

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-142079

(P2008-142079A)

(43) 公開日 平成20年6月26日(2008.6.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 3
C O 7 K 14/35 (2006.01)	C O 7 K 14/35	4 B O 6 4
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4

審査請求 有 請求項の数 35 O L (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-299636 (P2007-299636)	(71) 出願人	500226616
(22) 出願日	平成19年11月19日 (2007.11.19)		スタテンズ セーラム インスティテュート
(62) 分割の表示	特願平10-541074の分割		STATENS SERUM INSTITUT
原出願日	平成10年4月1日 (1998.4.1)		デンマーク国、コペンハーゲン エス デ
(31) 優先権主張番号	0376/97		ィーケー-2300、アルティレリバイ
(32) 優先日	平成9年4月2日 (1997.4.2)		5
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		Artillerivej 5, DK-2
(31) 優先権主張番号	60/044, 624		300 Copenhagen S DE
(32) 優先日	平成9年4月18日 (1997.4.18)		NMARK
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100065248
(31) 優先権主張番号	1277/97		弁理士 野河 信太郎
(32) 優先日	平成9年11月10日 (1997.11.10)		
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		
(31) 優先権主張番号	60/070, 488		
(32) 優先日	平成10年1月5日 (1998.1.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

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

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 結核菌に対するワクチンの成分として、あるいは結核菌感染の検出用診断組成物として有効な新規の抗原を提供する。

【解決手段】 結核菌タンパク質 E S A T - 6 (または M P T 5 9) 由来の T - 細胞エピトープを構成する少なくとも1つの範囲のアミノ酸を含む第一アミノ酸配列と、 E S A T - 6 (または M P T 5 9) とは異なる結核菌タンパク質由来の少なくとも1つの T - 細胞エピトープを含み、及び/又は生体内分解又は翻訳後プロセッシングから第一アミノ酸配列を保護するアミノ酸の範囲を含む第二アミノ酸配列とからなる融合ポリペプチドフラグメントからなる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1) 結核菌タンパク質ESAT-6由来のT-細胞エピトープを構成する少なくとも1つの範囲のアミノ酸を含む第一アミノ酸配列と、ESAT-6とは異なる結核菌タンパク質由来の少なくとも1つのT-細胞エピトープを含み、及び/又は生体内分解又は翻訳後プロセッシングから第一アミノ酸配列を保護するアミノ酸の範囲を含む第二アミノ酸配列、又は

2) 結核菌タンパク質MPT59由来のT-細胞エピトープを構成する少なくとも1つの範囲のアミノ酸を含む第一アミノ酸配列と、MPT59とは異なる結核菌タンパク質由来の少なくとも1つのT-細胞エピトープを含み、及び/又は生体内分解又は翻訳後プロセッシングから第一アミノ酸配列を保護するアミノ酸の範囲を含む第二アミノ酸配列
とからなる融合ポリペプチドフラグメント。

10

【請求項 2】

第一アミノ酸配列が、第二アミノ酸配列のC-末端又はN-末端に位置する請求項 1 に記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 3】

第二アミノ酸配列に含まれる少なくとも1つのT-細胞エピトープが、第一T-細胞エピトープがESAT-6 由来である場合にMPT59、及び第一T-細胞エピトープがMPT59由来である場合にESAT-6からなる群より選択される結核菌ポリペプチド由来である請求項 1 又は 2 に記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 4】

第一及び第二T-細胞エピトープが、

20

【化 1】

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}} \geq 1$$

[式中、 N_{dif} は整列している際の2つの配列中で同一でない残基の全数であり、 N_{ref} は1つの配列における残基数である]により算出して、由来タンパク質に天然に存在する配列と少なくとも70%の配列同一性をそれぞれ有する請求項 1 ~ 3 のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 5】

第一及び/又は第二アミノ酸配列が、

30

【化 2】

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}} \geq 1$$

[式中、 N_{dif} は整列している際の2つの配列中で同一でない残基の全数であり、 N_{ref} は1つの配列における残基数である]により算出して、由来タンパク質と少なくとも70%の配列同一性を有する請求項 1 ~ 4 のいずれか1つに記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6】

第一アミノ酸配列が ESAT-6 又はMPT59のアミノ酸配列であり、かつ第二アミノ酸配列が、第一アミノ酸配列がMPT59である場合にESAT-6、及び第一アミノ酸配列が ESAT-6である場合にMPT59から選択される結核菌のポリペプチドのアミノ酸配列である請求項 1 ~ 5 のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメント。

40

【請求項 7】

SEQ ID NO: 172又は173に示すアミノ酸配列からなる請求項 1 ~ 6 のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 8】

2つのアミノ酸配列間にリンカーが導入されていない請求項 7 に記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 9】

50

ポリペプチドの自己アジュバント作用を可能するように脂質化される請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 10】

ポリペプチドフラグメントが天然に結合している他のポリペプチド物質を多くて 5 重量 % 含む、医薬として用いるための請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントの調製物。

【請求項 11】

結核菌、マイコバクテリア・アフリカヌム又はマイコバクテリア・ボビスにより起こされる結核に対する診断又は予防接種用の医薬組成物の製造における請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントの使用。

10

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに定義する融合ポリペプチドフラグメントをエンコードする核酸配列からなるか、又はその相補的な核酸配列からなる単離形態の核酸フラグメント。

【請求項 13】

DNAフラグメントである請求項12に記載の核酸フラグメント。

【請求項 14】

ワクチンが、ワクチンを投与したヒトを含む動物により抗原を生体内で発現させ、抗原の発現量は、ヒトを含む動物での結核菌群のマイコバクテリア感染に耐性を増す効果を有する請求項12又は13に記載の核酸フラグメントからなるワクチン。

20

【請求項 15】

医薬として用いるための請求項12又は13に記載の核酸フラグメント。

【請求項 16】

結核菌、マイコバクテリア・アフリカヌム又はマイコバクテリア・ボビスにより起こされる結核に対する診断又は予防接種用の医薬組成物の製造における請求項12又は13に記載の核酸フラグメントの使用。

【請求項 17】

請求項1~9のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメントと、免疫的かつ医薬的に受容な担体、賦形剤又はアジュバントとからなる免疫組成物。

【請求項 18】

担体が、融合ポリペプチドフラグメントが疎水性の非共有相互作用で結合するポリマー、及び融合ポリペプチドフラグメントが共有結合するポリマーからなる群から選択され；賦形剤が、希釈剤及び懸濁剤からなる群から選択され；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)、キュイル A、ポリ 1:C、フロイント不完全アジュバント、IFN-、IL-2、IL-12、モノホスホリル脂質 A(MPL) 及びムラミルジペプチド(MDP) からなる群から選択される請求項17に記載の免疫組成物。

30

【請求項 19】

融合ポリペプチドフラグメントが疎水性の非共有相互作用で結合するポリマーが、プラスチックから選択され、融合ポリペプチドフラグメントが共有結合するポリマーが、多糖及びポリペプチドからなる群から選択される請求項18に記載の免疫組成物。

40

【請求項 20】

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 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントである請求項17~19のいずれか 1 つに記載の免疫組成物。

【請求項 21】

3 ~ 20 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 つに記載される融合ポリペプチドフラグメントである請求項20に記載の免疫組成物。

【請求項 22】

ワクチンの形態である請求項17~21のいずれか 1 つに記載の免疫組成物。

50

【請求項 2 3】

有効成分として非病原性微生物を含み、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントをエンコードする 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、微生物にポリペプチドを発現させ、任意に分泌させる様式で微生物ゲノムに挿入されている、結核菌群に属するマイコバクテリアで引き起こされる結核に対してヒトを含む動物を免疫化するためのワクチン。

【請求項 2 4】

微生物が、細菌である請求項 23 に記載のワクチン。

【請求項 2 5】

細菌が、マイコバクテリア、サルモネラ、シュードモナス及びエシェリキア属からなる群から選択される請求項 24 に記載のワクチン。

10

【請求項 2 6】

微生物が、マイコバクテリア・ボビス BCG である請求項 25 に記載のワクチン。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントをエンコードする DNA フラグメントの少なくとも 2 つのコピーが、微生物ゲノムに導入されている請求項 23 ~ 26 のいずれか 1 つに記載のワクチン。

【請求項 2 8】

コピー数が、少なくとも 5 である請求項 27 に記載のワクチン。

【請求項 2 9】

請求項 12、13 及び 15 のいずれか 1 項に記載の核酸フラグメントからなる複製可能な発現ベクター。

20

【請求項 3 0】

ウィルス、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド及びマイクロクロモソームからなる群から選択される請求項 29 に記載のベクター。

【請求項 3 1】

請求項 29 又は 30 に記載の少なくとも 1 つのベクターを有する形質転換細胞。

【請求項 3 2】

結核菌群に属する細菌である請求項 31 に記載の形質転換細胞。

【請求項 3 3】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントを発現する請求項 31 又は 32 に記載の形質転換細胞。

30

【請求項 3 4】

請求項 12 又は 13 に記載の核酸フラグメントを、宿主細胞で複製可能なベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞へ導入し、ポリペプチドを発現させるのに十分な条件下、培養培地で宿主細胞を培養し、宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収する；又は

短期培養液から請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つで定義する融合ポリペプチドフラグメントを単離する；又は

結核菌群の全マイコバクテリア又はその溶解物又は画分からポリペプチドを単離する；又は

40

固相又は液相ペプチド合成でポリペプチドを合成する

からなる請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントの産生方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントを製造、合成又は単離し、かつ

ワクチン用の培地に融合ポリペプチドフラグメントを可溶化又は分散させ、かつ

任意に他の結核菌抗原及び / 又は担体、賦形剤及び / 又はアジュバント物質を加えるか、又は

50

請求項31～33のいずれか1つに記載の細胞を培養し、かつ
ワクチン用の培地に細胞を移し、かつ
任意に担体、賦形剤及び/又はアジュバント物質を加える
ことからなる請求項17～22のいずれか1つに記載の免疫組成物の産生方法。

【請求項36】

請求項1～9のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメントと動物又はヒト由来の血液サンプルを接触させることからなり、血液サンプル中の単核細胞による細胞外相への少なくとも1つのサイトカインの顕著な放出は、動物が感作されていることを示す、動物又はヒトにおける結核菌群に属する細菌との現在又は過去の感作を診断するためのインビトロでの方法。

10

【請求項37】

請求項1～9のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメント又は請求項12もしくは13に記載の核酸フラグメントを、任意に検出用手段と組み合わせてなる、ヒトを含む動物での結核の診断用組成物。

【請求項38】

免疫アッセイで請求項1～9のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメントと特異的に反応するモノクローナル又はポリクローナル抗体、又は該抗体の特異的結合フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

発明の分野

本発明は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)由来で免疫学的に活性な幾つかの新規のポリペプチドフラグメント、免疫原性成分として該フラグメントを含むワクチン及び他の免疫性組成物、及び該ポリペプチドの産生方法ならびにその用途に関する。また、本発明は、本発明のポリペプチドフラグメントの製造又は結核菌感染の診断に有用な結核菌由来の新規の核酸フラグメントに関する。さらに、本発明は、ある融合ポリペプチド、特にESAT-6とMPT59の融合物に関する。

【背景技術】

【0002】

30

発明の背景

結核菌により引き起こされるヒトの結核(以下、「TB」で示す)は、WHOによれば、一年に約300万件の死亡原因となっている世界的に深刻な健康問題である。新しいTBの症例の世界的な発症率は、最近10年の間、徐々に減少しているが、ごく最近は、エイズの発生や多くの薬剤に耐性の結核菌株の出現により、この傾向が著しく変わってきている。

【0003】

臨床的な用途に現在利用可能な唯一のワクチンはBCGであり、有効なワクチンが議論の対象となっている。BCGは、一般的にTBの動物モデルにおいて高レベルな後天的耐性を誘導するが、開発途上国での数回のヒトの試験では、重要な防護を立証していない。特に、BCGは、合衆国での使用がFDAにより許可されていない。

40

このため、新規かつTBに対して改良されたワクチンの開発は緊急課題となっており、WHOによってかなり優先的に扱われている。防護的なマイコバクテリ物質を同定するための多くの試験がなされ、数人の研究者が、1950～1970年の間に実験的な予防接種後の耐性の増大を報告している。しかし、BCGの効力に対する特に長期間の防護的な免疫応答は、可溶性タンパク質又は細胞壁断片の投与によっても依然として立証されておらず、現在、短期培養液から誘導されたポリペプチド(後述参照)によって研究中である。

【0004】

結核菌に対する免疫性は、3つの基本的な特色で特徴づけられる。i)生細菌は、死菌製剤と対照的に防護的な免疫応答を有効に誘導する；ii)特異的な感作Tリンパ球は、この防護を媒介する；iii)もっとも重要な媒介分子は、インターフェロンガンマ(INF-)で

50

あると思われる。

【 0 0 0 5 】

短期培養液(ST-CF)は、液体培地で最初の数日成長させる間に結核菌から放出されるタンパク質の複合混合物である[Andersenら、1991]。培養液は、TB感染の第一相で宿主に認識される防護抗原を有していることが示唆されている[Andersenら、1991、Ormeら、1993]。幾つかの研究機関からの最近のデータにより、培養液の抗原をベースにする実験的なサブユニットワクチンは、TBに後天的な耐性を高レベルで生じることが立証されている[Pal及びHorwitz、1992；Robertsら、1995；Andersen、1994；Lindbladら、1997]。しかし、培養液は複雑なタンパク質混合物で、これまで、この防護的な免疫反応を果たす分子について利用可能な情報は非常に限られている。この点に関しては、2つの培養液抗原、つまり低質量抗原 ESAT-6 [Andersenら、1995及びEP-A-0 706 57 1号]及び31kDaのAg85B分子[EP-0 432 203]が免疫防護に関連して記載されているにすぎない。

10

【 0 0 0 6 】

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

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

発明の目的

20

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

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

発明の要約

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

30

40

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

【 0 0 0 9 】

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

【 0 0 1 0 】

50

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

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

【0011】

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

【0012】

【表 1】

抗原	N-末端 配列 SEQ ID NO:	ヌクレオチド配列 SEQ ID NO:	アミノ酸配列 SEQ ID NO:	
CFP7		1	2	
CFP7A	81	47	48	
CFP7B	168	146	147	
CFP8A	73	148	149	
CFP8B	74	150	151	
CFP9		3	4	
CFP10A	169	140	141	10
CFP11	170	142	143	
CFP16	79	63	64	
CFP17	17	5	6	
CFP19	82	49	50	
CFP19A		51	52	
CFP19B	80			
CFP20	18	7	8	
CFP21	19	9	10	
CFP22	20	11	12	
CFP22A	83	53	54	20
CFP23		55	56	
CFP23A	76			
CFP23B	75			
CFP25	21	13	14	
CFP25A	78	65	66	
CFP27	84	57	58	
CFP28	22			
CFP29	23	15	16	
CFP30A	85	59	60	
CFP30B	171	144	145	30
CFP50	86	61	62	
MPT51		41	42	
CWP32	77	152	153	
RD1-ORF8		67	68	
RD1-ORF2		71	72	
RD1-ORF9B		69	70	
RD1-ORF3		87	88	
RD1-ORF9A		93	94	
RD1-ORF4		89	90	
RD1-ORF5		91	92	
MPT59- ESAT6			172	40
ESAT6- MPT59			173	

【 0 0 1 3 】

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

【0014】

したがって、もっとも広い態様において、本発明は実質的に純粋なポリペプチドフラグメントに関し、

a) SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか1つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか1つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153及び168~171のいずれか1つで示される配列から選択されるアミノ酸配列からなり、

b) 少なくとも6アミノ酸残基の長さを有するa)で定義されるポリペプチドフラグメントのサブ配列であって、結核菌群(tuberculosis complex)に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引き起こす能力、又は結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示す、診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力に関して、a)で定義されるポリペプチドに免疫学的に等しい配列からなり、又は

c) a)に定義したポリペプチド又はb)で定義したサブ配列と少なくとも70%同一な配列を有し、同時に結核菌群に属するマイコバクテリアの感染に対する免疫防護応答を引き起こす能力、又は結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示す、診断上、顕著な免疫応答を引き出す能力に関して、a)で定義されるポリペプチドに免疫学的に等しいアミノ酸配列からなり、

但し、i) ポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO:2のアミノ酸配列1~96からなるか、又は -ガラクトシダーゼに融合するSEQ ID NO:4のアミノ酸配列87~108からなる際には、本質的に純粋形であり、

ii) c)における配列の同一性の程度が、ポリペプチドがSEQ ID NO:12のアミノ酸配列か、b)で定義するそのサブ配列を有するポリペプチドのホモログからなる際に、少なくとも95%であり、

iii) ポリペプチドフラグメントがSEQ ID NO:42の少なくとも6アミノ酸のアミノ酸配列からなる際に、SEQ ID NO:42の213の位置に相当するスレオニン残基を含む。

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

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

発明の詳細な説明

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

【0016】

この明細書で、「実質的に純粋なポリペプチドフラグメント」は、天然に結合している他のポリペプチド物質を、多くて5重量%(他のポリペプチド物質は、より低い%、例えば多くて4%、多くて3%、多くて2%、多くて1%及び多くて0.5%が好ましい)含むポリペプチド調製物を意味する。実質的に純粋なポリペプチドは、少なくとも96%純粋であることが好ましい。つまり、ポリペプチドは調製物中に存在する全ポリペプチド物質の少なくとも96重量%を構成し、より高い%であることが好ましく、例えば少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.25%、少なくとも99.5%及び少なくとも99.75%が好ましい。特に、ポリペプチドフラグメントは「本質的に純粋形」、つまり、ポリペプチドフラグメントは、天然に結合しているいずれの他の抗原も本質的になく

10

20

30

40

50

、結核菌群に属する細菌由来のいずれの他の抗原もないことが好ましい。これは、以下に詳細に記載するように、マイコバクテリアでない宿主細胞で組換え法によりポリペプチドフラグメントを調製するか、又は周知の固相あるいは液相ペプチド合成法（例えば、Merrifieldにより記載の方法やその変法）でポリペプチドフラグメントを合成してなされる。

【0017】

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

10

【0018】

「免疫学的に等しい」ポリペプチドに関しては、ワクチン又は診断剤（つまり、医薬的に受容な担体もしくは賦形剤及び任意のアジュバントと組合せて）に製剤化される際に、ポリペプチドが、ここで

20

1) 投与（単独、又は他の抗原と組合わせた免疫学的に活性な成分のいずれか）により、マウス及び/又はモルモット及び/又はヒトのような霊長類に、結核菌群に属する細菌感染に対して後天的に増した特異的な耐性を付与すること、

（その少なくとも20%がマイコバクテリア・ボビス BCGにより生じた後天的に増した耐性で、さらに少なくとも20%がSEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つからなる親ポリペプチド（親ポリペプチドは、図6に示した2DEゲルと実質的に同じ相対位置とパターンを有する。実施例参照）により生じる後天的に増した耐性であり、

30

後天的に増した耐性を、結核菌のビルレント株に実験的に感染させたマウスあるいはモルモットから単離した脾臓、肺又は他の器官のホモジネート由来のマイコバクテリア数の減少を計測するか、又はヒトのような霊長類では、プラセボもしくはBCGを受けた対照の群に対して予防接種した群で観察される臨床的な結核の進行に対する防護を測定することにより評価する（増大した抵抗性はより高く、マイコバクテリア・ボビス BCGにより誘発される免疫防護応答の少なくとも50%、例えば少なくとも60%に相当することが好ましく、マイコバクテリア・ボビス BCGにより誘発される免疫防護応答の少なくとも80%、例えば少なくとも90%が、さらに好ましい。増大した抵抗性が、マイコバクテリア・ボビス BCGにより生じる抵抗性を代替することが期待される場合には、抵抗性は、増大した抵抗性の少なくとも100%、例えば少なくとも110%であることが好ましい）、及び/又は

40

【0019】

11) 結核菌群に属するマイコバクテリア由来抗原での感作を過去あるいは現在示している哺乳類で、診断上、顕著な免疫応答を誘発する

（この診断上、顕著な免疫応答は、例えば皮膚試験で決定できる遅延型の過度感作反応の形態、又は例えば以下に詳述するIFN- γ アッセイで測定されるIFN- γ 放出の形態であってもよい。一連の皮膚試験で、診断上、顕著な反応は、少なくとも直径5mmで、少なくとも65%（好ましくは、少なくとも75%、例えば少なくとも85%）がSEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つからなる親ポリペプチドにより誘発さ

50

れる皮膚反応（皮膚反応直径として評価）を生じる反応であることを意味する。

【0020】

したがって、免疫性を増すポリペプチドフラグメントの能力は、予めポリペプチドで免疫化した後で結核菌群に属するマイコバクテリアのビルレント株に実験的に感染させた実験動物（例えば、マウス又モルモット）から単離した脾臓、肺又は他の器官のホモジネートからのマイコバクテリア数の減少を、同じビルレント株に感染させた実験動物（結核に対して予め免疫化していない）の対照群のマイコバクテリア数と比較して、実験動物で計測して評価することができる。マイコバクテリア数の比較は、マイコバクテリア・ボビス BCGで免疫化した後に同じビルレント株で実験的に感染させた実験動物群からのマイコバクテリアを計測して行ってもよい。

10

【0021】

本発明のポリペプチドフラグメントで免疫化した実験動物由来のホモジネート中のマイコバクテリア数は、マイコバクテリア・ボビス BCGで免疫化したマウス又はモルモットで多くて5倍の数で、例えば多くて3倍の数、好ましくは多くて2倍の数である。

