

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6055780号  
(P6055780)

(45) 発行日 平成28年12月27日(2016.12.27)

(24) 登録日 平成28年12月9日(2016.12.9)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02
<b>G O 1 N</b>	<b>33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/15 Z
<b>G O 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 P
<b>G O 1 N</b>	<b>33/68</b>	<b>(2006.01)</b>	G O 1 N 33/68
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/04

請求項の数 11 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-545368 (P2013-545368)	(73) 特許権者	500449363
(86) (22) 出願日	平成23年12月21日(2011.12.21)		マックス・ブランク-ゲゼルシャフト ツ
(65) 公表番号	特表2014-502841 (P2014-502841A)		ール フェルデルンク デル ヴィッセン
(43) 公表日	平成26年2月6日(2014.2.6)		シャフテン エー. ファウ.
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/073609		ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8053
(87) 国際公開番号	W02012/085099		9 ホフガルテンシュトラッセ 8
(87) 国際公開日	平成24年6月28日(2012.6.28)	(73) 特許権者	507132639
審査請求日	平成26年11月13日(2014.11.13)		ワクチン プロジェクト マネジメント
(31) 優先権主張番号	61/425,442		ゲーエムベーハー
(32) 優先日	平成22年12月21日(2010.12.21)		ドイツ国 ハノーバー メレンドルファー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ストラッセ 9
前置審査		(74) 代理人	100113376
			弁理士 南条 雅裕
		(74) 代理人	100179394
			弁理士 瀬田 あや子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗マイコバクテリアのワクチン接種の有効性の判定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

組み換えマイコバクテリア生ワクチン(recombinant mycobacterial live vaccine)の有効性を判定するための方法であって、ここで、前記ワクチンはDanish株の亜種Prague由来の組み換えマイコバクテリウムボビス細胞であり、

ワクチン接種された対象から得られた生物学的サンプル中でのTヘルパー17型(Th17)免疫応答を判定するステップを含み、

ここで、前記ワクチン接種された対象はヒトであり、検出可能なTh17免疫応答は、前記対象での防御免疫に関する指標であることを特徴とする、

10

【請求項2】

請求項1に記載の方法であって、

ここで前記ワクチンは、

(a) 免疫応答を誘導することが可能なドメイン、および、

(b) ファゴリソソームエスケープドメイン

を含む融合ポリペプチドをコードする組み換え核酸分子を含む、組み換えマイコバクテリウムであることを特徴とする、

方法。

【請求項3】

20

請求項 2 に記載の方法であって、  
前記マイコバクテリウムがウレアーゼ欠損であることを特徴とする、  
方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、  
前記マイコバクテリウムは、r B C G U r e c : : H l y + : : H y g + であることを特徴とする、  
方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法であって、  
前記ワクチンは、マイコバクテリア感染に対するワクチンであることを特徴とする、  
方法。

10

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法であって、  
前記ワクチンは、結核菌 ( m y c o b a c t e r i a l t u b e r c u l o s i s )  
感染に対するワクチンであることを特徴とする、  
方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法であって、  
ここで、前記 T h 1 7 免疫応答を判定するステップは、  
前記のワクチン接種された対象由来の免疫細胞を含むサンプルを、前記ワクチンにおける免疫原に対応する免疫原での再刺激にさらすステップ、および、  
前記サンプルにおける T h 1 7 免疫応答に関連する細胞の存在および/または量を判定するステップ  
を含むことを特徴とする、  
方法。

20

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法であって、  
前記 T h 1 7 免疫応答を判定するステップは、I L 1 7 を判定するステップを含むこと  
を特徴とする、  
方法。

30

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、  
I L 1 7 が免疫学的方法によって判定されることを特徴とする、  
方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法であって、  
前記 T h 1 7 免疫応答は、ワクチン接種後 2 0 ~ 5 0 日に判定されることを特徴とする、  
方法。

40

【請求項 11】

組み換えマイコバクテリア生ワクチンの有効性を判定するための、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法における試薬キットの使用であって、ここで、前記ワクチンは D a n i s h 株の亜種 P r a g u e 由来の組み換えマイコバクテリウムボビス細胞であり、  
( a ) 以前にワクチン接種された対象由来の免疫細胞を再刺激するための試薬、ここで、前記ワクチン接種された対象はヒトである、および、  
( b ) T h 1 7 免疫応答を検出するための試薬  
を含む、  
試薬キットの使用。

【発明の詳細な説明】

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ワクチン、特に結核ワクチンの有効性を判定するための方法および試薬に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

毎年、最大で200万人までが、結核(TB)により死亡する(1)。TBに対して利用可能なただ一つのワクチンは、*Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin*(BCG)であり、1921年に初めてヒトで用いられた(2)。これまでに、40億回のBCGが投与されて、それを、世界中で最も広く用いられるヒトワクチンにしてきた(3)。しかしながら、我々はまだ、決してTBの根絶を達成したわけではない。BCGワクチン接種は、乳幼児での結核性髄膜炎および粟粒結核症を防止する(4)。しかしながら、TBの他の形態、とりわけ青年期および成人での肺のTBに対する防御は、成人での0~80%の範囲の防御の有効性を明らかにしたメタ分析で強調されるとおり決定的ではない(5)。したがって、TBに対する新しいワクチンが緊急に必要とされる。現在、臨床試験中のTBに対する新しいワクチン接種の戦略は、標準的なBCGを置き換えるための組み換えBCG、ならびにBCGの初回投与をブーストするための、サブユニットワクチン、および非複製性のウイルスベクターに基づくワクチンを含む(6)(7)。

## 【0003】

防御に潜在する免疫学的メカニズムの同定は、TB予防のための新規のワクチン接種の戦略の合理的なデザインを促進することができる。さらに、この戦略は、臨床のTBワクチン有効性試験における臨床転帰の代替エンドポイントを明らかにすることが可能な防御免疫を示すバイオマーカーを明らかにすることができ、そして、したがって、それらの持続時間を減少させ、そして、並行試験での、より多くの数のワクチン候補の試験を促進する。新しく感染されたTB患者の健常接触者、およびBCGワクチン接種された乳幼児に着目した観察研究が、そのようなバイオマーカーを決定するために開始された(8)。TBに対する免疫応答に関する広範囲の研究にもかかわらず、防御メモリの基本要素は、まだ解明されていない。BCGワクチン接種後、抗原特異的なメモリーCD4 T細胞は、免疫優性抗原の不足のせいで、検出するのが困難である。現在、最も広く用いられるバイオマーカーは、CD4 T細胞の亢進されたIFN 産生頻度に基づく。TBにおける防御の関連要因としてのIFN の価値に疑問を投げかける証拠が増加している(9、10)。疑いの余地なく、IFN は、MTBに対する防御において、確かに重要な役割を果たすが(11)、IFN のみの判定は、もはや、防御免疫の信頼できるマーカーとして考えることができない。

## 【0004】

ファゴリソソームエスケープドメインを発現する組み換えBCG株は、W099/101496に記載され、その内容は参照により本明細書中に援用される。ファゴリソソームエスケープドメインは、ファゴソームの膜を穿孔することによって、感染した宿主細胞のファゴソームからこの株が逃れることを可能にする。最適なファゴリソソームエスケープ活性のための酸性のファゴソームのpHを提供するために、ウレアーゼ欠損組み換え株が開発された。この株は、W02004/094469に開示され、その内容は本明細書中に援用される。

## 【0005】

*Listeria monocytogenes*の膜穿孔性リステリオリシン(Hly)を発現し、ウレアーゼCを欠いている、組み換え ureC Hly<sup>+</sup> rBCG(rBCG)株は、前臨床モデルにおいて、MTBでの吸入チャレンジ(aerogenic challenge)に対して、親BCG(pBCG)と比較して優れた防御を誘導する(12)。このワクチン構築物は、第I相臨床試験において安全性と免疫原性の証明に成功しており(US61/384,375)、その内容は参照により本明細書中に援用さ

10

20

30

40

50

れる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本研究では、rBCGおよびpBCGが、顕著なTh1免疫応答を誘導し、一方で、rBCGのみが誘導するのは、加えて、重大なTh17応答であることが示される。rBCGワクチン接種されたマウスのMTB感染時に、抗原特異的Tリンパ球の肺への早期の動員も観察された。これらのT細胞は、再刺激後に、大量のTh1サイトカインを産生した。rBCGの優れた防御の有効性は、見かけ上、IL17に依存した。pBCGではなくrBCGワクチン接種後の亢進されたIL17産生は、第I相臨床試験中に、健常ボランティアでも検出された。本発明者らの知見は、サブユニットワクチン候補によって探索されることもできる、TBに対する改良されたワクチン接種の戦略のためのマーカーとしての、一般的な免疫学的経路を同定する。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の要旨は、ワクチンの有効性を判定するための方法であって、  
ワクチン接種された対象でのTh17免疫応答を判定するステップを含み、  
ここで、Th17免疫応答の存在は、前記対象での防御免疫に関する指標であることを特徴とする、方法である。

