろう：1~10  $\mu$ g/ml濃度の興味あるポリペプチドを、96ウェルのポリスチレンプレート(NUNC, Denmark)に被覆し、0.37 M NaCl及び0.5% Tween-20を含有するリン酸緩衝液pH 7.3での洗浄工程の後、TB患者由来の血清又は血漿を、1% Tween-20を有するPBSで1:10~1:1000に希釈する。ポリペプチドに対する抗体結合は、標識(例えばペルオキシダーゼ標識)した第二抗体を加えて測定し、その後、製造者(DAKO, Denmark)によって記載されるように、OPD 及びH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いて反応を可視化する。各ウェルのOD値は、適当なELISAリーダーを用いて測定する。

好ましい具体例では、ウエスタンブロットは以下のように行われる：1~40  $\mu$ g濃度のポリペプチドをSDS-PAGEに用い、電気泳動後、ポリペプチドを膜、例えばニトロセルロース又はPVDFに移す。その後、0.37 M NaCl 及び0.5% Tween-20を

含むリン酸緩衝液pH 7.3で膜を30分洗浄する。1人以上のTB患者から得た血清を、0.37 M NaClを含むリン酸緩衝液pH 7.3で1:10~1:1000に希釈する。

その後、結合緩衝液で4回5分膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ又はホスファターゼ標識した第二抗体でインキュベートする。次いで、製造者(DAKO, Denmark)によって推奨される染色方法を用いて反応を可視化する。

#### 【0022】

ポリペプチドが毒性マイコバクテリウムに感染していない個体、つまりBCGワクチン接種を受けたか、又はマイコバクテリウム・アビウム(*Mycobacterium avium*)に感染しているかもしくは非結核のマイコバクテリウムで感作された個体、又は毒性マイコバクテリウムに感染していない個体、つまり毒性マイコバクテリウムで進行中の感染が、陽性の培養物、顕微鏡上又は臨床上、全く明らかにされていない個体でかかるIFN- $\gamma$ 放出を誘発しない場合には、iv)に記載される性質も特に満たされるであろう。IFN- $\gamma$ の有意な増加、ポリペプチド濃度及び他のサイトカインに関する性質i)についてのコメントは、性質iv)に等しく関連しているであろう。

ポリペプチドが毒性マイコバクテリウムに感染していない個体、つまりBCGワクチン接種しているか、又はマイコバクテリウム・アビウムに感染もしくは非結核のマイコバクテリウムに感作している個体でかかる反応を誘発しない場合には、vii)に記載される性質が特に満たされるであろう。好ましい具体例において、皮膚内に注射されるか、又は塗布されるポリペプチド量は90  $\mu$ g、例えば 80  $\mu$ g、70  $\mu$ g、60  $\mu$ g、50  $\mu$ g、40  $\mu$ g又は30  $\mu$ gである。この発明の別の具体例で、陽性反応の直径は少なくとも6 mm、例えば7 mm、8 mm、9 mm又は10 mmである。好ましい具体例で、硬化又は紅斑又はその双方は、皮膚内注射、パッチ試験又は多重穿刺によるポリペプチドの投与後に測定できる。反応直径は、48時間以上後、例えば72又は96時間後に陽性であり得る。

#### 【0023】

ポリペプチドが、毒性マイコバクテリアに感染していない、つまり毒性マイコバクテリウムで進行中の感染が、陽性の培養物又は顕微鏡上、全く明らかにされていない個体でかかる反応を誘発しない場合には、viii)に記載の性質が特に満

たされるであろう。皮膚内に注射されるかもしくは塗布されるポリペプチド量及び陽性反応の直径に関する性質vii)についてのコメントは、性質viii)に等しく関連している。

この発明の1つの観点は、esat-6遺伝子ファミリーのメンバーによってエンコードされるアミノ酸配列からなる実質的に純粋なポリペプチドフラグメントと少なくとも70%の配列同一性を有し、同時に該ポリペプチドフラグメントに免疫学的に等価であり、但しRv0287、Rv0288、Rv1037c、Rv1038c、Rv1197、Rv1198、Rv1792、Rv1793、Rv2346c、Rv2347c、Rv3019c、Rv3619c、Rv3620c、Rv3874及びRv3875からなる群からは選択されない、上記の実質的に純粋なポリペプチドフラグメントに関する。

この明細書において、2つのポリペプチドフラグメントは、性質i)、性質ii)、性質iii)、性質iv)、性質v)、性質vi)、性質vii)又は性質viii)を満たすならば、免疫学的に等価である。

【0024】

【表1】

esat-6 遺伝子ファミリーの仮のメンバーリスト。隣合う遺伝子でコードされるタンパク質は、行間とともに挙げている(例えば Rv1036c, Rv1037c 及び Rv1038c)。TB10.4、CFP10 及び ESAT-6 に対する同一性の%は、それぞれ上記基準 c) の定義に用いた LALIGN アルゴリズムにしたがって算出した。SEQ ID NO は、表 2 (ヌクレオチド配列) 及び表 3 (タンパク質配列) に示す。

タンパク質	大きさ (アミノ酸数)	他の名称	CFP10 (SEQ ID NO: 1), ESAT-6 (SEQ ID NO: 2), 又は TB10.4 (SEQ ID NO: 3) に対するアミノ酸配列同一性の%
Rv0287	97		18.6 % (TB10.4), 31.0 % (CFP10), 16.5 % (ESAT-6)
Rv0288	96	TB10.4 (以前の名称 CFP7)	18.0 % (CFP10), 21.9 % (ESAT-6)
Rv1036c	100		15.0 % (TB10.4), 31.0 % (CFP10), 15.0 % (ESAT-6)
Rv1037c	94		18.8 % (TB10.4), 14.0 % (CFP10), 22.1 % (ESAT-6)
Rv1038c	98		21.4 % (TB10.4), 18.6 % (CFP10), 9.2 % (ESAT-6)
Rv1197	98		22.4 % (TB10.4), 20.6 % (CFP10), 9.2 % (ESAT-6)
Rv1198	94		18.8 % (TB10.4), 13.0 % (CFP10), 21.1 % (ESAT-6)
Rv1792	98		20.4 % (TB10.4), 19.6 % (CFP10), 11.2 % (ESAT-6)
Rv1793	94		18.0 % (TB10.4), 12.0 % (CFP10), 21.2 % (ESAT-6)
Rv2346c	94		19.8 % (TB10.4), 13.0 % (CFP10), 20 % (ESAT-6)
Rv2347c	98		21.4 % (TB10.4), 18.6 % (CFP10), 10.2 % (ESAT-6)
Rv2348c	108		14.8 % (TB10.4), 13.0 % (CFP10), 13 % (ESAT-6)
Rv2653c	107		18.3 % (TB10.4), 16.5 % (CFP10), 16.7 % (ESAT-6)
Rv2654c	81		21.0 % (TB10.4), 16.0 % (CFP10), 20.0 % (ESAT-6)
Rv3019c	96		84.4 % (TB10.4), 17.0 % (CFP10), 24.0 % (ESAT-6)
Rv3020c	97		17.5 % (TB10.4), 31 % (CFP10), 15.5 % (ESAT-6)
Rv3444c	100		20 % (TB10.4), 15.2 % (CFP10), 22.0 % (ESAT-6)
Rv3445c	125		15.2 % (TB10.4), 12.8 % (CFP10), 15.1 % (ESAT-6)
Rv3619c	94		18.8 % (TB10.4), 14.0 % (CFP10), 22.1 % (ESAT-6)
Rv3620c	98		21.4 % (TB10.4), 19.6 % (CFP10), 10.2 % (ESAT-6)
Rv3874	100	CFP10	18.0 % (TB10.4), 15.0 % (ESAT-6)
Rv3875	95	ESAT-6	21.9 % (TB10.4), 15.0 % (CFP10)
Rv3890c	95		25.8 % (TB10.4), 18.6 % (CFP10), 15.6 % (ESAT-6)
Rv3891c	107		23.4 % (TB10.4), 16.2 % (CFP10), 16.8 % (ESAT-6)
Rv3904c	90		23.2 % (TB10.4), 19.8 % (CFP10), 18.9 % (ESAT-6)
Rv3905c	103		22.3 % (TB10.4), 21.4 % (CFP10), 18.4 % (ESAT-6)

### 【 0 0 2 5 】

免疫診断及びワクチン調製の双方において、既知の免疫原性タンパク質又はポリペプチドのセグメントから抗原を調製することはしばしば可能かつ実際的なことである。あるエピトープ領域は、完全な抗原性ポリペプチドによって産生され

るものと同様の反応を生じるのに用いることができる。

免疫反応中に認識される関連T-細胞エピトープを同定するために、「ブルート・フォース (brute force)」法を使用することもできる:T-細胞エピトープは直線状であるので、SEQ ID NOs: 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31を有するポリペプチドの欠失変異体は、組織的に構築される場合には、例えばこれらの欠失変異体をここに記載されるIFN- $\gamma$ アッセイに付すことによって、免疫認識に必須なポリペプチドの領域を示すであろう。別の方法は、SEQ ID NOs: 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31を有するポリペプチド由来のオリゴペプチド(好ましくは約20アミノ酸残基長の合成物)の重複を利用する。これらの幾つかはIFN- $\gamma$ アッセイで陽性の反応を生ずるであろうが、他のものは生じないであろう。

#### 【0026】

この発明の好ましい具体例で、この発明のポリペプチドフラグメントは、B-細胞又はT-細胞のエピトープからなる。

T-細胞エピトープの最短長は少なくとも6アミノ酸であることが分かっているが、このようなエピトープはより長いアミノ酸のストレッチからなることが普通である。つまり、この発明のポリペプチドフラグメントは、少なくとも7アミノ酸残基長、例えば少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも22、少なくとも24及び少なくとも30のアミノ酸残基長を有することが好ましい。

1つの好ましい具体例で、この発明のポリペプチドフラグメントは、いずれのシグナル配列も有しない;これは、ポリペプチドフラグメントが合成で調製される際に特に興味深い;ポリペプチドフラグメントが組換えで調製される場合ですら、それらが宿主細胞により周辺細胞質又は細胞外空間に輸送されないことが通常容認される;ポリペプチドフラグメントは、宿主細胞の崩壊後に細胞質から従来の方法(後述参照)で回収することができ、ポリペプチドフラグメントの再生(refolding)が必要な際には、全体的な再生スキームを用いることができる(例えば、このような全体的な再生法が記載されるWO 94/18227の開示参照)。

#### 【0027】

融合ポリペプチドを産生することにより、この発明のポリペプチドフラグメントの優れた特性が得られる。例えば、組換えによって産生された場合にポリペプチドの輸出を助ける融合パートナー、ポリペプチドの精製を助ける融合パートナー及びこの発明のポリペプチドフラグメントの免疫原性を高める融合パートナーが、興味ある可能性の全てである。従って、この発明はまた、上記の少なくとも1個のポリペプチドフラグメントと少なくとも1個の融合パートナーを含む融合ポリペプチドに関する。免疫原性を高めるためには、融合パートナーは、例えば、上記の(関連エピトープの多重発現を可能にする)別のポリペプチドフラグメント、及び、ESAT-6、TB10.4、CFP10、FP17、CFP21、CFP25、CFP29、MPB59、MPT59、MPB64及びMPT64又はこれらの抗原のいずれかの少なくとも1つのT-細胞エピトープのような結核複合体に属する細菌由来の別のポリペプチドからなる群から選択することができる。融合パートナーとして役立つ免疫原性を高める他のポリペプチドは、T細胞エピトープ(例えばポリペプチドESAT-6、MPB64、MPT64又はMPB59から誘導されたT細胞エピトープ)、又は、標的遺伝子産物の免疫原性を高める免疫原性エピトープ、例えばIFN- $\gamma$ 、IL-2及びIL-12のようなリンホカインである。発現及び/又は精製を容易にするためには、融合パートナーは、例えば、細菌の線毛タンパク質、例えば毛成分pilin及びpapA; タンパク質 A; ZZ-ペプチド (ZZ-融合体はスウェーデンの Pharmaciaにより市販); マルトース結合タンパク質; グルタチオン S-トランスフェラーゼ;  $\beta$ -ガラクトシダーゼ; 又はポリ-ヒスチジンであってもよい。

#### 【0028】

他の興味ある融合パートナーは、脂質化され、免疫原性ポリペプチドが免疫系に適切な方法で提示されるようにするポリペプチドである。この作用は、例えば、ポリペプチド中の脂質化された膜アンカーが、これを産生する細胞から単離されているときに、自己-アジュバント作用を(天然に脂質化されている)ポリペプチドに付与するボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)OspA ポリペプチドベースのワクチンから知られている。反対に、OspA ポリペプチドは、脂質化アンカーなしに調製された場合には、免疫学的に比較的不活である。

#### 【0029】

この発明の別の部分は、単離形態の核酸フラグメントに関する。この核酸フラグメントは、

- 1) esat-6 遺伝子ファミリーのメンバーである核酸配列からなり、及び/又は
- 2) 少なくとも10ヌクレオチド長を有し、かつ、ストリンジентなハイブリッド形成条件（当該分野で定義される条件、すなわち、融点 $T_m$  下の5~10、Sambrookら、1989年、11.4~11.49頁参照）下で、1)の核酸フラグメントと容易にハイブリッド形成し、及び/又は
- 3) 少なくとも10ヌクレオチド長を有し、かつストリンジентなハイブリッド形成条件（当該技術分野で定義されている条件、すなわち、融点 $T_m$  下の5~10、Sambrookら、1989年、11.45~11.49頁参照）下で、

SEQ SEQ ID NO: 6 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 12 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 14 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 16 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 18 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 20 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 22 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 24 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 26 又はこれに相補的な配列、

SEQ ID NO: 28 又はこれに相補的な配列、又は

SEQ ID NO: 30 又はこれに相補的な配列

から選択されるヌクレオチド配列を有する核酸フラグメントと容易にハイブリッド形成する。

#### 【0030】

核酸フラグメントは、DNAフラグメントであるのが好ましい。

この発明による利点を確実にするためには、ハイブリッド形成研究又はアッセイに用いられる場合の好ましい核酸配列には、選択された配列の少なくとも10~40程度のヌクレオチドのストレッチに相補的な配列が含まれる。少なくとも10ヌ

クレオチド長の大きさは、フラグメントが、安定かつ選択的な二重らせん分子を形成するのに十分な長さを確実に有するのを助ける。しかしながら、ハイブリッドの安定性と選択性を増し、それによって、得られる特異的なハイブリッド分子の質と程度を向上させるためには、10塩基長より大きいストレッチにわたって相補配列を有する分子が一般的には好ましい。

#### 【0031】

従って、用語「サブ配列」は、この発明の核酸フラグメントに関して用いられる場合、上記ハイブリッド形成パターンを示す少なくとも10ヌクレオチドの連続ストレッチを示すことを意図する。通常、これは、SEQ ID NO: 6、12、14、16、18、20、22、24、26、28 又は30を有するハイブリッド形成パートナーのサブ配列と少なくとも70%の最小配列同一性を要するであろう。核酸フラグメントは、10ヌクレオチドよりも長く、例えば少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70及び少なくとも80のヌクレオチド長であることが好ましく、また配列同一性は好ましくは70%よりも高く、例えば少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%及び少なくとも98%であるべきである。配列同一性は100%であることが、最も好ましい。こうしたフラグメントは、例えば米国特許第4,603,102号のPCR技術のような核酸再生技術の適用による、化学的手段でフラグメントを直接合成することによって、又は組換え産生用の組換えベクターに選択した配列を導入することによって、容易に調製することができる。

#### 【0032】

同一アミノ酸が種々のコドンによりエンコードされることがあり、特にコドンの用途が、ヌクレオチド配列を発現する当該生物の好みに関係していることは周知である。このように、この発明の核酸フラグメントの少なくとも1つのヌクレオチド又はコドンは他のものと交換され、発現した場合には、当該核酸フラグメントによりエンコードされたポリペプチドに同一又は実質的に同一なポリペプチドを生じる可能性がある。したがって、この発明では、1以上のヌクレオチドの

置換、挿入(イントロンを含む)、付加、欠失及び転移(rearrangement)のような配列変異が可能である。これらの変異は、核酸フラグメント又はそのサブ配列によりエンコードされたポリペプチドに実質的な作用を及ぼさない。用語「置換」は、全ヌクレオチド配列中の1以上のヌクレオチドの1以上の異なるヌクレオチドでの交換を意味することを意図する。「付加」は、全ヌクレオチド配列のいずれかの末端での1以上のヌクレオチドの追加を意味すると理解される。「挿入」は、全ヌクレオチド配列内での1以上のヌクレオチドの導入を意味することを意図する。「欠失」は、1以上のヌクレオチドが、全ヌクレオチド配列から、配列のいずれかの末端において又はその内部の適当な点において、欠失されることを示すことを意図する。「転移」は、2以上のヌクレオチド残基が、互いに交換されることを意味することを意図する。

#### 【0033】

修飾されるヌクレオチド配列は、上に説明したようにcDNA又はゲノム由来であってもよいが、合成由来であってもよい。さらに、配列は、上に説明したようにcDNAとゲノムとの混合、cDNAと合成又はゲノムと合成との混合であってもよい。配列は、例えば部位特異的突然変異誘発により修飾されて、所望のポリペプチドをエンコードする所望の核酸フラグメントを生じてもよい。ポリペプチドをエンコードする核酸の修飾に焦点を当てた以下の説明は、こうした可能性ならびに所望の核酸フラグメントを得るために2以上のDNAフラグメントの連結反応により核酸を構築する可能性及び上記原理の組合わせを包含するものと理解されるべきである。

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

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

#### 【0034】

ここに開示される抗原の変異型を調製する好ましい方法は、部位特異的突然変異誘発である。この技術は、基礎となる核酸の特異的突然変異誘発により抗原配

列から誘導される、個々のペプチド、又は生物学的機能が等しいタンパク質もしくはペプチドの調製に有用である。さらに、この技術により、1以上のヌクレオチド変形配列を核酸に導入することによって、例えば、上記に考慮した項目の1以上を導入して、配列変異体を容易に調製し、試験することができる。部位特異的突然変異誘発は、所望の突然変異のヌクレオチド配列をエンコードする特異的なオリゴヌクレオチド配列ならびに十分数の隣合ったヌクレオチドの使用により突然変異体を産生でき、検討されている欠失結合の両側に安定な二重らせんを形成するのに十分な大きさのプライマー配列と配列コンプレキシティーを生じる。代表的には、変更される配列の結合の両側に約5~10残基を持った約17~25ヌクレオチド長のプライマーが好ましい。