【0022】

抵抗性を増す本発明のポリペプチドフラグメントの能力についてのより適切な評価は、一方の群が本発明の抗原を含む、ここに記載するワクチンを受けており、他方の群がプラセボもしくは他の公知の TB ワクチン（例えば BCG）のいずれかを受けている、2つ個体群（例えば、ヒト又は他の霊長類）での臨床的な結核の発症率の比較である。このような条件では、本発明の抗原は（当業者に公知の統計方法で測定されるように）プラセボの投与で生じるよりも著しく高い免疫防護を生じるはずである。

20

【0023】

「結核菌群」は通常の意味でTBを生じるマイコバクテリア菌群であり、結核菌、マイコバクテリア・ボビス、マイコバクテリア・ボビス BCG及びマイコバクテリア・アフリカヌム (*M.africanum*) がある。

【0024】

この明細書で、語「代謝しているマイコバクテリア」は、対数的に増殖し、培養されている培養培地にポリペプチドを放出している生きたマイコバクテリアを意味する。

語「配列の同一性」は、等しい長さの2つのアミノ酸配列又は2つのヌクレオチド配列間のホモロジーの程度の定量測定を示す。配列の同一性は、

30

【0025】

【化1】

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}} \quad 1$$

[式中、 N_{dif} は整列している際の2つの配列中で同一でない残基の全数であり、 N_{ref} は1つの配列における残基数である]として算出することができる。それ故、DNA配列 AGTCAGTCは、配列 AATCAATC と75%の配列の同一性を有するであろう ($N_{dif} = 2$ 、 $N_{ref} = 8$)。

【0026】

配列の同一性は、所定のポリペプチドのアミノ酸配列と SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つに示すアミノ酸配列との同一性の程度を例示するためにここで用いる。SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つに示すアミノ酸配列と比較されるアミノ酸配列は、例えば後述するハイブリダイゼーションで得られるDNA配列から推定するか、又は従来のアミノ酸配列法により得ることができる。配列の同一性は成熟ポリペプチドのアミノ酸配列について、つまり、いずれのり

40

50

ーダー配列も考慮せずに測定することが好ましい。

【0027】

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

【0028】

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

【0029】

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

【0030】

また、免疫応答のあいだに認識される関連したT-細胞エピトープを同定するために、「ブルートフォース(brute force)」法を使用することもできる。T-細胞エピトープは直鎖状であるので、SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つのポリペプチドの欠損変異体は、系統的に構築すると、例えばこれらの欠損変異体をここに記載するIFN- γ アッセイに付すことにより免疫認識に必要なポリペプチドの領域を示す。別の方法は、SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17~23いずれかの一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72~86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168~171のいずれか一つのポリペプチドから誘導される重複オリゴマー(好ましくは、例えば20アミノ酸残基の長さの合成物)を利用している。これらのなかには、IFN- γ アッセイで陽性の反応を生じるものと生じないものがあるであろう。

【0031】

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

T-細胞エピトープの最も小さい長さは少なくとも6アミノ酸であることが示されているが、このようなエピトープはより長い範囲のアミノ酸から構成されていることが普通であ

10

20

30

40

50

る。それ故、本発明のポリペプチドフラグメントは少なくとも7アミノ酸残基で、例えば少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも12、少なくとも14、少なくとも16、少なくとも18、少なくとも20、少なくとも22、少なくとも24及び少なくとも30のアミノ酸残基を有していることが好ましい。

【0032】

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

【0033】

別の好ましい具体例では、本発明のポリペプチドフラグメントは、いずれのシグナル配列もない。これは、ポリペプチドフラグメントが合成して産生される際に特に重要であるが、ポリペプチドフラグメントが組換えて産生される際には、通常、それらがペリプラズムや細胞外空間へ宿主細胞により輸送されないようにすることができる。ポリペプチドフラグメントは宿主細胞の破壊後に細胞質から従来法（以下、参照）で回収でき、ポリペプチドフラグメントの再生が必要な場合には一般的な再生方法（例えば、このような一般的に使用可能な再生法を記載する WO 94/18227号の開示参照）を用いることができる。

【0034】

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

【0035】

したがって、本発明の重要な具体例は、上記に定義されるポリペプチドフラグメントであって、

1)一次感染から2週間以内か、又はマウスを結核菌群に属するマイコバクテリアに再度実験的に感染させてから4日以内のマウスから回収した感作記憶T-リンパ球からのIFN- γ の放出を誘導し、

その誘導が約200,000個の脾臓細胞/mlを含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、ポリペプチドの添加により濃度が1~4 μ g ポリペプチド/ml懸濁液となり、IFN- γ の放出が懸濁液にポリペプチドを添加して2日後に回収した上清中のIFN- γ の測定により評価できる、及び/又は

【0036】

2)感染第1相のTB患者又はBCG予防接種した健康なドナー又はTB患者に接触している健康者から単離した約1,000,000個のヒトPBMC（末梢血液単核細胞）/mlから、バックグラウンドよりも少なくとも1,500pg/ml上のレベルでIFN- γ の放出を誘導し、

その誘導が約1,000,000個のPBMC/mlを含む懸濁液にポリペプチドを添加して行われ、

ポリペプチドの添加により濃度が1～4 µg ポリペプチド/ml懸濁液となり、IFN- の放出が懸濁液にポリペプチドを添加して2日後に回収した上清中のIFN- の測定により評価できる、及び/又は

【0037】

3)結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作した動物由来のウシPBMCからIFN- の放出を誘導し、その放出が結核菌群に属するマイコバクテリアで予め感作していない動物由来のウシPBMCから観察される放出の少なくとも2倍である。

【0038】

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

10

【0039】

本発明のポリペプチドフラグメントは、SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、17～23のいずれか一つ、42、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72～86のいずれか一つ、88、90、92、94、141、143、145、147、149、151、153又は168～171のいずれか一つと70%より高い配列の同一性を有する、少なくとも6アミノ酸残基の長さのアミノ酸配列からなることが好ましい。配列の同一性の最小割合は少なくとも80%、例えば少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%及び少なくとも99.5%であることが好ましい。

20

【0040】

上述のとおり、本発明のポリペプチドフラグメントからリーダー配列を省くことは、通常、重要であろう。しかし、融合ポリペプチドの産生により、本発明のポリペプチドフラグメントは、より良好に特徴づけることができる。例えば、組換えて産生される際にポリペプチドの輸送を容易にする融合パートナー(partner)、ポリペプチドの精製を容易にする融合パートナー及び本発明のポリペプチドフラグメントの免疫原性を高める融合パートナーは全て重要である可能性がある。したがって、本発明は、少なくとも1つの上記ポリペプチドフラグメントと少なくとも1つの融合パートナーからなる融合ポリペプチドにも関する。免疫原性を増すためには、融合パートナーは、例えば(関連するエピトープを多重発現できるように)上記の別のポリペプチドフラグメント及び結核菌群に属する細菌由来の他のポリペプチド(例えば、ESAT-6、MPB64、MPT64及びMPB59)又はこれらの抗原のいずれかに対する少なくとも1つのT-細胞エピトープからなる群から選択できる。融合パートナーとして役立つことができる他の免疫原性を高めるポリペプチドは、T-細胞エピトープ(例えば、ポリペプチドESAT-6、MPB64、MPT64又はMPB59由来)又は標的の遺伝子産物の免疫原性を高める他の免疫原性エピトープ(例えば、IFN-、IL-2及びIL-12のようなリンホカイン)である。発現及び/又は精製を容易にするためには、融合パートナーは、例えば細菌の線毛タンパク質、例えばピリン線毛成分及びpapA;タンパク質A;ZZ-ペプチド(ZZ-融合物は、スウェーデンのPharmaciaより市販されている);マルトース結合タンパク質;グルタチオンS-トランスフェラーゼ; -ガラクトシダーゼ;又はポリヒスチジンであってもよい。

30

40

【0041】

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

50

。

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

現在はMPT59とESAT6の融合作用が研究されているにすぎないが、ESAT6とMPT59又はそれら由来のエピトープは、融合構築物の全体的な免疫原性に対し実質的に同じ作用を有する他の融合パートナーに有利に融合させることができると考えられる。それ故、本発明の融合ポリペプチドフラグメントは、第二アミノ酸配列に含まれる少なくとも1つのT-細胞エピトープが、上記及び実施例に記載される本発明のポリペプチドフラグメントからなる群から選択される結核菌ポリペプチド(「親」ポリペプチド)に由来するか、又はアミノ酸配列が結核菌タンパク質DnaK、GroEL、ウレアーゼ、グルタミンシンセターゼ、プロリンリッチ複合体、L-アラニンデヒドロゲナーゼ、ホスフェート結合タンパク質、Ag 85複合体、HBHA(ヘパリン結合血球凝集素)、MPT51、MPT64、スーパーオキシドジスムターゼ、19kDaリポタンパク質、 α -クリスタリン、GroES、MPT59(第一アミノ酸配列がESAT-6由来である場合)及びESAT-6(第一アミノ酸配列がMPT59由来である場合)のいずれか1つに由来するものが好ましい。第一及び第二T-細胞エピトープは、由来タンパク質中の天然に存在する配列と少なくとも70%の配列同一性をそれぞれ有することが好ましく、第一及び/又は第二アミノ酸配列は、由来タンパク質と少なくとも70%の配列同一性を有することがさらに好ましい。この融合ポリペプチドのもっとも好ましい具体例は、第一アミノ酸配列がESAT-6又はMPT59のアミノ酸配列であり、及び/又は第二アミノ酸配列が上記の潜在的な「親」ポリペプチドのアミノ酸配列の全長であるポリペプチドである。

【0045】

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

【0046】

本発明の別の部分は、

- 1)上記のポリペプチド又は融合ポリペプチドをエンコードする核酸配列からなるか、又はその相補的な核酸配列からなり、及び/又は
- 2)少なくとも10ヌクレオチドの長さを有し、

【0047】

10

20

30

40

【化 2】

SEQ ID NO: 1	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 3	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 5	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 7	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 9	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 11	又はその相補鎖、	10
SEQ ID NO: 13	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 15	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 41	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 47	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 49	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 51	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 53	又はその相補鎖、	20
SEQ ID NO: 55	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 57	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 59	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 61	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 63	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 65	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 67	又はその相補鎖、	30
SEQ ID NO: 69	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 71	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 87	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 89	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 91	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 93	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 140	又はその相補鎖、	40
SEQ ID NO: 142	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 144	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 146	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 148	又はその相補鎖、	
SEQ ID NO: 150	又はその相補鎖及び	
SEQ ID NO: 152	又はその相補鎖	

【0048】

から選択されるヌクレオチド配列を有する核酸フラグメントと、ストリンジェントなハイ 50

ブリダイゼーション条件（当該分野で定義のとおり、つまり融解温度 T_m の 5 ~ 10 下、Sambrookら、1989、11.45-11.49頁参照）下で容易にハイブリダイズし、

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

【0049】

核酸フラグメントは、DNAフラグメントであることが好ましい。

【0050】

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

【0051】

それ故、語「サブ配列」は、本発明の核酸フラグメントに関して用いる際に、上記のハイブリダイゼーションパターンを示す少なくとも10ヌクレオチドの連続的な範囲を示すことが意図される。このため、最低でも、SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、12、15、21、41、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、87、89、91、93、140、142、144、146、148、150又は152を有するハイブリダイゼーションパートナーのサブ配列との配列同一性が少なくとも70%であることが、通常、必要となるであろう。核酸フラグメントは10ヌクレオチドより長く、例えば少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70及び少なくとも80ヌクレオチドの長さであることが好ましい。また、配列同一性は70%より高く、例えば少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%及び少なくとも98%であることが好ましい。配列同一性は100%であることが、

【0052】

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

【0053】

修飾されるヌクレオチド配列は、上記のcDNA又はゲノム由来でもよいが、合成由来であ

10

20

30

40

50

ってもよい。さらに、配列は、上述のとおり混合したcDNAならびにゲノム、混合したcDNAならびに合成物又はゲノム、及び合成物由来でもよい。配列は、例えば部位特異的突然変異で修飾し、所望のポリペプチドをエンコードする所望の核酸フラグメントを生じてもよい。ポリペプチドをエンコードする核酸の修飾に焦点をしばった以下の記載は、このような可能性、ならびに2以上のDNAフラグメントを結合して所望の核酸フラグメント及び上記主題の組合せを生じる核酸構築の可能性も含むものと理解されるべきである。

【0054】

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

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

10

【0055】

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

20

【0056】

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

【0057】

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

30

【0058】

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

40

【0059】

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

ベクターは、組換えDNA方法に便利に付すことができるいずれのベクターでもよく、ベ

50

クターの選択は、しばしばベクターが導入される宿主細胞による。したがって、ベクターは、その複製が染色体の複製から独立した自律複製ベクター（つまり、染色体外の単位として存在するベクター）であってもよい。このようなベクターの例は、プラスミド、ファージ、コスミド、ミニ-クロモソーム又はウイルスである。また、ベクターは、宿主細胞に導入される際に宿主ゲノムに組込まれ、組み込まれた染色体とともに複製されるベクターでもよい。

【0060】

発現ベクターは、ここに開示する DNAセグメントのいずれかを含むように構築してもよい。そのようなDNAは、マイコバクテリアのビルレント株に特異的な抗原性タンパク質又はサンプル中のマイコバクテリア核酸の検出用ハイブリダイゼーションプローブをエンコードしていてもよい。所望の抗原性タンパク質によって、長い又は短いDNAセグメントを用いることができる。開示されるDNAで発現又はエンコードされるタンパク質のエピトープ領域は、DNAの比較的短いセグメントとして含まれることができる。広範囲な発現ベクターは、例えば異種遺伝子産物及び/又は耐性遺伝子、例えば形質転換細胞の同定に有用な抗生物質耐性遺伝子の同定に有用なレポーター遺伝子産物をエンコードするDNAセグメントを含んでいてもよい。

10

【0061】

本発明のベクターを細胞の形質転換に用いて、本発明の核酸フラグメントを増殖させたり、本発明のポリペプチドフラグメントを発現させることができる。それ故、本発明は、本発明のベクターを少なくとも1つ有する形質転換細胞（その中に含まれる本発明のベクター及び/又は核酸フラグメントを天然に有しない細胞）にも関する。このような形質転換細胞（本発明の一部でもある）は、いずれかの適切な細菌の宿主細胞又はいずれかの他のタイプの細胞（例えば、単核真核生物、真菌もしくは酵母）又は多細胞生物（例えば動物や植物）由来細胞であってもよい。特に、タンパク質のグリコシル化は原核生物では珍しい事象であるが、グリコシル化が望ましい場合には哺乳類細胞が用いられる。しかし、通常は、例えばマイコバクテリア、サルモネラ (*Salmonella*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、バシラス (*Bacillus*) 及びエシェリキア (*Escherichia*) 属に属する細菌のような原核細胞が好ましい。形質転換細胞は、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌 (*B. subtilis*) 又はマイコバクテリア・ボビス BCG細胞が好ましく、形質転換細胞が、本発明のポリペプチドを発現することが特に好ましい。後者によって、本発明のポリペプチドが、形質転換細胞を含む培養液から単に回収することで産生できる可能性が増す。この発明の部分のもっとも好ましい具体例では、形質転換細胞はマイコバクテリア・ボビス BCG株のダニシュ (*Danish*) 1331、つまりデンマーク、コペンハーゲンの BCG研究所 (*Statens Seruminstitut*) からのマイコバクテリア・ボビス株コペンハーゲンである。

20

30

【0062】

本発明の核酸フラグメントは、本発明のポリペプチドフラグメントの組換え体を産生できる。しかし、ペプチド合成としてのポリペプチドフラグメントの提供方法は、天然源からの単離でもよい。

【0063】

したがって、本発明は、宿主細胞で複製可能なベクターに上記の核酸フラグメントを挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞に導入し（形質転換細胞は、分化ハイブリダイゼーション、融合レポーター遺伝子産物の同定、耐性マーカー、抗-抗原抗体などでのスクリーニングを含む様々な技術を用いて選択できる）、ポリペプチドの発現を生じるのに十分な条件下、培養培地で宿主細胞を培養（当然、細胞は環境に適切な条件下で培養でき、DNAが望ましい場合には複製条件が用いられる）し、宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収するか；又は
請求項1に記載の短期培養液からポリペプチドを単離するか；又は
結核菌群の全マイコバクテリア又はその溶解物もしくは画分（例えば、細胞壁含有画分）からポリペプチドを単離するか；又は
固相又は液相ペプチド合成でポリペプチドを合成する

40

50

ことからなる本発明のポリペプチドフラグメントの製造方法にも関する。

【0064】

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

【0065】

一般に、本発明の核酸配列の初期クローニングと本発明に有用なベクターの構築には、原核生物が好ましい。例えば、以下のより詳細に記載する特定の株に加えて、一例として大腸菌 K12 株 294 (ATCC No. 31446)、大腸菌 B 及び大腸菌 X 1776 (ATCC No. 31537) のような株が挙げられる。これらの例は当然に本発明の例示であり、限定するものではない。

【0066】

発現にも、原核生物が好ましい。上記の株ならびに大腸菌 W3110 (F⁻、ラムダ⁻、原栄養性、ATCC No. 273325)、枯草菌のような桿菌又はサルモネラ・ティフィムリウム (*S. typhimurium*) もしくはセラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*) のような他の腸内細菌及び様々なシュードモナス種を用いることができる。特に、成長の早いマイコバクテリア、例えばマイコバクテリア・スメグマ (*M. smegmatis*) は結核菌群のマイコバクテリアと高度に類似し、それ故に発現産物の翻訳後修飾を行う必要を減じる可能性があるため、重要である。

【0067】

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

【0068】

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

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

ある態様において、この発明で提供される DNA 配列情報により、マイコバクテリア遺伝

10

20

30

40

50

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

【0072】

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

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

上記のとおり、本発明のポリペプチドフラグメントは、結核菌群に属する代謝しているビルレントマイコバクテリアを含む培養培地で細胞外に存在するため、又はこのような細胞外抗原とホモロジーが高いため、又はマイコバクテリア・ボビス BCGに存在しないために、ワクチンの構成要素又は免疫診断剤の構成要素として優れている可能性がある。

【0076】

したがって、本発明の別の態様は、本発明のポリペプチド又は融合ポリペプチドからなる免疫性組成物に関する。このような免疫性組成物の能力を確実に最適化するためには、免疫学的かつ医薬的に受容な担体、賦形剤又はアジュバントを含むことが好ましい。

適切な担体は、ポリペプチド（類）が疎水性の非共有相互作用で結合するポリマー（例えばポリスチレンのようなプラスチック）、又はポリペプチド（類）が共有結合するポリマー（例えば多糖又はポリペプチド（例えば、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン又はキーホールリンペット（keyhole limpet）ヘモシアニン））からなる群から選択される。適切な賦形剤は、希釈剤及び懸濁剤からなる群から選択される。アジュバントは、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド（DDA）、キュイル（Quil）A、ポリ I:C、フロイント不完全アジュバント、IFN-、IL-2、IL-12、モノホスホリル脂質 A（MPL）及びムラミル

10

20

30

40

50

ジペプチド(MDP) からなる群から選択することが好ましい。

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

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

【0080】

ワクチンは、通常、非経口、例えば皮下又は筋肉内のいずれかの注射により投与される。他の投与様式に適切な別の製剤には座薬が含まれ、経口製剤が含まれる場合がある。座薬には、伝統的な結合剤及び担体、例えばポリアルカレングリコール又はトリグリセリドが含まれていてもよい。このような座薬は0.5~10%、好ましくは1~2%の範囲で活性成分を含む混合物から形成してもよい。経口製剤は、このような通常用いられる賦形剤、例えば医薬グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。これらの組成物は溶液、懸濁剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、継続放出製剤又は粉末形態であり、10~95%、好ましくは25~70%の活性成分を含む。

【0081】

タンパク質は、中性又は塩の形態としてワクチンに製剤化できる。医薬的に受容な塩は、酸付加塩(ペプチドの遊離のアミノ基とともに形成される)を含む。酸付加塩は、無機酸(例えば塩酸もしくはリン酸)又はオキサリ酢酸、酒石酸、マンデル酸のような有機酸などとともに形成される。遊離のカルボキシル基とともに形成される塩は、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム又は水酸化鉄のような無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインのような有機塩基などに由来してもよい。

【0082】

ワクチンは、服用製剤に適合する様式で、治療上、有効かつ免疫原性であるような量で投与される。投与量は、処置すべき対象(例えば、免疫応答を増すための個々の免疫系の能力を含む)及び望まれる保護の程度による。投与範囲は、予防接種1回当たりに数100の微生物活性成分のオーダーが適切であり、約0.1~1000µgの範囲、例えば約1~300µgの範囲が好ましく、特に約10~50µgの範囲が好ましい。最初の投与に適切な型及びブースター注射は変えることもできるが、最初の投与後の接種又は他の投与によって特徴づけられる。

【0083】

10

20

30

40

50

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

【0084】

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

【0085】

ワクチンにアジュバント作用をさせるための様々な方法は、例えば生理食塩水中で通常0.05~0.1%溶液として用いられる水酸化アルミニウム又はホスフェート(alum)、0.25%溶液として用いられる糖(カルボポール)の合成ポリマーとの混合物、それぞれ30秒~2分間、70~101の範囲の温度で熱処理することによるワクチン中のタンパク質の凝集物のような剤の使用を含む。ペプシン処理(Fab)抗体でアルブミンに再活性化させることによる凝集物、シー・パルブム(C.parvum)のような細菌細胞又はエンドトキシン又はグラム陰性細菌のリポ多糖成分との混合物、マンニトモノオレエート(Arace1 A)のような生理学的に受容な油性賦形剤中のエマルジョン又はブロック置換体として用いられるパーフルオロカーボン(Fluosol-DA)の20%溶液とのエマルジョンも、用いることができる。本発明によれば、DDA(ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド)はアジュバントの重要な代替物であるが、フロイントの完全及び不完全アジュバント、ならびにキュイルA及びR1BIも重要である可能性がある。さらに、モノホスホリル脂質 A(MPL) 及びムラミルジペプチド(MDP)でもよい。