【0008】

本発明のさらなる態様は、少なくとも1つの、Th17免疫応答を検出するための試薬を含む、ワクチンの有効性を判定するための試薬キットである。

20

【0009】

好ましい実施態様では、ワクチンは、生ワクチン、特に、マイコバクテリウム細胞である。さらにより好ましい実施態様では、ワクチンは、(a)免疫応答を誘導することが可能なドメイン、および、(b)ファゴリソームエスケープドドメインを含む融合ポリペプチドをコードする組み換え核酸分子を含む、組み換えマイコバクテリウムである。免疫応答を誘導することが可能なドメインは、好ましくは、病原体またはその免疫原性フラグメント由来の免疫原性ペプチドまたはポリペプチドである。さらなる実施態様では、ワクチンは、サブユニットワクチン、すなわち病原体由来の精製された抗原またはその免疫原性フラグメント、特に組み換え抗原またはその免疫原性フラグメントを含むワクチンである。さらに、さらなる実施態様では、ワクチンは、不活化された病原体細胞全体または細胞画分に基づくワクチンである。

30

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】WTマウスでのMTB負荷。皮下(s.c.)免疫付与は、MTBでの持続的感染(p.i.)90日の感染から防御する(A)。持続的感染(p.i.)7日では、細菌負荷は、ワクチン接種されたグループとワクチン接種されていないグループとの間で、同等である(B)。400CFUのMTBでのエアロゾル感染後の肺および脾臓におけるCFU測定。心肺葉(臓器全体の約71/10<sup>6</sup>)または脾臓の半分がホモジナイズされた;残りの材料は、インビトロの再刺激分析に用いられた。両側P値でのマンホイットニー検定により判定された統計的有意性。P<0.05; P<0.01。データは、同様の結果を有する3つの実験を代表する。

40

【図2】pBCGワクチン接種後よりも優れた、rBCGワクチン接種後のサイトカイン誘導。rBCGまたはpBCGでの皮下(s.c.)ワクチン接種後83日の、肺(A)および脾臓(B)での応答。合計2.5×10<sup>5</sup>(肺)または2×10<sup>6</sup>細胞(脾臓)が、PPDで20時間再刺激されて、上清が多重分析により分析された。サイトカイン濃度は、それぞれ3回再現した4つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。培地コントロールからのバックグラウンドのサイトカイン産生が差し引かれた。ANOVAおよびボンフェローニ多重比較検定が、統計的分析のために用いられた。P<0.05;

50

$P < 0.01$ 。

【図3】rBCGでのワクチン接種は、MTBでのエアロゾル感染時に、抗原特異的T細胞の、肺への動員を促進する。200~400CFUのMTBでのエアロゾル感染後7日の、肺細胞によるサイトカイン分泌。合計 $2 \times 10^5$ 細胞が、PPDで20時間刺激されて、上清が多重分析により分析された(A)。サイトカイン濃度は、それぞれ3回再現した2つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。培地コントロールからのバックグラウンドのサイトカイン産生が差し引かれた。プレフェルジンAの存在下で、PPDで6時間再刺激された細胞が、多色フローサイトメトリーによって分析された(B)。応答性CD4<sup>+</sup>T細胞の頻度は、それぞれ3回再現した3つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。ANOVAおよびボンフェローニ多重比較検定が、統計的分析に用いられた。 $P < 0.05$  ;  $P < 0.01$  ;  $P < 0.001$ 。

10

【図4】rBCGでのワクチン接種は、MTBでのエアロゾル感染時に、脾臓でのPPD特異的な応答を増加させる。200~400CFUのMTBでのエアロゾル感染後7日の、脾臓細胞によるサイトカイン分泌。合計 $2 \times 10^6$ 細胞が、PPDで20時間再刺激されて、上清が多重分析により分析された(A)。サイトカイン濃度は、それぞれ3回再現した4つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。培地コントロールからのバックグラウンドのサイトカイン産生が差し引かれた。プレフェルジンAの存在下で、PPDで6時間再刺激された細胞が、多色フローサイトメトリーによって分析された(B)。応答性CD4<sup>+</sup>T細胞の頻度は、それぞれ3回再現した3つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。ANOVAおよびボンフェローニ多重比較検定が、統計的分析に用いられた。 $P < 0.05$  ;  $P < 0.01$  ;  $P < 0.001$ 。

20

【図5】pBCGまたはrBCGでのワクチン接種は、Treg細胞の集団に有意な変化をもたらさない。rBCGまたはpBCGでの皮下(s.c.)免疫付与後の脾臓におけるTreg細胞。黒い棒は、CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>を表し、白い棒は、CD25<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>細胞を表す。免疫付与後83日(AとB)および7日(CとD)、または、200~400CFUのMTBでのエアロゾル感染後90日(EとF)の、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>Treg細胞の頻度。平均±標準誤差として示された、グループあたり3マウス。データは、同様の結果を有する3つの独立の実験を代表する。

【図6】ワクチン接種および後に続くMTBでのエアロゾル感染後に、肺でサイトカインを産生するCD8<sup>+</sup>T細胞の頻度。200~400CFUのMTBでのエアロゾル感染後7日の、サイトカイン分泌。プレフェルジンAの存在下で、PPDで6時間再刺激された細胞が、多色フローサイトメトリーによって分析された。応答性CD8<sup>+</sup>T細胞の頻度は、それぞれ3回再現した2つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。ANOVAおよびボンフェローニ多重比較検定が、統計的分析に用いられた。

30

【図7】ワクチン接種および後に続くMTBでのエアロゾル感染後に、脾臓でサイトカインを産生するCD8<sup>+</sup>T細胞の頻度。200~400CFUのMTBでのエアロゾル感染後7日の、サイトカイン分泌。プレフェルジンAの存在下で、PPDで6時間再刺激された細胞が、多色フローサイトメトリーによって分析された。応答性CD8<sup>+</sup>T細胞の頻度は、それぞれ3回再現した4つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。ANOVAおよびボンフェローニ多重比較検定が、統計的分析に用いられた。 $P < 0.05$  ;  $P < 0.01$  ;  $P < 0.001$ 。

40

【図8】rBCGワクチン接種されたマウスでの、持続的なMTB感染の間の、肺における免疫応答。200~400CFUのMTBでのエアロゾル感染後90日の、肺細胞によるサイトカイン分泌。細胞はPPDで20時間再刺激されて、上清が多重分析により分析された(A)。サイトカイン濃度は、それぞれ3回再現した2つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。培地コントロールからのバックグラウンドのサイトカイン産生が差し引かれた。プレフェルジンAの存在下で、PPDで6時間再刺激された細胞が、多色フローサイトメトリーによって分析された(B)。応答性CD4<sup>+</sup>T細胞の頻度は、それぞれ3回再現した2つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。ANOVAおよびボンフェローニ多重比較検定が、統計的分析に用いられた。 $P < 0.05$  ;  $P < 0$

50

. 0 1。

【図9】ワクチン接種および後に続くMTBでのエアロゾル感染後に、サイトカインを産生するCD8<sup>+</sup>T細胞の頻度。200~400CFUのMTBでのエアロゾル感染後90日の、肺から単離された細胞による、サイトカイン分泌。プレフェルジンAの存在下で、PPDで6時間再刺激された細胞が、多色フローサイトメトリーによって分析された。応答性CD8<sup>+</sup>T細胞の頻度は、それぞれ3回再現した2つの独立の実験の平均±標準誤差として示される。ANOVAおよびボンフェローニ多重比較検定が、統計的分析に用いられた。P<0.05。

【図10】ワクチン接種は、IL22産生を誘導するが、IL21産生は誘導しない。ワクチン接種および後に続く200~400CFUのMTBでのエアロゾル感染後83日のマウスの脾臓(2×10<sup>6</sup>細胞)または肺(2×10<sup>5</sup>細胞)由来の細胞による、IL21(A)およびIL22(B)分泌。平均±標準誤差が示された、グループあたり3サンプルから測定されたIL21濃度。1グループ由来のIL22サンプルに関しては、プールされた。データは、2つ(ワクチン接種後83日)および5つ(持続的感染(p.i.)7日)の同様な実験を代表する。細胞はPPDで20時間再刺激されて、上清がELISAにより分析された。

【図11】rBCGは、有意にAPCの集団を変化させることなく、T細胞およびNK細胞の増加された動員を生じさせる。10<sup>6</sup>CFUのrBCGまたはpBCGの腹腔内(i.p.)投与時に、腹腔腔へ動員された細胞。フローサイトメトリーによる、腹腔洗浄液中の細胞集団の分析。rBCGまたはpBCGの腹腔内(i.p.)投与後5時間(上パネル)および6日(下パネル)に、腹腔へ動員されたAPC(A)。注射後5時間の、T細胞集団のICS(B)。細胞は、プレフェルジンAの存在下で、CD3/CD28抗体で18時間刺激された。投与後6日の、T細胞集団のICS(C)。細胞は、プレフェルジンAの存在下で、PPDで18時間再刺激された。グループあたり5マウスでの、3つの独立の実験の概要として示されたデータ。横線は、中央値を示す。ANOVAおよびボンフェローニ多重比較検定が、統計的分析に用いられた。P<0.05;