一般的に、この発明による部位特異的突然変異誘発は、まず、この発明のポリペプチドをエンコードする核酸配列をその配列内に含む一本鎖ベクターを得ることによって行われる。所望の突然変異配列を持ったオリゴヌクレオチドプライマーは、一般的には合成によって、例えばCreaら(1978)の方法により調製される。次いで、このプライマーを一本鎖ベクターとアニーリングし、大腸菌ポリメラーゼIクレノウフラグメントのようなDNA重合酵素に付し、突然変異を有する鎖の合成を完了する。こうして、1方の鎖が本来の、突然変異していない配列をエンコードし、第2の鎖が所望の突然変異を有するヘテロ二重らせんが形成される。次いで、このヘテロ二重らせんベクターを用いて大腸菌細胞のような適当な細胞を形質転換し、突然変異配列が配置されている組換えベクターを含むクローンを選択する。

#### 【0035】

この発明の選択された核酸フラグメントの配列変異体を、部位特異的突然変異誘発を用いて調製することは、潜在的に有用な遺伝子種を産生する手段として提供されるものであり、この発明の核酸フラグメントの配列変異体を得る方法は他にもあるので、限定的であることを意味しない。例えば、所望の遺伝子をエンコードする組換えベクターを突然変異誘発剤で処理して、ヒドロキシルアミンを用いるプラスミドDNAの突然変異誘発用の配列変異体(例えば、Eichenlaub, 1979に記載の方法を参照)を得ることができる。

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

ベクターは、組換えDNA手順に好都合に付されるベクターであればいかなるベクターであってもよく、ベクターの選択は、大抵の場合、これが導入される宿主細胞に依存している。従って、ベクターは、自律複製ベクター、即ち、その複製が染色体複製から独立した、染色体外的なものとして存在するベクターであってもよい。こうしたベクターの例は、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ染色体又はウィルスである。あるいは、ベクターは、宿主細胞に導入されたときに、宿主細胞ゲノム中に組み込まれ、これが組み込まれた染色体と共に複製されるベクターであってもよい。

#### 【0036】

発現ベクターは、ここに開示されるいずれのDNAセグメントも含むように構築されていてもよい。こうしたDNAは、毒性マイコバクテリア株に、又は試料中のマイコバクテリア核酸検出用のハイブリッド形成プローブにすら特異的な抗原性タンパク質をエンコードし得る。所望の抗原性タンパク質に応じて、長い又は短いDNAセグメントを用いることができる。開示されているDNAにより発現又はエンコードされるタンパク質のエピトープ領域が、比較的短いDNAセグメントとして含まれていてもよい。種々の発現ベクターが可能であり、これらの発現ベクターには、例えば、異種遺伝子産物の同定に有用な遺伝子リポーター遺伝子産物をエンコードするDNAセグメント及び/又は形質転換細胞の同定に有用であり得る抗生物質耐性遺伝子のような耐性遺伝子が含まれる。

#### 【0037】

この発明のベクターを用いて細胞を形質転換させ、この発明の核酸フラグメントを増殖させるか、又はこの発明のポリペプチドフラグメントを発現させることができる。従って、この発明は、この発明による少なくとも1個のこうしたベクターを有する形質転換細胞にも関する。かかる形質転換細胞(これもこの発明の一部である)は、いずれかの好適な細菌宿主細胞又は他のいずれかの細胞型、例えば単細胞真核生物、真菌又は酵母、又は多細胞生物、例えば動物もしくは植物

由来の細胞であってもよい。哺乳動物の細胞が用いられるのは、特にグリコシル化が望ましい場合においてであるが、タンパク質のグリコシル化は原核生物では稀な現象である。しかしながら、通常は、マイコバクテリウム、サルモネラ、シユードモナス、バシラス及びエシェリキア属に属する細菌のような原核細胞が好ましい。形質転換細胞は、大腸菌、枯草菌又はエム・ボビスBCG細胞が好ましく、特に形質転換細胞が、この発明によるポリペプチドを発現することが好ましい。後者は、単に形質転換細胞を含む培養物からの回収によって、この発明のポリペプチドを産生する可能性を拓くものである。この発明のこの部分の最も好ましい実施態様においては、形質転換細胞は、Copenhagen BCG Laboratory(Statens Serum Institut、デンマーク)からのマイコバクテリウム・ボビス株Copenhagenであるマイコバクテリウム・ボビスBCG株: Danish 1331である。

この発明の核酸フラグメントは、この発明のポリペプチドフラグメントの組み換え体を産生することができる。しかし、天然源からの単離も、ペプチド合成のように、ポリペプチドフラグメントを提供する手段である。

#### 【0038】

従って、この発明は、この発明のポリペプチドフラグメントの産生方法にも関する。この方法は、上記核酸フラグメントを、宿主細胞中で複製可能なベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入し(形質転換細胞は、分画ハイブリッド形成、融合レポーター遺伝子産物、抵抗マーカ、抗-抗原抗体等の同定によるスクリーニングを含む種々の技術を用いて選択できる)、この宿主細胞を、ポリペプチドの発現を行うのに十分な条件下、培養培地で培養し(当然、細胞は状況に適した条件下で培養でき、DNAが所望される場合には複製条件を用いる)、宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収するか; 又は、

結核複合体の全マイコバクテリアから、又はその溶解物又はフラクション、例えば細胞壁含有フラクションから、ポリペプチドを単離するか、又は固相又は液相のペプチド合成によってポリペプチドを合成することからなる。

形質転換細胞の成長に用いられる培地は、目的にかなった通常の培地であればいかなる培地であってもよい。好適なベクターは上記ベクターのいずれであってもよく、好適な宿主細胞は上記細胞型のいずれであってもよい。ベクターを構築

し、それを宿主細胞に導入するのに用いられる方法は、組換えDNA分野におけるこうした目的の場合に知られるいずれの方法であってもよい。以下に、可能性についてより詳細に説明する：

#### 【0039】

一般的には、当然、原核生物は、この発明の核酸配列の初期クローニング、及びこの発明に有用なベクターの構築に好ましい。例えば、後述のより詳細な開示に記載される特定の菌株に加えて、例として、大腸菌K12 株294 (ATCC No. 31446)、大腸菌B、及び大腸菌X 1776 (ATCC No. 31537)のような菌株が挙げられる。これらの例は、当然、例示的なものであり限定的なものではない。

原核生物は、発現にも好ましい。上記の菌株ならびに大腸菌W3110 (F<sup>-</sup>、<sup>-</sup>、野生株、ATCC No. 273325)、枯草菌のような桿菌、又はサルモネラ・ティフィムリムもしくはセラチア・マルセッセンスのような他の腸内細菌、及び種々の シュードモナス種を用いてもよい。特に興味あるものは、成長の早いマイコバクテリア、例えばエム・スメグマチスである。というのは、これらの細菌は、結核複合体のマイコバクテリアに高度に類似しており、従って、発現産物の翻訳後修飾を行う必要性を低減する良好な可能性を有するためである。この発明の1つの局面においては、この発明のポリペプチドをGRAS生物、例えばラクトコッカス(*Lactococcus*)において産生するのが好ましい。

#### 【0040】

一般的には、レプリコンを含み、かつ、宿主細胞に和合性を有する種由来の制御配列を含むプラスミドベクターが、これらの宿主に関係して用いられる。ベクターは、通常は複製部位ならびに形質転換細胞に表現型選択を提供し得るマーキング配列を有する。例えば、大腸菌は通常は、大腸菌種由来のプラスミド、pBR322を用いて形質転換される(例えばBolivarら、1977, Gene 2: 95参照)。pBR322 プラスミドは、アンピシリンとテトラサイクリンに対する耐性遺伝子を含み、従って、形質転換細胞を同定する容易な手段を提供する。また、pBR プラスミド、又は他の微生物プラスミド、又はファージは、微生物により使用されうる発現用のプロモーターを含むか、又は含むように修飾されなければならない。

組換えDNA構築に最も一般的に用いられるこれらのプロモーターには、B-ラク

タマーゼ(ペニシリナーゼ)及びラクトースプロモーター系(Changら、1978; Itakuraら、1977; Goeddelら、1979)、及びトリプトファン(trp)プロモーター系(Goeddelら、1979; EPO Appl. Publ. No. 0036776)が含まれる。これらは最も一般的に用いられるプロモーターであるが、他の微生物プロモーターも発見され利用されており、それらのヌクレオチド配列に関する詳細は公開されているので、当業者はそれらをプラスミドベクターと機能的に連結することができる(Siebwenlistら、1980)。原核生物由来の所定の遺伝子が、それらの自身のプロモーター配列から大腸菌で効率的に発現され、人工的手段により別のプロモーターを付加する必要性を排除するようにしてもよい。

#### 【0041】

この発明によるポリペプチドの組換え産生後、例えば、この発明によるポリペプチドに実質的に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィー(又はクロマトグラフィーベースの他の通常の生化学的手順)により、ポリペプチドの単離を行ってもよい。他の可能性は、Andersenら、J. Immunol. Methods 161: 29~39に記載の同時電気溶出技術を用いることである。

この発明によると、翻訳後修飾には、ポリペプチドの脂質化、グリコシル化、切断、又は伸長が含まれてもよい。

ある局面においては、この発明により提供されるDNA配列情報により、マイコバクテリアの遺伝子配列に特異的にハイブリッド形成することのできる比較的短いDNA(又はRNA、PNA、又はLNA)配列を調製することができる。これらの局面においては、適当な長さの核酸プローブが、関連配列を考慮して調製される。こうした核酸プローブがマイコバクテリアの遺伝子配列に特異的にハイブリッド形成することによって、核酸プローブは、種々の実施態様に特別な有用性をもたらしている。最も重要なことには、プローブは、所定の試料中の病原性生物の存在を検出するために、種々の診断的アッセイで用いることができる。しかしながら、変異体種プライマー、又は他の遺伝子構築物の調製に用いられるプライマーの調製に配列情報を使用することをはじめとする、いかなる使用も想定される。

#### 【0042】

この発明の核酸フラグメントは、この発明のポリペプチド合成及びハイブリッド形成プローブ(直接的なハイブリッド形成アッセイ、又は例えばPCRもしくは他の分子増幅法におけるプライマーとして有用)のための開始点として用いることとは別に、抗原のインビボ発現に用いてもよい。即ち、核酸フラグメントをいわゆるDNAワクチンに用いてもよい。最近の研究から、真核細胞において非複製的なベクターでクローンされたDNAフラグメントは、例えば筋肉内注射又は経皮投与(いわゆる"遺伝子銃"法)により動物(ヒトを含む)に導入され得ることが明らかにされている。DNAは、例えば筋肉細胞により吸収され、興味ある遺伝子が、真核生物において機能しているプロモーター、例えばウィルス性プロモーターにより発現され、その後、遺伝子産物が免疫系を刺激する。これらの新しく発見された方法は、引用によりここに組み込まれるUlmerら、1993において検討されている。

従って、この発明は、この発明による核酸フラグメントからなるワクチンにも関し、このワクチンは、これを投与したヒトを含む動物により、抗原をインビボで発現する。発現される抗原の量は、ヒトを含む動物における結核複合体のマイコバクテリア感染に対する耐性を実質的に増大するのに有効である。

#### 【0043】

こうした"DNA ワクチン"の効能は、発現産物をエンコードする遺伝子を、免疫応答調節能を有するポリペプチドをエンコードするDNAフラグメントと共に投与することにより高められる可能性がある。例えば、リンホカイン前駆体又はリンホカイン(例えばIFN- $\gamma$ 、IL-2又はIL-12)をエンコードする遺伝子は、2個の個々のDNAフラグメントを投与するか、同一ベクターに含まれる両方のDNAフラグメントを投与することにより、免疫原性タンパク質をエンコードする遺伝子と共に投与することができる。また、それぞれがここに開示されるポリペプチドの関連するエピトープをエンコードする多数のヌクレオチド配列からなるDNAフラグメントを投与し、それにより、これらのエピトープの幅広いスペクトルで免疫系の連続的感作を行うこともあり得る。

上記のとおり、この発明のポリペプチドフラグメントは、ワクチン成分、又は免疫診断剤中成分の優れた候補である。

従って、この発明の他の部分は、この発明によるポリペプチド又は融合ポリペプチドからなる免疫組成物に関する。こうした免疫組成物の最適な効能を確保するために、免疫組成物は、免疫学的及び医薬的に許容される担体、ビヒクル又はアジュバントからなることが好ましい。

#### 【0044】

適当な担体は、プラスチックのようなポリペプチドが疎水性非共有相互作用により結合しているポリマー、例えばポリスチレン、又は多糖、もしくはポリペプチドのようなポリペプチドが共有結合しているポリマー、例えばウシ血清アルブミン、オバルブミン、又はキーホールリンペットヘモシアニンからなる群から選択される。適当なビヒクルは、希釈液及び懸濁剤からなる群から選択される。アジュバントは、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDA)、 Quil A、ポリ I:C、フロイント不完全アジュバント、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12、モノホスホリルリピド A (MPL)、及びムラミルジペプチド (MDP) からなる群から選択されることが好ましい。

この発明による好ましい免疫組成物は、それぞれ異なるポリペプチドフラグメントがポリペプチドか又は上記融合ポリペプチドかである、少なくとも 2 個の異なるポリペプチドフラグメントからなる。免疫組成物は、2~20個、例えば3~20個の異なるポリペプチドフラグメント又は融合ポリペプチドからなることが好ましい。

こうした免疫組成物は、好ましくはワクチンの形態又は皮膚試験試薬の形態であってもよい。

#### 【0045】

上記にしたがって、この発明はそれ故に、この発明による免疫組成物の産生方法にも関する。この方法は、この発明によるポリペプチドを調製、合成又は単離し、ポリペプチドをワクチン用媒体に可溶化又は分散し、任意に他のエム・ツベルクローシス抗原及び/又は担体、ビヒクル及び/又はアジュバント物質を加えることからなる。

活性成分としてペプチド配列を含むワクチンの調製は、全て引用によりここに組み込まれる米国特許第 4,608,251号；第 4,601,903号；第4,599,231号及び第4

,599,230号により例示されているように、当該分野において一般的に十分に理解されている。代表的には、こうしたワクチンは、液体溶液又は懸濁液のいずれかとして注射可能物質として製造され、注射に先立って液体に溶解又は懸濁するのに適した固体の形態で製造されてもよい。調製品は、乳化されてもよい。活性な免疫原性成分は大抵の場合、医薬的に許容されかつ活性成分と相溶性を有する賦形剤と混合される。適当な賦形剤は例えば水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等及びそれらの組合わせである。加えて、ワクチンは、必要であれば、ワクチンの有効性を高める湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤、又はアジュバントのような補助物質を少量含んでもよい。

#### 【0046】

ワクチンは通常は、非経口で、注射によって、例えば経皮的に又は筋肉注射によって投与される。他の投与形態に適した追加の製剤には、坐薬、及び、場合によっては、経口製剤が含まれる。坐薬の場合には、通常の場合と同様の結合剤と担体が、例えばポリアルカレングリコール又はトリグリセリドを含んでいてもよい。こうした坐薬は、活性成分を0.5~10%、好ましくは1~2%の範囲で含有する混合物から調製されてもよい。経口製剤には、こうした通常使用される賦形剤、例えば、医薬グレードのマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等が含まれる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放性製剤又は散剤の形態をとり、10~95%、好ましくは25~70%の活性成分を含有する。

タンパク質は、中性又は塩の形態としてワクチンに製剤化されてもよい。医薬的に許容される塩には、酸付加塩(ペプチドの遊離アミノ基と形成)が含まれる。それらは、例えば塩酸又はリン酸のような無機酸、又は、酢酸、蔞酸、酒石酸、マンデル酸等のような有機酸を用いて形成される。遊離カルボキシル基で形成される塩も、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は水酸化鉄のような無機塩、及び、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等のような有機塩から誘導され得る。

#### 【0047】

ワクチンは、用量製剤に適合するように、及び治療上効果的かつ免疫原性的になるような量で投与される。投与量は、例えば、免疫応答を高める個々の免疫系の能力、及び所望の保護程度をはじめとする治療対象に依存する。適当な用量範囲は、好ましくは約0.1~1000 µgの範囲、例えば約1~300 µgの範囲、特に約10~50 µgの範囲のワクチンにつき数百 µgオーダーである。初期投与及びブースター注射に適当な生活規制も様々であるが、初期投与に次いで接種又は他の投与を行うのが代表的である。

適用方法は、実に様々である。通常のワクチン投与法は、いずれも使用可能である。これらには、固形の生理的に許容される基体又は生理的に許容される分散剤での経口投与、非経口的な、注射等による投与が含まれると考えられる。ワクチンの用量は投与経路に依存し、ワクチンを投与される人の年齢、及びそれよりも度合いは低い但しワクチンを投与する人の体格にしたがって変化するであろう。

ワクチンのポリペプチドは、ワクチンにおいて十分に免疫原性なものもあるが、ワクチンがアジュバント物質をさらに含む場合に免疫応答が高められるものもある。

#### 【0048】

ワクチンのアジュバント効果を得るための種々の方法には、リン酸緩衝生理食塩水中0.05~0.1%溶液として通常用いられる水酸化アルミニウム又はホスフェート(alum)のような薬剤の使用、0.25%溶液として用いられる合成ポリマーと糖(Carbopol)との混合、それぞれ、70~101 °Cの温度範囲で30秒~2分間の熱処理によるワクチン中のタンパク質の凝集が含まれる。アルブミンに対するペプシン処理(Fab)抗体を用いた再活性化による凝集、又はシー.パルブム(*C. parvum*)のような細菌細胞又はエンドトキシン又はグラム-陰性細菌のリポポリサッカライド成分との混合、マンニッドモノ-オレエート(Aracel A)のような生理的に許容される油状ビヒクル中での乳化又はブロック代体として用いられるパーフルオロカーボン(Fluosol-DA)の20%溶液を用いた乳化も、用いることができる。この発明によれば、DDA (ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド)はアジュバントの興味ある候補であるが、フロイント不完全アジュバントならびにQuil Aが可能性として興味深い。さらなる可能性は、モノホスホリルリピド A (MPL)及び