【0086】

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

【0087】

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

【0088】

多くの例で、何回にもわたって、通常6回の予防接種を越えないで、さらに、通常4回の予防接種を越えないで、好ましくは1又は2回、通常、少なくともほぼ3回の予防接種でワクチンを投与する必要があるであろう。予防接種は2~12週間隔が通常であり、3~5週間隔がより普通である。1~5年、通常3年間隔の定期的なブースターが、所望の免疫防護レベルを維持するのに望ましい。免疫化の進行は、ESAT-6又はST-CFと同時培養したPBL(末梢血液リンパ球)の生体外での増殖アッセイ、特に感作リンパ球から放出されたIFN-レベルの測定により追跡できる。アッセイは、放射性核種、酵素、蛍光発色物などのような従来への標識を用いて行ってもよい。これらの技術は周知であり、これらのアッセイタイプの例として広範囲な特許、例えば米国特許第3,791,932号、第4,174,384号及び第3,949,064号に見出すことができる。

【0089】

遺伝的变化のために、異なる個体が、同じポリペプチドに対する強度を変えて免疫応答と反応することがある。したがって、本発明のワクチンは、免疫応答を増すために幾つかの異なるポリペプチドを含んでいてもよい。ワクチンは、全ポリペプチドが上記のとおり

10

20

30

40

50

であるか、又は全てではなく幾つかのポリペプチドが結核菌群に属する細菌由来である2以上のポリペプチドを含んでいてもよい。後者の例で、ポリペプチドについて上記する基準を充たす必要のないポリペプチドは、それら自身の免疫原性により作用するか、又は単なるアジュバントとして作用することができる。このような重要なポリペプチドの例にはMPB64、MPT64及びMPB59があるが、マイコバクテリアから単離できるいずれかの他の物質も代替物となり得る。

【0090】

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

【0091】

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

【0092】

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

【0093】

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

【0094】

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

【0095】

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

【0096】

本発明の生ワクチンは、本発明による形質転換された非病原性細胞を培養し、これらの細胞をワクチン用の培地に移し、任意に担体、賦形剤及び/又はアジュバント物質を加えて製造することができる。

【0097】

また、本発明は、本発明のポリペプチド又は上記する皮膚試験試薬を動物に皮肉注射することからなり、注射位置での陽性の皮膚反応はTBを有する動物を示し、注射位置で陰性の皮膚反応はTBを有しない動物を示す、結核菌、マイコバクテリア・アフリカム又はマイコバクテリア・ボビスにより動物(ヒトを含む)に引き起こされるTBの診断方法に関する。陽性反応は少なくとも直径が5mmの皮膚反応であるが、より大きい反応、例えば直径が少なくとも1cm、1.5cm、少なくとも2cmであることが好ましい。皮膚試験試薬として用

10

20

30

40

50

いられる組成物は、上記ワクチンについての記載と同じ方法で製造できる。

【0098】

ワクチンの製造と用途に関する上記の記載内において、本発明は、本発明のポリペプチド又は上記のような本発明のワクチン組成物又は上記した生ワクチンを動物に投与することからなる、結核菌群に属するマイコバクテリアにより引き起こされるTBに対する動物（ヒトを含む）の免疫化方法にも関する。投与経路は、非経口（例えば、静脈及び動脈内）、腹腔内、筋肉内、皮下、皮内、経口、口腔、舌下、鼻、直腸又は経皮経路が好ましい。

【0099】

マイコバクテリア由来の短期培養液に存在するタンパク質 ESAT-6ならびにマイコバクテリアゲノム中のesat-6遺伝子は、他のマイコバクテリア株での分布が非常に限られているので、結核菌、例えばesat-6がBCG及び環境から単離される多くのマイコバクテリア種（例えば、マイコバクテリア・アビウム(M. avium)及びマイコバクテリア・テラエ(M. terrae)）の両方に存在しないことを立証している。これは、本発明の抗原及びその遺伝子の少なくとも1つにも当てはまると考えられ、それ故に本発明の診断の具体例は、結核菌群のビルレントマイコバクテリア株での現在又は過去の感染診断を行うのに特に適している。1)例えば BCGワクチンであらかじめ予防接種されるか、又は非ビルレントマイコバクテリア由来抗原に付された対象（動物又はヒト）と2)ビルレントマイコバクテリアに活性に感染しているか、又は感染していた対象は、区別できると考えられる。

【0100】

幾つかの診断アッセイ及び方法が、可能であると考えられる。

過去又は現在のビルレントマイコバクテリア感染の診断が目的である際、患者の単核細胞（つまり、T-リンパ球）からなる血液サンプルを、本発明の1以上のポリペプチドサンプルに接触させることができる。この接触は生体外で行うことができ、陽性反応は、例えばT-細胞の増殖又は - インターフェロンのようなサイトカインの細胞外相（例えば、培養上清）への放出であってもよい。生体内試験では、上記のように皮膚試験が適している。血清サンプル中の抗体とポリペプチド間の結合の立証は過去又は現在の感染を示すので、対象の血清サンプルを本発明のポリペプチドを接触させることも考えられる。

【0101】

したがって、本発明は、動物又はヒトの血液サンプルを提供し、本発明のポリペプチドと動物由来のサンプルを接触させることからなる、動物又はヒトにおける結核菌群に属する細菌との現在又は過去の感作を診断するための生体外の方法にも関する。血液サンプル中の単核細胞による細胞外相への少なくとも1つのサイトカインの顕著な放出は、動物が感作されていることを示す。ここで、サイトカインの放出が、結核でない対象（例えば、TBに対する伝統的な皮膚試験で反応しない対象）由来の血液サンプルからのサイトカインの放出より著しく高いことは、語「顕著な放出」により意味する。通常、顕著な放出は、このようなサンプルから認められる放出の少なくとも2倍である。

【0102】

また、器官を感染する可能性があるサンプルは、本発明のポリペプチドに対して生じる抗体と接触させてもよい。当該分野で周知の方法でサンプルと抗体間の反応を立証することにより、現在の感染が示されるであろう。当然、対象由来の血清サンプルを本発明のポリペプチドフラグメントの少なくとも1つと接触させ、抗体及び抗原間の反応を可視化する周知の方法を用いることにより、血清中の抗マイコバクテリア抗体の存在を立証することもできる可能性がある。

【0103】

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

10

20

30

40

50

る動物又はヒト由来のサンプルでのヌクレオチド配列（PCR技術を用いることにより、核酸フラグメント（又はその相補フラグメント）とハイブリダイズする）の存在の検出を含む。

【0104】

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

【0105】

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

【0106】

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

【0107】

最終的に、イムノアッセイで本発明のポリペプチドと特異的に反応するモノクローナル又はポリクローナル抗体、又は特異的な抗体結合フラグメントも、本発明の一部である。このようなポリクローナル抗体の産生は、適切な動物がポリペプチドで免疫化されること、その後これらの抗体がイムノアフィニティークロマトグラフィーにより適切に単離されることを要する。本発明は、免疫化及び陽性ハイブリドーマのスクリーニングの両方に十分な量の抗原を提供するので、モノクローナルの産生は、当該分野で周知の方法で行うことができる。

【0108】

図面の説明

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

【0109】

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

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

10

20

30

40

50

オチドは、CFP7をエンコードするヌクレオチドである。

【 0 1 1 0 】

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

【 0 1 1 1 】

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

10

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

【 0 1 1 2 】

実施例 1 : 免疫防護に關与する単一培養ろ液抗原の同定

有効に防護されているマウスの群は、8~12週齢のメスのC57Bl/6jマウスに 5×10^4 個の結核菌を静脈で感染させて得た。感染から30日後に、マウスはイソニアジドで処理した抗生物質に60日間付し、次いで、休眠長期記憶免疫(resting long-term memory immunity)を確立するために200~240日間放置した。このような免疫記憶マウスは、二次感染に対して非常に効率良く防護される(図1)。このモデルで長期に続く免疫は、感染部位に補充された高度に反応性のCD4細胞の増殖で媒介され、ST-CFに応じて大量のIFN- γ の産生を誘導する(図1)[Andersen ら、1995]。

20

【 0 1 1 3 】

我々は、防護T細胞によって認識される単一抗原の同定にこのモデルを用いた。免疫記憶マウスを 1×10^6 個の結核菌に静脈で再感染させ、再感染から4~6日、つまり、この増殖がST-CFに高度に反応的な時間で、脾臓のリンパ球を回収した。これらのT細胞で認識される抗原は、多重溶出(multi-elution)技術によりマッピングした[Andersen及びHeron、1993]。この技術は、SDS-PAGEで分離した複雑なタンパク質混合物を、生理緩衝液中で狭い画分に分ける。これらの画分は生体外で脾臓リンパ球を刺激するのに用い、IFN- γ の放出をモニターした(図2)。長期記憶免疫マウスは、TB感染前はこれらの画分を認識しなかったが、免疫防護の回復のあいだに得られる脾臓リンパ球は、ある範囲の培養ろ液抗原を認識し、IFN- γ の産生ピークが6~12及び17~30 kDaの見かけ分子量のタンパク質に応じて見出された(図2)。したがって、これらの領域内の培養ろ液抗原は、免疫防護応答の第一相のあいだにIFN- γ の放出を誘発する記憶エフェクターT細胞で認識される主要な標的であることが結論づけられた。

30

【 0 1 1 4 】

実施例 2 : 低質量培養ろ液抗原を発現する遺伝子のクローニング

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

40

【 0 1 1 5 】

Mab 類に結合する抗原を同定するために、以下の実験を行った。

モノクローナル抗体 ST-3 及び PV-2 に結合する遺伝子産物を発現するファージについて、R.Young [Young,R.A. ら、1985] により構築され、世界保健機構 IMMTUB プログラム

50

(WHO.0032.wibr)を通して得られる組換え gt11 結核菌 DNAライブラリーをスクリーニングした。

約 1×10^5 pfuの遺伝子ライブラリー(約25%の組換えファージ含有)は、柔らかい寒天で大腸菌 Y1090 (DlacU169, proA⁺, Dlon, araD139, supF, trpC22::tn10 [pMC9] ATCC#37197)にプレートし、42 °C で 2.5時間培養した。

【0116】

プレートは、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドで飽和したニトロセルロース膜で積層(overlay)し、37 °C で2.5時間培養を続けた。ニトロセルロースを除き、最終濃度が0.05%になるように加えたツイン20を有する PBS中のモノクローナル抗体サンプルとインキュベートした。結合モノクローナル抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ-結合ウサギ抗マウス免疫グロブリン (P260, Dako, Glostrup, DK)及び5,5',3,3'-テトラメチルベンジジン及び H₂O₂を含む染色反応で可視化した。

10

【0117】

陽性プラークを再クローンし、プラーク1つから得たファージを大腸菌 Y1089 (DlacU169, proA⁺, Dlon, araD139, strA, hfl150 [chr::tn10] [pMC9] ATCC nr.37196)の溶原化に用いた。得られた溶原株は、DNA抽出用ファージ粒子の増殖に用いた。これらの溶原性大腸菌株は、以下のように命名した：

ブダベスト条約の規定にしたがって、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)のコレクションに1993年6月28日に受託番号 DSM 8377 で寄託されたAA226 (ST-3 反応性ポリペプチド CFP9 を発現する)、及び

20

ブダベスト条約の規定にしたがって、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) のコレクションに1993年6月28日に受託番号 DSM 8379で寄託されたAA242 (PV-2 反応性ポリペプチド CFP7 を発現する)。

【0118】

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

【0119】

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

30

【0120】

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

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

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

40

【0121】

両遺伝子の完全なDNA配列は、シーケナーゼ DNAシーケンシングキット1.0バージョン [United States Biochemical Corp., Cleveland, OH]を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー(reader) (モデル373A; Applied Biosystems)と組合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンシングにより得た。DNA配列は、それぞれSEQ ID NO:1 (CFP7) 及びSEQ ID NO:3 (CFP9)ならびに図3及び4に示す。DNAの両鎖をシークエンスした。

【0122】

CFP7

96アミノ酸残基の配列をエンコードするオープンリーディングフレーム (ORF)は、91 ~

50

93位置の ATG開始コドンから伸長する 379~381 位置の TAG停止コドンまで同定した。推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:2 (及び従来の一文字アミノ酸コードを用いる図3) に示す。

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

【0123】

CFP9

ST-3で認識されるタンパク質は、AA226 ラムダファージから発現する際に、 λ -ガラクトシダーゼ融合タンパク質として産生した。この融合タンパク質は、約 116~117kDaの大きさ (λ -ガラクトシダーゼ 116.25kDaに対するMw) を有し、CFP9遺伝子のごく一部は、ラムダクロン(AA226) に含まれたことを示唆している。

ラムダファージ AA226からの挿入で得られるヌクレオチド配列 90bp に基づいて、結核菌ゲノムのヌクレオチド配列とのホモロジー検索をサンガーデータベース (Sanger Mycobacterium tuberculosis database) ; <http://www.sanger.ac.uk/pathogens/TB-blast-server.html>; Williams, 1996で行った。クロンされた配列との100%の同一性は、MTCY48 コスミドで見出された。109アミノ酸残基の配列をエンコードするオープンリーディングフレーム(ORF) は、141~143位置の GTG開始コドンから伸長する 465~467 位置の TAG停止コドンまで同定した。推定されるアミノ酸配列は、従来の一文字コードを用いて図4に示す。

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

【0124】

発現ベクターでのCFP7及びCFP9のサブクロニング

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

PCR増幅は、マスターミックス(各オリゴヌクレオチドプライマー $0.5\mu\text{M}$ 、BSA [Stratagene] $0.25\mu\text{M}$ 、低塩緩衝液 (pH 8.8、Tris-HCl 20mM、KCl 10mM、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10mM、 MgSO_4 2mM及びTriton X-100 0.1%) [Stratagene]、各デオキシヌクレオチド三リン酸 0.25mM 及びTaq Plus Long DNAポリメラーゼ 0.5U [Stratagene])とプラスミドDNA 10ngを混合して温度反応器 (Rapid cycler, Idaho Technology, Idaho)で行った。最終容量は、 $10\mu\text{l}$ とした(示した全濃度は、最終容量での濃度である)。予備変性は、30秒94で行った。後の30サイクルは、30秒94での変性、30秒55でのアニーリング、及び1分72での伸長で行った。

【0125】

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

cfp7オリゴヌクレオチド(表1)は、CFP7配列のヌクレオチド配列(図3)をベースにして合成した。オリゴヌクレオチドは、直接的なサブクロニング用に5'末端の SmaI 制限酵素部位及び3'末端の BamHI 制限酵素部位を含むように設計した。

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

【0126】

CFP7

コード領域のみが発現されるように、SmaI部位が、PCRを用いてcfp7遺伝子をエンコー

ドする291bpのORFの最初のコドンの5'に隣接して設計され、BamHI 部位が3'末端の停止コドンの直後に挿入された。291bpのPCRフラグメントはSmaIとBamHIで切断し、アガロースゲルから精製し、pMST24発現ベクターの SmaI-BamHI 部位にサブクローンした。融合遺伝子を含むベクター DNAは、大腸菌 XL1-Blue の形質転換に用いた (pRVN01)。

【 0 1 2 7 】

CFP9

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

10

【 0 1 2 8 】

組換え CFP7 とCFP9の精製

ORFは、(His)₆-tagのN-末端に融合させた[EP-A-0 282 242号参照]。組換え抗原は、以下のようにして調製した。要約すれば、pRVN01又はpRVN02プラスミドのいずれかを有する大腸菌のコロニー1つを、アンピシリン100 µg/ml及びテトラサイクリン12.5 µg/mlを含むルリア-ベルタニ培地に接種し、OD_{600nm}が0.5になるまで37 °Cで成長させた。次いで、最終濃度が2mMになるようにIPTG (イソプロピル β-D-チオガラクトシド)を加え(発現が、強力なIPTG誘発性 P_{tac} 又は T5 プロモーターのいずれかで調節される)、さらに2時間成長させた。細胞は、8分4秒で4,200xgの遠心分離で回収した。ペレット化した細菌は、-20 °Cで一晩保存した。ペレットは、BC 40/100 緩衝液(Tris-HCl pH 7.9 20mM、20%グリセロール、KCl 100mM、イミダゾール 40mM)に再懸濁し、4 °Cでの超音波処理(30秒間隔、30秒間5回)、その後の4 °Cで30分の12,000xgの遠心分離で細胞を破壊し、上清(粗抽出物)を組換え抗原の精製に用いた。

20

【 0 1 2 9 】

2つのヒスチジン融合タンパク質(His-rCFP7及びHis-rCFP9)は、100ml容量のNi²⁺-NTAカラム [QUIAGEN]でのアフィニティクロマトグラフィーで粗抽出物から精製した。His-rCFP7及びHis-rCFP9は、Ni²⁺に結合する。BC 40/100緩衝液でカラムを大量に洗浄した後、イミダゾール 100mM、Tris pH 7.9 20mM、20%グリセロール及びKCl 1Mを含む BC 1000/100緩衝液を用いて融合タンパク質を溶出した。次いで、精製した生成物を、Tris pH 8.0 10 mMに大量に透析した。次いで、His-rCFP7 及びHis-rCFP9 は、0 ~ 1MのNaClの直鎖状勾配でTris pH 8.0 10mMのアニオン交換カラム(Mono Q、Pharmacia、スウェーデン)によりタンパク質高速液体クロマトグラフィー(FPLC)で不純物から分離した。画分のアリコートは、10~20%勾配のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析した。精製した His-rCFP7又はHis-rCFP9 のいずれかを含む画分をプールした。

30

【 0 1 3 0 】

【表 2】

表 1. オリゴヌクレオチド^a cfp7 と cfp9 の配列

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

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

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

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

【 0 1 3 1 】

実施例 2 A : BCG株で発現されない抗原の同定

TBの治療を制御するために、弱毒化細菌カルメット-ゲラン (BCG) を生の弱毒化ワクチンとして用いた。 BCGは、ビルレントマイコバクテリア・ボビスの弱毒化誘導体である。 パスツール研究所 (フランス、パリ) 由来のオリジナルの BCGは、1908 ~ 1921年に液体培地で231回継代してつくられたものであり、動物に毒性を復帰しないことが示されている。 BCGでの弱毒化変異は、容易に復帰しない安定な欠失及び / 又は多重変異であることを示している。 BCG及び結核菌及びマイコバクテリア・ボビスの生理的な差異が認められているが、オリジナルのBCG株の一連の継代のあいだに生じる弱毒化変異は、最近まで知られていなかった。 記載されている最初の変異は、幾つかのBCG株でMPB64をエンコードする遺伝子 [Liら、1993、Oettinger と Andersen、1994] 及び試験される全てのBCG株でESAT-6をエンコードする遺伝子 [Harboeら、1996] を欠落しており、その後、BCGでの3つの大きな欠失が同定されている [Mahairasら、1996]。 RD1と命名される領域は、ESAT-6をエンコードする遺伝子及びMPT64をエンコードする他の遺伝子 (RD2) を含む。 抗原は、ともに診断剤の可能性を示しており、ESAT-6は、ワクチンの代替物としての特性を有することが分かっている [PCT/DK/00273号及び PCT/DK/00270 号参照]。 結核菌に特異的な新規の診断用抗原ならびにTBに対する新規のワクチン用抗原を見出すために、結核菌 H37Rvの RD1領域 (17.499bp) を、オープンリーディングフレーム (ORF) について分析した。 BorodovskyとMcIninch (1993) により記載されているアルゴリズムを用いて、最小で96bpの長さの ORFが推測された。 推測された全体で27個のORFにおいて、これらの20個は、全ての公知のBCG株から欠失されているので、診断剤としての可能性及び / 又はワクチンとしての可能性がある。 推測されるORFは、アルゴリズムの能力についての正の対照として、あらかじめ記載 [Sorensenら、1995] されているESAT-6 (RD1-ORF7) 及びCFP10 (RD1-ORF6) を含む。 ここでは、推測される7つの抗原のTB診断に対する可能性ならびにTBに対する新規のワクチン代替物としての可能性を記載する。

【 0 1 3 2 】

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

【 0 1 3 3 】

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

結核菌H37Rv由来のrd1-orf2 のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:71に記載する。 RD1-OR

10

20

30

40

50

F2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:72に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf3のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:87に記載する。RD1-ORF 2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:88に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf4のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:89に記載する。RD1-ORF 2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:90に記載する。

【 0 1 3 4 】

結核菌H37Rv由来のrd1-orf5のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:91に記載する。RD1-ORF 2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:92に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf8のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:67に記載する。RD1-ORF 2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:68に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf9aのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:93に記載する。RD1-ORF 2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:94に記載する。

結核菌H37Rv由来のrd1-orf9bのヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:69に記載する。RD1-ORF 2の推定されるアミノ酸配列は、SEQ ID NO:70に記載する。

【 0 1 3 5 】

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

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

【 0 1 3 6 】

DNA配列rd1-orf4 (SEQ ID NO:89)は、4014～4012位置のGTGコドンで開始し、3597～3595位置(位置の数は、RD1での位置を参照)の終始コドン(TAG)で終わるオープンリーディングフレームを含む。推定されるアミノ酸配列(SEQ ID NO:90)は、分子量14,210に相当する139残基を含む。

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

【 0 1 3 7 】

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

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

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

【 0 1 3 8 】

ORFのrd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bのクローニング

ORFのrd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bは、発現ベクターpMST24 [Theisenら、1995](rd1-orf3)又はpQE32 [QIAGEN] (rd1-orf2

10

20

30

40

50

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

【 0 1 3 9 】

rd1-orf2。BamHI 部位はrd1-orf2の最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII 部位
は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf2は pQE32にサブクローンし、
pT096とした。