P<0.01。平均濃度±標準誤差として示された、多重分析により分析された、腹腔洗浄液中に検出されたサイトカインおよびケモカイン(D)。

【図12】rBCGは、第I相臨床試験の健常ボランティア由来のヒトPBMCにおいて、IL17を誘導する。第I相臨床試験のヒト健常ボランティアから単離されたヒトPBMCによるIL17産生。rBCGまたはpBCGでのワクチン接種後29日に単離された、合計5×10<sup>5</sup>細胞は、PPDで20時間再刺激されて、上清が多重分析により分析された。片側P値およびウェルチの補正を伴うマンホイットニー検定により判定された統計的有意性。P<0.05;pBCGに関してn=3、および、rBCGに関してn=7。

【発明を実施するための形態】

【0011】

マイコバクテリウム細胞は、好ましくはM.bovis細胞、M.tuberculosis細胞、特に、弱毒化M.tuberculosis細胞または他のマイコバクテリア、例えばM.microti、M.smegmatis、M.canettii、M.marinumまたはM.fortuitumである。さらに好ましくは、細胞は、組み換えM.bovis(BCG)細胞、特に、Danish株の亜種Prague(43)由来の組み換えM.bovis細胞である。特に好ましい実施態様では、ワクチンは、組み換えウレアーゼ欠損マイコバクテリウム細胞である。特に好ましい実施態様では、例えば、選択マーカー遺伝子によって破壊されたureC遺伝子を含む自殺ベクター(suicide vector)を構築して、そのベクターで標的細胞を形質転換し、そして、ウレアーゼ陰性の表現型を有する選択マーカー陽性の細胞をスクリーニングすることによって、マイコバクテリウム細胞のureC配列が不活化される(Urec)。最も好ましくは、細胞は、rBCG Urec::Hly<sup>+</sup>::Hyg<sup>+</sup>として特徴付けられる、組み換えBCGの、Danish株の亜型Pragueである。

## 【0012】

免疫応答を誘導することが可能なドメインは、好ましくは、M. bovisまたはM. tuberculosis由来の免疫原性ペプチドまたはポリペプチド、または、少なくとも6、好ましくは少なくとも8アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも9アミノ酸、そして例えば、最大で20アミノ酸までの長さを有する、それらの免疫原性フラグメントから選択される。適切な抗原に関する具体例は、M. tuberculosis由来のAg 85 B (p30)、M. bovis BCG由来のAg 85 B ( - 抗原)、M. tuberculosis由来のAg 85 A、および、M. tuberculosis由来のESAT - 6、およびそれらのフラグメントである。

## 【0013】

ワクチンは、好ましくはマイコバクテリア感染、特に肺のマイコバクテリア感染、さらに特に結核に対するワクチンである。

## 【0014】

本発明の方法によれば、ワクチン接種された対象でのTh 17免疫応答が判定される。対象は、好ましくは哺乳類、例えばヒトである。判定は、好ましくは、前記対象由来の生物学的サンプル中で行われ、ここで前記サンプルは、免疫細胞、特にT細胞および/またはNK細胞、さらに特に、CD4 T細胞のような抗原特異的T細胞を含む。サンプルは、体液または組織サンプル、例えば血液、血清または血漿サンプル、または、肺または脾臓由来のサンプルであってよい。サンプルを採取する方法は、当技術分野でよく知られている。

## 【0015】

本発明の方法は、Th 17免疫応答の判定を必要とする。この目的のために、分析される対象におけるサンプル中に存在する免疫細胞を、免疫原で再刺激して、前記細胞からのサイトカイン発現を判定することが好ましい。分析されるべき細胞は、好ましくは抗原特異的T細胞、さらに好ましくはCD4 T細胞である。再刺激のための免疫原は、(その有効性が判定されるべき)ワクチン中に存在する免疫原に対応する。免疫原は、ワクチン中に存在する形態と同一の形態または異なる形態のいずれかで存在してよい。例えば、ワクチンが免疫原性ポリペプチドを含む場合は、再刺激のステップでの免疫原は、その免疫原性フラグメントを含んでよく、また逆の場合も同様である。好ましくは、再刺激のステップに用いられる免疫原は、精製されたポリペプチドまたはペプチドである。結核ワクチン、特に、上述の結核生ワクチンの有効性を試験するために、免疫原は、有利に、例えば、マイコバクテリアのグリセロール抽出物またはAg 85 AおよびAg 85 BであるPPD「精製されたタンパク質誘導體」から選択されるマイコバクテリアの抗原、ならびに、他のマイコバクテリアの抗原およびそれらの免疫原性フラグメント(上述のような)であってよい。

## 【0016】

本発明による、Th 17応答の判定は、表面マーカー、および、前記細胞中に存在し、および/または、前記細胞により分泌されるサイトカインを用いて、Th 17応答と関連する細胞、例えばIL - 17を産生する細胞を判定するステップを含んでよい。表面マーカーの例は、CD4、CD8、IL - 23R、CCR4および/またはCCR6である。そのような細胞中に存在し、および/またはそのような細胞により分泌されるサイトカインの例は、IL - 17、IL - 21、IL - 22、IL - 23、IFN - およびそれらの組み合わせである。好ましくは、サイトカインは、IL - 17である。そのような細胞は、細胞学的方法によって、例えば、蛍光基などの標識を有し得る、細胞表面マーカーおよび/またはサイトカインに特異的な抗体のような免疫学的検出試薬を用いた細胞ソーティング技術によって、判定されてよい。

## 【0017】

さらに好ましくは、Th 17免疫応答と関連する細胞は、例えば、IL - 17を産生し、場合により分泌するCD4 T細胞である。

## 【0018】

さらなる実施態様では、Th17免疫応答の判定は、Th17免疫応答と関係がある細胞から分泌されるサイトカイン、例えばIL-17を判定するステップを含む。サイトカインは、適切な抗体、例えばIL-17に対する抗体を用いた免疫学的方法により、判定されてよい。

【0019】

本発明の方法では、Th17免疫応答は、ワクチン接種後の適切な時に判定される。例えば、免疫応答は、ワクチン接種後20-50日、特に25-35日に判定されてよい。

【0020】

本発明は、また、ワクチンの有効性を判定するための、特に上述の方法での使用のための、試薬キットに関する。試薬キットは、ワクチン接種された対象由来のサンプル中に存在する免疫細胞を再刺激するのに適切な免疫原を含む。さらに、試薬キットは、上述のTh17免疫応答マーカを検出するのに適切な、少なくとも1つの試薬を含む。試薬は、例えば、細胞学のおよび/または免疫学的検出試薬、例えば、Th17免疫応答と関係がある細胞に特徴的な細胞マーカに対する抗体、および/または、Th17免疫応答と関連するサイトカイン、特にIL-17および/またはIL-22に特異的な免疫学的試薬から選択されてよい。検出領域は、検出可能な基、例えば蛍光標識基を有してよい。

10

【0021】

さらに、本発明は、以下の図および実施例により、より詳細に説明される。

【実施例】

【0022】

20

[材料および方法]

[マウス]

雌BALB/cマウスは、ベルリンのBundesinstitut für Risikobewertung (BfR)で繁殖された。マウスは、実験の開始時に6~8週齢であり、特定病原体不在(SPF)の状態に維持された。動物実験は、Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo、ベルリン、ドイツ)の承認を得て行われた。

【0023】

[細菌]

用いられたMTB H37RvおよびpBCG株とrBCG株は、以前に記載された(12)。細菌は、グリセロール、0.05% Tween 80とADCが補充されたMiddlebrook 7H9プラス中で培養された。中間対数(Mid-logarithmic)の培養物が回収されて、使用するまで-80で保存された。全ての保存は、使用前に滴定された。単細胞の細菌懸濁液が、27Gニードルを有するシリンジを通した繰り返しの移行により得られた。

30

【0024】

[ワクチン接種およびMTB感染]

pBCGまたはrBCG( $10^6$  CFU)は、尾の基部にごく接近して皮下投与(sc.)された。MTBでのマウスの吸入感染が、Glass-Col吸入チャレンジシステムを用いて行われた。細菌負荷は、PBS 0.5% v/v Tween 80中での、無菌的に除去された臓器の機械的破碎およびOADCが補充されたMiddlebrook 7H11寒天プレート上に段階希釈でプレーティングすることにより、評価された。3週間後、MTBコロニーが数えられた。結果の統計的有意性は、GraphPad Prism 5.0を用いて、ノンパラメトリックデータに関する両側P値でのマンホイットニー検定により判定された。

40

【0025】

[細胞単離、刺激およびフローサイトメトリー]

細胞は、以前に記載されるとおりに(42)、精製された。実験グループは、5マウスからなる。2つの脾臓または肺がプールされて、1つのサンプルが個々に処理されて、後に続く刺激のために、5マウスのグループあたり3つのサンプルをもたらした。細胞は、