ムラミルジペプチド (MDP)である。

アジュバント効果の獲得に関し非常に興味ある(従って好ましい)他の可能性は、Gosselinら、1992(引用によりここに組み込まれる)に記載の技術を用いることである。手短に言えば、この発明の抗原のような関連抗原の提示は、単核細胞/マクロファージのFcγR1に対する抗体(又は抗原結合抗体フラグメント)に抗原を接合することにより、高めることができる。特に、抗原と抗FcγR1との接合により、ワクチン接種の目的のための免疫原性が高められることが示されている。

#### 【0049】

他の可能性としては、上記のアジュバントと組合わせられるリンホカイン(例えばIFN-γ、IL-2及びIL-12)のような免疫調節物質又は合成IFN-γインデューサー、例えばポリI:Cの使用が含まれる。実施例3bで説明したように、こうした抗原とアジュバントとの混合により、優れたワクチン製剤がもたらされると考えられる。

多くの場合、ワクチンの多回数の投与、通常は6回を越えないワクチン接種、より通常は4回を越えないワクチン接種、好ましくは1回以上、通常は少なくとも約3回のワクチン接種が必要であろう。ワクチン接種は、通常は2~12週間の間隔、より通常は3~5週間の間隔を置く。所望の保護免疫レベルを維持するためには、1~5年、通常は3年の間隔の周期的ブースターが望ましい。免疫化の過程後には、ワクチンに用いられる1以上のポリペプチドメンバーと同時培養(co-culture)、例えばESAT-6又はST-CFと同時培養したPBMCのインビトロでの増殖アッセイ、特に、感作リンパ球から放出されたIFN-γレベルの測定を行ってもよい。アッセイは、通常の標識、例えば放射性核種、酵素、蛍光剤等を用いて行ってもよい。これらの技術は周知であり、これらのタイプのアッセイの例示として種々の特許、例えば、米国特許第3,791,932号;第4,174,384号、及び第3,949,064号に見ることができる。

#### 【0050】

遺伝的な変異により、異なる個体は、同一ポリペプチドに対して強度の異なる免疫応答に反応し得る。従って、この発明のワクチンは、免疫応答を高めるため

に幾つかの異なるポリペプチドからなってもよい。ワクチンは、2以上のポリペプチドからなってもよい。それらのポリペプチドは全て上記されるとおりであるが、全てではなく幾つかのペプチドが、エム・ツベルクローシス複合体に属する細菌から誘導されもよい。後者の例においては、ポリペプチドについて上記した基準を必ずしも満たさないポリペプチドが、それら自身の免疫原性により作用したり、あるいは単にアジュバントとして作用することができる。こうした興味あるポリペプチドの例は、ESAT-6、TB10.4及びMPT64であるが、マイコバクテリアから単離され得る他のあらゆる物質が候補として可能である。

ワクチンは、1~20個、例えば2~20個又は3~20個の異なるポリペプチド、例えば3~10個の異なるポリペプチドからなってもよい。

この発明のポリペプチドとアジュバントとを混合する理由の1つは、細胞性免疫応答を効果的に活性化するためである。しかしながら、この効果は、他の方法で、例えば、ワクチン中の有効な抗原を非病原性微生物で発現させることにより得ることができる。こうした微生物の周知の例は、マイコバクテリア・ボビスBCGである。

#### 【0051】

従って、この発明の他の重要な局面は、現在入手可能な生BCGワクチンの改良であって、上記ポリペプチドをエンコードするDNA配列の1以上のコピーが、微生物がポリペプチドを発現し、分泌し得るように微生物ゲノムに導入されている微生物を有効成分として含むことからなる、結核複合体に属するマイコバクテリアによって引き起こされるTBに対する、ヒトを含む動物の免疫化用ワクチンである。

この明細書において、用語「ゲノム」は、微生物の染色体ならびに染色体外のDNA又はRNA、例えば プラスミドを指す。しかしながら、この発明のDNA配列は、非病原性微生物の染色体に導入されていることが好ましい。というのは、これにより、導入された遺伝物質の損失が防止されるからである。

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

菌株: Danish 1331であることが特に好ましい。

#### 【0052】

この発明によるポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列の1以上のコピーをエム・ボビスBCG 株由来のマイコバクテリウムに組み込むことにより、BCG 菌株の免疫原性効果が高まるであろう。この発明のヌクレオチド配列の1以上のコピーの組み込みにより、一層免疫応答が高まると考えられ、その結果、この発明の一局面は、ポリペプチドをエンコードするDNA配列の少なくとも2コピー、例えば少なくとも5コピーが、微生物のゲノムに組み込まれているワクチンである。DNA 配列のコピーは、同一ポリペプチドをエンコードする同一物、同一又は相同のポリペプチドをエンコードする同一のDNA配列の変異体であってもよく、あるいは別の具体例では、ポリペプチドの少なくとも1つがこの発明によるものである異なるポリペプチドをエンコードする異なるDNA配列であってもよい。

この発明の生ワクチンは、この発明による形質転換非病原性細胞を培養し、これらの細胞をワクチン用媒体に移し、任意に担体、ビヒクル及び/又はアジュバント物質を加えることにより調製することができる。

#### 【0053】

また、この発明は、ヒトを含む動物に、この発明によるポリペプチド又は上記皮膚試験試薬を皮内注射することからなる、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコバクテリウム・アフリカヌム又はマイコバクテリウム・ボビスによって動物に起こされるTBを診断する方法に関する。注射部位における陽性の皮膚応答は動物がTBを有していることを示し、注射部位における陰性の皮膚応答は動物がTBを有していないことを示す。陽性の応答は、少なくとも 5 mmの直径を有する皮膚応答であるが、より大きい、例えば少なくとも 1 cm、1.5 cm及び 少なくとも 2 cm の直径を有する反応が好ましい。皮膚試験試薬に用いられる組成物は、ワクチンについて上記したのと同じ方法で調製することができる。

ワクチンの調製及び使用に関する上記の開示に伴い、この発明は、この発明のポリペプチド、又は上述のこの発明のワクチン組成物、又は上述の生ワクチンをヒトを含む動物に投与することからなる、結核複合体に属するマイコバクテリアによって引き起こされたTBに対して動物を免疫感作する方法にも関する。好まし

い投与経路は、非経口(例えば静脈内及び動脈内)、腹膜内、筋肉内、皮下、皮内、経口、頬、舌下、鼻、直腸又は経皮経路である。

#### 【0054】

多数の可能な診断アッセイ及び方法が想定される：

毒性マイコバクテリアによる過去又は現在の感染についての診断が目的である場合、患者由来の単核細胞(すなわちTリンパ球)からなる血液試料を、この発明の1以上のポリペプチドの試料と接触させることができる。この接触はインビトロで行うことができ、陽性反応は、例えば、T細胞の増殖又は $\gamma$ -インターフェロンのようなサイトカインの細胞外相(例えば培養上清)への放出であってもよい。適当なインビボ試験は、上記皮膚試験であろう。患者由来の血清試料をこの発明のポリペプチドに接触させることも考えられ、血清試料中の抗体とポリペプチドとの結合に関する立証が、過去又は現在の感染を示す。

従って、この発明は、結核複合体に属する細菌による動物又はヒトでの現在又は過去の感作をインビトロで診断する方法にも関する。この方法は、動物又はヒト由来の血液試料を提供し、動物由来の試料とこの発明のポリペプチドとを接触させることからなり、血液試料中の単核細胞による少なくとも1個のサイトカインの細胞外相への有意な放出が、動物が感作していることを示す。用語「有意な放出」は、サイトカインの放出が、TB診断のない患者由来の血液試料からのサイトカインの放出よりも(スチューデントの両側(two-tailed)T検定のような適当な統計分析により定義された95%の信頼区間で)著しく多いことを意味する。通常は、有意な放出は、こうした試料から観察される放出の少なくとも2倍である。

#### 【0055】

あるいは、感染の可能性のある器官の試料を、この発明のポリペプチドに対して生じる抗体に接触させてもよい。当該分野で周知の方法による試料と抗体との反応の立証は、現在の感染を示す。また、当然に、患者由来の血清試料をこの発明のポリペプチドフラグメントの少なくとも1つと接触させ、抗体と抗原との反応を可視化する周知の方法を用いることにより、血清中の抗マイコバクテリア抗体の存在を立証できる可能性がある。

この発明の核酸フラグメントを動物に投与するか、又はこの発明の核酸フラグ

メントもしくはそれに相補的な核酸フラグメントとともに試料をインキュベートし、インキュベーションから得られるハイブリダイズした核酸の存在を(当該分野で周知であるハイブリダイゼーションアッセイを用いて)検出することからなる、ヒトを含む動物、又は試料においてマイコバクテリアの核酸の存在を立証する方法も、この発明に含まれる。こうしたTB診断法には、上記ヌクレオチド配列の少なくとも一部からなり、PCR技術の使用により核酸フラグメント(又は相補的なフラグメント)とハイブリッド形成する被試験動物又はヒト由来の試料中でヌクレオチド配列の存在を検出する組成物の使用が含まれる。

#### 【0056】

開示された抗原のうちのある抗原がエム.ボビスBCGには存在しないが毒性マイコバクテリアには存在するという事実は、それらが、興味ある薬剤標的であることを示している。抗原は、マイコバクテリウムによる感染を容易にするレセプター分子又は毒素を構成している可能性があり、こうした機能が阻害された場合には、マイコバクテリウムの感染力が低減されるであろう。

この発明の抗原から特に適当な薬剤標的を決定するためには、この発明のポリペプチドの少なくとも1つをエンコードする遺伝子と必要な制御配列をマイコバクテリアの無毒性株(例えばBCG)に導入し、どのポリペプチドが毒性に重要であるかを決定することができる。特定のタンパク質が毒性に重要である/毒性に寄与するといったん同定されれば、抗マイコバクテリア剤を合理的に設計して、重要遺伝子の発現を阻害するか、又は重要遺伝子産物を攻撃することができる。例えば、抗体又はそのフラグメント、例えばFab及び(Fab')<sub>2</sub> フラグメントを、当該分野で公知の方法によってこうした重要なポリペプチドに対して調製し、その後、予防又は治療剤として用いることができる。あるいは、例えば遺伝子の内因性プロモーターを含む組換え発現系を用いて、重要な遺伝子産物の発現を選択的に抑制する能力に関して、又は標的の作用を直接妨げる能力に関して、小分子をスクリーニングすることができる。次いで、これらの小分子が、マイコバクテリアの毒性を抑制する治療剤又は予防剤として用いられる。

#### 【0057】

あるいは、毒性マイコバクテリウムを無毒性にする抗マイコバクテリア剤は、

制御配列を発現するように操作可能に連結し、毒性マイコバクテリウムを形質転換するために用いることができる。こうした抗マイコバクテリア剤は、マイコバクテリウムにおける剤の転写又は翻訳によって特定のマイコバクテリウムの複製を阻害する。このような「新たな無毒」マイコバクテリウムは、例えばBCGと比較して毒性マイコバクテリウムに免疫学的に極めて類似しているため、ワクチンの目的について上記修飾BCGの優れた代替物となる。

最後に、イムノアッセイにおいてこの発明のポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、又は上記抗体の特異的な結合フラグメントも、この発明の一部である。こうしたポリクローナル抗体の産生では、適当な動物がポリペプチドによって免疫感作されること、及びこれらの抗体が次いで、好適にはイムノアフィニティークロマトグラフィーにより単離されることが必要である。モノクローナルの産生は、この発明が、免疫感作及び陽性ハイブリドーマのスクリーニングの双方に十分量の抗原を提供するため、当該分野で周知の方法により行うことができる。

#### 【0058】

#### 参考文献

Andersen, P.及び I, Heron. 1993. Journal of Immunological Methods 161 29 ~ 39

Andersen, P., A.B. Andersen, A.L. Sorensen及びS. Nagai. 1995. J.Immunol. 154:3359 ~ 3372

Berthet, F.X., Rasmussen, P.B., Rosenkrands, I., Andersen, P. Gicquel, B . Microbiology (1998)144 3195 ~ 3203

S. T. Coleら、(1998). Nature 393 (6685) 537 ~ 544

Ravnら、(1999) J. Infect. Dis. 179、 637 ~ 645

W098/53075

W098/53076

Rook, G.A.W. (1990). Res. Microbiol. 141:253 ~ 256

Flesch, I. ら、(1987). J. Immunology, 138: 4408 ~ 4413

Flynn ら(1993) J.Exp.Med 178: 2249 ~ 2254

- Cooper ら(1993) J.Exp.Med. 178:2243 ~ 2248
- Orme ら (1988). Infect.Immun. 140:3589
- Ulmer ら、(1993). Curr. Opin. Invest. Drugs, 2: 983 ~ 989
- Gosselin ら、(1992) J. Immunol. 149: 3477 ~ 3481
- Pearson W.R及びD.J. Lipman (1988) PNAS USA 85:2444 ~ 2448
- X. Huang 及び W. Miller. Adv. Appl. Math. (1991) 12:337 ~ 357
- Nielsen P E ら(1991. Science 254: 1497 ~ 1500
- Koshkinら(1998). Tetrahedron 54、 3607 ~ 3630;
- Nielsen, N.K.ら(1998). J.Am.Chem.Soc. 120、 5458 ~ 5463
- Lefford ら(1973). Immunology 25:703
- Creaら(1978). PNAS 75(12):5765 ~ 5769
- Eichenlaub, (1979). Journal of Bacteriology, 138: 559 ~ 566
- Bolivarら、(1977). Gene 2: 95
- Changら、(1978). Nature, 375: 515
- Itakuraら、(1977). Science, 198: 1056
- Goeddelら、(1979). Nature, 281:544
- 欧州出願公開公報第0036776号
- Siebwentら、(1980). Cell、 20: 269
- Harboeら(1998). Infect. Immun. 66、 717 ~ 723
- Sambrookら (1989)"Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition Cold Spring Harbor N. Y."
- WO 98/44119
- WO 94/18227
- 米国特許第4,603,102号
- 米国特許第4,608,251号
- 米国特許第4,601,903号
- 米国特許第4,599,231号
- 米国特許第4,599,230号
- 米国特許第3,791,932号

米国特許第4,174,384号

米国特許第3,949,064号

【0059】

図面の説明

図1

rTB7.3、rTB10.4及びrCFP10に対するヒトリンパ球の応答。2人のヒトTB患者( )、及びrTB7.3 (A)、rTB10.4 (B)及びrCFP10 (C)の濃度を増していった、2人のBCGワクチン接種を受けた健康なヒトドナー( )由来のPBMCの刺激から得られたIFN- 応答。全てのIFN- 分析は、3つのウェルからプールした上清について2回行い、平均として示した。複数のウェルにおける偏差は、常に、平均の10%未満であった。50 pg/ml より下のIFN- レベルを、陰性として考えた。

図2

異なるドナー群におけるエム.ツベルクローシスからの低質量抗原に対するIFN- 応答。7人の健康なワクチン接種を受けていないドナー、7人の健康なBCGワクチンを受けたドナー及び17人のTB患者を、5 µg/mlのST-CF又は組換え抗原で刺激した。個々の抗原特異的応答は、デルタ値(抗原刺激したウェルにおけるIFN- 放出 - 非刺激ウェルにおけるIFN- 放出)として示す。ST-CF: 短期間培養濾液、rTB7.3: Rv3221cの組み換え型、rTB10.4: Rv0288の組換え型、rCFP10: CFP10の組換え型、rESAT-6: ESAT-6の組換え型。

【0060】

実施例

実施例1 ヒトTB患者由来PBMCの刺激に対するCFP10、ESAT-6及びTB10.4の効果

ESAT-6 抗原を、高レベルの放出されたIFN- との強いT細胞応答により、培養濾液の低分子量フラクションで同定した(Andersenら、1995)。この抗原は現在、多くの研究により、良好な刺激性の抗原特性を有することが立証され、TB患者ならびにTBに感染した異なる種の動物の高い%によって強く認められている。最近、他の小さいいくつかのタンパク質が種々のマイコバクテリア抽出物から同定され、それらの免疫学的な関連性について評価された。近年、ESAT-6と同じオペロ

ンでエンコードされる10 kDaの分子 (CFP10) が同定された(Berthet, F.X.1998)。  
。

2つの新規な低量のエム.ツベルクローシスタンパク質 : TB10.4及びTB7.3 (Rv3221c と同一であり、ESAT-6 遺伝子ファミリーのメンバーではない)が同定された。TB10.4 は、ESAT-6ファミリーの新規なメンバーとして同定された。我々のデータは、今までに試験されたESAT-6 ファミリーの3つのメンバー(TB10.4、CFP10及びESAT-6)が、全てエム.ツベルクローシスに対するヒトの免疫応答によって強く認識された標的であることを立証している。

#### 【0061】

CFP10、TB7.3及びTB10.4をエンコードする遺伝子のクローニング

CFP10 をエンコードする遺伝子を前記のようにクローンした(Berthet, F.X. 1998)。TB7.3 (以前CFP7Aと呼ばれた) をST-CFから同定し、相当する遺伝子を(W098/44119)に記載のようにクローンした。

TB10.4 (以前CFP7と呼ばれた) をエンコードする遺伝子は、Mab PV-2で gt11エム.ツベルクローシスのゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって同定し、以前(W098/44119)に記載されるようにクローンした。

#### 【0062】

組換え型TB7.3、TB10.4及びCFP10の発現及び精製

ヒスチジンタグ標識した組換え型タンパク質 (rTB7.3、rTB10.4及びrCFP10)は、本質的には製造業者により記載されるように、8M の尿素の存在下、タロンカラム(Clonetech, Palo Alto, Ca) を用いて金属アフィニティークロマトグラフィーによって発現及び精製した。均質化のためのタンパク質の精製は、1mlのHitrapカラム(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーによって行った。タンパク質の濃度は、BCA試験 (Micro BCA Protein Assay Reagent kit, Pierce, Oud-Beijerland, オランダs) によって測定した。カプトガニアメーバ様細胞溶解物/Limulus Amoebocyte Lysate (LAL)-試験により測定したこれらの調製物中のLPS含量は、常に0.05ng LPS/タンパク質  $\mu$ g未満であった。

#### 【0063】

### 低量のエム・ツベルクローシスタンパク質の免疫学的認識

PBMCは、デンマーク、コペンハーゲン大学病院、肺医学部(Department of Pulmonary Medicine, University Hospital of Copenhagen)で診断及び治療された17人のデンマーク人のTB患者、及びBCG ワクチン接種した7人ならびにエム・ツベルクローシスへの暴露が知られてない、ワクチン接種していない健康な7人から得た。血液試料を、結核の診断後0~6ヶ月間、BCGワクチン接種後2ヶ月~40年間回収した。