10

rd1-orf3。SmaI 部位はrd1-orf3の最初のコドンの5'に隣接して設計し、NcoI 部位は、3'
末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf3はpMST24にサブクローンし、pT087
とした。

rd1-orf4。BamHI 部位はrd1-orf4の最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII 部位は
、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf4はpQE32にサブクローンし、pT0
89とした。

【 0 1 4 0 】

rd1-orf5。BamHI 部位はrd1-orf5の最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII 部位は
、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf5はpQE32にサブクローンし、pT0
88とした。

20

rd1-orf8。BamHI 部位はrd1-orf8の最初のコドンの5'に隣接して設計し、NcoI 部位は、3'
末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf8はpMST24 にサブクローンし、pT09
8とした。

rd1-orf9a。BamHI 部位はrd1-orf9aの最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII 部位
は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf9aはpQE32にサブクローンし、
pT091とした。

rd1-orf9b。ScaI 部位はrd1-orf9bの最初のコドンの5'に隣接して設計し、HindIII 部位
は、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。遺伝子rd1-orf9bはpQE32にサブクローンし、
pT090とした。

【 0 1 4 1 】

30

PCRフラグメントは適切な制限酵素で消化し、アガロースゲルから精製し、pMST24又はp
QE32のいずれかにクローンした。7つの構築物を用いて、大腸菌XL1-Blueを形質転換した
。融合遺伝子のエンドポイントは、ジデオキシ鎖末端法で決定した。DNAの両鎖をシーク
エンスした。

【 0 1 4 2 】

組換え RD1-ORF2、RD1-ORF3、RD1-ORF4、RD1-ORF5、RD1-ORF8、RD1-ORF9a及び RD1-ORF9
bの精製

rRD1-ORFは、(His)₆-tagのN-末端に融合させた。組換え抗原は、接種用にpT087、pT088
、pT089、pT090、pT091、pT096又はpT098のいずれかを有する大腸菌のコロニー1つを用
いて実施例 2 に記載(例外として、pT090は37 でなく30 で発現させた)のよう
にして調製した。Ni²⁺アフィニティクロマトグラフィーによる組換え抗原の精製も、実施例 2 に
記載のよう
にして行った。精製したHis-rRD1-ORF2、His-rRD1-ORF3、His-rRD1-ORF4、His
-rRD1-ORF5、His-rRD1-ORF8、His-rRD1-ORF9a又はHis-rRD1-ORF9bを含む画分をプールし
た。His-rRD1-ORFは、10mM Tris/HCl (pH 8.5)、ユレア 3Mに大量に透析し、次いで、タ
ンパク質高速液体クロマトグラフィー(FPLC) [Pharmacia, Uppsala, スウェーデン]を用い
てアニオン交換カラム(Mono Q)でさらに精製工程を行った。精製は、10mM Tris/HCl (pH
8.5)、ユレア 3M中で行い、0 ~ 1MのNaClの直鎖状勾配でタンパク質を溶出した。His-rR
D1-ORFを含有する画分をプールし、次いで、使用前に25mM Hepes (pH 8.0)に大量に透析
した。

40

【 0 1 4 3 】

50

【表 3】

表 2. rd1-orf オリゴヌクレオチド^aの配列

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

10

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

20

【 0 1 4 4 】

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

【 0 1 4 5 】

実施例 3 : ST-CF 由来の17~30kDa の抗原を発現する遺伝子のクローニング
CFP17、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25及びCFP28の単離

ST-CFは、80%飽和硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後、ユレア 8Mで洗浄した。CHAPSとグリセロールは、それぞれ最終濃度が0.5% (w/v) 及び 5% (v/v) になるまで加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞(Rotofor isoelectrical Cell) [Biorad] に塗布した。ロトフォル細胞は、0.5% (w/v) CHAPS、5% (v/v)グリセロール、3% (v/v) バイオリット(Biolyt) 3/5及び1% (v/v) バイオリット 4/6 [Biorad] を含むユレア 8M緩衝液で平衡化した。等電点フォーカスは、3~6のpH勾配で行った。画分は、銀染色した10~20%の SDS-PAGE で分析した。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、1~3mlの最終容量になるように3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ(Centriprep)濃縮器 [Amicon]でPBSを用いて3回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のSDSを加え、タンパク質溶液を5分煮沸した後、電気勾配下の16%ポリアクリルアミドのマトリクスでプレップ細胞(Prep Cell) [Biorad]でさら

30

40

【 0 1 4 6 】

CFP29の単離

CFP29と反応する抗-CFP29は、2週間の間隔でRIBIアジュバント(第一及び第二回目の免疫化)又は水酸化アルミニウム(第三回目の免疫化及び追加免疫化(boosting))中の破砕したゲル片で、BALB/cマウスを免疫化して生じた。2~5µgのCFP29を含むSDS-PAGEのゲル片は、免疫化にそれぞれ用いた。マウスは、脾臓を除く前に3日間、抗原で追加免疫化した。CFP29に対する抗体を産生するモノクローナルセルラインの発生は、本質的にKohlerとMilstein(1975)により記載されているようにして得られた。成長しているクローン

50

由来の上清のスクリーニングは、SDS-PAGEで分離したST-CFを含むニトロセルロースのストリップをイムノプロットして行った。各ストリップは、ST-CFを約50 µg含んだ。抗CFP29の抗体のクラスは、製造者の指示にしたがったマウスモノクローナル抗体イソタイピングキット RPN29 [Amersham]により IgMとして同定した。

【0147】

CFP29は、以下の方法で精製した：ST-CFは限外ろ過で10倍に濃縮し、45～55%の飽和範囲で硫酸アンモニウム沈殿を行った。ペレットは、50mMリン酸ナトリウム、1.5M硫酸アンモニウム(pH 8.5)に再溶解し、Affi-Tゲルカラム [Kem-En-Tec]でチオフィル(thiophilic)吸着クロマトグラフィー [Porathら、1985]に付した。タンパク質は1.5M～0Mの硫酸アンモニウムの直鎖状勾配で溶出し、0.44～0.31Mの範囲の硫酸アンモニウムで回収した画分を、mAb 抗-CFP29を用いるウェスタンブロット実験でCFP29含有画分として同定した。これらの画分をプールし、FPLCシステム [Pharmacia]に接続したMono Q HR 5/5カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは、10mM Tris-HCl(pH 8.5)で平衡化し、0～500mM NaClの線状勾配で溶出を行った。400～500mMの塩化ナトリウムから、かなり純粋な CFP29が溶出された。最終精製工程として、CFP29を含むMono Q 画分を12.5%の SDS-PAGE ゲルにローディングし、多重溶出技術 [Andersen及び Heron、1993]により純粋な CFP29を得た。

【0148】

N-末端のシーケンシング及びアミノ酸解析

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25及びCFP28は、10kDa のカットオフを有するセントリコン(Centricon)濃縮機 [Amicon]で水と洗浄し、次いで、プロスピ(ProSpin)濃縮機 [Applied Biosystems]にアプライしてタンパク質をPVDF膜に回収した。膜は、プロサイス(Procise)シークエンサー [Applied Biosystems]でシークエンスする前に、メタノール20%で5回洗浄した。

【0149】

CFP29含有画分は、トリシンSDS-PAGE後にPVDF膜にプロットした [Plougら、1989]。関連するバンドを切りだし、プロサイスシークエンサー [Applied Biosystems]でアミノ酸解析 [Barkholt及びJensen、1989]及びN-末端配列解析に付した。

以下のN-末端配列が得られた：

【0150】

【化3】

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

【0151】

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

【0152】

CFP29をエンコードする遺伝子のクローニング

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

【0153】

CFP29のN-末端配列とブレビバクテリウム・リネンス由来のリノシン M18タンパク質とのこの同一性に基づいて、CFP29をエンコードする結核菌遺伝子のPCRクローニング用に連の変性プライマーを構築した。PCR 反応物は、10 μ lの反応容量に4つの各ヌクレオチド 250 μ M [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー5pmol及び Taq+ DNAポリメラーゼ 0.5 ユニット[Stratagene]を加えた1x低塩 Taq+ 緩衝液 [Stratagene]に結核菌の染色体DNA 10ngを含むものであった。反応は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモサイクラー装置 [Idaho Technology]を用いて15秒間94、15秒間55 及び90秒間72 のプログラムを30サイクル行った。

【 0 1 5 4 】

約300bpのフラグメントが、配列

10

【化 4】

1: 5'-CCCGGCTCGAGAACCTSTACCGCGACCTSGCSCC (SEQ ID NO: 24)

2: 5'-GGGCCGGATCCGASGCSGCGTCCTTSACSGGYTGCCA (SEQ ID NO: 25)

-ここで S = G/C 及び Y = T/C

【 0 1 5 5 】

を有するプライマーを用いて得られた：

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

20

【 0 1 5 6 】

この配列の最初の 150bpは、サンガーの結核菌データベース：

(http://www.sanger.ac.uk/projects/M-tuberculosis/blast_server)のブラスト(Blast)プログラムを用いてホモロジー検索に用いた。

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

【 0 1 5 7 】

最後に、795bpのオープンリーディングフレームは、プライマー：

30

【化 5】

3: 5'-GGAAGCCCCATATGAACAATCTCTACCG (SEQ ID NO: 26)

4: 5'-CGCGCTCAGCCCTTAGTGACTGAGCGCGACCG (SEQ ID NO: 27)

を用いて上記と同じ PCR条件下で PCRクローンした。

【 0 1 5 8 】

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

40

【化 6】

5: 5'-GGACGTTCAAGCGACACATCGCCG-3' (SEQ ID NO: 115)

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

に加えてプライマー 3 及び 4 を用いてシーケンスした。

【 0 1 5 9 】

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

50

全ての他の DNA操作は、Maniatisら(1989)にしたがって行った。

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

【0160】

サンガーデータベースでのホモロジー検索

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25及びCFP28について、各タンパク質のN-末端アミノ酸配列は、サンガーの結核菌のデータベース：

<http://www.sanger.ac.uk/pathogens/TB-blast-server.html>.

のブラストプログラムを用いてホモロジー検索に用いた。

CFP29については、DNA 配列の最初の150bpを検索に用いた。さらに、EMBLデータベースで、CFP29とホモロジーを有するタンパク質を検索した。

10

これにより、以下の情報が得られた。

【0161】

CFP17

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

オープンリーディングフレーム内で、翻訳されたタンパク質は162アミノ酸の長さである。培養液から精製したタンパク質のN-末端は31番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子質量 13833Da及び理論pI 4.4に相当する132アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。SDS-PAGEで認められた質量は、17kDaである。

20

【0162】

CFP20

CFP20の決定された15アミノ酸に100%同一な配列が、翻訳されたコスミドcscy09F9に見出された。停止コドンは、1の位置のアミノ酸 Mから166番目のアミノ酸に見出された。これにより、理論分子質量16897kDa及びpI 4.2に相当する 165アミノ酸の長さの生じることが推測される。SDS-PAGEで認められた分子量は、20kDaである。

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

30

最高のホモロジー、つまり163アミノ酸が重複する51.5%の同一性が、ヘモフィルス・インフルエンザ(Haemophilus influenza) Rd toxR reg (HIHI0751)に見られた。

【0163】

CFP21

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

オープンリーディングフレーム内で、翻訳タンパク質は217アミノ酸長である。培養液から精製したタンパク質の決定されたN-末端配列は33番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子質量18657Da、理論pI 4.6に相当する185アミノ酸長の成熟タンパク質が得られる。SDS-PAGEで認められた分子量は、21kDaである。

40

タンパク質は、193アミノ酸を重複して、209アミノ酸長のクチナーゼ(cutinase)前駆体(CUTI ALTBR P41744)に32.6%の同一性を有する。

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

【0164】

CFP22

CFP22の決定された15アミノ酸に100%同一な配列は、MTCY10H4に見られた。オープンリ

50

ーディングフレーム内で、翻訳タンパク質は182アミノ酸長である。培養ろ液から精製したタンパク質のN-末端配列は8番目のアミノ酸で始まり、それ故に結核菌培養ろ液中で175アミノ酸長のタンパク質を生じる。これにより、理論分子量18517Da及びpI 6.8が得られる。SDS-PAGEで認められた分子量は、22kDaである。

182アミノ酸の重複で、翻訳タンパク質は、E235739、ペプチジル-プロリル シス-トランスイソメラーゼと90.1%の同一性を有する。

【0165】

CFP25

決定された15アミノ酸に93%同一な配列は、コスミドMTCY339.08cに見出された。2つの配列間で異なる1つのアミノ酸は、MTCY339.08cでCであり、N-末端シークエンスデータによればXである。シークエンスでは、おそらくこの違いによりCを決定できない。

培養ろ液から精製したタンパク質の決定されたN-末端配列は33番目のアミノ酸で始まり、切断されるシグナル配列の存在に一致する。これにより、理論分子量19665Da及び理論pI 4.9に相当する187アミノ酸長の成熟タンパク質が得られる。SDS-PAGEで認められた分子量は、25kDaである。

タンパク質は、217アミノ酸の重複でCFP21(MTCY39.35)に42.9%の同一性を有する。

【0166】

CFP28

データベース検索でSEQ ID NO:22の2~8、11、12及び14残基の決定された10アミノ酸を用いる際に、ホモロジーは見られなかった。

【0167】

CFP29

サンガーデータベース検索：CFP29タンパク質の配列150bpにほぼ100%同一な配列は、コスミドcy444に見出された。配列は、オープンリーディングフレーム795bp内に含まれ、その5'末端は、精製されたCFP29タンパク質のN-末端シークエンスされた19アミノに100%同一な配列に翻訳する。オープンリーディングフレームは、265アミノ酸のタンパク質をエンコードする。

精製タンパク質について行ったアミノ酸解析により、コスミド444でのオープンリーディングフレームにエンコードされるタンパク質とCFP29の同一性がさらに確認された。

EMBLデータベース検索：オープンリーディングフレームは、リノシン M18タンパク質(DNAレベルで61%同一)に58%同一で、74%類似している265アミノ酸タンパク質をエンコードしている。これは、バクテリオシン活性を有する28.6kDaのタンパク質である [Valdes-Stauber及び Scherer, 1994; Valdes-Stauber及び Scherer, 1996]。2つのタンパク質は同じ長さ(1アミノ酸を除いて)を有し、同じ理論物理化学特性を有する。したがって、CFP29は、プレバクテリウム・リネンスのリノシン M18タンパク質のマイコバクテリアホモログ(mycobacterial homolog)であることが示唆される。

【0168】

サンガーデータベースから選んだ精製抗原のアミノ酸配列を以下のリストに示す。N-末端シークエンスで決定したアミノ酸は、太字で示す。

【0169】

10

20

30

40

【化7】

CFP17 (SEQ ID NO: 6):

1 MTDMPDIEK DQTSDEVTVE TTSVFRADFL **SELDAPAQAG TESAVSGVEG**
 51 LPPGSALLVV KRGNAGSRF LLDQAITSAG RHPDSDIFLD DVTVSRRHAE
 101 FRLENNEFNV VDVGSLNGTY VNREPVD SAV LANGDEVQIG KFRLVFLTGP
 151 KQGEDDGSTG GP

10

CFP20 (SEQ ID NO: 8):

1 **MAQITLRGNA INTVGELPAV** GSPAPAFTLT GGDLGVISSD QFRGKSVLLN
 51 IFPSVDTPVC ATSVRTFDER AAASGATVLC VSKDLPFAQK RFCGAEGTEN
 101 VMPASAFRDS FGEDYGV TIA DGPMAGLLAR AIVVIGADGN VAYTELVPEI
 151 AQEPNYE AAL AALGA

CFP21 (SEQ ID NO: 10):

20

1 MTPRSLVRIV GVVVATTLAL VSAPAGGRAA **HADPCSDIAV**
 41 **VFARGTHQAS** GLGDVGEAFV DSLTSQVGGR SIGVYAVNYP ASDDYRASAS
 91 NGSDDASAHI QRTVASCPNT RIVLGGYSQG ATVIDLSTSA MPPAVADHVA
 141 AVALFGEPSS GFSSMLWGGG SLPTIGPLYS SKTINLCAPD DPIC TGGGNI

【0170】

【化 8】

191 MAHVSIVQSG MTSQAATFAA NRLDHAG

CFP22 (SEQ ID NO: 12):

1 MADCDSVTNS **PLATATATLH** TNRGDIKIAL FGNHAPKTVA NFVGLAQGTK
 51 DYSTQNASGG PSGPFYDGA V FHRVIQGFMI QGGDPTGTGR GPGYKFADE
 101 FHPELQFDKP YLLAMANAGP GTNGSQFFIT VGKTPHLNRR HTIFGEVIDA
 151 ESQRVVEAIS KTATDGND RP TDPVVIESIT IS

10

CFP25 (SEQ ID NO: 14):

1 MGA AAA MLAA VLLLTPEITVP AGYPGAVAPA **TAACPDAEVV FARGRFEPPG**
 51 IGTVGN AFVS ALRSKVNKNV GYAVKYPAD NQIDVGANDM SAHIQSMANS
 101 CPNTRLVPGG YSLGAAVTDV VLAVPTQMWG FTNPLPPGSD EHIAAVALFG
 151 NGSQWVGPI T NFSPAYNDRT IELCHGDDPV CHPADPNTWE ANWPQHLAGA
 201 YVSSGMVNQA ADFVAGKLQ

20

CFP29 (SEQ ID NO: 16):

1 **MNNLYRDLAP VTEAAWAEIE** LEAARTFKRH IAGRRVVDVS DPGGPVTA AV
 51 STGRLIDVKA PTNGVIAHLR ASKPLVRLRV PFTLSRNEID DVERGSKDSD
 101 WEPVKEAAKK LAFVEDRTIF EGYSAA SIEG IRSASSNPAL TLPEDPREIP
 151 DVISQALSEL RLAGVDGPYS VLLSADVTK VSETS DHGYP IREHLNRLVD
 201 GDIIWAPAI D GAFVLTTRGG DFDLQLGTDV AIGYASHDTD TVRLLYQETL
 251 TFLCYTAEAS VALSH

30

【 0 1 7 1 】

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

【 0 1 7 2 】

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

40

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

PCR反応物は、10 µl の反応容量に4つの各ヌクレオチド250mM [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー 5pmol及びTaq+ DN Aポリメラーゼ 0.5 ユニット [Stratagene]を加えた1x低塩 Taq+ 緩衝液 [Stratagene]に結核菌の染色体DNA 10ngを含むものであった。反応は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモサイクラー装置 [Idaho Technology]を用いて10秒間94、10秒間55及び90秒間72のプログラムを30サイクル行った。

【 0 1 7 3 】

50

次いで、DNAフラグメントを1%アガロースゲルに付し、バンドを切りだしてスピン-X スピンカラム[Costar]で精製し、pBluescript SK II+ -Tベクター [Stratagene]にクローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミド DNAを調製し、適切な制限酵素で消化し、発現ベクター pMCT6 (発現されるタンパク質のN-末端に加えられる8個のヒスチジン残基とフレームを合わせた)にサブクローンした。得られたクローンは、この後、シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp.、合衆国]を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー[モデル373A、Applied Biosystems]と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンスにより、シーケンスした。

10

【0174】

個々の抗原のクローニングには、以下の遺伝子の特定のプライマーを用いた：

CFP17:cfp17のクローニングに用いられるプライマー：

【化9】

OPBR-51: ACAGATCTGTGACGGACATGAACCCG (SEQ ID NO: 117)

OPBR-52: TTTTCCATGGTCACGGGCCCCCGGTACT (SEQ ID NO: 118)

【0175】

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

20

CFP20:cfp20のクローニングに用いられるプライマー：

【0176】

【化10】

OPBR-53: ACAGATCTGTGCCCATGGCACAGATA (SEQ ID NO: 119)

OPBR-54: TTTAAGCTTCTAGGCGCCAGCGCGGC (SEQ ID NO: 120)

【0177】

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

30

CFP21:cfp21のクローニングに用いられるプライマー：

【0178】

【化11】

OPBR-55: ACAGATCTGCGCATGCGGATCCGTGT (SEQ ID NO: 121)

OPBR-56: TTTTCCATGGTCATCCGGCGTGATCGAG (SEQ ID NO: 122)

【0179】

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

40

CFP22:cfp22のクローニングに用いられるプライマー：

【0180】

【化12】

OPBR-57: ACAGATCTGTAATGGCAGACTGTGAT (SEQ ID NO: 123)

OPBR-58: TTTTCCATGGTCAGGAGATGGTGATCGA (SEQ ID NO: 124)

【0181】

OPBR-57及びOPBR-58は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ

50

ぞれ生じる。

CFP25:cfp25のクローニングに用いられるプライマー：

【0182】

【化13】

OPBR-59: ACAGATCTGCCGGCTACCCCGGTGCC (SEQ ID NO: 125)

OPBR-60: TTTTCCATGGCTATTGCAGCTTTCGGC (SEQ ID NO: 126)

【0183】

OPBR-59及びOPBR-60は、pMCT6でのクローニングに用いられるBglII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

【0184】

CFP17、CFP20、CFP21、CFP22及びCFP25の組換えタンパク質の発現/精製

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。各タンパク質について、アンピシリン100 µg/mlを含有するLB-培地1 lを、組換えpMTC6プラスミドを有するXL1-Blue細胞の一晚培養液10mlに接種した。培養は、OD₆₀₀が0.4~0.6の密度に達するまで37 °Cで振盪した。最終濃度が1mMになるようにIPTGをこの後加え、さらに4~16時間培養した。細胞を回収して1x超音波処理緩衝液+8Mユレアに再懸濁し、パルスの際に30秒停止して、5x30秒、超音波処理した。