50

多重分析によるサイトカイン分析のために50 µg/mlのPPD (SSI、コペンハーゲン、デンマーク)で20時間、または、細胞内サイトカイン染色 (ICS) のために25 µg/mlのプレフェルジンAの存在下で6時間、刺激された。以下の抗体が用いられた: CD4 (RM4-5)、IFN (XMG-1.2)、IL2 (JES6-5H4)、Ly6G/C (RB6-8C5)、CD11b (M1/70)、 $\alpha$ -TCR (GL-3)、FoxP3染色セットおよびCD49b (clone DX5)、全てeBioscience。CD8 (YTS169)、TNF- $\alpha$  (XT22)、CD16/CD32 (2.4G2)、F4/80 (CI:A3-1) およびCD11c (N418) は、ハイブリドーマ上清から精製されて、自家で (in house) 蛍光標識された。IL-17 (TC11-18H10) はBD Biosciencesから取得された。細胞は、FACSCanto IIまたはLSRIIFローサイトメーターおよびFACS Divaソフトウェア (BD Biosciences) を用いて分析された。サイトカインは、メーカーの使用説明書にしたがって、Bio-Radからの、Bio-Plex Mouse Th1/Th2、IL17およびIL6ビーズに基づくイムノアッセイを用いて測定された。IL21およびIL22は、R&D systemsからのELISAによって測定された。ヒトIL17は、MilliporeからのMilliplex 42-plexアッセイで検出された。

【0026】

[腹腔洗浄]

pBCGまたはrBCGは、中間対数の培養物から新しく調製された。細菌はPBSで3回洗浄されて、濃度が、580 nmでの光学濃度を測定することにより判定された。10<sup>6</sup> CFUの投与が、腹腔内に行われた。動員された細胞は、5時間または6日後に、5 mlのPBSの注射により腹膜腔から得られて、フローサイトメリーにより分析された。洗浄液中のサイトカインおよびケモカインは、Bio-RadからのBio-Plex Mouse Cytokine 23-plexキットを用いて判定された。

【0027】

[結果]

[rBCGおよびpBCGワクチン接種後のTh1/Th17応答]

TBワクチンの有効性に関連のある免疫のメカニズムを解明する試みにおいて、本発明者らは、マウスにおけるrBCGおよびpBCGに対する免疫応答を比較した。rBCGの優れた防御の有効性は、当初は、経静脈 (i.v.) 免疫付与後に判定された (12)。ここで、本発明者らは、rBCGの皮下 (s.c.) 投与が、匹敵するレベルの防御を誘導し、pBCGよりも優れた有効性を保持したことを示す (図1A)。次に、本発明者らは、rBCGまたはpBCGでの皮下 (s.c.) ワクチン接種後83日の、マウスの肺および脾臓における長期のメモリー応答を分析した。細胞は、PPDで再刺激されて、上清が、サイトカインに関する多重分析により分析された。rBCGでの免疫付与は、pBCGと比較して、有意により高い、肺から単離された細胞によるサイトカイン産生を誘導した (図2A)。これらは、IFN、IL2、IL6、およびGM-CSFを含んだ。対照的に、タイプ2サイトカインIL4、IL5およびIL10は、バックグラウンドのレベルを超えては増加しなかった (データ示さず)。興味深いことに、およそ3倍高いIL17濃度が、rBCGワクチン接種されたマウス由来の肺細胞により産生された。感染されていないマウスの肺からは、ほんの少しの細胞しか単離され得なかったことに留意されたい。その結果として、全体のサイトカイン濃度は、ウェルあたり10倍高い細胞密度を刺激のために用いることができた脾臓よりも低かった (図2B)。脾臓では、IL2、IL6、IFN およびGM-CSFの同程度の濃度により示されるように、両方のワクチンが同様に強いTh1応答を誘導した。しかしながら、rBCGワクチン接種されたマウス由来の脾臓細胞は、PPDでの再刺激の際に、pBCGワクチン接種された動物と比較して、有意に、より多いIL17を産生した。このように、pBCGではなくrBCGでの免疫付与は、肺および脾臓での同時かつ強いTh1およびTh17応答を誘導し、それは長期間持続した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 8 】

[ r B C G ワクチン接種されたマウスにおける、毒性 M T B での感染時の、M T B 特異的な T 細胞の促進された動員 ]

T h 1 7 細胞は、改良された免疫監視に関係している ( 1 3 )。本発明者らは、ワクチン接種された動物における、毒性 M T B でのエアロゾル感染時の、感染後 7 日の肺および脾臓での、抗原特異的な T 細胞の応答を比較した。r B C G ワクチン接種されたマウス由来の肺細胞による、際立った I F N 、 I L 1 7、I L 2 および G M - C S F 産生が、P P D ( 図 3 A ) または A g 8 5 A ペプチド ( データ示さず ) での再刺激後 2 0 時間に検出された。対照的に、これらのサイトカインは、p B C G ワクチン接種されたマウス由来の細胞からは、ほとんど分泌されなかった。M T B で感染された、ワクチン接種されていない動物では、サイトカイン産生は検出限界よりも下であり、M T B 特異的な T 細胞は、M T B 感染後 3 週間前は現れないという以前の報告 ( 1 3 ) と一致した。タイプ 2 サイトカイン I L 4、I L 5 および I L 1 0 は検出されず、T N F 、 I L 1 2 p 7 0 および I L 6 は、M T B チャレンジ後の、この早い時点において、かろうじてバックグラウンドレベルよりも上なだけであった ( データ示さず )。

10

## 【 0 0 2 9 】

本発明者らは、M T B 感染後 7 日に、フローサイトメトリーによって、肺の T 細胞によるサイトカイン産生を判定した ( 図 3 B )。細胞は P P D で 6 時間刺激されて、I L 2、I L 1 7、I F N および T N F に関する細胞内サイトカイン染色が続いた。ワクチン接種されていないコントロールでは、少ない割合の C D 4 T 細胞が、I L 2、T N F または I F N を産生した。ワクチン接種されたマウスでは、C D 4 T 細胞は、I L 2、I F N、T N F および I L 1 7 をも、分泌した。単一のサイトカインを産生する細胞の頻度は、有意ではないが、r B C G グループにおいて最も高かった。ワクチン接種された動物において、本発明者らは、防御免疫に関与する多機能 T 細胞 ( 1 4 ) を検出した。多重のサイトカインを産生する T 細胞は、主に、I L 2 + T N F + の二重プロデューサーであり、r B C G ワクチン接種時に有意に増加した。三重プロデューサー細胞は、ほぼ例外なく I L 2 + I F N + T N F + であり、p B C G ワクチン接種されたマウスと比較して、r B C G においてわずかに増加した。また、I L 2 + T N F + I F N + I L 1 7 + 四重陽性細胞は、非常に低い頻度であるが、r B C G グループにおいてのみ現れた。

20

30

## 【 0 0 3 0 】

原理上、脾臓の T 細胞は、肺の T 細胞と同様のサイトカインパターンを産生した ( 図 4 )。I L 2 と G M - C S F の産生は、p B C G グループと比較して、r B C G ワクチン接種された動物において、有意により高く、ワクチン接種されていないコントロールで少ない割合の C D 4 T 細胞が I F N を産生したとしても、ワクチン接種されていないコントロールでは、検出レベルより低かった。要するに、p B C G または r B C G のいずれかでのワクチン接種は、p B C G グループと比較して、r B C G ワクチン接種されたマウスにおいて、より高い頻度の単一または多重プロデューサーで I F N および T N F を分泌する C D 4 T 細胞を誘導した。

## 【 0 0 3 1 】

持続的感染 ( p . i . ) 7 日目に、C D 4 T 細胞は、主要なサイトカインプロデューサーであった。 ; C D 8 サイトカインプロデューサーは、同様のパターンであるが、肺 ( 図 6 ) および脾臓 ( 図 7 ) において、より低い頻度で検出された。有意により高い頻度の、T N F を単一に産生する C D 8 T 細胞が、r B C G グループに検出されたことは、留意することである。

40

## 【 0 0 3 2 】

差示的なサイトカイン産生およびプロデューサー細胞の頻度は、肺および脾臓での同等のコロニー形成単位 ( C F U ) 数により確認されるように ( 図 1 B )、感染後の、この早い時点での異なる細菌負荷のせいではなかった。T r e g 細胞の合計数は、2 つのワクチン接種されたグループにおいて同程度に、感染時に増加した ( 図 5 )。

50

## 【 0 0 3 3 】

[ r B C Gでのワクチン接種は、持続的な感染の間、強力な免疫応答を与える ]