上清におけるPBMCの分離、培養及び IFN- $\gamma$  の測定は、Ravnらによって以前記載されたように行った。3つの組換え型タンパク質(rTB7.3、rTB10.4及びrCFP10)の容量応答の研究は、0.3~10  $\mu$ g抗原/培養液mlを用いて行った。2人のデンマーク人のTB患者及びBCGワクチン接種した2人の健康なデンマーク人ドナーのリンパ球培養物を3つの抗原で刺激した。TB7.3 で刺激後のリンパ球の応答は、一般に1000pg/ml未満のIFN- $\gamma$  の放出を伴って低かった(図 1A)。IFN- $\gamma$  も、この抗原に対する増殖応答(データは提示せず)も、ST-CFで見られる応答の20%以上に達しなかった。他の2つの抗原に対して、高レベルのIFN- $\gamma$  が、抗原の濃度が増大するにつれて誘発された(図 1 B 及びC)。抗原の最適濃度は1.25~10  $\mu$ g/ml で、これらの濃度はml当たり1000~4000pg の範囲でIFN- $\gamma$  の応答を生じた。

抗原を13~17人のTB患者、4~7人のBCGワクチン接種者及び7人の非ワクチン接種のドナーで調査した(図2)。TB7.3 は認識されたが、患者とワクチン接種したドナーとの両者において低レベルであった。TB患者の約40%(13人中5人)は、バックグラウンド以上のかんりのレベルでこの分子を認識し、応答中央値は、これらのドナーの場合、ST-CFの場合の同じドナーでの4024pg IFN- $\gamma$  /mlに対し、659pg IFN- $\gamma$  /mlであった。

#### 【0064】

TB10.4 は、BCG ワクチン接種をしたドナー(71%の応答者、IFN- $\gamma$  の中央値=1mlにつき3968pg)に対し、ST-CFの場合、同じドナーで1mlにつき5335pg)及びTB患者(88%の応答者、IFN- $\gamma$  の中央値=3298pg/ml)に対し、ST-CFの場合、同じドナーで4707pg/ml)の両者によってより高いレベルで認識された。TB患者では、CFP10は著しいIFN- $\gamma$  の放出(IFN- $\gamma$  の中央値=2135pg/ml)に対し、ST-CFの場

合、同じドナーで4755pg/ml)を誘発した。

TB10.4、CFP10及びESAT-6に対する著しいT細胞応答と比較すると、TB7.3は、非常に低い活性を有する、弱くではあるが認識された抗原であった。

ESAT-6に例えると、TB患者では、TB10.4は著しく高いレベルのIFN- $\gamma$ を誘発した(P = 0.0017, ウィルコキソン・サイン(Wilcoxon Signed)・ランク試験)のに対し、CFP10及びESAT-6に対するT細胞の応答は類似していた(P = 0.121)。CFP10及びTB10.4の両方は、70%未満のTB患者により認識され、興味深いことに、これら2つの効力のある免疫原性分子は、ESAT-6との共通点をいくつか有する：即ち、それらは大きさとpI (10kDa と4.5)がほぼ同じで、ESAT-6に対するアミノ酸配列同一性をそれぞれ15%及び21.9%示し、上記で定義したようにesat-6遺伝子ファミリーのメンバーである。

表示されたデータは、ESAT-6ファミリーのメンバーに対する宿主の免疫応答に厳密に集束しており、このファミリーが将来的なTBのワクチン及び診断法に関連し得る幾つかの分子を含むことを立証している。

#### 【0065】

実施例2 ESAT-6ファミリーから低量のタンパク質をエンコードする遺伝子のクローニング

タンパク質の大腸菌中での組換え型発現のため、Rv0287、Rv1036c、Rv1037c、Rv2346c、Rv2348c、Rv2653c、Rv2654c、Rv3020c、Rv3444c、Rv3445c、Rv3890c、Rv3891c、Rv3904c及びRv3905cをエンコードする遺伝子を、遺伝子特異的なプライマーでのPCR増幅によって、発現ベクターpMCT3 (6つのN-末端ヒスチジン残基を含むことだけを除いては、pMCT6 (Harboeら、1998)と同一)にクローンした。

タンパク質のクローニングのため、以下の遺伝子特異的なプライマーを使用した：

Rv0287:

PA0287: 5'-CTGAGATCTATGAGCCTTTTGGATGC-3' (BglIII)

PB0287: 5'-CTAAGCTTGGATCCTCAGAACCCGGTATAGG-3' (BamHI)

Rv1036c:

- PA1036c: 5' - CTGAGATCTTTGATCCCCGGTCGGATGGTG (BgIII)
- PB1036c: 5' - CTCCCATGGGTCAGGTGATCGAATCAGCCA (NcoI)
- Rv1037c:
- PA1037c: 5' - CTGAGATCTATGACCATCAACTATC - 3' (BgIII)
- PB1037c: 5' - CTAAGCTTGGATCCTTAGGCCCAGCTGGAGCC - 3' (BamHI)
- Rv2346c:
- PA2346c: 5' - CTGAGATCTATGACCATCAACTATC - 3' (BgIII)
- PB2346c: 5' - CTAAGCTTGGATCCTCAGGCCCAGCTGGAGCC - 3' (BamHI)
- Rv2348c:
- PA2348c: 5' - CTGAGATCTGTGCTTTTGCCTCTTGGTCCG (BgIII)
- PB2348c: 5' - CCCAAGCTTCTAGCCGGCCGCCGAGA (HindIII)
- Rv2653c:
- PA2653c: 5' - CTGAGATCTTTGACCCACAAGCGCACTAAA (BgIII)
- PB2653c: 5' - CTCCCATGGTCACTGTTTCGCTGTCGGGTTC (NcoI)
- Rv2654c:
- PA2654c: 5' - CTGAGATCTATGAGCGGCCACGCGTTGGCT (BgIII)
- PB2654c: 5' - CTCCCATGGTCACGGCGGATCACCCCGGTC (NcoI)
- Rv3020c:
- PA3020c: 5' - CTGAGATCTATGAGTTTGTGGATGCCCAT (BgIII)
- PB3020c: 5' - CTCCCATGGTTAAAACCCGGTGTAGCTGGA (NcoI)
- Rv3444c:
- PA3444c: 5' - CTGAGATCTATGAACGCAGACCCCGTG - 3' (BgIII)
- PB3444c: 5' - CTAAGCTTGGATCCCTAGCGTGCCCAAGCTCC - 3' (BamHI)
- Rv3445c:
- PA3445c: 5' - CTGAGATCTATGGTTGAACCGGAAGG - 3' (BgIII)
- PB3445c: 5' - CTAAGCTTGGATCCCTATAGGTGCGCCCGGC - 3' (BamHI)
- Rv3890c:
- PA3890c: 5' - CTGAGATCTATGTCAGATCAAATCACG - 3' (BgIII)
- PB3890c: 5' - CTAAGCTTGGATCCTTAGAACAAGCCCGCG - 3' (BamHI)

Rv3891c:

PA3891c: 5' - CTGAGATCTATGGCAGACACAATTCAGG - 3' (BglIII)

PB3891c: 5' - CTAAGCTTCCCGGGTCAGGATCCGTGGCTAGC - 3' (SmaI)

Rv3904c:

PA3904c: 5' - CTGAGATCTATGGATCCGACCGTGTGG - 3' (BglIII)

PB3904c: 5' - CTGCCATGGTCACGACCACATACCC - 3' (NcoI)

Rv3905c:

PA3905c: 5' - CTGAGATCTATGGGTGCCGACGACAC - 3' (BglIII)

PB3905c: 5' - CTAAGCTTGGATCCTCAGCCACCGCCCACC - 3' (BamHI)

### 【0066】

上記に挙げたプライマーは、各配列の後に示した制限部位をもたらす。制限部位は、pMCT3にクローニングするために用いられる。ATGに代わる開始コドンが本来の配列で用いられる場合、プライマーは、代わりにATGコドンを導入する。PCR反応物は、400  $\mu$ MのdNTP混合物(Boehringer Mannheim)を有する1 $\times$ PCR緩衝液 + Mg (Boehringer Mannheim) 中10 ngのエム.ツベルクローシスの染色体DNA、0.4 pMの各プライマー及び50  $\mu$ lの反応容量中1.5 ユニットの Tag DNA ポリメラーゼ (Boehringer Mannheim)を含有した。PTC-200サーマルサイクラー(M J Research, Inc.)を用いて、反応物をはじめ94  $^{\circ}$ Cに5分間加熱し、92  $^{\circ}$ Cで1分間、52  $^{\circ}$ Cで1分間及び72  $^{\circ}$ Cで2分間のプログラムを30サイクル行い、7分72  $^{\circ}$ Cで終了した。PCR産物をpRC2.1クローニングベクターにクローンし、製造業者によって記載されるように、ワン・ショット(One Shot)(登録商標)大腸菌細胞(Invitrogen, Leek, オランダ)に形質転換した。プラスミドDNAを適当な制限酵素(プライマー配列を参照)で消化し、pMCT3にクローンし、大腸菌XL-1 Blue細胞に形質転換した。正確な挿入は、常に塩基配列決定によって確認した。DNA塩基配列決定法は、自動ゲル読み取り装置(model 373A; Applied Biosystems)と組み合わせてサイクル塩基配列決定システムを用いてStatens Serum Institutで行った。

### 【0067】

組換え型Rv0287、Rv1036c、Rv1037c、Rv2346c、Rv2348c、Rv2653c、Rv2654c、Rv3020c、Rv3444c、Rv3445c、Rv3890c、Rv3891c、Rv3904c及びRv3905cの発現及び

## 精製

組換え型タンパク質の発現及び金属アフィニティー精製は、本質的に製造業者によって記載されるようにして行った。100 µg/mlのアンピシリン及び12.5 µg/mlのテトラサイクリンを含むLB-培地に、組換え型pMCT3プラスミドを収容するXL1-Blue 細胞の一晩培養液を接種した。培養物を、 $OD_{600}$  の密度が0.5に達するまで37 °Cで振盪した。その後、IPTG を1 mMの最終濃度まで添加し、培養物をさらに2~16時間インキュベートした。細胞を採取し、1×超音波処理緩衝液+ 8 Mの尿素で再懸濁し、パルス間で30秒停止しながら5×30秒超音波処理した。遠心分離した後、溶解物を10 mlのタロン樹脂 (Clontech, Palo Alto, USA)を含むカラムに加えた。カラムを洗浄し、製造業者によって記載されるように溶離した。

組換え型タンパク質を含むフラクションを貯留し、均質なタンパク質調製物を得て、貯留したフラクションを多溶離技術(multielution technique) (Andersen and Heron, 1993) 又はHitrapカラムで陰イオン交換(Pharmacia, Uppsala, Sweden)のどちらか一方に付した。

【0068】

【表2】

名称、オープンリーディングフレーム(ORF)ならびに  
SEQ ID No と合わせたヌクレオチド配列のリスト

タンパク質	ORF:	SEQ ID NO:
Rv0287	294	4
Rv1036c	339	6
Rv1037c	285	8
Rv2346c	282	10
Rv2348c	327	12
Rv2653c	324	14
Rv2654c	246	16
Rv3020c	294	18
Rv3444c	303	20
Rv3445c	378	22
Rv3890c	288	24
Rv3891c	324	26
Rv3904c	273	28
Rv3905c	312	30

【0069】

【表3】

名称、分子量 (Daltons で測定)、それらの等電点及び SEQ ID NO と合わせたタンパク質のリスト

タンパク質	大きさ (aa)	分子量 (Da)	等電点	SEQ ID NO:
CFP10 Rv3874	100	10794	4.41	1
ESAT-6 Rv3875	95	9904	4.3	2
TB10.4 Rv0288	96	10391	4.43	3
Rv0287	97	9778.40	6.3111	5
Rv1036c	112	12996.06	4.60	7
Rv1037c	94	9833.10	4.543	9
Rv2346c	94	9954.01	4.76	11
Rv2348c	108	11396.53	3.89	13
Rv2653c	107	12359.82	8.20	15
Rv2654c	81	7697.71	5.04	17
Rv3020c	97	9842.03	6.14	19
Rv3444c	100	11120.70	6.165	21
Rv3445c	125	13495.10	6.489	23
Rv3890c	95	9920.40	4.176	25
Rv3891c	107	11193.70	4.619	27
Rv3904c	90	9602.90	5.480	29
Rv3905c	103	10460.30	4.641	31

### 【 0 0 7 0 】

#### 合成ペプチドの合成

3つの抗原(Rv3444c, Rv3890c及びRv3905c)は、ライデン大学 (Leiden University) メディカルセンター(Albinusdreef 2, 2333 Leiden, オランダ)の感染症及び免疫血液学/血液銀行C5-P部で、ABIMED ペプチドシンセサイザー (ABIMED, Langenfeld, ドイツ)で標準的な固相方法によって合成ペプチドとして合成した。

ペプチドには以下のアミノ酸を含めた；

Rv3444c p1: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 1-18

Rv3444c p2: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 11-28

Rv3444c p3: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 21-38

Rv3444c p4: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 31-48

Rv3444c p5: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 41-58

Rv3444c p6: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 51-68

Rv3444c p7: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 61-78

Rv3444c p8: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 71-88

Rv3444c p9: SEQ. ID. NO. 21: アミノ酸 81-100

【 0 0 7 1 】

Rv3890c p1: SEQ. ID. NO. 25: アミノ酸1-18

Rv3890c p2: SEQ. ID. NO. 25: アミノ酸11-28

Rv3890c p3: SEQ. ID. NO. 25: アミノ酸 21-38

Rv3890c p4: SEQ. ID. NO. 25: アミノ酸 31-48

Rv3890c p5: SEQ. ID. NO. 25: アミノ酸 41-58

Rv3890c p6: SEQ. ID. NO. 25: アミノ酸 51-68

Rv3890c p7: SEQ. ID. NO. 25: アミノ酸 61-78

Rv3890c p8: SEQ. ID. NO. 25: アミノ酸 71-95

【 0 0 7 2 】

Rv3905c p1: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 1-18

Rv3905c p2: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 11-28

Rv3905c p3: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 21-38

Rv3905c p4: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 31-48

Rv3905c p5: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 41-58

Rv3905c p6: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 51-68

Rv3905c p7: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 61-78

Rv3905c p8: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 71-88

Rv3905c p9: SEQ. ID. NO. 31: アミノ酸 81-103

【 0 0 7 3 】

実施例3A: T細胞系のインターフェロン- の誘導

精製した組換え型タンパク質を、IFN- の放出として測定されるT細胞応答の誘導能についてスクリーンした。スクリーニングは、PPD陽性ドナーから生じたT細胞系のIFN- の誘導の試験及び/又はTB患者、PPDが陽性ならびに陰性の健康なドナーから得られるPBMC調製物における応答の測定を伴った。

ヒトのドナー: PBMC は、インビトロでPPDに対する応答が陽性の健康なドナーから得た。

T細胞系の調製: 1 mlの総容量中5細菌/細胞の割合で、新たに単離された $1 \sim 5 \times 10^6$  のPBMCを生存可能なエム.ツベルクローシスと1.5時間培養することによって、T細胞系を調製した(ドナー1及び2)。洗浄後、細胞をHEPESで補足したRPMI 1640培地(Gibco, Grand Island, N.Y)及び10%の熱不活化NHS中で培養した。あるいは、 $1 \sim 5 \times 10^6$  の新たに単離されたPBMCを $5 \mu\text{g/ml}$ のST-CFと培養することによって、T細胞系統を調製した(ドナー3~5)。 $37^\circ\text{C}$ 及び5%  $\text{CO}_2$ で7日培養した後、T細胞をウェル当たり30-50 Uのr-IL-2(組換え型インターロイキン 2)(Boehringer Mannheim)でおおよそ7日間補足した。最後に、 $5 \times 10^5$ のオートロガス抗原提示細胞/ml(ドナー1及び2)又は $1 \times 10^6$ 細胞/照射(2000 RAD)オートロガスPBMC/ml(ドナー3~5)の存在下、 $5 \mu\text{g/ml}$ のPPD及び/又はST-CF、組み換え型のRv2653c、Rv3891c、Rv3904cならびにRv3444c、Rv3890c及びRv3905cのペプチド貯留(2~9ペプチド)で $1 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mlを刺激することによって、組換え抗原及び合成ペプチドに対する反応性について、T細胞系を試験した。抗原なし(No ag)及びPHAを陰性及び陽性の対照としてそれぞれ使用した。上清を培養の4日後採取し、IFN- $\gamma$ の存在が分析されるまで $-20^\circ\text{C}$ で貯蔵した。

異なるT細胞系で得られた応答を表4に示す。ここで、ドナー1及び2は、生存可能なエム.ツベルクローシスにより駆動されるT細胞系に基づくのに対し、ドナー3~5は、ST-CFで刺激することによって生じる。

【0074】

【表4】

組換え型抗原及び合成ペプチドの貯留でのT細胞系の刺激。PHA及びPPD又はST-CFに対する応答を比較のために示す。結果をpg IFN- $\gamma$ /mlとして示す。

ドナー	No ag	PHA (1 $\mu$ g/ml)	PPD (5 $\mu$ g/ml)	Rv2653c (5 $\mu$ g/ml,1 $\mu$ g/ml)	Rv3444c p1-4 (5 $\mu$ g/ml,1 $\mu$ g/ml)	Rv3444c p5-9 (5 $\mu$ g/ml,1 $\mu$ g/ml)
1	350	3940	3690	1283, 853	132, 602	330, 553
2	325	3845	1824	673, 270	454, 558	1578, 1570

ドナー	Rv3890c p1-4 (5 $\mu$ g/ml,1 $\mu$ g/ml)	Rv3890c p5-9 (5 $\mu$ g/ml,1 $\mu$ g/ml)	Rv3904c (5 $\mu$ g/ml,1 $\mu$ g/ml)	Rv3905c p1-4 (5 $\mu$ g/ml,1 $\mu$ g/ml)	Rv3905c p5-9 (5 $\mu$ g/ml,1 $\mu$ g/ml)
1	1167, 872	915, 1109	1827, 1146	1250, 622	332, 778
2	318, 362	522, 242	296, 664	503, 874	817, 422