【0185】

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

溶出後、全画分(各1.5ml)を、マイティ・スモール(Mighty Small) [Hoefer Scientific Instruments, 合衆国]システムを用いるSDS-PAGEでの分析に付し、タンパク質濃度を280nmで見積もった。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、10mM Tris-HCl(pH8.5)中の3Mユレアに透析した。透析したタンパク質は、6mlのResource-Qカラムを用いてFPLC [Pharmacia, スウェーデン]でさらに精製し、0~1MのNaClの線状勾配で溶出した。画分はSDS-PAGEで分析し、タンパク質濃度はOD₂₈₀で見積もった。タンパク質を含む画分をプールし、25mM HEPES緩衝液(pH 8.5)に透析した。

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

【0186】

実施例3A:CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19B、CFP22A、CFP23A、CFP23B、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50の同定

CFP16及びCFP19Bの同定

ST-CFは、80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後に8Mユレアで洗浄した。最終濃度がそれぞれ0.5%(w/v)と5%(v/v)になるようにCHAPSとグリセロールを加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞 [BioRad]に塗布した。ロトフォル細胞は、0.5%CHAPS(w/v)、5%グリセロール(v/v)、3%バイオリット3/5 (v/v)及び1%バイオリット4/6 (v/v) [BioRad]を含む8Mユレア緩衝液で平衡化した。等電点フォーカスは、3~6のpH勾配で行った。画分を、銀染色した10~20%のSDS-PAGEで分析した。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、最終容量が1~3mlになるように、3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機 [Amicon]でPBSを用いて3回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のSDSを加え、タンパク質溶液を5分煮沸し、電気勾配下の16%ポリアクリルアミドのマトリクスでプレップ細胞 [Biorad]についてさらに分離した。PVDF膜への転移後に、SDS-PAGEで分離したバンドのウェル含有画分をN-末端シーケンス用に選択した。

【0187】

CFP8A、CFP8B、CFP19、CFP23A及びCFP23Bの単離

ST-CFは、80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿させ、PBS(pH 7.4)に再溶解し、25mMピペラジン-HCl(pH 5.5)に3回透析し、FPLCシステム [Pharmacia]に接続したカラムでPBE94

10

20

30

40

50

[Pharmacia]のマトリクスについての等電点クロマトグラフィーに付した。カラムは25mM ピペラジン-HCl(pH 5.5)で平衡化し、溶出を10%PB74-HCl (pH 4.0) [Pharmacia]を用いて行った。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、最終容量が1~3mlになるように3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機 [Amicon]でPBSを用いて3回洗浄し、上記のようにしてプレップ細胞で分離した。

【0188】

CFP22Aの同定

ST-CFを限外ろ過で約10倍に濃縮し、80%飽和でタンパク質を沈殿させ、PBS(pH 7.4)に再溶解し、PBS(pH 7.4)に3回透析した。Rnase(0.2mg/ml, QUIAGEN)とDNase(0.2mg/ml, B oehringer Mannheim)で透析したST-CF 5.1mlを6時間処理し、ソルバル(Sorvall)チューブ [Ultracrimp 03987, DuPont Medical Products]内のPBS(pH 7.4)中48%ショ糖(w/v)6.4mlの上部に置き、10、257,300xg_{max}で20時間、超遠心分離した。ペレットは、200µlの25mM Tris-192mMグリシン、0.1% SDS(pH 8.3)に再溶解した。

10

【0189】

CFP7A、CFP25A、CFP27、CFP30A及びCFP50の同定

CFP27、CFP30A及びCFP50については限外ろ過でST-CFを約10倍に濃縮し、45~55%飽和の硫酸アンモニウム沈殿を行った。タンパク質は、50mMリン酸ナトリウム、1.5mM硫酸アンモニウム(pH 8.5)に再溶解し、Affi-Tゲルカラム [Kem-En-Tec] でのチオフィル吸着クロマトグラフィーに付した。タンパク質は、1.5から0Mに低下する硫酸アンモニウムの勾配で溶出した。SDS-PAGEで同様のバンドパターンを有する画分をプールし、FPLCシステム [Pharmacia]に接続したMono Q HR 5/5カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは、10mM Tris-HCl(pH 8.5)で平衡化し、0~1MのNaCl勾配で溶出した。SDS-PAGEで分離したバンドのウェル含有画分を選択した。

20

【0190】

CFP7とCFP25Aは、以下の点を変えるほかは上記のようにして得られた:限外ろ過でST-CFを約10倍に濃縮し、80%飽和でタンパク質を沈殿させ、PBS(pH 7.4)に再溶解し、PBS(pH 7.4)に3回透析した。1.5Mの濃度まで硫酸アンモニウムを加え、ST-CFタンパク質をAffi T-ゲルカラムにロードした。Affi T-ゲルカラムとアニオン交換からの溶出は、上記のようにして行った。

【0191】

30

CWP32の単離

熱処理したH37Rvは、Sorensenらが記載(1995)しているように、細胞下画分にサブ分画した。細胞壁画分は、8Mユレア、0.2%(w/v) N-オクチル -_Dグルコピラノシド [Sigma]及び5%(v/v)グリセロールに再懸濁し、同じ緩衝液で平衡化したロトフォル等電点細胞 [BioRad]にタンパク質溶液を塗布した。等電点フォーカスは、3~6のpH勾配で行った。画分をSDS-PAGEで分析し、分離したバンドのウェル含有画分をプールし、PVDF膜への転移後にN-末端シーケンシングに付した。

【0192】

N-末端シーケンシング

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

40

以下のN-末端配列が得られた:

【0193】

【化14】

CFP7A: AEDVRAEIVA SVLEVVVNEG DQIDKGDVVV LLESMYMEIP
 VLAEAAGTVS (SEQ ID NO: 81)
 CFP8A: DPVDDAFIAKLNTAG (SEQ ID NO: 73)

CFP8B: DPVDAIINLDNYGX (SEQ ID NO: 74)
 CFP16: AKLSTDELLDAFKEM (SEQ ID NO: 79)
 CFP19: TTSPDPYAALPKLPS (SEQ ID NO: 82)
 CFP19B: DPAXAPDVPTAAQLT (SEQ ID NO: 80)
 CFP22A: TEYEGPKTKF HALMQ (SEQ ID NO: 83)
 CFP23A: VIQ/AGMVT/GHIHXVAG (SEQ ID NO: 76)
 CFP23B: AEMKXFKNAIVQEID (SEQ ID NO: 75)
 CFP25A: AIEVSVLRVF TDSGD (SEQ ID NO: 78)
 CWP32: TNIVVLIKQVPDTWS (SEQ ID NO: 77)
 CFP27: TTIVALKYPG GVVMA (SEQ ID NO: 84)
 CFP30A: SFPYFISPEX AMRE (SEQ ID NO: 85)
 CFP50: THYDVVVLGA GPGGY (SEQ ID NO: 86)

10

20

【0194】

サンガーデータベースでのN-末端ホモロジー検索及び相当する遺伝子の同定

各タンパク質由来のN-末端アミノ酸配列は、サンガーの結核菌データベース:

<http://www.sanger.ac.uk.projects.m-tuberculosis/TB-blast-server>.

のブラストプログラムを用いるホモロジー検索に用いた。

CFP23B、CFP23A及びCFP19Bについては、サンガーのデータベースで類似性が見出されなかった。これは、検索を行ったときにシーケンスされていた結核菌ゲノムは70%にすぎないという事実のためである。これらのタンパク質をエンコードする遺伝子は、シーケンスデータがいまだ利用できない残りの30%のゲノムに含まれているであろう。

CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19B、CFP22A、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50については、以下の情報が得られた。 30

【0195】

CFP7A: CFP7Aの決定された50アミノ酸のうち、98%同一な配列がコスミドcsCY07D1(contig 256)に見出された: スコア=226(100.4ビット)、イクスペクト(expect)=1.4e-24、P=1.4e-24、同一性=49/50(98%)、陽性=49/50(98%)、フレーム(frame)=-1。

【0196】

【化15】

問 : 1 AEDVRAEIVASVLEVVVNEG DQIDKGDVVV LLESMYMEIPVLAEAAGTVS 50
 (Query) AEDVRAEIVASVLEVVVNEG DQIDKGDVVV LLESM MEIPVLAEAAGTVS
 対象 : 257679 AEDVRAEIVASVLEVVVNEG DQIDKGDVVV LLESMKMEIPVLAEAAGTVS 257530
 (subject)

40

(SEQ ID NOS: 127, 128, 及び 129)

【0197】

同一性は、理論MWがCFP7Aの7305.9Da及びpI 3.762に相当する71アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内で見出される。SDS-PAGEで認められた分子量は、7kDaである。

【0198】

CFP8A: 15個のN-末端アミノ酸に80%が同一な配列が、contig TB 1884に見出された。培養液から精製したタンパク質由来の決定されたN-末端配列は、32番目のアミノ酸で開始する。これにより、MW 9700Da及びpI 3.72の理論値に相当する98アミノ酸長の成熟タン

50

パク質が生じる。これは、SDS-PAGEで認められる約8kDaのMWに一致する。全長タンパク質は、MW 12989Da及びpI 4.38の理論値を有する。

【0199】

CFP8B: 14個のN-末端アミノ酸に71%同一な配列が、contig TB 653に見出された。しかし、最初のN-末端配列データを注意深く再評価することにより、タンパク質の同一性が確認された。培養液から精製したタンパク質の決定されたN-末端配列は、29番目のアミノ酸で開始する。これにより、MW 8337Da及びpI 4.23の理論値に相当する82アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。これは、SDS-PAGEで認められる約8kDaのMWに一致する。アミノ酸配列解析により、培養液に見出された成熟タンパク質から切断されたシグナルペプチドの存在することが予測される。

10

【0200】

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

同一性は、13440.4Da及びpI 4.59のCFP16の理論MWに相当する130アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、16kDaである。

【0201】

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

同一性は、18633.9Da及びpI 5.41のCFP19の理論MWに相当する176アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、19kDaである。

20

【0202】

CFPA22A: 15個のN-末端アミノ酸配列は、コスミド MTCY1A6 に見られる配列と100%同一であることが分かった。

同一性は、20441.9Da及びpI 4.73のCFP22Aの理論MWに相当する181アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、22kDaである。

【0203】

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

同一性は、24574.3Da及びpI 4.95のCFP25Aの理論MWに相当する228アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、25kDaである。

30

【0204】

CFPA27: 15個のN-末端アミノ酸配列は、コスミド MTCY 261に見られる配列と100%同一であることが分かった。

同一性は、291アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。培養液から精製したタンパク質の決定されたN-末端配列は、58番目のアミノ酸で開始する。これにより、24422.4Daの理論分子量、4.64の理論pIに相当する233アミノ酸長の成熟タンパク質が生じる。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、27kDaである。

40

【0205】

CFPA30A: CFP30Aで決定された13個のアミノ酸について、100%同一な配列がコスミドMTCY 261 に見出された。

同一性は、26881.0Da及びpI 5.41のCFP30Aの理論MWに相当する248アミノ酸のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、30kDaである。

【0206】

CWP32: 15個のN-末端アミノ酸配列は、contig 281に見られる配列と100%同一であることが分かった。同一性は、28083Da及びpI 4.563のCWP32の理論MWに相当する266アミノ酸長

50

のオープンリーディングフレーム内に見出された。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、32kDaである。

【0207】

CFP50: 15個のN-末端アミノ酸配列は、MTV038.06に見られる配列と100%同一であることが分かった。同一性は、49244Da及びpI 5.66のCFP50の理論MWに相当する464アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見出される。SDS-PAGEゲルで認められた分子量は、50kDaである。

【0208】

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

TFASTAアルゴリズムを用いる、2つの初期に同定された高度に免疫応答性のST-CFタンパク質のアミノ酸配列とのEMBLデータベース (BiobaseのGCGパッケージを使用、Arhus-DK) でのホモロジー検索により、これらのタンパク質(CFP21とCFP25、実施例3)が、真菌のクチナーゼホモログの群に属することが示された。これらのうちで、もっとも相同な配列は、コスミドMTCY13E12に見らる2つの結核菌配列であった。まず、MTCY13E12.04は、CFP25とCFP21に、それぞれ46%及び50%同一である。次に、MTCY13E.12.05も、CFP25とCFP21に46%及び50%同一である。2つのタンパク質は、184残基を重複させて62.5%の同一なアミノ酸を共有する。強力なT-細胞抗原CFP21とCFP25に高度なホモロジーに基づくと、CFP19AとCFP23は、それぞれ新規なT-細胞抗原であるものと考えられる。

【0209】

最初の読み枠は、254アミノ酸のタンパク質をエンコードし、最初の26アミノ酸は、タンパク質の細胞外の位置を強く示す仮想のリーダーペプチドを構成している。したがって、成熟タンパク質は、23149.0Daの理論MWと5.80のpIに相当する228アミノ酸の長さである。このタンパク質を、CFP23と命名する。

二番目の読み枠は、231アミノ酸のタンパク質をエンコードし、最初の44アミノ酸は、タンパク質の細胞外の位置を強く示す仮想のリーダーペプチドを構成している。したがって、成熟タンパク質は、19020.3Daの理論MWと7.03のpIに相当する187アミノ酸の長さである。このタンパク質を、CFP19Aと命名する。

【0210】

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

【0211】

EMBLデータベースでのCFP7A、CFP16、CFP19、CFP19A、CFP19B、CFP22A、CFP23、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50とのホモロジー検索

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

【0212】

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

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

10

20

30

40

50

【 0 2 1 3 】

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

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

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

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

【 0 2 1 4 】

CFP19B: ホモロジーは、見られない。

CFP22A: ホモロジーは、見られない。

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

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

【 0 2 1 5 】

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

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

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

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

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

【 0 2 1 6 】

CFP7A、CFP8A、CFP8B、CFP16、CFP19、CFP19A、CFP22A、CFP23、CFP25A、CFP27、CFP30A、CWP32及びCFP50をエンコードする遺伝子のクローニング

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

【 0 2 1 7 】

PCR反応物は、10mlの反応容量に4つの各ヌクレオチド250mM [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー 5pmol及び Taq+ DNAポリメラーゼ 0.5 ユニット[Stratagene]を加えた1x低塩 Taq+ 緩衝液 [Stratagene]に結核菌の染色体 DNA 10ng を含むものであった。反応は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモサイクラー装置[Idaho Technology]を用いて10秒間94、10秒間55 及び90秒間72 のプログラムを30サイクル行った。

【 0 2 1 8 】

次いで、DNAフラグメントを1%アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピン-Xスピンカラム [Costar] で精製し、pBluescript SK II+ -T ベクター [Stratagene] にクローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミド DNAを調製し、適切な制限酵素で消化し、発現ベクター pMCT6 (発現されるタンパク質のN-末端に加えられる8個のヒスチジン残基とフレームを合わせた) にサブクローンした。得られたクローンは、この後、シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp.、合衆国]を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー [モデル373A、Applied Biosystems]と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンスにより、シーケンスした。遺伝子の両鎖をシーケンスした。

10

20

30

40

50

個々の抗原のクローニングには、以下の特異的な遺伝子プライマーを用いた：

【 0 2 1 9 】

CFP7A: cfp7Aのクローニングに用いたプライマー

【 化 1 6 】

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

【 0 2 2 0 】

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

10

CFP8A: cfp8Aのクローニングに用いたプライマー：

【 化 1 7 】

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

【 0 2 2 1 】

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

CFP8B: cfp8Bのクローニングに用いたプライマー：

【 化 1 8 】

20

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

【 0 2 2 2 】

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

CFP16: cfp16のクローニングに用いたプライマー：

【 化 1 9 】

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

30

【 0 2 2 3 】

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

CFP19: cfp19のクローニングに用いたプライマー：

【 化 2 0 】

OPBR-96: GAGGAAGATCTATGACAACCTCACCACCGCCG (SEQ ID NO: 107)
 OPBR-97: CATGAAGCCATGGCCCGCAGGCTGCATG (SEQ ID NO: 108)

【 0 2 2 4 】

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

40

CFP19A: cfp19Aのクローニングに用いたプライマー

【 化 2 1 】

OPBR-88: CCCCCAGATCTGCACCACCGGCATCGGCGGGC (SEQ ID NO: 99)
 OPBR-89: GCGGCGGATCCGTTGCTTAGCCGG (SEQ ID NO: 100)

【 0 2 2 5 】

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

50

CFP22A: cfp22Aのクローニングに用いたプライマー :

【化22】

OPBR-90: CCGGCTGAGATCTATGACAGAATACGAAGGGC (SEQ ID NO: 101)
 OPBR-91: CCCC GCCAGGGA ACTAGAGGCGGC (SEQ ID NO: 102)

【0226】

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

CFP23: cfp23のクローニングに用いたプライマー :

【化23】

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

【0227】

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

CFP25A: cfp25Aのクローニングに用いたプライマー :

【化24】

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

【0228】

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

CFP27: cfp27のクローニングに用いたプライマー :

【化25】

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

【0229】

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

CFP30A: cfp30Aのクローニングに用いたプライマー :

【化26】

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

【0230】

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

CWP32: cwp32のクローニングに用いたプライマー :

【化27】

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

【0231】

CWP32-F及びCWR32-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBglIII及びNcoI部位をそれぞれ生じる。

CFP50: cfp50のクローニングに用いたプライマー :

10

20

30

40

【化 2 8】

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

【 0 2 3 2】

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

【 0 2 3 3】

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

10

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。各タンパク質について、アンピシリン100 µg/mlを含有するLB-培地1 lを、組換えpMCT6プラスミドを有するXL-1 Blue細胞の一晩培養液10mlに接種した。培養は、OD₆₀₀が0.4~0.6の密度に達するまで37 °Cで振盪した。この後、最終濃度が1mMになるようにIPTGを加え、さらに4~16時間、培養した。細胞を回収して1x超音波処理緩衝液+8Mユレアに再懸濁し、パルス間で30秒停止して、5x30秒、超音波処理した。

【 0 2 3 4】

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

溶出後、全画分(各1.5ml)を、マイティ・スモール [Hoefer Scientific Instruments, 合衆国]システムを用いるSDS-PAGEでの分析に付し、タンパク質濃度を280nmで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、10mM Tris-HCl(pH8.5)中の3Mユレアに透析した。透析したタンパク質は、6mlのResource-Qカラムを用いてFPLC [Pharmacia、スウェーデン]でさらに精製し、0~1MのNaClの線状勾配で溶出した。画分はSDS-PAGEで分析し、タンパク質濃度はOD₂₈₀で予測した。タンパク質含有画分をプールし、25mM Hepes緩衝液(pH 8.5)に透析した。

20

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

【 0 2 3 5】

実施例3B:CFP7B、CFP10A、CFP11及びCFP30Bの同定
 CFP7Bの単離

30

ST-CFは、80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿し、PBS(pH 7.4)に再溶解し、25mMピペラジン-HCl(pH 5.5)に3回透析し、FPLCシステム [Pharmacia]に接続したカラムでPBE94 [Pharmacia]のマトリクスについての等電点クロマトグラフィーに付した。カラムは25mMピペラジン-HCl(pH 5.5)で平衡化し、10%PB74-HCl (pH 4.0) [Pharmacia]を用いて溶出を行った。同様のバンドパターンを有する画分をプールし、最終容量が1~3mlになるように3kDaのカットオフメンブレンを有するセントリプレップ濃縮機 [Amicon]でPBSを用いて3回洗浄した。サンプル緩衝液を含む等量のSDSを加え、タンパク質溶液を5分煮沸し、10~20%ポリアクリルアミドのマトリクス [Andersen, P.及びHeron, I., 1993]のマルチエリユーター (MultiEluter) [Biorad]でさらに分離した。PVDF膜への転移後に、10kDa以下で

40

【 0 2 3 6】

CFP11の単離

ST-CFは、80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿した。沈殿したタンパク質は遠心分離で除き、再懸濁後に8Mユレアで洗浄した。最終濃度がそれぞれ0.5%(w/v)と5%(v/v)になるようにCHAPSとグリセロールを加え、タンパク質溶液をロトフォル等電点細胞 [BioRad]に塗布した。0.5%CHAPS(w/v)、5%グリセロール(v/v)、3%バイオリット3/5 (v/v)及び1%バイオリット4/6 (v/v) [BioRad]を含む8Mユレア緩衝液で、ロトフォル細胞を平衡化した。等電点フォーカスは、3~6のpH勾配で行った。銀染色した10~20%のSDS-PAGEで画分を分析した。pH 5.5~6の勾配で画分をプールし、最終容量が1mlになるように、3kDaのカ

50

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

【0237】

CFP10AとCFP30Bの単離

ST-CFは、限外ろ過及び80%飽和の硫酸アンモニウム沈殿で約10倍に濃縮した。タンパク質は、50mMのリン酸ナトリウム、1.5Mの硫酸アンモニウム(pH8.5)に再溶解し、Affi-Tゲルカラム [Kem-En-Tec]でのチオフィル吸着クロマトグラフィーに付した。タンパク質は、1.5から0Mに減少する硫酸アンモニウムの勾配で溶出した。SDS-PAGEで同様のバンドパターンを有する画分をプールし、FPLCシステム[Pharmacia]に接続したMono Q HR 5/5カラムでアニオン交換クロマトグラフィーを行った。カラムは10mM Tris-HCl(pH 8.5)で平衡化し、0~1MのNaCl勾配で溶出した。SDS-PAGEで分離したバンドのウェル含有画分を選択した。

10

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

【0238】

N-末端シーケンシング

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

20

以下のN-末端配列が得られた:

【0239】

【化29】

CFP7B:	PQGTVKWFNAEKGFG	(SEQ ID NO: 168)
CFP10A:	NVTVSIPTILRPXXX	(SEQ ID NO: 169)
CFP11:	TREMTDPHAMRDMAG	(SEQ ID NO: 170)
CFP30B:	PKRSEYRQGTNPWVD	(SEQ ID NO: 171)