本発明者らは、肺の細菌負荷が p B C Gグループと比較して r B C Gで免疫付与された動物においておよそ 10 倍低く、そしてワクチン接種されていないコントロールグループと比較して 100 倍低い場合の、持続的な感染 ( p . i . ) 90 日の M T B 特異的な免疫応答を分析した。ワクチン接種されたマウスおよび未処理のコントロールの肺由来の細胞は、 P P D で 20 時間、再刺激されて、サイトカイン濃度が多重分析により測定された ( 図 8 A )。再刺激時に検出されたサイトカインは、主にタイプ 1 であった。しかしながら、本発明者らは、持続的な感染の間、ワクチン接種されたグループ間で、 I F N または I L 17 に違いは検出することができなかった。対照的に、 I L 2、 I L 6、 G M - C S F および T N F の量は、 r B C G ワクチン接種されたマウスにおいて、より高かった。全てのグループにおいて、 I L 4 および I L 5 は、検出限界よりも低く、いくらかの I L 12 p 70 および I L 10 が測定された ( データ示さず )。さらに、多色フローサイトメトリーによる肺細胞の分析は、持続的な感染の間にサイトカインを産生する C D 4 T 細胞を、主に、明らかにした ( 図 8 B )。 I F N のみを分泌する C D 4 T 細胞は、全てのグループにおいて同様の頻度で検出された。その上、ワクチン接種時に I L 2、 I F N、 T N F または I L 17 を異なる組み合わせで産生する C D 4 T 細胞が検出され得た。興味深いことに、応答性 C D 4 T 細胞の頻度は、上清中の I L 2 および T N F の、より高い濃度にもかかわらず、 r B C G および p B C G ワクチン接種の間で有意に異ならなかった。本発明者らは、両方のワクチンが、持続的な M T B 感染の間に、 r B C G 誘導された T 細胞がより強力なサイトカインプロデューサーになるのに伴って肺における抗原特異的 C D 4 T 細胞の頻度を増加させたことを推測する。 C D 8 T 細胞は、ほぼ例外なく、全てのグループにおいて同等の頻度で I F N を分泌し、一方で、有意に、より高い単一の T N F を産生する C D 8 T 細胞が r B C G グループにおいて検出された。多機能 C D 8 T 細胞は、かろうじてバックグラウンドよりも上に現れた ( 図 9 )。

## 【 0 0 3 4 】

[ ワクチン接種は I L 2 2 産生を生じさせるが、 I L 2 1 産生を生じさせない ]

T h 17 細胞は、 I L 2 1 ( 15 ) および I L 2 2 ( 16 ) のような、さらなるエフェクターサイトカインを産生することができる。 I L 2 2 を産生する細胞は、 T B 患者で同定されているが、これらは I L 17 を産生する細胞 ( 17 ) とは異なるようである。本発明者らは、ワクチン接種されてその後に M T B 感染されたマウス由来の脾臓または肺細胞の P P D での刺激後に、 I L 2 1 を検出しなかった ( 図 10 A )。 I L 2 2 は、 r B C G で免疫付与されたマウスにおいて、 P P D で 20 時間刺激された脾細胞により、亢進された濃度で産生されたが ( 図 10 B )、 M T B での感染後早期には、さらに増加しなかった。肺細胞による I L 2 2 産生は、 r B C G ワクチン接種されたグループでのみ観測され、エアロゾル M T B 感染後に減少した。

## 【 0 0 3 5 】

[ 腹腔内 r B C G は、有意に A P C の集団を変化させることなく、 T 細胞および N K 細胞の増加した動員を生じさせる ]

本発明者らは、 r B C G での免疫付与後の、潜在する選択的な T h 17 細胞の誘導のメカニズムを明らかにしたかった。この目的を達成するために、 r B C G および p B C G が、腹腔内 ( i . p . ) 投与されて、投与後 5 時間または 6 日に移民細胞 ( i m m i g r a n t c e l l ) が腹膜腔から単離されて、そしてフローサイトメトリーにより分析された ( 図 11 A )。好中球 ( G r 1<sup>H I</sup>、 C D 11 b<sup>H I</sup>、 M H C I I<sup>-</sup>、 C D 11 c<sup>-</sup>として定義される) は、急速に腹膜腔に入り、そして、 p B C G および r B C G グループにおいて同程度に、持続的な感染 ( p . i . ) 6 日の時点で亢進されたままであった。常在性の腹膜のマクロファージ ( C D 11 b<sup>H I</sup>、 F 4 / 8 0<sup>H I</sup>、 G r 1<sup>-</sup>、 M H C I I<sup>H I</sup>、 C D 11 c<sup>-</sup>として定義される) および樹状細胞 ( C D 11 c<sup>+</sup>、 C D 11 b<sup>L O</sup>、 G r 1<sup>-</sup>) の頻度は、低い割合で変化されないままであった。要するに、 r B C G および p B C G グループの間で、有意差は検出されなかった。

## 【0036】

ワクチン接種後5時間に回収された腹膜細胞は、CD3 / CD28抗体でのポリクローナル刺激(図11B)にさらされた。CD4 T細胞およびNK細胞の頻度は、IFNおよびIL17産生と同じように、全てのグループ間で同等であった。投与後6日に、これらの細胞は数値的に増加して、rBCGグループにおいて最高頻度に到達した(図11C)。PPDが、6日の時点での細胞の再刺激のために用いられた。CD4 T細胞は、はっきり認識できるほどの量のIFNまたはIL17を産生せず、一方で、相当な割合のNK細胞が、rBCG投与後にIFNを産生した。T細胞は、TBでの早期のIL17の主要な原因として同定された(18)。有意ではないが、増加した割合の、IFNを産生するT細胞が、rBCGでの注射後5時間に確認された。この細胞集団は、さらに増加して、そして、著しくより高い頻度の、IL17を産生するT細胞が、注射後6日にrBCGグループで検出された。CD8 T細胞は、いずれのグループにおいても、腹膜で検出されなかった。本発明者らは、腹膜腔中に存在するサイトカインおよびケモカインを、腹腔洗浄液の多重分析により分析した(図11D)。MCP-1、MIP1、G-CSFおよびKCは、注射の際に急激に増加した；エオタキシンのレベルは変化しないままであり、IL12p40は6日後に、より高い濃度で検出された。IL12p70、IFN、IL1a、IL2、IL3、IL4、IL5、IL10、IL17、GM-CSF、およびTNFの濃度は、検出限界よりも低く、一方で、IL1、IL6、IL9、IL13、MIP1およびRANTESは測定され得たが、産生はrBCGとpBCGとの間で同等であった。このように、rBCGおよびpBCGは、APCの動員、および、投与部位でのケモカインおよびサイトカインの同程度の産生を誘導した。興味深いことに、IL17を分泌するT細胞およびIFNを産生するNK細胞の割合は、rBCG投与後に最も大量であった。

10

20

## 【0037】

[rBCGでのワクチン接種は、ヒトにおいて、IL17を産生する細胞を産生する]

最後に、本発明者らは、rBCGワクチン接種された研究被験者においてIL17産生が増加されるかどうかを調べるために、第I相臨床試験のヒト健常ボランティア由来のPBMCを分析した。ボランティア由来の血液が、rBCGまたはpBCGでの免疫付与後29日に採取されて、PBMCが単離されて凍結された。PBMCは、解凍されて一晩休まされて、20時間のPPDでの再刺激がその後続いた。サイトカイン産生は、多重分析により分析された。IL17産生は、rBCGで免疫付与された研究被験者由来のPBMCにおいてのみ検出された(図12)。制限された数のサンプルが利用可能であったことに留意されたい。

30

## 【0038】

[考察]

防御の免疫マーカーの同定は、新規のTBワクチンの合理的デザインに極めて重要である。これらのマーカーは、また、TBワクチン有効性試験での臨床転帰のエンドポイントを予測するための代替マーカーの定義のための基礎を確立することができ、そしてこのように、現在のワクチン候補者の改良のためのガイドラインを提供する。マクロファージの抗マイコバクテリア能力を活性化する、IFN(21)およびTNF(22)を含む、主要なサイトカインの重要性、および、メモリー細胞の増殖におけるIL2の必要性(23)が良く実証されて、そしてこのように、一般に、TBワクチン試験をモニターするために用いられる。

40

## 【0039】

ワクチンの有効性のバイオマーカーを同定するための試みにおいて、本発明者らは、その親株であるpBCGよりも優れた防御を与えることが証明されたrBCGによって誘導される長期のメモリー免疫応答を比較した。応答は、量的および質的の両方で異なった。本発明者らは、肺において、rBCGでのワクチン接種に続いて、タイプ1サイトカインおよびIL17の増加した存在量を検出した(図2A)。肺での、ワクチン誘導された免疫応答の分析は、臨床試験に照らして、明らかに実行不可能である。したがって、本発明

50

者らは、全身性の長期のメモリー応答（図2B）も分析した。興味深いことに、同等の濃度のタイプ1指向性のサイトカインが、pBCGおよびrBCGグループで検出された。対照的に、脾細胞によるIL17産生は、rBCGワクチン接種時に有意に亢進した。このように、本発明者らは、IFN またはIL2よりむしろ、IL17が、rBCGにより誘導される、優れた防御のマーカーとして適格であると結論付ける。