ドナー	No ag	PHA (1 $\mu$ g/ml)	ST-CF (5 $\mu$ g/ml)	Rv3891c (5 $\mu$ g/ml,0.5 $\mu$ g/ml)	Rv3444c p1+3 (5 $\mu$ g/ml,0.5 $\mu$ g/ml)	Rv3444c p2 (5 $\mu$ g/ml,0.5 $\mu$ g/ml)
3	136	4467	2425	1260, 606	223, 166	58, 154
4	0	5410	4490	23, 5	14, 12	12, 32
5	0	1996	1175	472, 479	254, 20	26, 33

ドナー	Rv3444c p4 (5 $\mu$ g/ml,0.5 $\mu$ g/ml)	Rv3444c p5-6 (5 $\mu$ g/ml,0.5 $\mu$ g/ml)	Rv3444c p7-9 (5 $\mu$ g/ml,0.5 $\mu$ g/ml)	Rv3444c p1-9 (5 $\mu$ g/ml,0.5 $\mu$ g/ml)	Rv3905c p1-9 (5 $\mu$ g/ml,0.5 $\mu$ g/ml)
3	59, 93	700, 682	596, 298	308, 225	262, 116
4	33, 34	109, 69	240, 87	43, 17	452, 25
5	19, 16	119, 148	162, 29	319, 16	407, 26

### 【0075】

組換え型抗原Rv2653c、Rv3891c及びRv3904c ならびに抗原Rv3444c、Rv3890c及びRv3905cをカバーするペプチドに関する表4に示す結果は、これらの抗原がPPD陽性の個体から生じるT細胞系でIFN- $\gamma$ 産生を誘導できることを示す。

### 【0076】

実施例3B ヒトのTB患者又はBCGワクチン接種者におけるインターフェロン- $\gamma$ の誘導

ヒトのドナー：PBMC は、エム.ツベルクローシスへの暴露が知られていないBCGワクチンを接種した健康なドナー及び培養又は顕微鏡検査法を用いてTBに感染したと判明した患者から得た。血液試料は、診断の0~6ヶ月後TB患者から採取した。

リンパ球の調製及び細胞培養：PBMC をLymphoprep (Nycomed, Oslo, ノルウェー)でヘパリン添加血液の勾配遠心分離によって新たに単離し、使用するまで液体窒素で貯蔵した。1%のペニシリン/ストレプトマイシン(Gibo BRL, Life Technol

ogies)、1%の非必須アミノ酸(Flow, ICN Biomedicals, CA, USA)、及び地方の血液銀行の正常なヒトのABO血清(NHS)10%で補足した完全RPMI 1640培地(Gibco, Grand Island, N.Y.)で、細胞を再懸濁した。細胞の数及び生存能力を、ニグロシン染色によって測定した。マイクロタイタープレート(Nunc, Roskilde, Denmark)に50  $\mu$ l中に $1.25 \times 10^5$ のPBMCとともに培養物を定着させ、ST-CF PDD、Rv0287、Rv1036c、Rv1037c、Rv2653c、Rv3445c、Rv3891c及びRv3904cで刺激した。抗原なし(No ag)及び植物性赤血球凝集素(PHA)を、陰性ならびに陽性の対照としてそれぞれ使用した。培養、貯留の5日後、サイトカインを検出するための上清を採取し、使用するまで-80 で貯蔵した。

#### 【0077】

サイトカインの分析: インターフェロン- (IFN-) を、市販のモノクローナル抗体ペア(Endogen)を用いて標準的なサンドウィッチELISA技術で検出し、製造業者の指示に従って使用した。組換え型IFN- (Endogen) を基準として用いた。全てのデータは2つ(duplicate)のウェルの平均であり、ウェル間の偏差は平均の10%を超過しなかった。50 pg/ml未満のサイトカインのレベルは、陰性であると考えた。42人の各ドナーの応答を、表5及び6に示す。

表5に示すように、幾つかの組換えタンパク質で刺激した後、著しいIFN- の放出が認められる。6人のドナーに対して、Rv0287での刺激は高いIFN- の応答を生じる。Rv1037c、Rv3891c及びRv3904cで刺激した場合、ドナーの40%~60%はIFN- 応答の中央値を示すのに対し、この実験のRv3445cでの刺激によっては、限定された応答が得られるに過ぎない。

#### 【0078】

#### 【表5】

4人の健康な非BCGワクチン接種者、4人の健康なBCGワクチン接種者及び6人のTB患者由来PBMCの組換え抗原での刺激。ST-CF及びPHAに対する応答を、比較のために示す。結果を、pg IFN- $\gamma$ /mlとして示す。

TB暴露が知られていないBCGワクチン接種の対照ドナー

ドナー	No ag	PHA (1 $\mu$ g/ml)	ST-CF (5 $\mu$ g/ml)	Rv0287 (10 $\mu$ g/ml)	Rv1037c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3445c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3891c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3904c (10 $\mu$ g/ml)
1	0	8305	622	1459	1800	5	2159	27
2	82	20862	15759	32	30	35	461	50
3	7	17785	16198	380	53	79	610	76
4	912	16198	11350	3020	3137	799	8137	716

TB患者

ドナー	No ag	PHA (1 $\mu$ g/ml)	ST-CF (5 $\mu$ g/ml)	Rv0287 (10 $\mu$ g/ml)	Rv1037c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3445c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3891c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3904c (10 $\mu$ g/ml)
1	60	12301	11057	2225	799	338	2115	94
2	7	10390	6123	51	44	20	0	522
3	34	11678	8136	1437	665	84	0	528
4	0	13459	7731	17	0	0	0	0
5	21	10143	9513	7869	3135	1646	4116	3018
6	0	10795	10932	8610	1409	421	9	1080

TB暴露が知られていない非ワクチン接種の対照ドナー

ドナー	No ag	PHA (1 $\mu$ g/ml)	ST-CF (5 $\mu$ g/ml)	Rv0287 (10 $\mu$ g/ml)	Rv1037c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3445c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3891c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3904c (10 $\mu$ g/ml)
1	61	8379	511	23	115	0	604	269
2	16	11005	1923	12	23	8	615	16
3	0	10190	126	0	0	0	249	0
4	51	10819	1030	0	0	0	n.d.	0

【0079】

【表6】

9 人の健康な PPD 及び又は ST-CF 陰性、13 人の健康な PPD 及び又は ST-CF 陽性のドナーならびに 6 人の Tb 患者由来 PBMC の組換え抗原での刺激。ST-CF、PPD 及び PHA を比較のために示す。結果を、pg IFN- $\gamma$ /ml で示す。

健康な PPD 及び又は ST-CF の 陰性ドナー

ドナー	no ag	PHA	PPD	STCF (2.5 $\mu$ g/ml)	Rv1036c (10 $\mu$ g/ml)	Rv1036c (5 $\mu$ g/ml)	Rv1036c (2.5 $\mu$ g/ml)	Rv2653c (5 $\mu$ g/ml)	Rv2653c (2.5 $\mu$ g/ml)	Rv3891c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3891c (2.5 $\mu$ g/ml)	Rv3904c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3904c (2.5 $\mu$ g/ml)
A	0	3354	113	nd.	0	0	37	0	4	n.d.	n.d.	nd.	nd.
B	0	3803	563	nd.	15	0	14	0	50	n.d.	n.d.	nd.	nd.
C	0	3446	525	nd.	138	97	59	97	0	nd.	nd.	nd.	nd.
D	32	1919	nd.	234	137	nd.	148	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
E	0	2889	nd.	178	59	nd.	206	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
F	42	3998	nd.	175	15	nd.	67	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
G	44	6269	190	195(5 $\mu$ g)	340	nd.	173	nd.	nd.	30	51	22	41
H	5	2282	n.d.	10 (5 $\mu$ g)	3	nd.	2	nd.	nd.	27	16	nd.	nd.
I	2	10427	n.d.	80 (5 $\mu$ g)	7	nd.	5	nd.	nd.	412	300	nd.	nd.

【0080】

【表6 (つづき1)】

## 健康な PPD 及び又は ST-CF の陽性ドナー

ドナー	no	PHA	PPD	STCF (5 $\mu$ g/ml)	Rv1036c (10 $\mu$ g/ml)	Rv1036c (5 $\mu$ g/ml)	Rv1036c (2.5 $\mu$ g/ml)	Rv2653c (5 $\mu$ g/ml)	Rv2653c (2.5 $\mu$ g/ml)	Rv3891c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3891c (2.5 $\mu$ g/ml)	Rv3904c (10 $\mu$ g/ml)	Rv3904c (2.5 $\mu$ g/ml)
A	31	6716	2275	nd.	687	900	1	62	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
B	43	4733	6159	nd.	2244	1108	179	126	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
C	7	6165	5808	nd.	4074	3788	110	30	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
D	63	6532	6314	nd.	1589	1450	2445	235	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
E	14	5614	3852	nd.	390	738	147	448	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
F	13	3493	4327	3381	229	605	nd.	nd.	8	25	42	61	61
G	12	8164	nd.	738	1774	2771	nd.	nd.	30	76	25	96	96
H	5	7378	840	nd.	568	948	nd.	nd.	15	19	730	102	102
I	0	5168	n.d.	4241	0	0	nd.	nd.	575	447	nd.	nd.	nd.
J	12	4873	nd.	745	4	3	nd.	nd.	511	214	nd.	nd.	nd.
K	1	4512	nd.	2137	5	1	nd.	nd.	1903	1105	nd.	nd.	nd.
L	75	8047	nd.	2778	812	235	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.
M	52	6095	nd.	9133	1368	1223	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.	nd.

【0081】

【表6(つづき2)】

Tb 患者

トナ一	no ag	PHA	PPD	STCF (5μg/ml)	Rv1036c (10μg/ml)	Rv1036c (2.5μg/ml)	Rv3904c (10μg/ml)	Rv3904c (2.5μg/ml)
A	5	5282	4647	nd.	844 (5μg/ml)	557	nd.	nd.
B	60	7239	nd.	5474	301	595	nd.	nd.
C	44	11014	nd.	11639	384	646	nd.	nd.
D	8	5757	1095	877	624	692	31	88
E	25	7135	7118	5881	362	1035	55	54
F	23	6415	6085	6123	145	237	985	657

組換え型抗原Rv1036c、 Rv2653c、 Rv3891c及びRv3904c に関する表6に示す結果は、これらの抗原が健康なPPD及び/又はST-CF陽性の個体及び/又はTb患者由来のPBMCでIFN- 産生を誘導できることを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Statens Serum Institut

<120> Tuberculosis vaccine and diagnostics  
based on the Mycobacterium tuberculosis esat-6 gene family

<130> 23388PC1

<160> 31

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 100

<212> PRT

<213> M.Tuberculosis

<400> 1

```
Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly
 1                    5                10                15
Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val
 20                25                30
Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly
 35                40                45
Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys
 50                55                60
Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly
 65                70                75                80
Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Ala Leu Ser Ser
 85                90                95
Gln Met Gly Phe
 100
```

<210> 2

<211> 95

<212> PRT

<213> M.Tuberculosis

<400> 2

```
Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser
 1                    5                10                15
Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly
 20                25                30
Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser
 35                40                45
Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu
 50                55                60
Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly
 65                70                75                80
Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala
 85                90                95
```

<210> 3

<211> 96

<212> PRT

<213> M.Tuberculosis

<400> 3  
 Met Ser Gln Ile Met Tyr Asn Tyr Pro Ala Met Leu Gly His Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Met Ala Gly Tyr Ala Gly Thr Leu Gln Ser Leu Gly Ala Glu Ile  
 20 25 30  
 Ala Val Glu Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ala Trp Gln Gly Asp Thr Gly  
 35 40 45  
 Ile Thr Tyr Gln Ala Trp Gln Ala Gln Trp Asn Gln Ala Met Glu Asp  
 50 55 60  
 Leu Val Arg Ala Tyr His Ala Met Ser Ser Thr His Glu Ala Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Met Ala Met Met Ala Arg Asp Thr Ala Glu Ala Ala Lys Trp Gly Gly  
 85 90 95

<210> 4  
 <211> 294  
 <212> DNA  
 <213> M Tuberculosis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(294)

<400> 4  
 atg agc ctt ttg gat gct cat atc cca cag ttg gtg gcc tcc cag tcg 48  
 Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu Val Ala Ser Gln Ser  
 1 5 10 15  
 gcg ttt gcc gcc aag gcg ggg ctg atg cgg cac acg atc ggt cag gcc 96  
 Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His Thr Ile Gly Gln Ala  
 20 25 30  
 gag cag gcg gcg atg tcg gct cag gcg ttt cac cag ggg gag tcg tcg 144  
 Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His Gln Gly Glu Ser Ser  
 35 40 45  
 gcg gcg ttt cag gcc gcc cat gcc cgg ttt gtg gcg gcg gcc gcc aaa 192  
 Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val Ala Ala Ala Ala Lys  
 50 55 60  
 gtc aac acc ttg ttg gat gtc gcg cag gcg aat ctg ggt gag gcc gcc 240  
 Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn Leu Gly Glu Ala Ala  
 65 70 75 80  
 ggt acc tat gtg gcc gcc gat gct gcg gcc gcg tcg acc tat acc ggg 288  
 Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Thr Tyr Thr Gly  
 85 90 95  
 ttc tga 294  
 Phe \*

<210> 5  
 <211> 97  
 <212> PRT  
 <213> M Tuberculosis

<400> 5  
 Met Ser Leu Leu Asp Ala His Ile Pro Gln Leu Val Ala Ser Gln Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Phe Ala Ala Lys Ala Gly Leu Met Arg His Thr Ile Gly Gln Ala  
 20 25 30  
 Glu Gln Ala Ala Met Ser Ala Gln Ala Phe His Gln Gly Glu Ser Ser  
 35 40 45  
 Ala Ala Phe Gln Ala Ala His Ala Arg Phe Val Ala Ala Ala Lys  
 50 55 60  
 Val Asn Thr Leu Leu Asp Val Ala Gln Ala Asn Leu Gly Glu Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Thr Tyr Thr Gly  
 85 90 95  
 Phe

<210> 6  
 <211> 339  
 <212> DNA  
 <213> M Tuberculosis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(339)

<400> 6  
 ttg atc ccc ggt cgg atg gtg ctg aac tgg gaa gat ggc ctc aat gcc 48  
 Leu Ile Pro Gly Arg Met Val Leu Asn Trp Glu Asp Gly Leu Asn Ala  
 1 5 10 15  
 ctt gtt gcg gaa ggg att gag gcc atc gtg ttt cgt act tta ggc gat 96  
 Leu Val Ala Glu Gly Ile Glu Ala Ile Val Phe Arg Thr Leu Gly Asp  
 20 25 30  
 cag tgc tgg ttg tgg gag tcg ctg ctg ccc gac gag gtg cgc cga ctg 144  
 Gln Cys Trp Leu Trp Glu Ser Leu Leu Pro Asp Glu Val Arg Arg Leu  
 35 40 45  
 ccc gag gaa ctg gcc cgg gtg gac gca ttg ttg gac gat ccg gcg ttc 192  
 Pro Glu Glu Leu Ala Arg Val Asp Ala Leu Leu Asp Asp Pro Ala Phe  
 50 55 60  
 ttc gcc ccg ttc gtg ccg ttc ttc gac ccg cgc agg ggc cgg ccg tcg 240  
 Phe Ala Pro Phe Val Pro Phe Phe Asp Pro Arg Arg Gly Arg Pro Ser  
 65 70 75 80  
 acg ccg atg gag gtc tat ctg cag ttg atg ttt gtg aag ttc cgc tac 288  
 Thr Pro Met Glu Val Tyr Leu Gln Leu Met Phe Val Lys Phe Arg Tyr  
 85 90 95  
 cgg ctg ggc tat gag tcg ctg tgc cgg gag gtg gct gat tcg atc acc 336  
 Arg Leu Gly Tyr Glu Ser Leu Cys Arg Glu Val Ala Asp Ser Ile Thr  
 100 105 110  
 tga 339

<210> 7  
 <211> 112  
 <212> PRT

&lt;213&gt; M Tuberculosis

&lt;400&gt; 7

```

Met Ile Pro Gly Arg Met Val Leu Asn Trp Glu Asp Gly Leu Asn Ala
1           5           10           15
Leu Val Ala Glu Gly Ile Glu Ala Ile Val Phe Arg Thr Leu Gly Asp
20           25           30
Gln Cys Trp Leu Trp Glu Ser Leu Leu Pro Asp Glu Val Arg Arg Leu
35           40           45
Pro Glu Glu Leu Ala Arg Val Asp Ala Leu Leu Asp Asp Pro Ala Phe
50           55           60
Phe Ala Pro Phe Val Pro Phe Phe Asp Pro Arg Arg Gly Arg Pro Ser
65           70           75           80
Thr Pro Met Glu Val Tyr Leu Gln Leu Met Phe Val Lys Phe Arg Tyr
85           90           95
Arg Leu Gly Tyr Glu Ser Leu Cys Arg Glu Val Ala Asp Ser Ile Thr
100          105          110

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 285

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; M Tuberculosis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(285)

&lt;400&gt; 8

```

atg acc atc aac tat caa ttc ggg gac gtc gac gct cac ggc gcc atg      48
Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met
1           5           10           15

atc cgc gct cag gcc ggg tcg ctg gag gcc gag cat cag gcc atc att      96
Ile Arg Ala Gln Ala Gly Ser Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Ile
20           25           30

tct gat gtg ttg acc gcg agt gac ttt tgg ggc gcc ggt tcg gcg      144
Ser Asp Val Leu Thr Ala Ser Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Ala
35           40           45

gcc tgc cag ggg ttc att acc cag ctg ggc cgt aac ttc cag gtg atc      192
Ala Cys Gln Gly Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile
50           55           60

tac gag cag gcc aac gcc cac ggg cag aag gtg cag gct gcc ggc aac      240
Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn
65           70           75           80

aac atg gca caa acc gac agc gcc gtc ggc tcc agc tgg gcc taa      285
Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala *
85           90

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 94

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; M Tuberculosis

&lt;400&gt; 9

Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met  
 1 5 10 15  
 Ile Arg Ala Gln Ala Gly Leu Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val  
 20 25 30  
 Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Val  
 35 40 45  
 Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile  
 50 55 60  
 Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn  
 65 70 75 80  
 Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala  
 85 90

<210> 10  
 <211> 285  
 <212> DNA  
 <213> M Tuberculosis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(282)