「X」は、用いたシーケンス法では決定できないアミノ酸を示す。

30

【0240】

サンガーデータベースでのN-末端ホモロジー検索及び相当する遺伝子の同定

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

CFP11について15個のN-末端アミノ酸に100%同一な配列が、contig TB 1314に見られた。同一性は、MW 10977Da及びpI 5.14の理論値に相当する98アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

この配列も得られたように(結果を示していない)、アミノ酸の1つは、(Thrの代わりに)Alaでもよい。このN-末端に100%同一な配列がcontig TB 671及びMTCI 364.09の座に見出される。

40

【0241】

CFP7Bについて15個のN-末端アミノ酸に100%同一な配列が、EMBL受託番号がz95436のcontig TB 2044及びMTY15C10.04の座に見られた。同一性は、MW 7240Da及びpI 5.18の理論値に相当する67アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

CFP10Aについて12個のN-末端アミノ酸に100%同一な配列が、EMBL受託番号: Q10646及びZ73902のcontig TB 752及びCY130.20の座に見られた。同一性は、MW 9557Da及びpI 4.78の理論値に相当する93アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

【0242】

CFP30Bについて15個のN-末端アミノ酸に100%同一な配列が、contig TB 335に見られた

50

。同一性は、MW 27345Da及びpI 4.24の理論値に相当する261アミノ酸長のオープンリーディングフレーム内に見られた。

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

【 0 2 4 3 】

【化30】

CFP7B (SEQ ID NO: 147)

1 MPQGTVKWFN AEKGFQFIAP EDGSADVFEVH YTEIQGTGFR TLEENQKVEF
51 EIGHSPKGPQ ATGVRSL

10

CFP10A (SEQ ID NO: 141)

1 MNVTVSIPTI LRPHTGGQKS VSASGDTLGA VISDLEANYS GISERLMDPS
51 SPGKLRHFVN IYVNDEDVRF SGGLATAIAD GDSVTILPAV AGG

CFP11 protein sequence (SEQ ID NO: 143)

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

20

CFP30B (SEQ ID NO: 145)

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

30

【 0 2 4 4 】

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

PCR反応物は、10mlの反応容量に4つの各ヌクレオチド250mM [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー 5pmol及び Taq+ DNAポリメラーゼ 0.5 ユニット [Stratagene]を加えた1x低塩 Taq+ 緩衝液 [Stratagene]に結核菌の染色体 DNA 10ng を含むものであった。反応物は、最初に25秒間94 に加熱し、サーモサイクラー装置 [Idaho Technology]を用いて10秒間94、10秒間55 及び90秒間72 のプログラムを30サイクル行った。

40

【 0 2 4 5 】

次いで、DNAフラグメントを1%アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピン-Xスピンカラム [Costar] で精製し、pBluescript SK II+ -T ベクター [Stratagene] にクローンした。その後、所望のフラグメントを有するクローンからプラスミド DNAを調製し、適切な制限酵素で消化し、発現ベクター pMCT6 (発現されるタンパク質のN-末端に加えらるる8個のヒスチジン残基とフレームを合わせた) にサブクローンした。得られたクローンは、この後、シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp.、合衆国]を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがった自動ゲルリーダー [モデル373A、Applied Biosyst

50

ems]と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンスにより、シーケンスした。遺伝子の両鎖をシーケンスした。

個々の抗原のクローニングには、以下の特異的な遺伝子プライマーを用いた：

【0246】

CFP7B: cfp7Bのクローニングに用いたプライマー

【化31】

CFP7B-F:	CTGAGATCTAGAAATGCCACAGGGAAGTGTG	(SEQ ID NO: 160)
CFP7B-R:	TCTCCCGGGGTAACCTCAGAGCGAGCGGAC	(SEQ ID NO: 161)

CFP7B-F及びCFP7B-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBgIII及びSmaI部位をそれぞれ生じる。 10

【0247】

CFP10A: cfp10Aのクローニングに用いたプライマー：

【化32】

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

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

【0248】

CFP11: cfp11のクローニングに用いたプライマー：

【化33】

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

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

【0249】

CFP30B: cfp30Bのクローニングに用いたプライマー：

【化34】

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

CFP30B-F及びCFP30B-Rは、pMCT6でのクローニングに用いられるBgIII及びPvuII部位をそれぞれ生じる。

【0250】

CFP7B、CFP10A、CFP11及びCFP30Bの組換えタンパク質の発現/精製

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているようにして行った。アンピシリン100 µg/mlを含有するLB-培地1 lを、組換えpMTC6プラスミドを有するXL-1 Blue細胞の一晚培養液10mlに接種した。培養は、OD₆₀₀が0.5の密度に達するまで37 で振盪した。その後、最終濃度が1mMになるようにIPTGを加え、さらに4時間、培養した。細胞を回収して1x超音波処理緩衝液+8Mユレアに再懸濁し、パルス間で30秒停止して、5x30秒、超音波処理した。 40

【0251】

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

溶出後、全画分(各1.5ml)を、マイティ・スモール [Hoefer Scientific Instruments, 合衆国]システムを用いるSDS-PAGEで分析に付し、タンパク質濃度を280nmで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、10mM Tris-HCl(pH8.5)中の3Mユレアに透析した。透析したタンパク質は、6mlのResource-Qカラムを用いてFPLC [Pharmacia, スウェー 50

デン]でさらに精製し、0~1MのNaClの線状勾配で溶出した。画分はSDS-PAGEで分析し、タンパク質濃度はOD₂₈₀で予測した。タンパク質含有画分をプールし、25mM HEPES緩衝液(pH 8.5)に透析した。

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

【0252】

実施例4：CFP26(MPT51)発現遺伝子のクローニング

プローブの合成及びデザイン

オリゴヌクレオチドプライマーは、DNAシンセサイザー [Applied Biosystems, Foster City, Ca, ABI-391, PCRモード]で自動合成し、脱阻害し、エタノール沈殿で精製した

10

Oharaら(1995)により記載されているmpb51のヌクレオチド配列に基づいて、3つのオリゴヌクレオチドを合成した(表3)。オリゴヌクレオチドは、5'末端と3'末端にEcoRI制限酵素部位を含むように設計し、後者によってサブクローニングを可能にした。

MPT51のヌクレオチド配列(図5及びSEQ ID NO:41)に基づいて、さらに4つのオリゴヌクレオチドを合成した。PCR研究にはプライマーの4つの組み合わせを用いた。

【0253】

DNAクローニングとPCR技術

DNAの調製と処理には、標準的な方法を用いた [Sambrookら、1989]。遺伝子mpt51は、前述のとおりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて結核菌H37Rvの染色体DNAからクローンした [OettingerとAndersen、1994]。PCR産物は、pBluescript SK+ [Stratagene]にクローンした。

20

【0254】

mpt51のクローニング

遺伝子、つまりMPT51のシグナル配列とシャインダルガノ領域は、PCR技術を用いてpBluescript SK+ に952bp及び815bpの2つのフラグメントとしてクローンし、pT052及びpT053とした。

【0255】

DNAシーケンシング

MPT51のシャインダルガノ配列、シグナルペプチド配列及び構造遺伝子を含む952bpの結核菌 H37Rv PCRフラグメントがクローンされたヌクレオチド配列 pT052及び MPT51の構造遺伝子を含む815bpのPCRフラグメントがクローンされたヌクレオチド配列 pT053は、シーケナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp., Cleveland, OH]を用いてスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー [モデル373A、Applied Biosystems]と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンスにより決定した。DNAの両鎖をシーケンスした。

30

【0256】

pT052とpT053のヌクレオチド配列及び推測されるアミノ酸配列は、図5に示す。DNA配列は、45~47の位置のATGコドンで開始し、942~944の位置の終止コドン(TAA)で終わるオープンリーディングフレームを含んだ。最初の33コドンのヌクレオチド配列は、シグナル配列をエンコードしているものと推測された。精製MPT51 [Nagaiら、1991]の公知のN-末端アミノ酸配列 (Ala-Pro-Tyr-Glu-Asn)及びシグナルペプチドの特徴に基づく、シグナルペプチダーゼ認識配列 (Ala-X-Ala) [von Heijne, 1984]は、144位置の成熟タンパク質のN-末端領域の前に位置しているものと考えられる。したがって、結核菌 H37Rv由来の MPT51をエンコードする構造遺伝子 mpt51は、図5に示す配列の144~945の位置に位置していることが分かった。mpt51のヌクレオチド配列は、Oharaら (1995)により記載されているMPB51のヌクレオチド配列と比較してヌクレオチドが1つ異なった(図5)。mpt51の780の位置では、グアニンをアデニンに置換していることが分かった。推定されるアミノ酸配列によれば、この変化は最初の位置のコドンで生じ、アミノ酸をアラニンからスレオニン

40

50

に変わる。したがって、mpt51は801bpからなること、及び推定されるアミノ酸配列は、分子量が27,842の266残基を含むこと、MPT51はMPB51と99.8%の同一性を示すことが結論づけられる。

【0257】

mpt51のサブクローニング

MPT51をエンコードする遺伝子のコード領域のみが発現されるように、EcoRI部位をmpt51の最初のコドンの5'に隣り合うように設計し、3'末端の停止コドンの直後に挿入した。

組換えプラスミド pT053のDNAは、EcoRI部位で切断した。アガロースゲルから815bpのフラグメントを精製し、pMAL-cR1発現ベクター [New England Biolabs]のEcoRI部位にサブクローンし、pT054とした。融合遺伝子を含むベクターDNAは、DNA操作の標準的な方法で大腸菌 XL-1 Blueの形質転換に用いた。

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

【0258】

rMPT51の調製及び精製

組換え抗原は、New England Biolabsの指示にしたがって調製した。要約すると、アンピシリン50 µg/ml及びテトラサイクリン12.5 µg/mlを含むルリア - ベルタニ培地にpT054プラスミドを有する大腸菌のシングルコロニーを接種し、 2×10^8 細胞/mlまで37 °Cで成長させた。次いで、最終濃度が0.3mMになるようにイソプロピル - β-D-チオガラクトシド (IPTG)を加え、さらに2時間成長させた。新しいカラム緩衝液 (Tris-HCl 20mM (pH 7.4)、NaCl 200mM、EDTA 1mM、ジチオスレイトール(DTT) 1mM)にペレット化した細菌を-20 °Cで一晩置き、4 °Cで溶かした後、30分氷上でリゾチーム 1mg/mlとインキュベーションし、超音波処理 (20秒間隔、10秒間20回)した。4 °Cで30分、9,000xgで遠心分離後、マルトース結合タンパク質-MPT51融合タンパク質 (MPB-rMPT51)を、アミロース樹脂カラムのアフィニティクロマトグラフィーで粗抽出物から精製した。MPB-rMPT51は、アミロースに結合する。カラムを何度も洗浄した後、融合タンパク質をマルトース 10mMで溶出した。アリコートの画分を10% SDS-PAGEで分析した。重要な融合タンパク質を含む画分をプールし、生理食塩水に何度も透析した。

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

【0259】

10

20

30

【表 4】

表 3. mpt51 ヌクレオチド^aの配列

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

10

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

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

20

【 0 2 6 0 】

発現ベクター pMST24でのmpt51のクローニング

PCRフラグメントは、MPT51-FとMPT51-Rのプライマーの組み合わせを用いてpT052から産生した(表4)。BamHI部位は、MPT51をエンコードする遺伝子のコード領域のみが発現されるように mpt51の最初のコドンの5'に隣接して設計し、3'末端の停止コドンの直後に NcoI部位を導入した。

PCR産物は、BamHI及びNcoI部位で切断した。811bpのフラグメントをアガロースゲルから精製し、pMST24発現ベクターのBamHI部位及びNcoI部位にサブクローンし、pT086とした。DNA操作の標準的な方法で、融合遺伝子を含有するベクターDNAを大腸菌 XL-1 Blueの形質転換に用いた。

30

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

【 0 2 6 1 】

rMPT51の調製及び精製

組換え抗原は、アンピシリン50 µg/ml及びテトラサイクリン12.5 µg/mlを含むルリアーベルタニ培地に接種したプラスミド pT086を有する大腸菌のシングルコロニーから調製し、 2×10^8 細胞/mlまで37 °Cで成長させた。

40

【 0 2 6 2 】

次いで、最終濃度が1mMになるようにイソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)を加え、さらに2時間成長させた。BC 100/20緩衝液 (KCl 100mM、イミダゾール20mM、Tris/HCl 20mM(pH 7.9)、グリセロール20%)にペレット化した細菌を再懸濁した。細胞は、超音波処理(20秒間隔、10秒間20回)で破壊した。4 °Cで30分、9,000xgで遠心分離後、不溶物を8Mユレアを有するBC 100/20緩衝液に再懸濁し、超音波処理し、上記のように遠心分離した。6xHis tag-MPT51融合タンパク質(His-rMPT51)は、Ni-NTA樹脂カラム [Qiagen, Hiden、ドイツ]でのアフィニティークロマトグラフィーで精製した。His-rMPT51は、Ni-NTAに結合する。カラムを何度も洗浄した後、8Mユレアを有するBC 100/40緩衝液(KCl 100mM、イミダゾール40mM、Tris/HCl 20mM(pH 7.9)、グリセロール20%)及び8Mユレアを有する

50

BC 1000/40緩衝液(KCl 1000mM、イミダゾール40mM、Tris/HCl 20mM(pH 7.9)、グリセロール20%)で融合タンパク質を溶出した。His-rMPT51は、Tris/HCl 10mM(pH 8.5)、3Mユレアに透析し、0~1MのNaClの線状勾配でTris/HCl 10mM(pH 8.5)、3Mユレアを用いるアニオン交換カラム(Mono Q)でタンパク質高速液体クロマトグラフィー(FPLC)[Pharmacia, Uppsala, スウェーデン]を用いて精製した。rMPT51含有画分をプールし、次いで使用前にHepe s 25mM (pH 8.0)に透析した。

【0263】

タンパク質濃度は、Pierce [Pierce Chemical Company, Rockford, IL]のBCA法で測定した。リポポリサッカライド(LPS)含量はリムルス変形細胞溶解試験(LAL)で決定した。rMPT51は0.004ng/μg未満であった。この濃度は、細胞活性に影響がなかった。

10

【0264】

【表5】

表4. mpt51 オリゴヌクレオチドの配列

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

20

【0265】

実施例4A: ESAT6-MPT59及びMPT59-ESAT6ハイブリッドのクローニング
ESAT6-MPT59及びMPT59-ESAT6融合物のバックグラウンド

ESAT-6は免疫原性であるが、免疫化の際に一貫した結果を得るために補助するのは比較的難しいことが、幾つかの研究により立証されている。抗原での免疫化後にESAT-6の生体外認識を見出すことは、結核菌に対する免疫記憶を回復するあいだに見出される抗原の強力な認識と比較すると非常に困難である。切断型(truncated version)のST-CFに見られるESAT-6は、1~15アミノ酸が欠失されている。欠損は、C57BL/6jマウスで認識される主要なT-細胞エピトープを含む [Brandtら、1996]。この結果、ESAT-6は、STCFでN-末端処理されているか、又はタンパク質加水分解で分解される。免疫原としてESAT-6を最適化するために、ESAT-6と別の主要なT細胞抗原 MPT59の融合遺伝子が構築された。2つの異なる構築物、MPT59-ESAT-6 (SEQ ID NO:172)及びESAT-6-MPT59(SEQ ID NO:173)がつくられた。最初のハイブリッドで、ESAT-6はMPT59によりN-末端が保護され、後者では、2つの優勢なT-細胞抗原の融合で相乗効果の生じることが推測される。

30

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

40

【0266】

MPT59-ESAT6ハイブリッドの構築

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

ESAT6:

【化35】

OFBR-4: GGC GCCGGCAAGCTTGCCATGACAGAGCAGCAGTGG (SEQ ID NO: 132)
OFBR-28: CGAACTCGCCGGATCCCGTGTTCGC (SEQ ID NO: 133)

【0267】

50

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

MPT59:

【化36】

OPBR-48: GGCAACCGCGAGATCTTTCTCCCGCGGGGGC (SEQ ID NO: 134)

OPBR-3: GGCAAGCTTGCCGGCGCCTAACGAACT (SEQ ID NO: 135)

【0268】

OPBR-48及びOPBR-3は、それぞれBglIII及びHindIIIを生じる。さらに、OPBR-3は、MPT59の停止コドンに欠失している。

【0269】

PCR反応物は、10µlの反応容量に4つの各ヌクレオチド250mM [Boehringer Mannheim]、BSA 0.5mg/ml [IgG technology]、1% DMSO [Merck]、各プライマー 5pmol及びTaq+ DNAポリメラーゼ 0.5ユニット[Stratagene]を加えた1x低塩 Taq+ 緩衝液 [Stratagene]に結核菌の染色体 DNA 10ngを含むものであった。反応物は、最初に25秒間94に加熱し、サーモサイクラー装置[Idaho Technology]を用いて10秒間94、10秒間55及び90秒間72のプログラムを30サイクル行った。

【0270】

次いで、DNAフラグメントを1%アガロースゲルに付し、バンドを切りだして、スピン-Xスピニングカラム [Costar] で精製した。2つのPCRフラグメントをHindIIIで消化し、結合した。MPT59-ESAT6をエンコードする結合したPCRフラグメントのPCR増幅は、プライマー OPBR-48及びOPBR-28を用いて行った。PCR反応は最初に25秒間94に加熱し、30秒間94、30秒間55及び90秒間72のプログラムを30サイクル行った。得られたPCRフラグメントをBglIIIとBamHIで消化し、発現ベクター pMCT6にクローン(発現されるハイブリッドタンパク質のN-末端に加えらる8個のヒスチジンとフレームを合わせた)した。得られたクローンは、この後シーケンナーゼDNAシーケンシングキットバージョン1.0 [United States Biochemical Corp.、合衆国]を用いるスーパーコイルDNA用に合わせたジデオキシ鎖末端法、及び添付の指示書にしたがって自動ゲルリーダー [モデル373A、Applied Biosystems]と組み合わせたダイ・ターミネーターシステムを用いるサイクルシーケンシングによりシーケンシングした。DNAの両鎖をシーケンシングした。

【0271】

ESAT6-MPT59ハイブリッドの構築

ESAT6-MPT59ハイブリッドの構築は、ハイブリッド MPT59-ESAT6に記載しているようにして行った。構築及びクローニングに用いたプライマーは、以下のとおりであった：

ESAT6:

【化37】

OPBR-75: GGACCCAGATCTATGACAGAGCAGCAGTGG (SEQ ID NO: 136)

OPBR-76: CCGGCAGCCCCGCGGGGAGAAAAGCTTTGCGAACATCCCAGTGACG (SEQ ID NO: 137)

【0272】

OPBR-75及びOPBR-76は、それぞれBglIII及びHindIII部位を生じる。さらに、OPBR-76は、ESAT6の停止コドンに欠失している。

MPT59:

【化38】

OPBR-77: GTTCGCAAAGCTTTTCTCCCGCGGGGGCTGCCGGTCGAGTACC (SEQ ID NO: 138)

OPBR-18: CCTTCGGTGGATCCCGTCAG (SEQ ID NO: 139)

OPBR-77及びOPBR-18は、それぞれHindIII及びBamHI部位を生じる。

【0273】

MPT59-ESAT6及びESAT6-MPT59ハイブリッドタンパク質の発現/精製

組換えタンパク質の発現及び金属親和性精製は、本質的に製品に記載されているように

10

20

30

40

50

して行った。各タンパク質について、アンピシリン100 μ g/mlを含有するLB-培地1 lを、組換えpMTC6プラスミドを有するXL-1 Blue細胞の一晚培養液10mlに接種した。培養は、 OD_{600} が0.4~0.6の密度に達するまで37 で振盪した。この後、最終濃度が1mMになるようにIPTGを加え、さらに4~16時間、培養した。細胞を回収して1x超音波処理緩衝液+8Mユレアに再懸濁し、パルスの際に30秒停止して、5x30秒、超音波処理した。

【0274】

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

溶出後、全画分(各1.5ml)を、マイティ・スモール [Hoefer Scientific Instruments, 合衆国]システムを用いるSDS-PAGEで分析に付し、タンパク質濃度を280nmで予測した。組換えタンパク質を含有する画分をプールし、10mM Tris-HCl(pH8.5)中の3Mユレアに透析した。透析したタンパク質は、6mlのResource-Qカラムを用いてFPLC [Pharmacia, スウェーデン]でさらに精製し、0~1MのNaClの線状勾配で溶出した。画分はSDS-PAGEで分析し、タンパク質濃度は OD_{280} で予測した。タンパク質含有画分をプールし、25mM Hepes緩衝液(pH 8.5)に透析した。

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

MPT59-ESAT6融合タンパク質の生物活性は、実施例6Aに記載する。

【0275】

実施例5:2DEシステムでの精製抗原のマッピング

精製抗原を特徴づけるために、二次元電気泳動(2DE)参照システムで、それらをマッピングした。これは、等電点フォーカス、次いでポリアクリルアミドゲル電気泳動での大きさにしたがった分別で分離されるST-CFタンパク質を含む銀染色ゲルからなる。2DEは、Hochstrasserら(1989)にしたがって行った。ST-CF 85 μ gは、両性電解質のバイオリット4-6(2部)とバイオリット5-7(3部) [BioRad]を含む等電点フォーカスチューブにアプライした。一次元は、ユレア、界面活性剤 CHAPS及び還元剤DTTの存在下、18時間400V及び2時間800Vでアクリルアミド/ピペラジンジアクリルアミドチューブゲルで行った。10~20%のSDS-PAGEの二次元は18時間100Vで行い、銀染色した。2DE参照ゲルでのCFP7、CFP7A、CFP7B、CFP8A、CFP8B、CFP9、CFP11、CFP16、CFP17、CFP19、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25、CFP27、CFP28、CFP29、CFP30A、CFP50及びMPT51の同定は、精製抗原を用いるか、用いないで、ST-CFとの精製抗原のスポットパターンを比較して行った。分析用2DEソフトウェアシステム[Phoretix International, 英国]を用いて、スポットを図6で同定した。MPT51とCFP29の位置は、Mabの抗CFP29及びHBT4を用いる2DEゲルのウェスタンプロットで確認した。