#### 【0040】

Th17細胞は、IL17に反応して動員される最初の細胞のうちの一つである好中球を引き付けて、活性化することにより、抗菌の防御に寄与する（24）。IL17は、初期のMTB感染の間は不必要であるが（25、26）、メモリー応答において重要性を得る（13）ことが示されている。加えて、CCR6は、好中球により産生されるCCL20に対する受容体であり（29）、そして、CCL20-CCR6は、TBの免疫病原性に関与している（30）ので、ヒトTh17細胞上のCCR6の発現に関する最近の報告（27、28）は、ポジティブフィードバックループを指摘する。このように、Th17細胞は、細菌が存在する部位への、抗原特異的なメモリーT細胞の促進された動員を促すことができた。MTBでのエアロゾル感染後7日の、ワクチン誘導された免疫応答を分析することにより、本発明者らは、rBCGでのワクチン接種は、実際に、細菌の複製の部位への、エフェクター細胞の促進された動員をもたらすことを示す。本発明者らは、抗原特異的なCD4 T細胞の増加した頻度および肺（図3）および脾臓細胞（図4）によるIL2、IL17、IFN およびGM-CSFの亢進された産生を確認した。

#### 【0041】

IL2、IFN およびTNF を共に産生する多機能CD4 T細胞は、当初、Leishmania majorに対して（14）、そして後に、MTBに対しても（31）、成功したワクチン接種戦略に関与した。最近になって、これらの多機能CD4 T細胞は、臨床のTBワクチン試験においても検出された（32、33）。本発明者らは、rBCGとpBCGのワクチン接種と後に続く感染時に、多機能CD4 T細胞を検出した（図3 and 4）；しかしながら、二重および三重のプロデューサーにおけるサイトカインの構成（IL2、IL17、IFN およびTNF）は、実験および個々の動物間で、かなり変化した。もし、多機能細胞が、真の、防御の関連要因であるならば、rBCGグループにおいて、より高いそれらの全体の頻度は、それらの構成よりむしろ、最も関連があるように思われる。

#### 【0042】

rBCGはなぜTh17応答を誘導したのだろうか？ rBCGおよびpBCGでの免疫付与は、APCおよびケモカインとサイトカインのプロデューサーの動員を、同程度に生じさせた。興味深いことに、IL17を分泌する T細胞とIFN を産生するNK細胞の割合は、rBCGワクチン接種後に極めて高かった。これは、IL17は T細胞（34、18）およびNKT細胞（35）によって、急速に産生されることができると示している報告と一致する。NK細胞は、これもrBCGでのワクチン接種時に増加したものであり、早期のIFN の重要な原因である。本発明者らは、rBCGから遊離された異なる分子構成要素が、感染されたマクロファージの細胞基質中に存在することをすでに示している（12）。Nod-2は重要な細胞質PRRであり、そしてその関与は、Th17メモリーT細胞応答の発生に関連している（19）。

#### 【0043】

細菌の感染中に誘導されるアポトーシスは、Th17細胞を誘導する（36）。本発明者らは、rBCGが、pBCGに比較して増加したアポトーシスを誘導し（12）、さらに、Th17細胞の増加した発生に寄与することができたという証拠を得た。インフラマソームの活性化もまた、IL1 の産生を経由したTh17メモリー応答に寄与することができた（37）。例えば、NLRP3は、ATPレベルでの変化を通じて、リステリオリシンの存在を感知することが見出されている（38）。このように、rBCGワクチン接種時のTh17細胞の誘導は、細胞内刺激と増加したアポトーシスの複雑な相互作用を必要とするのかもしれない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

Th17細胞は、成功したワクチン接種に対して有用であるよりむしろ、コラーゲン誘導の関節炎(39)、EAE(40、39)およびアレルギー性気道過敏症(41、39)のような炎症性および自己免疫性疾患に役立つと考えられる。この病原の役割は、通常、深刻なIL21仲介の炎症性応答の発生に関連する。本発明者らは、いずれの実験においても、決して、ワクチン接種および後に続くMTB感染後に、バックグラウンドレベルより上のIL21を検出しなかった(図10A)。加えて、本発明者らは、rBCGでのワクチン接種時にも、またはMTB感染後最大で200日までの肺においても、決して、注射の部位において自己免疫または過剰な炎症の兆候を観察しなかった。

## 【 0 0 4 5 】

マウスでの実験的TB由来のデータとヒトデータを比較する最初の試みでは、本発明者らは、rBCGおよびpBCGでの第I相臨床試験由来の冷凍PBMCのサイトカインプロファイルを分析した。制限された数のサンプルにおいて、本発明者らは、rBCGワクチン接種後にIL17産生を検出したが、pBCGワクチン接種後では検出しなかった。Th17細胞は、MTB感染されたヒトの末梢血中に検出された(17)。最近になって、IL17を産生するCD4 T細胞は、Ag85Aを発現する改良されたワクシニアウイルスAnkaraからなるTBワクチン候補でワクチン接種された青年において、報告されている(33)。応答はワクチン接種後7~28日にピークになり、そしてその後減少した。これは、rBCGグループにおいて、ワクチン接種後29日に亢進されたIL17産生を示す、本発明者らのデータと一致する(図12)。このように、TBワクチン試験における、防御の関連要因として、IL17を提案したい。

## 【 0 0 4 6 】

要するに、本発明者らは、rBCGでのワクチン接種は、Th17細胞の選択的な産生をもたらし、おそらく、Nod-2による細菌の構成要素の細胞内認識に依存することを示す。これらのTh17細胞は、次々に、抗原特異的T細胞の、肺への動員を促進する。最終的に、この現象のカスケードは、MTBの早期の抑制をもたらし、したがって、pBCGと比較して、rBCGによる優れた防御をもたらす。本発明者らは、成功を果たした第I相臨床試験での、rBCGワクチン接種されたボランティア由来のPBMCによってのみ、IL17産生を検出する。IL17は、抗原特異的T細胞の、MTB複製部位への、促進された動員に役立つようなので、さらなるTBワクチンは、バランスのとれたTh1およびTh17応答を同時に誘導する目的に合わせられるべきである。

[ 参考文献 ]

10

20

30

1. Tuberculosis Fact Sheet N°104 March. WHO. 2010;
2. Calmette A. Sur la vaccination préventive des enfants nouveau-nés contre tuberculose par le BCG. *Ann Inst Pasteur*. 1929;41201-232.
3. Reece ST, Kaufmann S. H. Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. *Int J Med Microbiol*. 2008;298(1-2):143-150. 10
4. Trunz BB, Fine P., Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006;367(9517):1173-1180.
5. Colditz GA, Brewer T. F., Berkey C. S., Wilson M. E., Burdick E., Fineberg H. V. et el. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA*. 1994;271(9):698-702. 20
6. Skeiky YA, Sadoff J. C. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(6):469-476.
7. Kaufmann SH, Baumann S., Nasser Eddine A. Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10(10):1068-1079. 30
8. Fletcher HA. Correlates of immune protection from tuberculosis. *Curr Mol Med*. 2007;7(3):319-325.
9. Goldsack L, Kirman J. R. Half-truths and selective memory: Interferon gamma, CD4(+) T cells and protective memory against tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2007;87(6):465-473.
10. Tchilian EZ, Desel C., Forbes E. K., Bandermann S., Sander C. R., Hill A. V. et el. Immunogenicity and protective efficacy of prime-boost regimens with recombinant (delta)ureC hly+ *Mycobacterium bovis* BCG and modified vaccinia virus ankara expressing M. tuberculosis antigen 85A against murine tuberculosis. *Infect Immun*. 2009;77(2):622-631. 40

11. Pearl JE, Saunders B., Ehlers S., Orme I. M., Cooper A. M. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse. *Cell Immunol.* 2001;211(1):43-50.
12. Grode L, Seiler P., Baumann S., Hess J., Brinkmann V., Nasser Eddine A. et al. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest.* 2005;115(9):2472-2479. 10
13. Khader SA, Bell G. K., Pearl J. E., Fountain J. J., Rangel-Moreno J., Cilley G. E. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4<sup>+</sup> T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol.* 2007;8(4):369-377.
14. Darrah PA, Patel D. T., De Luca P. M., Lindsay R. W., Davey D. F., Flynn B. J. et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med.* 2007;13(7):843-850. 20
15. Korn T, Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jager A., Strom T. B. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature.* 2007;448(7152):484-487.
16. Liang SC, Tan X. Y., Luxenberg D. P., Karim R., Dunussi-Joannopoulos K., Collins M. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-2279. 30
17. Scriba TJ, Kalsdorf B., Abrahams D. A., Isaacs F., Hofmeister J., Black G. et al. Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4<sup>+</sup> T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response. *J Immunol.* 2008;180(3):1962-1970.
18. Lockhart E, Green A. M., Flynn J. L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 2006;177(7):4662-4669. 40
19. van Beelen AJ, Zelinkova Z., Taanman-Kueter E. W., Muller F. J., Hommes D. W., Zaat S. A. et al. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity.* 2007;27(4):660-669.