<400> 10  
 atg acc atc aac tat cag ttc ggt gat gtc gac gct cat ggc gcc atg 48  
 Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met  
 1 5 10 15  
 atc cgc gct cag gcc ggg ttg ctg gag gcg gag cat cag gcc atc gtt 96  
 Ile Arg Ala Gln Ala Gly Leu Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val  
 20 25 30  
 cgt gat gtg ttg gcc gcg ggt gac ttt tgg ggc ggc gcc ggt tcg gtg 144  
 Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Val  
 35 40 45  
 gct tgc cag gag ttc att acc cag ttg ggc cgt aac ttc cag gtg atc 192  
 Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile  
 50 55 60  
 tac gag cag gcc aac gcc cac ggg cag aag gtg cag gct gcc ggc aac 240  
 Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn  
 65 70 75 80  
 aac atg gca caa acc gac agc gcc gtc ggc tcc agc tgg gcc 282  
 Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala  
 85 90  
 tga 285

<210> 11  
 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> M Tuberculosis

<400> 11  
 Met Thr Ile Asn Tyr Gln Phe Gly Asp Val Asp Ala His Gly Ala Met  
 1 5 10 15  
 Ile Arg Ala Gln Ala Gly Leu Leu Glu Ala Glu His Gln Ala Ile Val  
 20 25 30

Arg Asp Val Leu Ala Ala Gly Asp Phe Trp Gly Gly Ala Gly Ser Val  
 35 40 45  
 Ala Cys Gln Glu Phe Ile Thr Gln Leu Gly Arg Asn Phe Gln Val Ile  
 50 55 60  
 Tyr Glu Gln Ala Asn Ala His Gly Gln Lys Val Gln Ala Ala Gly Asn  
 65 70 75 80  
 Asn Met Ala Gln Thr Asp Ser Ala Val Gly Ser Ser Trp Ala  
 85 90

<210> 12  
 <211> 327  
 <212> DNA  
 <213> M Tuberculosis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(327)

<400> 12

gtg ctt ttg cct ctt ggt ccg cct ttg ccg ccc gac gcg gtg gtg gcg 48  
 Val Leu Leu Pro Leu Gly Pro Pro Leu Pro Pro Asp Ala Val Val Ala  
 1 5 10 15  
 aaa cgg gct gag tcg gga atg ctc ggc ggg ttg tcg gtt ccg ctc agc 96  
 Lys Arg Ala Glu Ser Gly Met Leu Gly Gly Leu Ser Val Pro Leu Ser  
 20 25 30  
 tgg gga gtg gct gtg cca ccc gat gat tat gac cac tgg gcg cct gcg 144  
 Trp Gly Val Ala Val Pro Pro Asp Asp Tyr Asp His Trp Ala Pro Ala  
 35 40 45  
 ccg gag gac ggc gcc gat gtc gat gtc cag gcg gcc gaa ggg gcg gac 192  
 Pro Glu Asp Gly Ala Asp Val Asp Val Gln Ala Ala Glu Gly Ala Asp  
 50 55 60  
 gca gag gcc gcg gcc atg gac gag tgg gat gag tgg cag gcg tgg aac 240  
 Ala Glu Ala Ala Ala Met Asp Glu Trp Asp Glu Trp Gln Ala Trp Asn  
 65 70 75 80  
 gag tgg gtg gcg gag aac gct gaa ccc cgc ttt gag gtg cca cgg agt 288  
 Glu Trp Val Ala Glu Asn Ala Glu Pro Arg Phe Glu Val Pro Arg Ser  
 85 90 95  
 agc agc agc gtg att ccg cat tct ccg gcg gcc ggc tag 327  
 Ser Ser Ser Val Ile Pro His Ser Pro Ala Ala Gly \*  
 100 105

<210> 13  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> M Tuberculosis

<400> 13

Met Leu Leu Pro Leu Gly Pro Pro Leu Pro Pro Asp Ala Val Val Ala  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Ala Glu Ser Gly Met Leu Gly Gly Leu Ser Val Pro Leu Ser  
 20 25 30  
 Trp Gly Val Ala Val Pro Pro Asp Asp Tyr Asp His Trp Ala Pro Ala

```

          35          40          45
Pro Glu Asp Gly Ala Asp Val Asp Val Gln Ala Ala Glu Gly Ala Asp
  50          55          60
Ala Glu Ala Ala Ala Met Asp Glu Trp Asp Glu Trp Gln Ala Trp Asn
  65          70          75          80
Glu Trp Val Ala Glu Asn Ala Glu Pro Arg Phe Glu Val Pro Arg Ser
          85          90          95
Ser Ser Ser Val Ile Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
          100          105

<210> 14
<211> 324
<212> DNA
<213> M Tuberculosis

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(324)

<400> 14
ttg acc cac aag cgc act aaa cgc cag cca gcc atc gcc gca ggg ctc      48
Leu Thr His Lys Arg Thr Lys Arg Gln Pro Ala Ile Ala Ala Gly Leu
  1          5          10          15

aac gcc ccg cgt cgg aat cgc gtt ggg cgg caa cat ggt tgg ccg gcc      96
Asn Ala Pro Arg Arg Asn Arg Val Gly Arg Gln His Gly Trp Pro Ala
          20          25          30

gac gtt ccg tcc gcc gag cag cgc cgc gcc caa cgg cag cgc gac ctc      144
Asp Val Pro Ser Ala Glu Gln Arg Arg Ala Gln Arg Gln Arg Asp Leu
          35          40          45

gag gct atc cgc cga gcg tac gcc gag atg gtg gcg aca tca cac gaa      192
Glu Ala Ile Arg Arg Ala Tyr Ala Glu Met Val Ala Thr Ser His Glu
  50          55          60

atc gac gac gac aca gcc gaa ctg gcg ctg ttg tcg atg cat ctc gac      240
Ile Asp Asp Asp Thr Ala Glu Leu Ala Leu Leu Ser Met His Leu Asp
  65          70          75          80

gat gag cag cgc cgg ctt gag gcg ggg atg aag ctc ggc tgg cat ccg      288
Asp Glu Gln Arg Arg Leu Glu Ala Gly Met Lys Leu Gly Trp His Pro
          85          90          95

tat cac ttc ccc gac gaa ccc gac agc aaa cag tga      324
Tyr His Phe Pro Asp Glu Pro Asp Ser Lys Gln *
          100          105

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> M Tuberculosis

<400> 15
Met Thr His Lys Arg Thr Lys Arg Gln Pro Ala Ile Ala Ala Gly Leu
  1          5          10          15
Asn Ala Pro Arg Arg Asn Arg Val Gly Arg Gln His Gly Trp Pro Ala
          20          25          30

```

```

Asp Val Pro Ser Ala Glu Gln Arg Arg Ala Gln Arg Gln Arg Asp Leu
      35                               40                               45
Glu Ala Ile Arg Arg Ala Tyr Ala Glu Met Val Ala Thr Ser His Glu
      50                               55                               60
Ile Asp Asp Asp Thr Ala Glu Leu Ala Leu Leu Ser Met His Leu Asp
      65                               70                               75                               80
Asp Glu Gln Arg Arg Leu Glu Ala Gly Met Lys Leu Gly Trp His Pro
      85                               90                               95
Tyr His Phe Pro Asp Glu Pro Asp Ser Lys Gln
      100                               105

<210> 16
<211> 246
<212> DNA
<213> M Tuberculosis

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(246)

<400> 16
atg agc ggc cac gcg ttg gct gct cgg acg ttg ctg gcc gcc gcg gac      48
Met Ser Gly His Ala Leu Ala Ala Arg Thr Leu Leu Ala Ala Ala Asp
      1                               5                               10                               15

gag ctt gtc ggc ggc ccg cca gtc gag gct tcg gcc gcc gcg ctg gcc      96
Glu Leu Val Gly Gly Pro Pro Val Glu Ala Ser Ala Ala Ala Leu Ala
      20                               25                               30

ggc gac gcc gcg ggc gca tgg cgg acc gcg gcc gtc gag ctt gcg cga      144
Gly Asp Ala Ala Gly Ala Trp Arg Thr Ala Ala Val Glu Leu Ala Arg
      35                               40                               45

gcg ttg gtc cgc gct gtg gcg gag tcg cac ggc gtc gcg gcc gtt ttg      192
Ala Leu Val Arg Ala Val Ala Glu Ser His Gly Val Ala Ala Val Leu
      50                               55                               60

ttc gcc gcg acg gcc gcc gcg gcg gcg gcc gtc gac cgg ggt gat ccg      240
Phe Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Val Asp Arg Gly Asp Pro
      65                               70                               75                               80

ccg tga      246
Pro *

```

```

<210> 17
<211> 81
<212> PRT
<213> M Tuberculosis

```

```

<400> 17
Met Ser Gly His Ala Leu Ala Ala Arg Thr Leu Leu Ala Ala Ala Asp
      1                               5                               10                               15
Glu Leu Val Gly Gly Pro Pro Val Glu Ala Ser Ala Ala Ala Leu Ala
      20                               25                               30
Gly Asp Ala Ala Gly Ala Trp Arg Thr Ala Ala Val Glu Leu Ala Arg
      35                               40                               45
Ala Leu Val Arg Ala Val Ala Glu Ser His Gly Val Ala Ala Val Leu

```



Val Asn Thr Leu Leu Asp Ile Ala Gln Ala Asn Leu Gly Glu Ala Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Thr Tyr Val Ala Ala Asp Ala Ala Ala Ser Ser Tyr Thr Gly  
 85 90 95  
 Phe

<210> 20  
 <211> 303  
 <212> DNA  
 <213> M Tuberculosis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(303)

<400> 20  
 atg aac gca gac ccc gtg ttg tcg tac aac ttt gac gcc atc gaa tac 48  
 Met Asn Ala Asp Pro Val Leu Ser Tyr Asn Phe Asp Ala Ile Glu Tyr  
 1 5 10 15  
 tcc gtt cgt cag gag atc cac acc acc gcg gcc cgt ttc aac gct gcg 96  
 Ser Val Arg Gln Glu Ile His Thr Thr Ala Ala Arg Phe Asn Ala Ala  
 20 25 30  
 ctg caa gag ctg agg tcg cag atc gcg ccg ttg cag cag ctc tgg aca 144  
 Leu Gln Glu Leu Arg Ser Gln Ile Ala Pro Leu Gln Gln Leu Trp Thr  
 35 40 45  
 cgg gaa gcg gcc gcc gcc tac cac gcg gag caa ctc aag tgg cac cag 192  
 Arg Glu Ala Ala Ala Ala Tyr His Ala Glu Gln Leu Lys Trp His Gln  
 50 55 60  
 gcg gcc agc gcg ctc aac gag atc ctg atc gac ttg gga aac gcg gtt 240  
 Ala Ala Ser Ala Leu Asn Glu Ile Leu Ile Asp Leu Gly Asn Ala Val  
 65 70 75 80  
 cgc cac ggt gcc gac gac gtg gcg cat gcc gac cgg cgg gcg gct gga 288  
 Arg His Gly Ala Asp Asp Val Ala His Ala Asp Arg Arg Ala Ala Gly  
 85 90 95  
 gct tgg gca cgc tag 303  
 Ala Trp Ala Arg \*  
 100

<210> 21  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> M Tuberculosis

<400> 21  
 Met Asn Ala Asp Pro Val Leu Ser Tyr Asn Phe Asp Ala Ile Glu Tyr  
 1 5 10 15  
 Ser Val Arg Gln Glu Ile His Thr Thr Ala Ala Arg Phe Asn Ala Ala  
 20 25 30  
 Leu Gln Glu Leu Arg Ser Gln Ile Ala Pro Leu Gln Gln Leu Trp Thr  
 35 40 45  
 Arg Glu Ala Ala Ala Ala Tyr His Ala Glu Gln Leu Lys Trp His Gln



Val Leu Leu Asp Val Ser Thr Pro Asn Thr Leu Asn Ala Asp Phe Asp  
 20 25 30  
 Leu Met Arg Ser Val Ala Gly Ile Thr Asp Ala Arg Asn Glu Glu Ile  
 35 40 45  
 Arg Ala Met Leu Gln Ala Phe Ile Gly Arg Met Ser Gly Val Pro Pro  
 50 55 60  
 Ser Val Trp Gly Gly Leu Ala Ala Ala Arg Phe Gln Asp Val Val Asp  
 65 70 75 80  
 Arg Trp Asn Ala Glu Ser Thr Arg Leu Tyr His Val Leu His Ala Ile  
 85 90 95  
 Ala Asp Thr Ile Arg His Asn Glu Ala Ala Leu Arg Glu Ala Gly Gln  
 100 105 110  
 Ile His Ala Arg His Ile Ala Ala Ala Gly Gly Asp Leu  
 115 120 125

<210> 24  
 <211> 288  
 <212> DNA  
 <213> M Tuberculosis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(288)

<400> 24  
 atg tca gat caa atc acg tat aac ccg gga gcc gta tcc gac ttc gct 48  
 Met Ser Asp Gln Ile Thr Tyr Asn Pro Gly Ala Val Ser Asp Phe Ala  
 1 5 10 15  
 tcc gac gtg ggc tcg cgc gcc ggc cag ctc cac atg att tac gaa gac 96  
 Ser Asp Val Gly Ser Arg Ala Gly Gln Leu His Met Ile Tyr Glu Asp  
 20 25 30  
 acc gcc agc aaa aca aat gcg ctg caa gag ttt ttc gcg ggc cac gcc 144  
 Thr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Leu Gln Glu Phe Phe Ala Gly His Gly  
 35 40 45  
 gcg caa ggg ttt ttc gac gcc cag gcg cag atg ctg tcg ggg ctg cag 192  
 Ala Gln Gly Phe Phe Asp Ala Gln Ala Gln Met Leu Ser Gly Leu Gln  
 50 55 60  
 ggg ctc att gag acg gtg ggt cag cat ggg act acc acc ggc cac gtg 240  
 Gly Leu Ile Glu Thr Val Gly Gln His Gly Thr Thr Thr Gly His Val  
 65 70 75 80  
 ctg gac aac gcg atc gga acc gac cag gcc atc gcg ggc ttg ttc taa 288  
 Leu Asp Asn Ala Ile Gly Thr Asp Gln Ala Ile Ala Gly Leu Phe \*  
 85 90 95

<210> 25  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> M Tuberculosis

<400> 25  
 Met Ser Asp Gln Ile Thr Tyr Asn Pro Gly Ala Val Ser Asp Phe Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Asp Val Gly Ser Arg Ala Gly Gln Leu His Met Ile Tyr Glu Asp

Thr Ala Ser 20 Thr Asn Ala Leu 25 Gln Glu Phe Phe Ala 30 Gly His Gly  
 35 Phe Phe Asp Ala Gln Ala Gln Met Leu Ser Gly Leu Gln  
 Ala Gln Gly 50 55 60  
 Gly Leu Ile Glu Thr Val Gly Gln His Gly Thr Thr Thr Gly His Val  
 65 70 75 80  
 Leu Asp Asn Ala Ile Gly Thr Asp Gln Ala Ile Ala Gly Leu Phe  
 85 90 95

<210> 26  
 <211> 324  
 <212> DNA  
 <213> M Tuberculosis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(324)

<400> 26  
 gtg gca gac aca att cag gta aca ccg cag atg ctg cgc agc acc gcc 48  
 Val Ala Asp Thr Ile Gln Val Thr Pro Gln Met Leu Arg Ser Thr Ala  
 1 5 10 15  
 aac gat atc cag gcg aat atg gag caa gcc atg gga atc gcc aag gcc 96  
 Asn Asp Ile Gln Ala Asn Met Glu Gln Ala Met Gly Ile Ala Lys Gly  
 20 25 30  
 tac cta gcc aac cag gaa aac gtc atg aac ccc gcc acc tgg tct ggt 144  
 Tyr Leu Ala Asn Gln Glu Asn Val Met Asn Pro Ala Thr Trp Ser Gly  
 35 40 45  
 acc ggc gtc gtt gct tcg cat atg aca gcc acc gag atc acc aat gaa 192  
 Thr Gly Val Val Ala Ser His Met Thr Ala Thr Glu Ile Thr Asn Glu  
 50 55 60  
 ttg aac aag gtc ctt acc ggg ggc acg cgc ctg gcc gag ggc ctc gtg 240  
 Leu Asn Lys Val Leu Thr Gly Gly Thr Arg Leu Ala Glu Gly Leu Val  
 65 70 75 80  
 cag gcc gca gcc ctg atg gag gga cac gag gcg gac tcg cag aca gcc 288  
 Gln Ala Ala Ala Leu Met Glu Gly His Glu Ala Asp Ser Gln Thr Ala  
 85 90 95  
 ttt cag gcg ctg ttc ggc gct agc cac gga tcc tga 324  
 Phe Gln Ala Leu Phe Gly Ala Ser His Gly Ser \*  
 100 105

<210> 27  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> M Tuberculosis

<400> 27  
 Met Ala Asp Thr Ile Gln Val Thr Pro Gln Met Leu Arg Ser Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Asn Asp Ile Gln Ala Asn Met Glu Gln Ala Met Gly Ile Ala Lys Gly  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Asn Gln Glu Asn Val Met Asn Pro Ala Thr Trp Ser Gly  
 35 40 45  
 Thr Gly Val Val Ala Ser His Met Thr Ala Thr Glu Ile Thr Asn Glu  
 50 55 60  
 Leu Asn Lys Val Leu Thr Gly Gly Thr Arg Leu Ala Glu Gly Leu Val  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Ala Ala Leu Met Glu Gly His Glu Ala Asp Ser Gln Thr Ala  
 85 90 95  
 Phe Gln Ala Leu Phe Gly Ala Ser His Gly Ser  
 100 105

<210> 28  
 <211> 273  
 <212> DNA  
 <213> M Tuberculosis

<220>  
 <221> CDS  
 <222> {1}... (273)