【0276】

実施例6:精製抗原の生物活性

TB感染マウスモデルでのIFN- の誘導

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

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

【0277】

10

20

30

40

【表 6】

表 5

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

抗原 ^a	IFN- γ (pg/ml) ^b
ST-CF	12564
CFP7	ND ^d
CFP9	ND
CFP17	9251
CFP20	2388
CFP21	10732
CFP22 + CFP25 ^c	5342
CFP26 (MPT51)	ND
CFP28	2818
CFP29	3700

10

20

データは、3回の実験のうちの代表的な実験に基づく。

^a ST-CF は 5 μ g/ml の濃度で試験し、個々の抗原は 2 μ g/ml の濃度で試験した。

^b 再試験から 4 日後に、3 匹のマウス由来の細胞のプールを試験した。

結果は、デュプリケート値の平均として示す。デュプリケート培養の差は、平均の 15%未満である。抗原なしで培養した培養液の IFN- γ 放出は、390pg/ml であった。

^c CFP22 及び CFP25 のプールを試験した。

30

^d ND、測定不能

【 0 2 7 8 】

TB感染したモルモットでの皮膚反応試験

精製タンパク質の皮膚活性試験は、結核菌に感染したモルモットで試験した。PBS 0.2ml 中に 1×10^4 CFU の結核菌 H37Rv で耳の静脈を通して一群のモルモットを感染させた。4週間後に皮膚試験を行い、注射から 24 時間後に紅斑の直径を測定した。

表 6 及び 6a から分かるように、全抗原が、顕著な遅延型過度感作 (DTH) 反応を誘導した。

【 0 2 7 9 】

【表 7】

表 6

天然抗原での刺激後に、 1×10^4 CFU の結核菌に感染したモルモットでの DTH 紅斑の直径

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

10

20

示した値は、4 匹の動物の紅斑直径の平均である。SEM は括弧に示す。PPD と CFP29 については、値は、10 匹の動物の紅斑直径の平均である。

^a 抗原は、CFP29 を $0.8 \mu\text{g}$ の濃度で試験した以外は、 $0.1 \mu\text{g}$ の濃度で試験した。

^b 皮膚反応は、皮内注射から 24 時間後の紅斑を mm で測定する。

^c PPD 10TU を用いた。

^d CFP22 と CFP25 のプールを試験した。

^e ND、測定不能

30

【0280】

これらの分析とともに、同定された抗原の多くは生物活性が高く、異なる動物モデルでの TB 感染のあいだに認識されることが示された。

【0281】

【表 8】

表 6a

1x10⁴ CFU の結核菌に感染した異系交配モルモットでの組換え抗原の DTH 紅斑の直径

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

示した値は、4 匹の動物での紅斑直径の平均である。SEM は括弧に示す。

対照、PPD と CFP29 については、値は、8 匹の動物の紅斑直径の平均である。

^a 抗原は、1.0 μg の濃度で試験した。

^b 皮膚反応試験は、皮内注射から 24 時間後の紅斑を mm で測定する。

^c PPD 10TU を用いた。

【0282】

精製組換え抗原の生物活性

TB感染したマウスモデルでのインターフェロン - の誘導

一次感染：8～12週齢のメスのマウス C57BL/6j(H-2^b)、CBA/J(H-2^k)、DBA.2(H-2^d)及びA.SW(H-2^s) [Bomholtegaard, Ry]は、側方(lateral)の尾の静脈を介して、0.1ml容量のPBSに懸濁した結核菌5x10⁴の接種物で静脈感染させた。感染から14日後に動物を屠殺し、脾臓細胞を単離し、組換え抗原の認識について試験した。

【0283】

表7から分かるように、組換え抗原 rCFP7A、rCFP17、rCFP21、rCFP25及びrCFP29は、全てST-CFに匹敵するレベルでマウスの少なくとも2つの種で認識された。rMPT51とrCFP7は、ST-CFの刺激後に検出された応答のわずか1/3に相当するレベルで、それぞれ1又は2つの種で認識されるにすぎなかった。抗原rCFP20とrCFP22は、いずれも4つのマウスの種のいずれによっても認識されなかった。

【0284】

記憶応答：8～12週齢のメスのマウス C57BL/6j(H-2^b) [Bomholtegaard, Ry]は、側方の尾の静脈を介して、0.1ml容量のPBSに懸濁した結核菌5x10⁴の接種物で静脈感染させた。感染から1ヵ月後に、飲料水中のイソニアジド [Merck and Co., Rahway, NJ]及びリファブチン(rifabutin) [Farmatalia Carlo Erba, ミラノ、イタリア]でマウスを2ヶ月間、処理した。実験に用いる前に、マウスを4～6ヵ月間休養させた。免疫記憶の回復研究のために、1x10⁶細菌の接種物で動物を静脈感染させ、感染から4日後に屠殺した。脾臓細胞を単離し、組換え抗原の認識について試験した。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 5 】

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

【 0 2 8 6 】

【表 9】

表 7 TB 一次感染での T 細胞の応答

10

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

20

結核菌に対する免疫記憶の回復のあいだのマウスの IFN- γ の放出

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

30

【 0 2 8 7 】

【表 10】

表 8 免疫記憶動物での T 細胞の応答

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

10

結核菌の一次感染から 14 日後のマウスの IFN- γ の放出

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

20

【0288】

ヒトTB患者及びBCG予防接種を受けたヒトでのインターフェロン- γ の誘導

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

【0289】

リンパ球調製及び細胞培養：PBMCは、リンホプレップ(Lymphoprep) [Nycomed、オスロ、ノルウェー]でヘパリン化した血液を勾配遠心分離により用時に単離した。細胞は、完全培地：ストレプトマイシン40 μ g/ml、ペニシリン 40U/ml及びグルタミン 0.04mM/ml [全てGibco Laboratories, Paisley, スコットランド]及び10%の通常のヒトABO血清(NHS) [local blood bank]を補足したRPMI 1640 [Gibco, Grand Island, N.Y.]で再懸濁した。細胞数と生存度は、トリパンブルー染色で測定した。培養は、マイクロタイタープレート [Nunc, Roskilde, デンマーク]で200 μ l中の2.5 $\times 10^5$ PBMCを用いて行い、最終濃度5 μ g/mlで、抗原なし、ST-CF、PPD(2.5 μ g/ml); rCFP7、rCFP7A、rCFP17、rCFP20、rCFP21、rCFP22、rCFP25、rCFP26、rCFP29で刺激した。フィットヘマグルチニン 1 μ g/ml [PHA, Difco laboratories, Dertoit, MI.]は、ポジティブコントロールとして用いた。サイトカインの検出のために、培養から5日後に上清を回収してプールし、-80 $^{\circ}$ Cで使用するまで保存した。

30

【0290】

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

40

【0291】

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

50

【 0 2 9 2 】

【 表 1 1 】

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

ST-CF 及びマイコバクテリウム・アビウム培養液は、比較用に示す。

対照、健常者、BCG 予防接種者、公知の TB 曝露なし

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

10

診断から 1~4 ヶ月後の TB 患者

	no ag	PHA	PPD	STCF	CFP7	CFP17	CFP7A	CFP20	CFP21
6	9	8973	5096	6145	852	4250	4019	284	1131
7	1	12413	6281	3393	168	6375	4505	11	4335
8	4	11915	7571	7375	104	2753	3356	119	407
9	32	22130	16417	17213	8450	9783	16319	91	5957

20

【 0 2 9 3 】

実施例 6A

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

1 群 : ESAT-6/DDA (250 μ g) 10 μ g

2 群 : MPT59/DDA (250 μ g) 10 μ g

3 群 : MPT59-ESAT-6/DDA (250 μ g) 10 μ g

4 群 : アジュバント対照群 : NaCl 中の DDA (250 μ g)

30

【 0 2 9 4 】

動物は、0.2ml の容量で注射した。最初の注射から 2 週間後及び二回目の注射から 3 週間後に、マウスの背の上部をわずかにブースターに付した。

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

【 0 2 9 5 】

【表 1 2】

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

a) 血液細胞は、最後の免疫化から 1 週間後に単離し、抗原の刺激 (5 µg/ml) から 72 時間後に IFN- γ の放出 (pg/ml) を測定した。

示した値は、3 匹のマウスからプールした細胞について行ったトリプリケートの平均±SEM である。

b) 測定せず

【0 2 9 6】

実験は、ハイブリッドでの免疫化が、単一抗原での免疫化後より強力に ESAT-6 及び MPT59 を認識する T 細胞を刺激していることを立証している。特に、ESAT-6 の認識は、MPT59-ESAT-6 ハイブリッドでの免疫化で促進された。DDA で免疫化した対照のマウスでの IFN- の放出は、1000pg/ml を超えなかった。

【0 2 9 7】

実施例 6B

組換え抗原は、マウスでのサブユニットワクチンとして個々に試験した。11 群の 6~8 週齢のメスの C57Bl/6J マウス [Bomholtegaard, デンマーク] を、以下のワクチン組成物で尾の基部に皮下で免疫化した。

1 群 : CFP7 10 µg

2 群 : CFP17 10 µg

3 群 : CFP21 10 µg

4 群 : CFP22 10 µg

5 群 : CFP25 10 µg

6 群 : CFP29 10 µg

7 群 : MPT51 10 µg

8 群 : ST-CF 50 µg

9 群 : アジュバント対照群

10 群 : BCG 2.5×10^5 /ml, 0.2ml

11 群 : 対照群 : 未処理

【0 2 9 8】

全てのサブユニットワクチンは、アジュバントとして DDA とともに与えた。動物は、0.2 ml の容量で予防接種した。最初の注射から 2 週間後、及び二回目の注射から 3 週間後に、1~9 群の背の上部をわずかにプースターに付した。最後の注射から 1 週間後にマウスを交配させ、血液細胞を単離した。相同なタンパク質で生体外で刺激された際の培養上清への IFN- の放出により、誘導される免疫応答をモニターした。

【0 2 9 9】

最後の免疫化から 6 週間後に、生存能力のある結核菌 5×10^6 /ml を有するエアロゾルにマウスを付した。感染から 6 週間後にマウスを屠殺し、感染したマウスの肺及び脾臓で生存している細菌数を、7H11 プレートで 3 連続希釈した器官のホモジネートをプレートして測定した。コロニーは、インキュベーションから 2~3 週間後に計測した。防護効率は、関連する 5 群のマウスから得られる数の幾何学上 (geometric) の平均と、関連する対照の群の 5 匹のマウスから得られる数の幾何学上の平均の \log_{10} 値の違いとして示す。

実験の結果は、以下の表に示す。

10

20

30

40

50

【 0 3 0 0 】

【表 1 3】

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

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

10

+++ 強力な免疫原性/高防護 (BCG レベル)

++ 中間的な免疫原性/中間的な防護

- 認識せず/防護せず

【 0 3 0 1 】

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

20

【 0 3 0 2 】

実施例7: cfp7、cfp9、mpt51、rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bならびにcfp7a、cfp7b、cfp10a、cfp17、cfp20、cfp21、cfp22、cfp22a、cfp23、cfp25及びcfp25aの種の分布

異なるマイコバクテリア種でのcfp7、cfp9、mpt51、rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bの存在

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

30

【 0 3 0 3 】

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

【 0 3 0 4 】

用いたオリゴヌクレオチドプライマーは、DNAシンセサイザーで自動合成し [Applied Biosystems, Foster City, CA, ABI-391, PCRモード]、脱阻害し、エタノール沈殿で精製した。分析に用いたプライマーは、表11に示す。

40

【 0 3 0 5 】

PCR増幅は、染色体20ngを、マスターミックス (各オリゴヌクレオチドプライマー0.5 μM、BSA [Stratagene] 0.25 μM、低塩緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH 8.8)、KCl 10mM、(NH₄)₂SO₄ 10mM、MgSO₄ 2mM及びTriton X-100 0.1%) [Stratagene]、各デオキシヌクレオシド三リン酸 0.25mM及びTaq Plus Long DNA ポリメラーゼ [Stratagene] 0.5U) と混合して、サーマル反応機 [Rapid Cycler, Idaho Technology, Idaho]で行った。最終容量は、10 μlとした (示した濃度は、全て最終容量での濃度である)。予備変性は、30秒間94で行った。変性30秒間94、アニーリング30秒間55及び伸長1分間72で、30サイクル

50

行った。

【 0 3 0 6 】

以下のプライマーの組み合わせも用いた（増幅した産物の長さを括弧で示す）。mpt51: MPT51-3及びMPT51-2（820bp）、MPT51-3及びMPT51-6（108bp）、MPT51-5及びMPT51-4（415bp）、MPT51-7及びMPT51-4（325bp）

cfp7: pVF1及びPVR1（274bp）、pVF1及びPVR2（197bp）、pVF3及びPVR1（302bp）、pVF3及びPVR2（125bp）

cfp9: stR3及びstF1（351bp）

【 0 3 0 7 】

【 表 1 4 】

10

表 10. この実施例で用いたマイコバクテリア株

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

20

30

^a American Type Culture Collection、合衆国

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

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

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

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

40

【 0 3 0 8 】

【表 15】

表 11. mpt51、cfp7 及び cfp9 オリゴヌクレオチドの配列

方向及び オリゴヌクレオチド センス	配列 (5'→3') ^a	位置 ^b (ヌクレオチド)
MPT51- 1	<u>CTCGAATTCG</u> CCGGTGCACACAG (SEQ ID NO: 28)	6 - 21 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 3	<u>CTCGAATTCG</u> CCCCATACGAGAAC (SEQ ID NO: 29)	143 - 158 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 5	GTGTATCTGCTGGAC (SEQ ID NO: 30)	228 - 242 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 7	CCGACTGGCTGGCCG (SEQ ID NO: 31)	418 - 432 (SEQ ID NO: 41)
pvR1	<u>GTACGAGAATTC</u> ATGTCGCAAATCATG (SEQ ID NO: 35)	91 - 105 (SEQ ID NO: 1)
pvR2	<u>GTACGAGAATTC</u> GAGCTTGGGGTGCCG (SEQ ID NO: 36)	168 - 181 (SEQ ID NO: 1)
stR3	<u>CGATTCCAAGCTT</u> GTGGCCGCCGACCCG (SEQ ID NO: 37)	141 - 155 (SEQ ID NO: 3)
アンチセンス		
MPT51- 2	GAGGAATTCGCTTAGCGGATCGCA (SEQ ID NO: 32)	946 - 932 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 4	CCCACATTCGGTTGG (SEQ ID NO: 33)	642 - 628 (SEQ ID NO: 41)
MPT51- 6	GTCCAGCAGATACAC (SEQ ID NO: 34)	242 - 228 (SEQ ID NO: 41)
pvF1	<u>CGTTAGGGATCCT</u> CATCGCCATGGTGTGG (SEQ ID NO: 38)	340 - 323 (SEQ ID NO: 1)
pvF3	<u>CGTTAGGGATC</u> CGGTTCCACTGTGCC (SEQ ID NO: 39)	268 - 255 (SEQ ID NO: 1)
stF1	<u>CGTTAGGGATCCT</u> CAGGTCTTTTCGATG (SEQ ID NO: 40)	467 - 452 (SEQ ID NO: 3)

10

20

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

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

30

【0309】

サザンプロットは、以下の点を変えるほかは、前述 [Oettinger 及び Anderse, 1994] のようにして行った：ゲノムDNA 2 µgはPvuIIで消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、真空転移装置 [Milliblot, TM-v; Millipore Corp., Bedford, MA] を用いてナイロンメンブレン (Hybond N-プラス; Amersham International plc, Little Chalfont, 英国) に移した。cfp7、cfp9、mpt51、rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9b遺伝子フラグメントは、プラスミド pRVN01、pRVN02、pT052、pT087、pT088、pT089、pT090、pT091、pT096又はpT098に表11及び表2 (実施例2a) に示すプライマーを用いるPCRにより増幅した。プローブは、改良されたケミルミネッセンスキット [ECL; Amersham International plc, Little Chalfont, 英国] で放射活性なしで標識した。ハイブリダイゼーション及び検出は、製品に添付されている指示書にしたがって行った。結果を表12及び13に要約する。

40

【0310】

【表 16】

表 12

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

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

+ ; 陽性反応、- ; 反応なし、N.D. ; 測定せず

【0311】

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

【0312】

さらに、異なるマイコバクテリア株由来の培養液中の天然の MPT51 の存在は、Mab HBT 4 を用いて展開したウェスタンブロッティングで研究した。

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

【0313】

10

20

30

40

【表 17】

表 13a

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

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

+ ; 陽性反応、- ; 反応なし、N. D. ; 測定せず

【0314】

rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bについての陽性の結果は、結核菌及びマイコバクテリウム・ボビス由来のゲノムDNAを用いた際にのみ得られ、rd1-orf4がマイコバクテリウム・マリナムにも見出された以外はマイコバクテリウム・ボビス又は分析された他のマイコバクテリアからも得られなかった。

【0315】

異なるマイコバクテリア種でのcfp7a、cfp7b、cfp10a、cfp17、cfp20、cfp21、cfp22、cfp22a、cfp23、cfp25及びcfp25aの存在

サザンブロッティングは、rd1-orf2、rd1-orf3、rd1-orf4、rd1-orf5、rd1-orf8、rd1-orf9a及びrd1-orf9bについて記載しているようにして行った。cfp7a、cfp7b、cfp10a、cfp17、cfp20、cfp21、cfp22、cfp22a、cfp23、cfp25及びcfp25aの遺伝子フラグメントは、個々の遺伝子をエンコードする組換えpMCT6プラスミドからPCRにより増幅した。用いたプライマー(クローニングに用いたプライマーと同じ)は、実施例3、3A及び3Bに記載する。結果を表13bに要約する。

【0316】

10

20

30

【表 18】

表 13b

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

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

10

20

＋；陽性反応、－；反応なし、N.D.；測定せず

【0317】

【表 19】

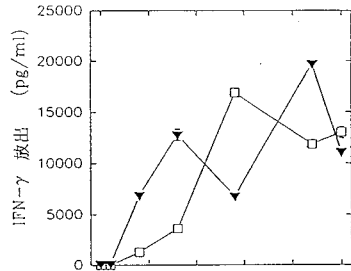
参照文献リスト

- Andersen, P. 及び Heron, I., 1993, *J. Immunol. Methods* **161**: 29-39.
- Andersen, Å. B. et al., 1992, *Infect. Immun.* **60**: 2317-2323.
- Andersen P., 1994, *Infect. Immun.* **62**: 2536-44.
- Andersen P. et al., 1995, *J. Immunol.* **154**: 3359-72
- Barkholt, V. 及び Jensen, A. L., 1989, *Anal. Biochem.* **177**: 318-322. 10
- Borodovsky, M., 及び J. McIninch. 1993, *Computers Chem.* **17**: 123-133.
- van Dyke M. W. et al., 1992. *Gene* pp. 99-104.
- Gosselin et al., 1992, *J. Immunol.* **149**: 3477-3481.
- Harboe, M. et al., 1996, *Infect. Immun.* **64**: 16-22.
- von Heijne, G., 1984, *J. Mol. Biol.* **173**: 243-251.
- Hochstrasser, D.F. et al., 1988, *Anal. Biochem.* **173**: 424-435
- Köhler, G. 及び Milstein, C., 1975, *Nature* **256**: 495-497. 20
- Li, H. et al., 1993, *Infect. Immun.* **61**: 1730-1734.
- Lindblad E.B. et al., 1997, *Infect. Immun.* **65**: 623-629.
- Mahairas, G. G. et al., 1996, *J. Bacteriol* **178**: 1274-1282.
- Maniatis T. et al., 1989, "Molecular cloning: a laboratory manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Nagai, S. et al., 1991, *Infect. Immun.* **59**: 372-382.
- Oettinger, T. 及び Andersen, Å. B., 1994, *Infect. Immun.* **62**: 2058-2064.
- Ohara, N. et al., 1995, *Scand. J. immunol.* **41**: 233-442.
- Pal P. G. 及び Horwitz M. A., 1992, *Infect. Immun.* **60**: 4781-92. 30
- Pearson, W. R. 及び Lipman D. J., 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- Ploug, M. et al., 1989, *Anal. Biochem.* **181**: 33-39.
- Porath, J. et al., 1985, *FEBS Lett.* **185**: 306-310.
- Roberts, A.D. et al., 1995, *Immunol.* **85**: 502-508.
- Sørensen, A.L. et al., 1995, *Infect. Immun.* **63**: 1710-1717.
- Theisen, M. et al., 1995, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **2**: 30-34.
- Valdés-Stauber, N. 及び Scherer, S., 1994, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3809-3814.
- Valdés-Stauber, N. 及び Scherer, S., 1996, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1283-1286. 40
- Williams, N., 1996, *Science* **272**: 27.
- Young, R. A. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2583-2587.