20. Ferwerda G, Girardin S. E., Kullberg B. J., Le Bourhis L., de Jong D. J., Langenberg D. M. et al. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005;1(3):279-285.
21. Flynn JL, Chan J., Triebold K. J., Dalton D. K., Stewart T. A., Bloom B. R. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993;178(6):2249-2254. 10
22. Flynn JL, Goldstein M. M., Chan J., Triebold K. J., Pfeffer K., Lowenstein C. J. et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 1995;2(6):561-572.
23. Williams MA, Tyznik A. J., Bevan M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature.* 2006;441(7095):890-893. 20
24. Happel KI, Dubin P. J., Zheng M., Ghilardi N., Lockhart C., Quinton L. J. et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med.* 2005;202(6):761-769.
25. Khader SA, Pearl J. E., Sakamoto K., Gilmartin L., Bell G. K., Jelley-Gibbs D. M. et al. IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available. *J Immunol.* 2005;175(2):788-795. 30
26. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13(2):139-145.
27. Singh SP, Zhang H. H., Foley J. F., Hedrick M. N., Farber J. M. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J Immunol.* 2008;180(1):214-221. 40
28. Liu H, Rohowsky-Kochan C. Regulation of IL-17 in human CCR6+ effector memory T cells. *J Immunol.* 2008;180(12):7948-7957.
29. Scapini P, Laudanna C., Pinardi C., Allavena P., Mantovani A., Sozzani S. et al. Neutrophils produce biologically active macrophage

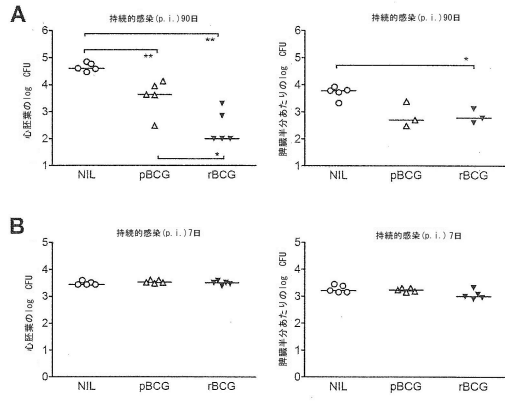
inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):1981-1988.

30. Lee JS, Lee J. Y., Son J. W., Oh J. H., Shin D. M., Yuk J. M. et al. Expression and regulation of the CC-chemokine ligand 20 during human tuberculosis. *Scand J Immunol.* 2008;67(1):77-85.
31. Forbes EK, Sander C., Ronan E. O., McShane H., Hill A. V., Beverley P. C. et al. Multifunctional, high-level cytokine-producing Th1 cells in the lung, but not spleen, correlate with protection against *Mycobacterium tuberculosis* aerosol challenge in mice. *J Immunol.* 2008;181(7):4955-4964. 10
32. Abel B, Tameris M., Mansoor N., Gelderbloem S., Hughes J., Abrahams D. et al. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181(12):1407-1417. 20
33. Scriba TJ, Tameris M., Mansoor N., Smit E., van der Merwe L., Isaacs F. et al. Modified vaccinia Ankara-expressing Ag85A, a novel tuberculosis vaccine, is safe in adolescents and children, and induces polyfunctional CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* 2010;40(1):279-290.
34. Roark CL, Simonian P. L., Fontenot A. P., Born W. K., O'Brien R. L. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):353-357. 30
35. Rachitskaya AV, Hansen A. M., Horai R., Li Z., Villasmil R., Luger D. et al. Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgamma and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol.* 2008;180(8):5167-5171.
36. Torchinsky MB, Garaude J., Martin A. P., Blander J. M. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature.* 2009;458(7234):78-82.
37. Meng G, Zhang F., Fuss I., Kitani A., Strober W. A mutation in the Nlrp3 gene causing inflammasome hyperactivation potentiates Th17 cell-dominant immune responses. *Immunity.* 2009;30(6):860-874. 40
38. Mariathasan S, Weiss D. S., Newton K., McBride J., O'Rourke K., Roose-Girma M. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in

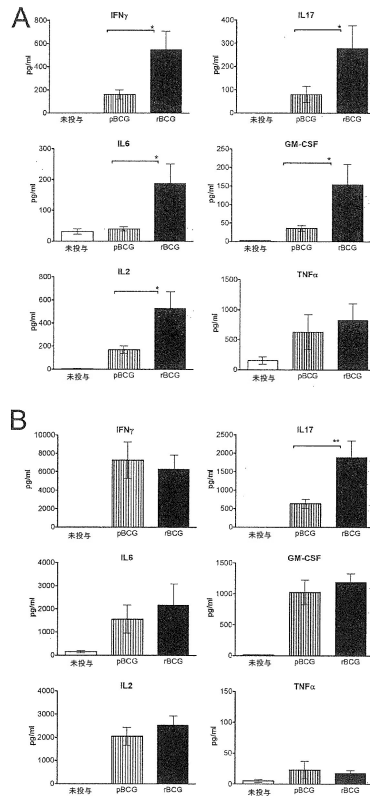
response to toxins and ATP. *Nature*. 2006;440(7081):228-232.

39. Nakae S, Nambu A., Sudo K., Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*. 2003;171(11):6173-6177.
40. Langrish CL, Chen Y., Blumenschein W. M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J. D. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233-240. 10
41. Hellings PW, Kasran A., Liu Z., Vandekerckhove P., Wuyts A., Overbergh L. et al. Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(1):42-50.
42. Kursar M, Koch M., Mittrucker H. W., Nouailles G., Bonhagen K., Kamradt T. et al. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2007;178(5):2661-2665. 20
43. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J, Cole ST, Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Mar 27; 104 (13): 5596-601. Epub 2007 Mar 19. 30