<400> 28  
 gtg gat ccg acc gtg ttg gct gat gcg gtg gcg cgg atg gcc gaa ttc 48  
 Val Asp Pro Thr Val Leu Ala Asp Ala Val Ala Arg Met Ala Glu Phe  
 1 5 10 15  
 ggt cgc cac gtc gag gag ctg gtc gcc gag att gag tcc ttg gtt acc 96  
 Gly Arg His Val Glu Glu Leu Val Ala Glu Ile Glu Ser Leu Val Thr  
 20 25 30  
 cgg ctg cat gtg acg tgg acg ggg gag ggc gcg gcg gct cat gct gag 144  
 Arg Leu His Val Thr Trp Thr Gly Glu Gly Ala Ala Ala His Ala Glu  
 35 40 45  
 gcg caa cga cat tgg gct gcc ggt gag gcg atg atg cgc cag gcg ttg 192  
 Ala Gln Arg His Trp Ala Ala Gly Glu Ala Met Met Arg Gln Ala Leu  
 50 55 60  
 gcc cag ctc acg gcc gcg ggg cag agc gcg cac gcc aac tac acc ggc 240  
 Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gly Gln Ser Ala His Ala Asn Tyr Thr Gly  
 65 70 75 80  
 gcg atg gcc acg aat ttg ggt atg tgg tcg tga 273  
 Ala Met Ala Thr Asn Leu Gly Met Trp Ser \*  
 85 90

<210> 29  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 <213> M Tuberculosis

<400> 29  
 Met Asp Pro Thr Val Leu Ala Asp Ala Val Ala Arg Met Ala Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Gly Arg His Val Glu Glu Leu Val Ala Glu Ile Glu Ser Leu Val Thr  
 20 25 30  
 Arg Leu His Val Thr Trp Thr Gly Glu Gly Ala Ala Ala His Ala Glu  
 35 40 45  
 Ala Gln Arg His Trp Ala Ala Gly Glu Ala Met Met Arg Gln Ala Leu

```

      50              55              60
Ala Gln Leu Thr Ala Ala Gly Gln Ser Ala His Ala Asn Tyr Thr Gly
65              70              75              80
Ala Met Ala Thr Asn Leu Gly Met Trp Ser
      85              90

<210> 30
<211> 312
<212> DNA
<213> M Tuberculosis

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(312)

<400> 30
atg ggt gcc gac gac acg ctg cgc gta gag cct gcg gtg atg cag ggt      48
Met Gly Ala Asp Asp Thr Leu Arg Val Glu Pro Ala Val Met Gln Gly
  1              5              10              15

ttc gcc gcg tcg ttg gat gga gcg gcc gag cat ctc gcg gtt caa ctg      96
Phe Ala Ala Ser Leu Asp Gly Ala Ala Glu His Leu Ala Val Gln Leu
      20              25              30

gcc gag ctg gac gct cag gtc ggg cag atg ttg ggc ggg tgg cgc ggg      144
Ala Glu Leu Asp Ala Gln Val Gly Gln Met Leu Gly Gly Trp Arg Gly
      35              40              45

gcg tcg ggc agt gcg tat ggc tcg gcg tgg gag cta tgg cat cgc ggg      192
Ala Ser Gly Ser Ala Tyr Gln Ser Ala Trp Glu Leu Trp His Arg Gly
  50              55              60

gcc ggt gag gtg cag ctg gga ttg tcg atg ctg gcg gcg gcg ata gct      240
Ala Gly Glu Val Gln Leu Gly Leu Ser Met Leu Ala Ala Ala Ile Ala
  65              70              75              80

cac gcc ggt gcg ggt tat caa cac aac gag acc gcg tcg gcg cag gtg      288
His Ala Gly Ala Gly Tyr Gln His Asn Glu Thr Ala Ser Ala Gln Val
      85              90              95

ctt cgt gag gtg ggc ggt ggc tga      312
Leu Arg Glu Val Gly Gly Gly *
      100

<210> 31
<211> 103
<212> PRT
<213> M Tuberculosis

<400> 31
Met Gly Ala Asp Asp Thr Leu Arg Val Glu Pro Ala Val Met Gln Gly
  1              5              10              15
Phe Ala Ala Ser Leu Asp Gly Ala Ala Glu His Leu Ala Val Gln Leu
      20              25              30
Ala Glu Leu Asp Ala Gln Val Gly Gln Met Leu Gly Gly Trp Arg Gly
      35              40              45
Ala Ser Gly Ser Ala Tyr Gly Ser Ala Trp Glu Leu Trp His Arg Gly
  50              55              60

Ala Gly Glu Val Gln Leu Gly Leu Ser Met Leu Ala Ala Ala Ile Ala
65              70              75              80
His Ala Gly Ala Gly Tyr Gln His Asn Glu Thr Ala Ser Ala Gln Val
      85              90              95
Leu Arg Glu Val Gly Gly Gly
      100

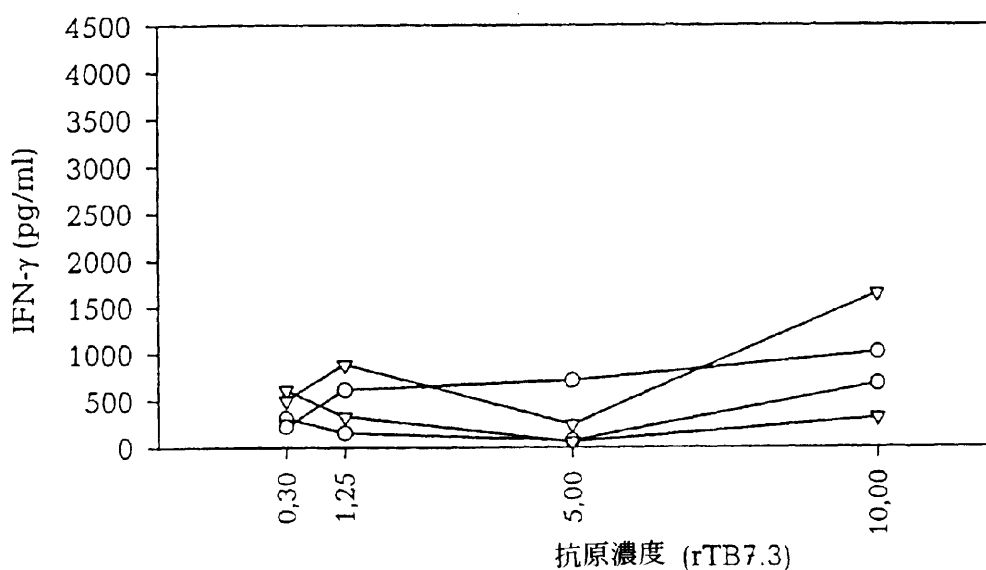
```


## 【図面の簡単な説明】

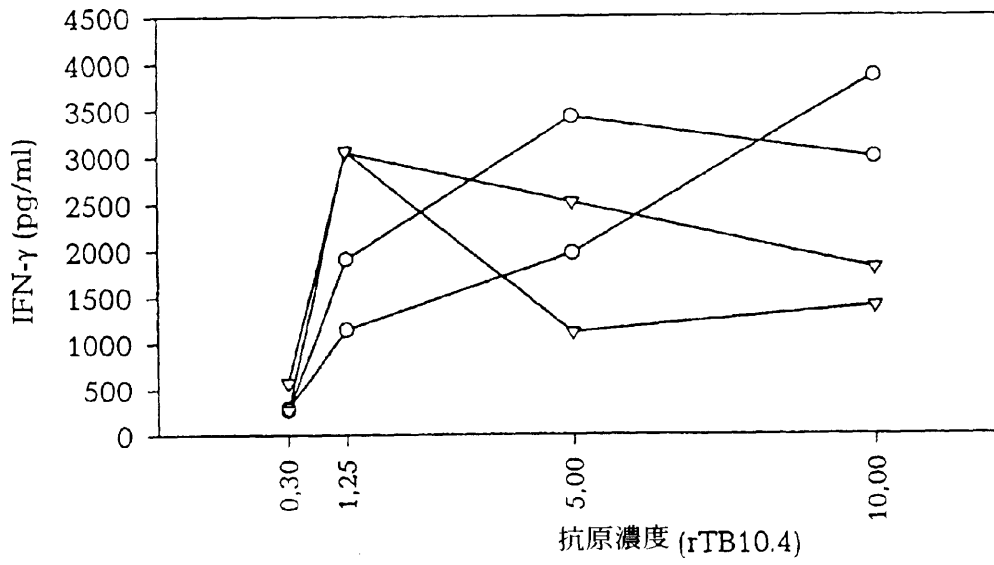
【図1】 rTB7.3、rTB10.4及びrCFP10に対するヒトリンパ球の応答。2人のヒトTB患者( )、及びrTB7.3 (A)、rTB10.4 (B)及びrCFP10 (C)の濃度を増していった、2人のBCGワクチン接種を受けた健康なヒトドナー( )由来のPBMCの刺激から得られたIFN- $\gamma$  応答。全てのIFN- $\gamma$  分析は、3つのウェルからプールした上清について2回行い、平均として示した。複数のウェルにおける偏差は、常に、平均の10%未満であった。50 pg/ml より下のIFN- $\gamma$  レベルを、陰性として考えた。


【図2】 異なるドナー群におけるエム.ツベルクローシスからの低質量抗原に対するIFN- $\gamma$  応答。7人の健康なワクチン接種を受けていないドナー、7人の健康な BCG ワクチンを受けたドナー及び17人の TB患者を、5  $\mu$ g/mlのST-CF又は組換え抗原で刺激した。個々の抗原特異的応答は、デルタ値(抗原刺激したウェルにおけるIFN- $\gamma$  放出 - 非刺激ウェルにおけるIFN- $\gamma$  放出)として示す。ST-CF: 短期間培養濾液、rTB7.3: Rv3221cの組み換え型、rTB10.4: Rv0288の組換え型、rCFP10: CFP10の組換え型、rESAT-6: ESAT-6の組換え型。

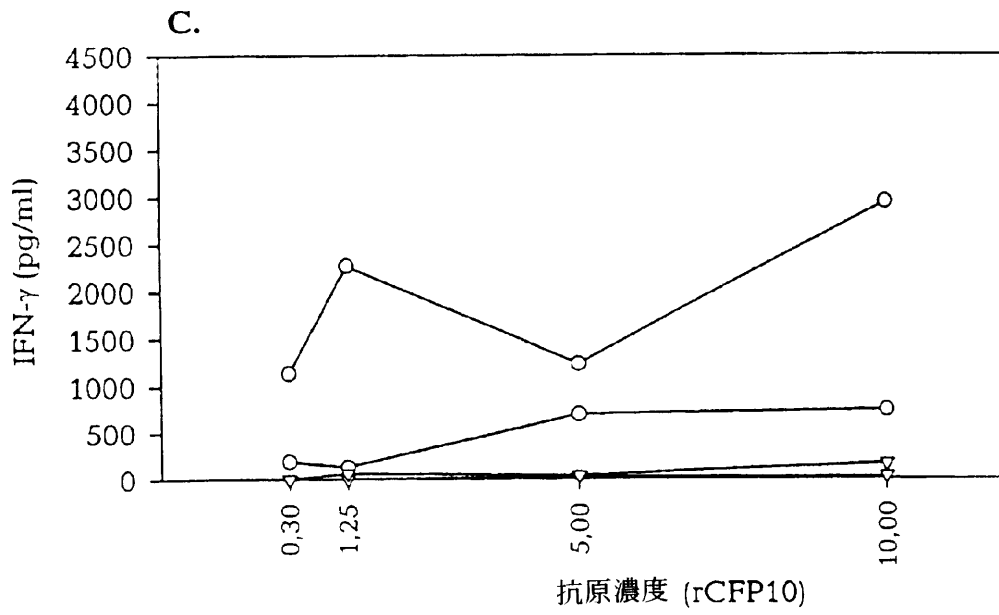
## 【図1 a】



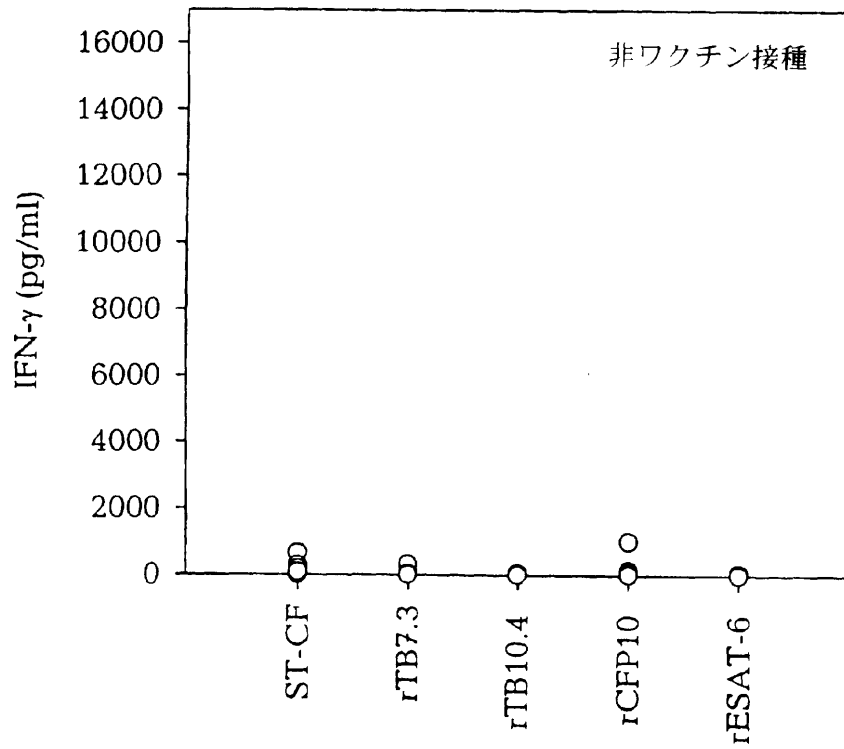
【 1 b】



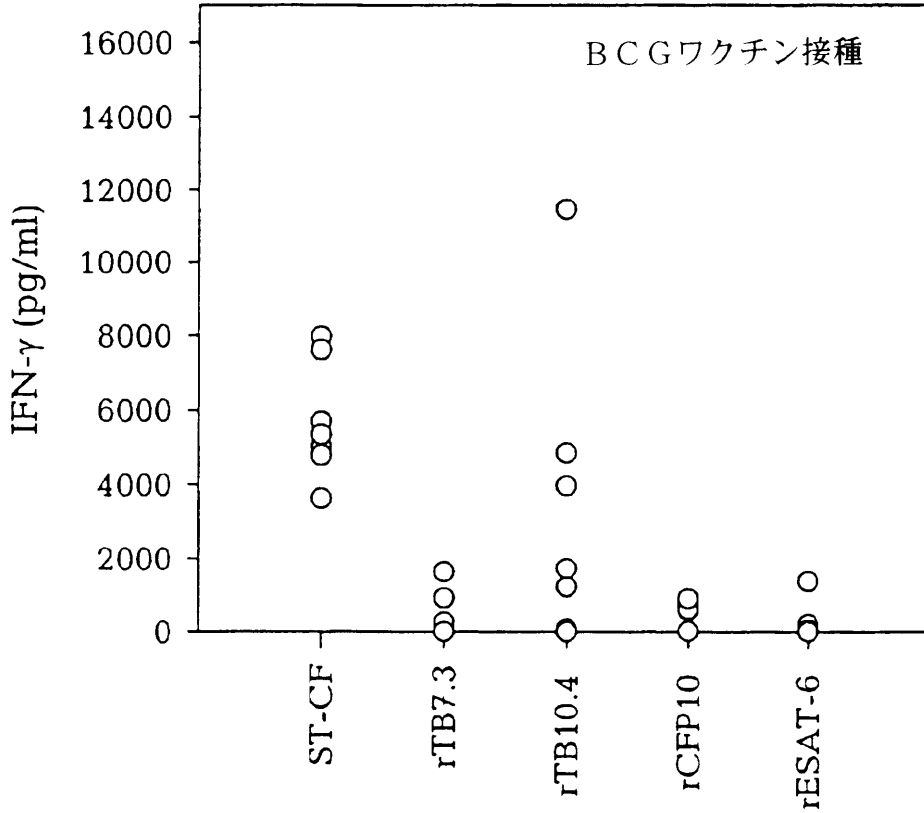
【 1 c】



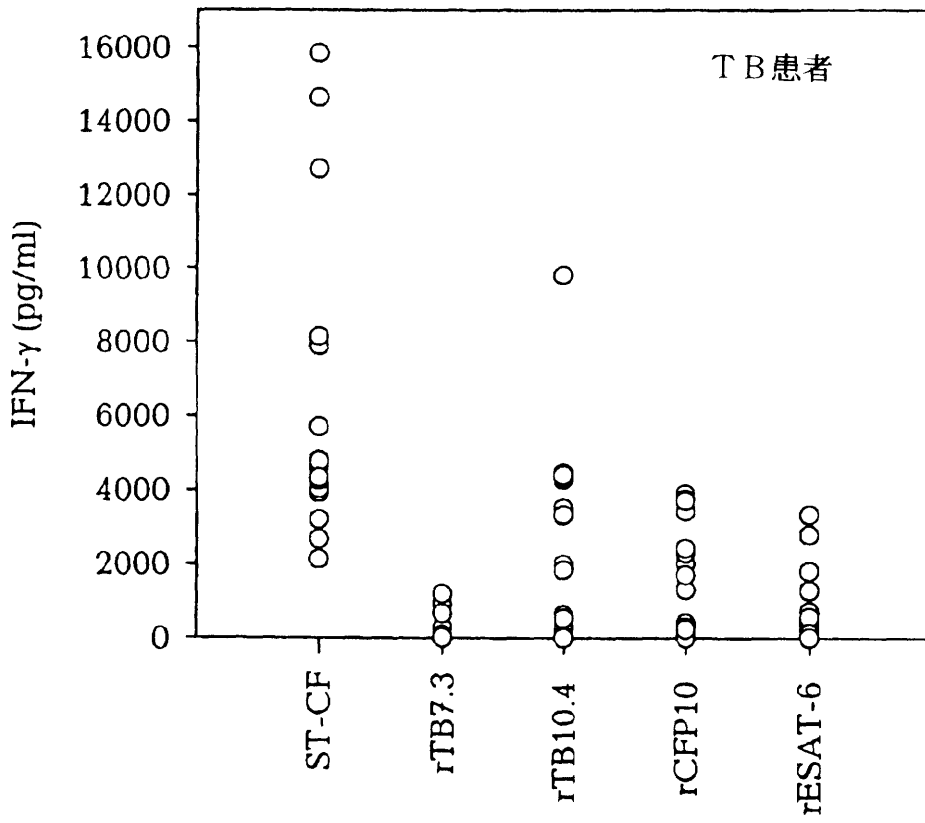
【図2 a】



【図2 b】



【図2c】



【**手続補正書**】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【**提出日**】平成13年8月7日(2001.8.7)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】明細書

【**補正対象項目名**】特許請求の範囲

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【**特許請求の範囲**】

【請求項1】 1) SEQ ID NO:7と少なくとも70%の配列同一性を有すると同時に、SEQ ID NO:7に免疫学的に等価なアミノ酸配列類似体；  
2) SEQ ID NO:7に示されるアミノ酸配列のT-細胞エピトープ；及び  
3) 2)のT-細胞エピトープと少なくとも70%の配列同一性を有すると同時に、SEQ ID NO:7と免疫学的に等価なアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなり、但しRv1036c及びRv3386が除かれる、実質的に純粋なポリペプチドフラグメント。

【請求項2】 本質的に純粋な形態である請求項1によるポリペプチドフラグメント。

【請求項3】 少なくとも7アミノ酸残基、例えば少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも22、少なくとも24及び少なくとも30アミノ酸残基長を有する前記請求項のいずれかによるポリペプチドフラグメント。

【請求項4】 いずれのシグナル配列も有しない前記請求項のいずれかによるポリペプチドフラグメント。

【請求項5】 1) SEQ ID NO:7と少なくとも70%の配列同一性を有すると同時に、SEQ ID NO:7に免疫学的に等価なアミノ酸配列類似体；  
2) SEQ ID NO:7に示されるアミノ酸配列のT-細胞エピトープ；及び  
3) 2)のT-細胞エピトープと少なくとも70%の配列同一性を有すると同時に、SEQ ID NO:7と免疫学的に等価なアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列及び少なくとも1つの融合パートナーが

らなる融合ポリペプチド。

【請求項6】 融合パートナーが、

- 1) SEQ ID NOs:7、13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドフラグメント；
- 2) SEQ ID NOs:7、13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有すると同時に、該配列に免疫学的に等価なアミノ酸配列類似体からなるポリペプチドフラグメント；
- 3) SEQ ID NOs:7、13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31に示すアミノ酸配列のT-細胞エピトープからなるポリペプチドフラグメント；
- 4) SEQ ID NOs:7、13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31に示すアミノ酸配列のT-細胞エピトープと少なくとも70%の配列同一性を有すると同時に、そのアミノ酸配列に免疫学的に等価なアミノ酸配列からなるポリペプチドフラグメント；及び
- 5) ESAT-6又はその少なくとも1つのT-細胞エピトープ、TB10.4又はその少なくとも1つのT-細胞エピトープ、及びMPT59又はその少なくとも1つのT-細胞エピトープのような、結核複合体に属する細菌由来のポリペプチドフラグメントからなる群から選択される請求項5による融合ポリペプチド。

【請求項7】 融合パートナーが、DnaK、GroEL、ウレアーゼ、グルタミンシンターゼ、プロリンリッチ複合体、L-アラニンデヒドロゲナーゼ、ホスフェート結合タンパク質、Ag 85複合体、HBHA（ヘパリン結合血球凝集素）、MPT51、スーパーオキシドジスムターゼ、19 kDaリポプロテイン、 $\alpha$ -クリスタリン、GroES及びMPT59からなる群から選択される請求項5による融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項8】 ポリペプチドの自己アジュバント作用を可能にするよう脂質化される前記請求項のいずれかによるポリペプチド。

【請求項9】 配列同一性が少なくとも80%、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%及び少なくとも99.5%である前記請求項のいずれかによ

るポリペプチドフラグメント。

【請求項10】 医薬に用いるための

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；
- Rv1036c；及び
- Rv3386

からなる群から選択される実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項11】 マイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコバクテリウム・アフリカヌム又はマイコバクテリウム・ボビスによって哺乳動物に引起こされる結核に対する診断又はワクチン接種用医薬組成物の製造における、

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；
- Rv1036c；及び
- Rv3386

からなる群から選択される実質的に純粋なポリペプチドの使用。

【請求項12】 - 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；

- Rv1036c；及び
- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドからなる免疫組成物。

【請求項13】 さらに、

- SEQ ID NO:13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31に示すアミノ酸配列；
- SEQ ID NO:13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31に示すアミノ酸配列と少なくとも70%の配列同一性を有すると同時に、該アミノ酸配列に免疫学的に等価な類似体；
- SEQ ID NO:13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31に示すアミノ酸配列のT-細胞エピトープ；及び
- SEQ ID NO:13、15、17、19、21、23、25、27、29又は31に示すアミノ酸配列のT-細胞エピトープと少なくとも70%の配列同一性を有すると同時に、該アミノ酸配列に免疫学的に等価なアミノ酸配列

からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる少なくとも1つのポリペプチ

ドフラグメントからなる請求項12による免疫組成物。

【請求項14】 さらに免疫学的かつ医薬的に許容される担体、ビヒクル又はアジュバントからなる請求項12又は13のいずれかによる免疫組成物。

【請求項15】 担体が、ポリペプチドが疎水性の非共有相互作用により結合するプラスチックのようなポリマー、例えばポリスチレン、ポリペプチドが共有結合する多糖及びポリペプチドのようなポリマー、例えばウシ血清アルブミン、オバルブミン又はキーホールリンペットヘモシアニンからなる群から選択され；ビヒクルが希釈剤及び懸濁剤からなる群から選択され；かつアジュバントがジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド(DDA)、Quil A、ポリI:C、フロイントの不完全アジュバント、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12、モノホスホリルリピドA (MPL) 及びムラミルジペプチド(MDP)からなる群から選択される請求項14による免疫組成物。

【請求項16】 少なくとも2つの異なるポリペプチドフラグメントからなり、異なるポリペプチドフラグメントが、それぞれ

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；
- Rv1036c；及び
- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドである請求項12～15のいずれかによる免疫組成物。

【請求項17】 3～20個の異なるポリペプチドフラグメントからなる請求項16による免疫組成物。

【請求項18】 ワクチンの形態である請求項12～17のいずれかによる免疫組成物。

【請求項19】 皮膚試験試薬の形態である請求項12～18のいずれかによる免疫組成物。

- 【請求項20】
- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；
  - Rv1036c；及び
  - Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドをエンコードするDNA配列からなる

少なくとも1つのDNAフラグメントのコピーが、微生物がポリペプチドを発現し、任意に分泌し得るように微生物ゲノムに導入されている非病原性微生物を有効成分として含むことからなる、結核複合体に属するマイコバクテリアによって引き起こされる結核に対する、ヒトを含む動物の免疫化用ワクチン。

【請求項21】 微生物が細菌である請求項20によるワクチン。

【請求項22】 細菌が、マイコバクテリウム、サルモネラ、シュードモナス及びエシェリキアの属からなる群から選択される請求項21によるワクチン。

【請求項23】 微生物が、マイコバクテリウム・ボビスBCG、例えばマイコバクテリウム・ボビスBCG株: Danish 1331である請求項22によるワクチン。

【請求項24】 - 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；

- Rv1036c；及び

- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドをエンコードするDNAフラグメントの少なくとも2つのコピーが、微生物のゲノム中に導入される請求項20～23のいずれかによるワクチン。

【請求項25】 コピー数が少なくとも5である請求項24によるワクチン

。

【請求項26】 検出手段と任意に組み合わせさせた、

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；

- Rv1036c；及び

- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドからなる、ヒトを含む動物における結核診断用組成物。

【請求項27】 1) SEQ ID NO:6に記載される配列を有する核酸配列からなり、  
2) 少なくとも10ヌクレオチド長を有し、かつSEQ ID NO:6に記載される配列又はそれに対する相補配列を有する核酸フラグメントと適度なストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、  
但し、W098/53075に記載されるSEQ ID NO:7及びS.T.Coleら(1998), Nature 393

(6685) 537-544に記載される核酸配列は除かれる、単離形態の核酸フラグメント。

【請求項28】 DNAフラグメントである請求項27による核酸フラグメント。

【請求項29】 医薬として用いるための、

- 1) SEQ ID NO:6に記載される配列を有する核酸配列からなり、
- 2) 少なくとも10ヌクレオチド長を有し、かつSEQ ID NO:6に記載される配列又はそれに対する相補配列を有する核酸フラグメントと適度なストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、

但し、W098/53075に記載されるSEQ ID NO:7は除かれる、核酸フラグメント

。

【請求項30】 マイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコバクテリウム・アフリカヌム又はマイコバクテリウム・ボビスによって起こされる結核に対する診断又はワクチン接種用の医薬組成物の製造における請求項27～29のいずれか1つによる核酸フラグメントの使用。

【請求項31】 ワクチンを投与したヒトを含む動物によって抗原をインビボで発現させ、発現される抗原の量が、ヒトを含む動物における結核複合体のマイコバクテリア感染に対する耐性を実質的に増大するのに有効な、請求項27～29のいずれか1つによる核酸フラグメントからなるワクチン。

【請求項32】 請求項27～29のいずれか1つによる核酸フラグメントからなる複製可能な発現ベクター。

【請求項33】 ウイルス、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド及びミニ染色体からなる群から選択される請求項32によるベクター。

【請求項34】 請求項32又は33による少なくとも1つのベクターを有する形質転換細胞。

【請求項35】 結核複合体に属する細菌、例えばエム・ツベルクローシスボビスBCG細胞である請求項34による形質転換細胞。

【請求項36】 - 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；  
- Rv1036c；及び

- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドを発現する、請求項34又は35による形質転換細胞。

【請求項37】 検出用手段と任意に組み合わせさせた、請求項27～29のいずれか1つによる核酸フラグメントからなる、ヒトを含む動物での結核の診断用組成物。

【請求項38】 1) SEQ ID NO:6に記載される配列を有する核酸配列からなり、

2) 少なくとも10ヌクレオチド長を有し、かつSEQ ID NO:6に記載される配列又はそれに対する相補配列を有する核酸フラグメントと適度なストリンジェントな条件下でハイブリダイズする

核酸フラグメントを、宿主細胞中で複製可能なベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入し、宿主細胞を、ポリペプチドの発現を行うのに十分な条件下、培養培地で培養し、かつ宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収するか、又は、

結核複合体の全マイコバクテリアから、又はその溶解物又はフラクション、例えば細胞壁含有フラクションから、ポリペプチドを単離するか、又は

固相又は液相のペプチド合成によってポリペプチドを合成することからなる

、

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；

- Rv1036c；及び

- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドの産生方法。

【請求項39】 - 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；

- Rv1036c；及び

- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドを調製し、合成又は単離し、かつワクチン用媒体にポリペプチドを可溶化又は分散し、任意に他のエム・ツベルクローシス抗原及び/又は担体、ビヒクル及び/又はアジュバント物質を加えるか、

又は

請求項34～36のいずれかによる細胞を培養し、ワクチン用媒体に細胞を移し、かつ担体、ビヒクル及び/又はアジュバント物質を任意に加えることからなる、請求項12～19のいずれかによる免疫組成物の産生方法。

【請求項40】 ヒトを含む動物に、

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；
- Rv1036c；及び
- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチド又は請求項19による免疫組成物を皮内注射することからなり、注射部位での陽性の皮膚応答が動物が結核を有していることを示し、注射部位での陰性の皮膚応答が動物が結核を有していないことを示す、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、マイコバクテリウム・アフリカヌム又はマイコバクテリウム・ボビスによって動物に起こされる結核の診断方法。

【請求項41】 ヒトを含む動物に、

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；
- Rv1036c；及び
- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチド、請求項18による免疫組成物又は請求項20～25のいずれかによるワクチンを投与することからなる、結核複合体に属するマイコバクテリアによって起こされる結核に対する動物の免疫化方法。

【請求項42】 ポリペプチド、免疫組成物又はワクチンが、非経口(例えば静脈内及び動脈内)、腹膜内、筋肉内、皮下、皮内、経口、頬、舌下、鼻、直腸又は経皮経路によって投与される請求項41による方法。

【請求項43】 動物又はヒト由来の血液試料を提供し、

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；
- Rv1036c；及び
- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドと動物由来の試料を接触させることから

なり、血液試料中の単核細胞による少なくとも 1つのサイトカインの細胞外相への有意な放出が、動物が感作されていることを示す、結核複合体に属する細菌での動物又はヒトでの過去もしくは現在の感作を診断する方法。

【請求項44】 イムノアッセイで

- 請求項1～9のいずれか1つによるポリペプチド；
- Rv1036c；及び
- Rv3386

からなる群から選択されるポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、又は該抗体の特異的な結合フラグメント。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Intern. Application No PCT/DK 00/00398
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/35 C07K19/00 A61K39/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 53076 A (CORIXA CORP) 26 November 1998 (1998-11-26) page 35 -page 36; claim 8 & Geneseq Ac = X01184 ---	1-44
X	WO 98 53075 A (CORIXA CORP) 26 November 1998 (1998-11-26) page 34 -page 35; claim 9 & Geneseq A = X01184 ---	1-44
X	COLE S T ET AL: "Deciphering the Biology of Mycobacterium Tuberculosis from the Complete Genome Sequence" NATURE, vol. 393, 1906 - 1998, pages 537-544, XP002901304 page 542, line 29 - line 33 & PIR2, G70624 ---	1-44
		-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 23 October 2000		Date of mailing of the international search report 24 01 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer P. Andersson/GH

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Nat. Application No PCT/DK 00/00398
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERTHET F-X ET AL: "A Mycobacterium Tuberculosis Operon Encoding ESAT-6 and a Novel Low-Molecularmass Culture Filtrate Protein (CFP-10)" MICROBIOLOGY, vol. 144, 1998, pages 3195-3203, XP002901305 table 3	1-44
A	--- SORENSEN A L ET AL: "Purification and Characterization of a Low-Molecular-Mass T-Cell Antigen Secreted by Mycobacterium Tuberculosis" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 5, May 1995 (1995-05), pages 1710-1717, XP002901306 page 1716, column 2, line 40 - line 43	1-44
A	--- HARBOE M ET AL: "B-Cell Epitopes and Quantification of the ESAT-6 Protein of Mycobacterium Tuberculosis" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 66, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 717-723, XP002901307 the whole document	1-44
A	--- POLLOCK J M ET AL: "Predominant Recognition of the ESAT-6 Protein in the First Phase of Infection with Mycobacterium Bovis in Cattle" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 65, no. 7, July 1997 (1997-07), pages 2587-2592, XP002901308 the whole document -----	1-44

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK 00/00398**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-44

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 7 and related items

## 2. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 13 and related items

## 3. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 15 and related items

## 4. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 17 and related items

## 5. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 19 and related items

## 6. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 21 and related items

## 7. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 23 and related items

## 8. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 25 and related items

## 9. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 27 and related items

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

10. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 29  
and related items

11. Claims: 1-44

Polypeptide comprising the amino acid sequence SEQ ID NO: 31  
and related items

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/DK 00/00398

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9853076 A	26-11-1998	AU 7591698 A	11-12-1998
		BR 9809443 A	13-06-2000
		NO 995690 A	18-01-2000
		PL 337333 A	14-08-2000
WO 9853075 A	26-11-1998	AU 7690798 A	11-12-1998
		BR 9809445 A	13-06-2000
		EP 1012293 A	28-06-2000
		NO 995689 A	18-01-2000
		PL 337330 A	14-08-2000

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>7</sup> (参考)	
A 6 1 K	39/39	A 6 1 P	31/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P	11/00	C 0 7 K	14/35	
	31/06		16/16	
C 0 7 K	14/35		19/00	
	16/16	C 1 2 N	1/21	
	19/00	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 N	1/21	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 Q	1/68		33/569	F
G 0 1 N	33/53		33/577	B
	33/569	C 1 2 P	21/08	
	33/577	C 1 2 R	1:32	
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 N	15/00	Z N A A
(C 1 2 N	1/21			A
C 1 2 R	1:32)			
(C 1 2 N	15/09			
C 1 2 R	1:32)			
(C 1 2 P	21/02			
C 1 2 R	1:32)			
(C 1 2 Q	1/68			
C 1 2 R	1:32)			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 スクジヨ, リッケ  
デンマーク、ディーケー - 2640 ヘデハウ  
ゼン、エル・エー・リングス ヴァンゲ  
17

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA50 CA04  
CA07 DA05 EA04 GA01 GA11  
HA01 HA14  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ01 QQ42  
QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62  
QR82 QS25 QS34 QS36 QX02  
4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19  
CA20 CC24 CE11 CE12 DA01  
DA13  
4B065 AA01X AA36Y AA90X AB01  
AB02 BA01 BA08 CA24 CA25  
CA45 CA46  
4C085 AA03 AA08 AA24 AA38 BA09  
CC07 DD33 DD86 EE03  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA41 CA11 EA31 EA50 FA34  
FA72 FA74 GA23 GA26

专利名称(译)	基于结核分枝杆菌esat-6基因家族的结核病疫苗和诊断方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003510018A</a>	公开(公告)日	2003-03-18
申请号	JP2001509760	申请日	2000-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	国立血清研究所		
申请(专利权)人(译)	Sutatenzu研究所塞勒姆		
[标]发明人	アンデルセン,ペーター スクジヨリツケ		
发明人	アンデルセン,ペーター スクジヨ,リツケ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/04 A61K39/385 A61K39/39 A61P11/00 A61P31/06 C07K14/35 C07K16/16 C07K19/00 C12N1/21 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 C12R1/32 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	A61K39/04 A61K39/385 A61K2039/523 A61K2039/53 A61K2039/6018 A61K2039/6031 A61K2039/6068 A61K2039/6081 A61K2039/6087 A61K2039/6093 A61P11/00 A61P31/06 C07K14/35 G01N2333/35 G01N2469/20		
FI分类号	A61K39/00.H A61K39/04 A61K39/385 A61K39/39 A61P11/00 A61P31/06 C07K14/35 C07K16/16 C07K19/00 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/569.F G01N33/577.B C12P21/08 C12R1/32 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA36Y 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/AA24 4C085/AA38 4C085/BA09 4C085/CC07 4C085/DD33 4C085/DD86 4C085/EE03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA26		
优先权	199901020 1999-07-13 DK 60/144011 1999-07-15 US		
其他公开文献	JP2003510018A5 JP5010079B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及由esat-6基因成员编码的氨基酸序列组成的多肽片段。esat-6基因家族的成员定义为编码小蛋白的基因，两个这样的基因在基因组上彼此相邻放置，并且至少一个基因产物是Rv3874，Rv3875或Rv0288。具有与以上任何一个至少15%相同的氨基酸序列。

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

~~\_\_\_\_\_~~

$$N_{ref}$$