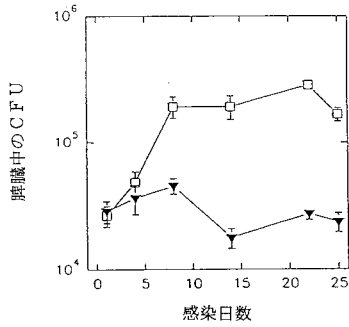
【図面の簡単な説明】

【 0 3 1 8 】

【 図 1 】

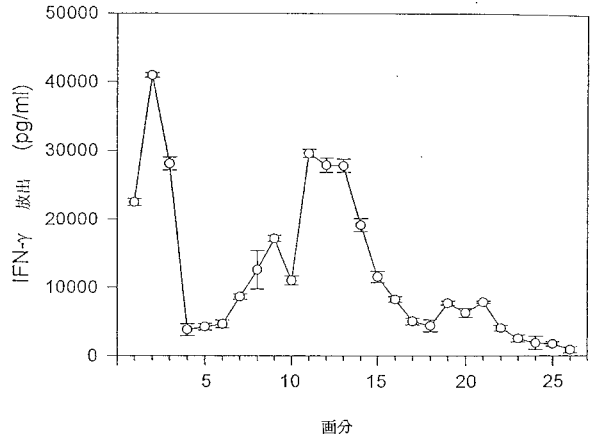


A



B

【 図 2 】



画分

【 図 3 】

```

60
120
180
240
300
360
381
GGCCGCGGTT ACCATATZTG CCGCCGATGC TCGCGNGGG TCGACCTAZA CCGGTTCTG
-35 領域
        シャインダルガノ
61 ATCGDACCCT CCTGACCCGAG AGGACTTGTG ATG TGG CAA ATC ATG TAC AAC TAC CCG GCG
        M S Q I M Y N Y P A
121 ATG TTG GGT CAC GCC GGG GAT ATG GCC GGA TAT GCC GGC ACC CTG CAG AGC TTG GGT GCC
        M L G H A G D M A G Y A G T L Q S L G A
181 GAG ATC GCC GTG GAG CAG GCC GCG TTG CAG AGT GCG TCG CAG GGC GAT ACC GGG ATC ACG
        E I A V E Q A A L Q S A W Q G D T G I T
241 TAT CAG GCG TGG CAG GCA CAG TGG MAC CAG GCC ATG GAA GAT TTG GTG CCG GCC TAT CAT
        Y Q A W Q A Q W N Q A W E D L V R Y H A
301 GCG ATC TCC AGC ACC CAT GAA GCC AAC ACC ATG GCG ATG ATG GCG ACC GAC ACC GCC GAA
        Y M S S T H E A N T M A M M A R D T A E
361 GCC GCC AAA TGG GGC GGC TAG
        A A K W G G *

```

【 図 4 】

```

60
120
170
230
290
350
410
467
GGGTAGCCCG ACCAGGCTG GGCARAGATG TCGAGGCCCG CATCARAGCGG GTCARAGCCCG
-35 領域
        シャインダルガノ
61 CCGACGGCT CATTAACCG GACGGCACT TGTGGGGGG CCCGGGGGTG CTGACGCCCG
        V A A D P E S T A A
121 ACGATACAA CTCGGGCTG GTG GCC GAC CCG GAG TCC ACC GCG GCG
        シャインダルガノ
171 TTG CCC GAC GCC GCG CTG GTC GTT CTG GAT GGC ACC GTC ACT GCC GAA CTC GAA GCC
        L P D G A G L V L D G T V T A E L E A
231 GAG GCG TGG GCC AAA GAT CGC ATC CGC GAA CTG CAA GAG CTG GGT AAG TCG ACC GGG CTG
        E G W A K D R I R E L Q E L R K S T G L
291 GAC GTT TCC GAC CCG ATC CCG GTG ATG TCG CCT GCG GAA CGC GAA GAC TGG GCG
        D V S D R I R V V M S V P A E R E D W A
351 CGC ACC CAT CGC GAC CTC ATT GCC GGA GAA ATC TTG GCT ACC GAC TTC GAA TTC GCC GAC
        R T H R D L I A G E I L A T D F E F A D
411 CTC GCC GAT GGT GTG GCC ATC GGC GAC GCG GTG GGT GTA AGC ATC GAA AAG ACC TGA
        L A D G V A I G D G V R V S I E K T *

```

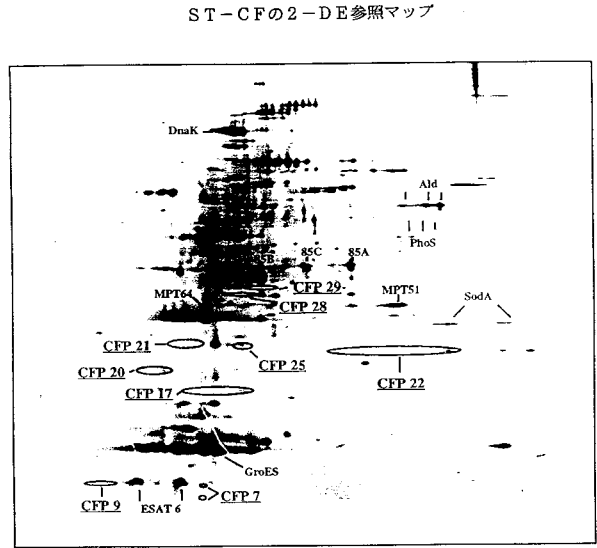
【 図 5 】

```

1  GAAATCGCCCGGGTGCACACAGCCTTACACGACGGAGGTGGACACATGAAG 50
                                     M K
51  GGTGCGGTCGGCGCTGCTGCGGGCGCTCTGGATTGCCCGACTGTCAATTCGG 100
    G R S A L L R A L W I A A L S F G
101  GTTGGGCGGTGTCGGGTAGCCGCGGAACCCACCGCCAAGGCCGCCCAT 150
    L G G V A V A A E P T A K A A P
151  ACGAGAACCTGATGGTCCGCTGCCTCGATGGGCCGGGACATCCCGGTG 200
    Y E N L M V P S P S M G R D I P V
201  GCCTTCCTAGCCGGTGGCCGACCGGGTGTATCTGCTGGACGCCTTCAA 250
    A F L A G G P H A V V L L D A F N
251  CGCCGGCCCGGATGTCAGTAACCTGGGTACCGCGGGTAACCGCGATGAACA 300
    A G P D V S N W V T A G N A M N
301  CGTTGGCGGGCAAGGGGATTCGGTGGTGGCACCGCGCGGTGGTGGCTAC 350
    T L A G K G I S V V A P A G G A Y
351  AGCATGTACCAACTGGGAGCAGGATGGCAGCAAGCAGTGGGACACCTT 400
    S M Y T N W E Q D G S K Q W D T F
401  CTTGTCGGCTGAGCTGCCCGACTGGTGGCCGCTAACCGGGGCTTGGCCC 450
    I S A E L P D W L A A N R G L A
451  CCGGTGGCCATGCGCCGCTGGCCGCGCTCAGGGCGGTACGGGGCGGATG 500
    P G G H A A V G A A O G G Y G A M
501  GCGCTGGCGGCTTCCACCCGACCGCTTCGGCTTCGGTGGCTCGATGTC 550
    A L A A F H P D R F G F A G S M S
551  GGGCTTTTGTACCGTCAACACCAACCAACCGGTGCGATCGCGGGGG 600
    G F L Y P S N T T T N G A I A A
601  GCATGCAGCAATTCGGCGGTGGACACCAACGGAATGTGGGAGCACCA 650
    G M Q Q F G G V D T N G M W G A P
651  CAGCTGGGTGGTGAAGTGGCAGCACCCGTTGGTGCATGCCAGCCTGCT 700
    Q L G R W K W H D P W V H A S L L
701  GGCAGAAAACAACCCCGGTGTGGGTGTGGAGCCGACCAACCCGGGAG 750
    A Q N N T R V W V W S P T N P G
751  CCAGCGATCCCGCCCATGATCGGCCAAACCGCCGAGGCGATGGGTAAC 800
    A S D P A A M I G O T A E A M G N
801  AGCCGATGTTCTACAACAGTATCGCAGCGTCCGGCGGCACAACGGACA 850
    S R M F Y N O Y R S V G G H N G H
851  CTTGACTTCCAGCCAGCGGTGACAACGGGTGGGGTCTGTGGGGCCGCC 900
    F D F P A S G D N G W G S W A P
901  AGCTGGGCGTATGTCGGCGGATATCGTGGTGGATCCGCTAAGCGAAT 950
    Q L G A M S G D I V G A I R
951  TC 952

```

【 図 6 】



【 配列表 】

2008142079000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成19年12月12日(2007.12.12)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】明細書

【 補正対象項目名 】0 3 1 8

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 0 3 1 8 】

【 図 1 】パネル A は、結核菌を適用したマウスの脾臓リンパ球をST-CFと生体外で刺激したときの、IFN- の放出を示す。パネル B は、2 群のマウスの脾臓中のCFU含量を示す。

【 図 2 】結核菌を適用してから4日後に単離した脾臓のT細胞を、ST-CFの狭い分子質量画分で生体外で刺激したときのIFN- の放出を示す。

【 図 3 】cfp7のヌクレオチド配列(SEQ ID NO:1)である。

【 図 4 】cfp9のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:3)である。

【 図 5 】mpt51のヌクレオチド配列である。

【 図 6 】2DE系での精製抗原の位置を決定し、参照ゲルにマッピングしたものを示す。

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成19年12月19日(2007.12.19)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 1) 結核菌タンパク質ESAT-6由来のT-細胞エピトープを構成する少なくとも1つの範囲のアミノ酸を含む第一アミノ酸配列と、MPT59由来の少なくとも1つのT-細胞エピトープを含む第二アミノ酸配列、又は
- 2) 結核菌タンパク質MPT59由来のT-細胞エピトープを構成する少なくとも1つの範囲のアミノ酸を含む第一アミノ酸配列と、ESAT-6由来の少なくとも1つのT-細胞エピトープを含む第二アミノ酸配列からなる融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 2】

第一及び第二T-細胞エピトープが、

【化 1】

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}} \geq 1$$

[式中、 N_{dif} は整列している際の2つの配列中で同一でない残基の全数であり、 N_{ref} は1つの配列における残基数である]により算出して、由来タンパク質に天然に存在する配列と少なくとも70%の配列同一性をそれぞれ有する請求項1に記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 3】

第一及び/又は第二アミノ酸配列が、

【化 2】

$$\frac{(N_{ref} - N_{dif})100}{N_{ref}} \geq 1$$

[式中、 N_{dif} は整列している際の2つの配列中で同一でない残基の全数であり、 N_{ref} は1つの配列における残基数である]により算出して、由来タンパク質と少なくとも70%の配列同一性を有する請求項1又は2に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4】

第一アミノ酸配列が ESAT-6 又はMPT59のアミノ酸配列であり、かつ第二アミノ酸配列が、第一アミノ酸配列がMPT59である場合にESAT-6、及び第一アミノ酸配列が ESAT-6である場合にMPT59から選択される結核菌のポリペプチドのアミノ酸配列である請求項1～3のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 172又は173に示すアミノ酸配列からなる請求項1～4のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 6】

2つのアミノ酸配列間にリンカーが導入されていない請求項5に記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 7】

ポリペプチドの自己アジュバント作用を可能するように脂質化される請求項1～6のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメント。

【請求項 8】

結核菌、マイコバクテリア・アフリカヌム又はマイコバクテリア・ボビスにより起こされる結核に対する診断又は予防接種用の医薬組成物の製造における請求項1～7のいずれか1つに記載の融合ポリペプチドフラグメントの使用。

【請求項 9】

請求項1～7のいずれか1つに定義する融合ポリペプチドフラグメントをエンコードする核酸配列からなるか、又はその相補的な核酸配列からなる単離形態の核酸フラグメント。

【請求項 10】

DNAフラグメントである請求項9に記載の核酸フラグメント。

【請求項 11】

ワクチンが、ワクチンを投与したヒトを含む動物により抗原を生体内で発現させ、抗原の発現量は、ヒトを含む動物での結核菌群のマイコバクテリア感染に耐性を増す効果を有する請求項9又は10に記載の核酸フラグメントからなるワクチン。

【請求項 12】

医薬として用いるための請求項9又は10に記載の核酸フラグメント。

【請求項 13】

結核菌、マイコバクテリア・アフリカヌム又はマイコバクテリア・ボビスにより起こされる結核に対する診断又は予防接種用の医薬組成物の製造における請求項9又は10に記載の核酸フラグメントの使用。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 7のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントと、免疫的かつ医薬的に受容な担体、賦形剤又はアジュバントとからなる免疫組成物。

【請求項 15】

担体が、融合ポリペプチドフラグメントが疎水性の非共有相互作用で結合するポリマー、及び融合ポリペプチドフラグメントが共有結合するポリマーからなる群から選択され；賦形剤が、希釈剤及び懸濁剤からなる群から選択され；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)、キュイル A、ポリ I:C、フロイント不完全アジュバント、IFN-、IL-2、IL-12、モノホスホリル脂質 A(MPL) 及びムラミルジペプチド(MDP) からなる群から選択される請求項14に記載の免疫組成物。

【請求項 16】

融合ポリペプチドフラグメントが疎水性の非共有相互作用で結合するポリマーが、プラスチックから選択され、融合ポリペプチドフラグメントが共有結合するポリマーが、多糖及びポリペプチドからなる群から選択される請求項15に記載の免疫組成物。

【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 ~ 7のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントである請求項14 ~ 16のいずれか 1 つに記載の免疫組成物。

【請求項 18】

3 ~ 20 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 ~ 7のいずれか 1 つに記載される融合ポリペプチドフラグメントである請求項17に記載の免疫組成物。

【請求項 19】

ワクチンの形態である請求項14 ~ 18のいずれか 1 つに記載の免疫組成物。

【請求項 20】

有効成分として非病原性微生物を含み、請求項 1 ~ 7のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントをエンコードする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、微生物にポリペプチドを発現させ、任意に分泌させる様式で微生物ゲノムに挿入されている、結核菌群に属するマイコバクテリアで引き起こされる結核に対してヒトを含む動物を免疫化するためのワクチン。

【請求項 21】

微生物が、細菌である請求項20に記載のワクチン。

【請求項 22】

細菌が、マイコバクテリア、サルモネラ、シュードモナス及びエシェリキア属からなる群から選択される請求項21に記載のワクチン。

【請求項 23】

微生物が、マイコバクテリア・ボビス BCGである請求項22に記載のワクチン。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントをエンコードする DNA フラグメントの少なくとも 2 つのコピーが、微生物ゲノムに導入されている請求項 20 ~ 23 のいずれか 1 つに記載のワクチン。

【請求項 25】

コピー数が、少なくとも 5 である請求項 24 に記載のワクチン。

【請求項 26】

請求項 9、10 及び 12 のいずれか 1 項に記載の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 27】

ウィルス、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド及びマイクロクロモソームからなる群から選択される請求項 26 に記載のベクター。

【請求項 28】

請求項 26 又は 27 に記載の少なくとも 1 つのベクターを有する形質転換細胞。

【請求項 29】

結核菌群に属する細菌である請求項 28 に記載の形質転換細胞。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントを発現する請求項 28 又は 29 に記載の形質転換細胞。

【請求項 31】

請求項 9 又は 10 に記載の核酸フラグメントを、宿主細胞で複製可能なベクターに挿入し、得られた組換えベクターを宿主細胞へ導入し、ポリペプチドを発現させるのに十分な条件下、培養培地で宿主細胞を培養し、宿主細胞又は培養培地からポリペプチドを回収する；又は

短期培養液から請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つで定義する融合ポリペプチドフラグメントを単離する；又は

結核菌群の全マイコバクテリア又はその溶解物又は画分からポリペプチドを単離する；又は

固相又は液相ペプチド合成でポリペプチドを合成するからなる請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントの産生方法。

【請求項 32】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントを製造、合成又は単離し、かつ

ワクチン用の培地に融合ポリペプチドフラグメントを可溶化又は分散させ、かつ

任意に他の結核菌抗原及び / 又は担体、賦形剤及び / 又はアジュバント物質を加えるか、又は

請求項 28 ~ 30 のいずれか 1 つに記載の細胞を培養し、かつ

ワクチン用の培地に細胞を移し、かつ

任意に担体、賦形剤及び / 又はアジュバント物質を加える

ことからなる請求項 14 ~ 19 のいずれか 1 つに記載の免疫組成物の産生方法。

【請求項 33】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントと動物又はヒト由来の血液サンプルを接触させることにより、血液サンプル中の単核細胞による細胞外相への少なくとも 1 つのサイトカインの顕著な放出は、動物が感作されていることを示す、動物又はヒトにおける結核菌群に属する細菌との現在又は過去の感作を診断するためのインビトロでの方法。

【請求項 34】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメント又は請求項 9 もしくは 10 に記載の核酸フラグメントを、任意に検出用手段と組み合わせてなる、ヒトを含む動物での結核の診断用組成物。

【請求項 35】

免疫アッセイで請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の融合ポリペプチドフラグメントと特異的に反応するモノクローナル又はポリクローナル抗体、又は該抗体の特異的結合フラグメント。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 6
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 8 7
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04	
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569 F	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 35/74 (2006.01)	A 6 1 K 35/74	

- (72)発明者 アンデルセン, ペーター
デンマーク国、ブロンショイ ディーケイ - 2 7 0 0、リストルプヴェイ 7
- (72)発明者 スクジョト, リッケ
デンマーク国、フレデリクスベルグ シー ディーケイ - 1 8 7 1、サル 5 .、ツアヴァルセン
スヴェイ 9
- (72)発明者 ローゼンクランツ, イーダ
デンマーク国、コペンハーゲン オー ディーケイ - 2 1 0 0、ティーエイチ 1 .、ラグンヒル
ドガード 7 0
- (72)発明者 ヴェルディング, カーリン
デンマーク国、コペンハーゲン エヌ ディーケイ - 2 4 0 0、ティーブイ 3 .、ノレプロガー
ド 2 2 4
- (72)発明者 ラースムセン, ペータ, ピアク
デンマーク国、コペンハーゲン オー ディーケイ - 2 1 0 0、ルドルフ ベルグスガード 5
- (72)発明者 エティンガ, トマス
デンマーク国、ヘレラップ ディーケイ - 2 9 0 0、エゲブジェルグ アレ 1 2
- (72)発明者 フロリオ, ヴァルタ
デンマーク国、フレデリクスベルグ シー ディーケイ - 1 9 6 4、インゲマンズヴェイ 2 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA13 BA31 BA50 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09
CA10 CA12 DA05 DA06 EA02 EA03 EA04 EA06 EA10 FA02
FA07 FA10 GA05 GA11 GA19 GA27 HA03 HA08 HA09 HA12
HA14
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ06 QQ42 QQ53 QQ79 QR08 QR32
QR36 QR42 QR48 QR55 QR62 QR66 QR69 QR75 QR77 QR82
QS03 QS12 QS16 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36 QX02
4B064 AG01 AG26 AG27 AG31 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 CE10
CE11 CE12 DA01 DA13 DA15
4B065 AA26X AA36X AA36Y AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA45 CA46
4C084 AA13 MA17 MA66 NA14 ZB35
4C085 AA03 BA09 CC07 DD23 DD61 EE06 GG01
4C086 AA01 AA02 EA17 EA18 MA01 MA04 MA17 MA66 NA14 ZB35
4C087 BC29 BC33 BC35 BC40 CA08 CA12 MA17 MA66 NA14 ZB35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA76 DA86 EA20
EA29 EA31 EA50 EA52 FA30 FA33 FA72 FA74 GA23 GA25
GA26

专利名称(译)	来自结核分枝杆菌的核酸片段和多肽片段		
公开(公告)号	JP2008142079A	公开(公告)日	2008-06-26
申请号	JP2007299636	申请日	2007-11-19
[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 スクジヨトリッケ ローゼンクランツイーダ ヴェルディングカーリン ラースムセンペータビアク エティンガトマス フロリオヴァルタ		
发明人	アンデルセン,ペーター スクジヨト,リッケ ローゼンクランツ,イーダ ヴェルディング,カーリン ラースムセン,ペータ,ビアク エティンガ,トマス フロリオ,ヴァルタ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K14/35 C07K16/12 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/04 A61K39/04 A61P31/06 G01N33/53 G01N33/569 C12P21/08 A61K48/00 A61K31/711 A61K35/74 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/104 A61K39/112 A61P31/04 A61P43/00 C12N5/10 C12N15/31		
CPC分类号	C07K14/35 A61K38/00 A61K39/00 A61K2039/51 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K14/35 C07K16/12 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/04 A61K39/04 A61P31/06 G01N33/53.D G01N33/569.F C12P21/08 A61K48/00 A61K31/711 A61K35/74 A61K35/74.B C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024 /CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA12 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/EA06 4B024/EA10 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024 /GA05 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063 /QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063 /QS12 4B063/QS16 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064 /CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA15 4B065/AA26X 4B065/AA36X 4B065/AA36Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065 /CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA17 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB35 4C085/AA03 4C085/BA09 4C085/CC07 4C085/DD23 4C085/DD61 4C085/EE06 4C085/GG01 4C086 /AA01 4C086/AA02 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA17 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB35 4C087/BC29 4C087/BC33 4C087/BC35 4C087/BC40 4C087/CA08 4C087 /CA12 4C087/MA17 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045 /EA29 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA30 4H045/FA33 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA25 4H045/GA26		

优先权 199700376 1997-04-02 DK
60/044624 1997-04-18 US
199701277 1997-11-10 DK
60/070488 1998-01-05 US

其他公开文献 JP4406024B2

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

要解决的问题：提供一种新颖的抗原，可有效地作为抗结核分枝杆菌疫苗的成分或作为检测结核分枝杆菌感染的诊断组合物。与ESAT-6（或MPT59）不同的结核杆菌蛋白和第一氨基酸序列，其至少一个氨基酸范围构成源自结核杆菌蛋白ESAT-6（或MPT59）的T细胞表位的氨基酸融合多肽片段，其包含至少一个衍生自和/或第二氨基酸序列的T细胞表位，所述第二氨基酸序列包含保护第一氨基酸序列免于体内降解或翻译后加工的一系列氨基酸。 [选择图]无