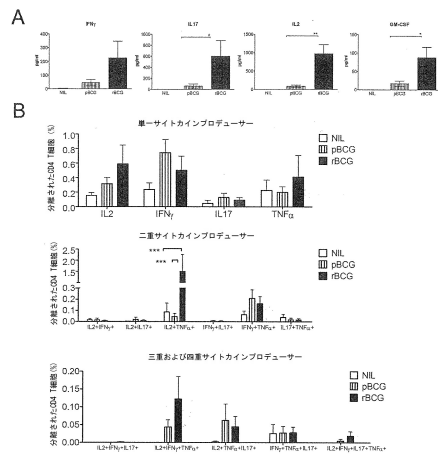
【図1】



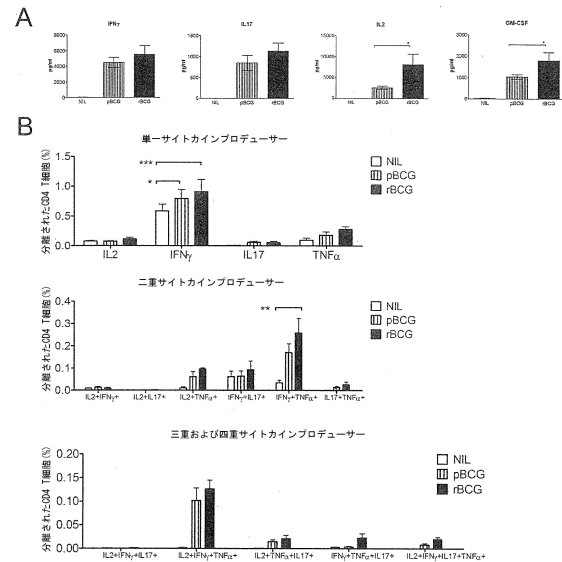
【図2】



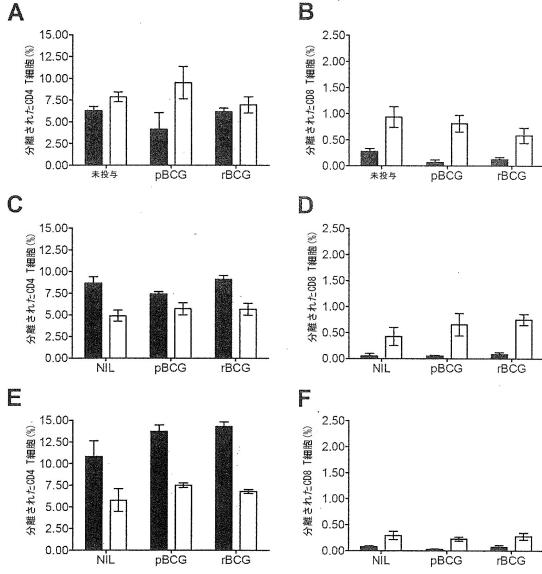
【図3】



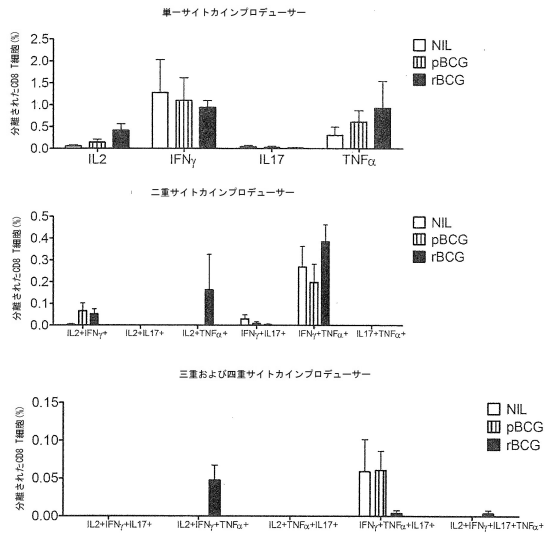
【図4】



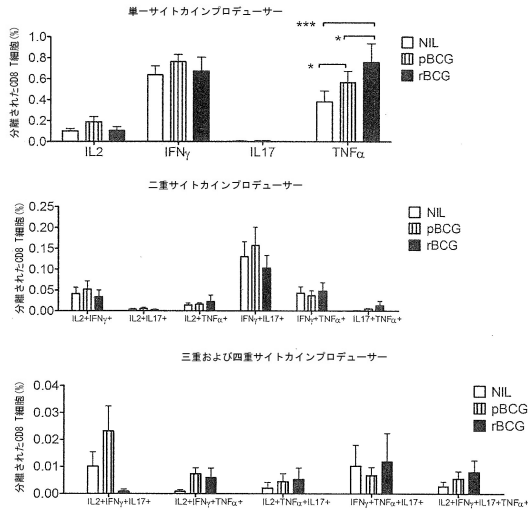
【図5】



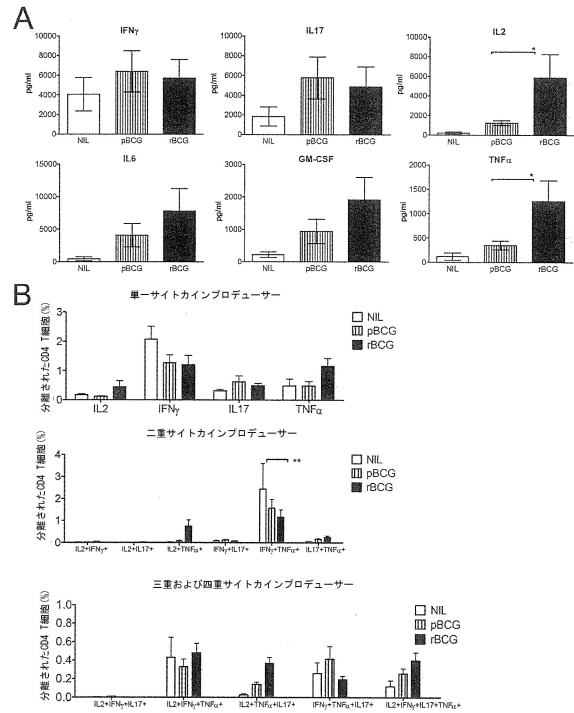
【図6】



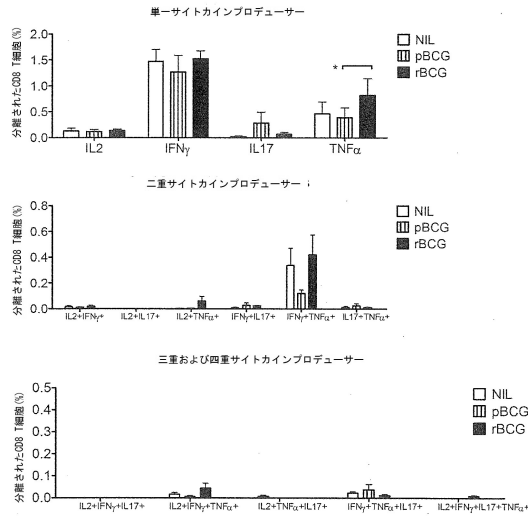
【図7】



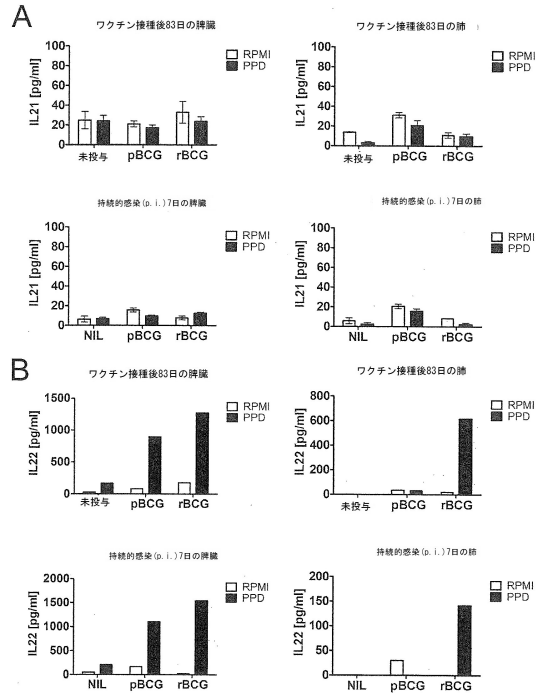
【図8】



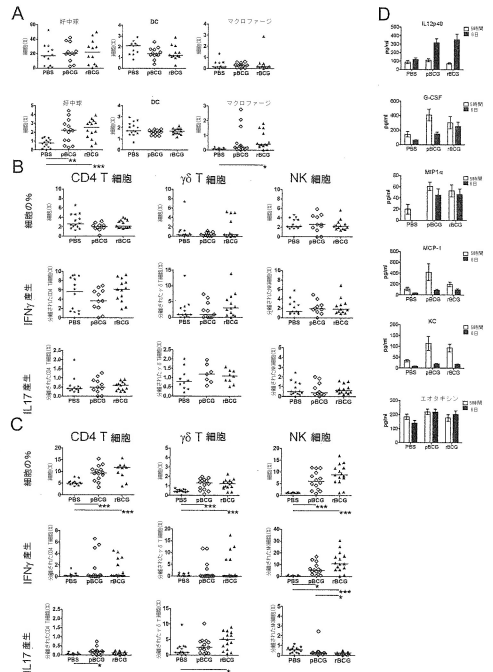
【図 9】



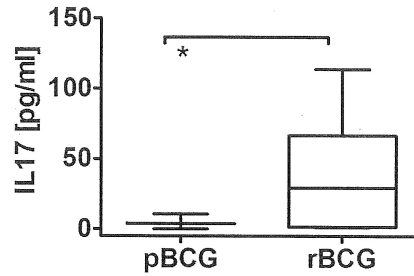
【図 10】



【図 11】



【図 12】



## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 P 31/06 (2006.01) A 6 1 P 31/06  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A  
 C 1 2 N 1/21 (2006.01) C 1 2 N 1/21
- (74)代理人 100185384  
 弁理士 伊波 興一朗
- (74)代理人 100137811  
 弁理士 原 秀貢人
- (72)発明者 ディーゼル クリスティアーネ  
 ドイツ連邦共和国 9 0 4 1 9 ニュルンベルク フロマンシュトラッセ 9
- (72)発明者 カウフマン ステファン エイチ . イー .  
 ドイツ連邦共和国 1 0 1 1 7 ベルリン マリエンシュトラッセ 2 2
- (72)発明者 バンデルマン シルケ  
 ドイツ連邦共和国 1 3 1 8 7 ベルリン ウルフシャグネル シュトラッセ 8 2
- (72)発明者 グローデ リンダー  
 ドイツ連邦共和国 3 8 1 1 8 ブラウンシュバイク ユリウスシュトラッセ 3 3 シー

審査官 柴原 直司

- (56)参考文献 特表2007-524367(JP,A)  
 特表2002-529082(JP,A)  
 特開2001-215224(JP,A)  
 国際公開第2011/008548(WO,A1)  
 国際公開第99/010496(WO,A1)  
 特開2010-051307(JP,A)  
 特表2003-511669(JP,A)  
 Semin. Immunopathol., (2010), 32, [1], p.1-2  
 Clin. Vaccine Immunol., (2010), 17, [7], p.1066-1073  
 Semin. Immunopathol., (2010), 32, [1], p.79-90  
 J. Clin. Invest., (2005), 115, [9], p.2472-2479  
 BMC Immunol., (2010), 11, Article.35

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0  
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 5 / 1 0  
 A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4  
 MEDLINE / BIOSIS / EMBASE / WPIDS (STN)  
 JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	确定抗分枝杆菌疫苗接种的效力		
公开(公告)号	<a href="#">JP6055780B2</a>	公开(公告)日	2016-12-27
申请号	JP2013545368	申请日	2011-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	马普科技促进协会 疫苗工程管理有限公司		
申请(专利权)人(译)	马克斯 - 普朗克 - GESELLSCHAFT 工具 Feruderunku 德尔维托里奥·森沙夫十大器结垢. 疫苗项目管理有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	马克斯 - 普朗克 - GESELLSCHAFT 工具 Feruderunku 德尔维托里奥·森沙夫十大器结垢. 疫苗项目管理有限公司		
[标]发明人	ディーゼル クリステア ーネ カウフマン ステファン エイチ ー バンデルマン シルケ グローデリンダー		
发明人	ディーゼル クリステア ーネ カウフマン ステファン エイチ ー. バンデルマン シルケ グローデ リンダー		
IPC分类号	C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68 A61K39/04 A61P31/06 C12N15/09 C12N1/21		
CPC分类号	G01N33/6869 A61K39/04 G01N33/505 G01N33/5091 G01N2333/35 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.P G01N33/68 A61K39/04 A61P31/06 C12N15/00.A C12N1/21		
优先权	61/425442 2010-12-21 US		
其他公开文献	JP2014502841A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于确定疫苗，特别是结核病疫苗的有效性的方法和试剂。

【 図 3 】

