

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公表特許公報(A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 519467

(P2003 - 519467A)

(43)公表日 平成15年6月24日(2003.6.24)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		39/04	4 B 0 6 3
39/04		48/00	4 B 0 6 5
48/00		A 6 1 P 31/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 31/06		C 0 7 K 14/35	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求(全 37数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 615041(P2000 - 615041)

(86)(22)出願日 平成12年5月4日(2000.5.4)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月5日(2001.11.5)

(86)国際出願番号 PCT/US00/12257

(87)国際公開番号 W000/066157

(87)国際公開日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(31)優先権主張番号 60/132,505

(32)優先日 平成11年5月4日(1999.5.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ・パブリック・ヘルス・リサーチ・イン
スティテュート・オブ・ザ・シティ・オブ
・ニュー・ヨーク・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国・ニューヨーク・10016・ニ
ューヨーク・ファースト・アヴェニュー・45
5

(72)発明者 ジェナロ、マリア、エル .
アメリカ合衆国 10023 ニューヨーク州、
ニューヨーク、セントラル パーク ウエス
ト 25,アパートメント11 - ティー

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト型結核菌により発現され且つBCGによって発現されないタンパク質、ならびに診断薬およびワクチンとしてのそれらの使用

(57)【要約】

本発明は、ヒト型結核菌のゲノム中に存在するがBCGのゲノム中には存在しないオープンリーディングフレームによってコードされるポリペプチド、ならびにこれらのポリペプチドを用いた診断および予防の方法論を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 図1に示すポリペプチドMTBN1、MTBN2、MTBN3、MTBN4、MTBN5、MTBN6、MTBN7およびMTBN8のアミノ酸配列からなる群より選択される第1アミノ酸配列、または前記第1アミノ酸配列が保存的置換されたものと同一である第2アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA配列を含む単離DNA分子であって、

この場合、前記ポリペプチドは、ヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有するものである、上記単離DNA分子。

【請求項2】 請求項1記載の単離DNA分子の一部であって、該部分は前記ポリペプチドの全長ポリペプチドより短いセグメントをコードし、この場合、該セグメントはヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有するものである、上記部分。

【請求項3】 (a) 請求項1記載のDNA分子、および、
(b) 前記DNA配列によりコードされるポリペプチドの細胞内発現を可能とする、前記DNA配列に機能し得る形で連結された転写および翻訳調節配列、を含むベクター。

【請求項4】 (a) 請求項2記載のDNA分子、および、
(b) 前記DNA配列によりコードされるポリペプチドの細胞内発現を可能とする、前記DNA配列に機能し得る形で連結された転写および翻訳調節配列、を含むベクター。

【請求項5】 請求項3記載のベクターで形質転換された細胞。

【請求項6】 請求項4記載のベクターで形質転換された細胞。

【請求項7】 請求項3記載のベクター、および薬学的に許容され得る希釈剤または充填剤を含む組成物。

【請求項8】 請求項4記載のベクター、および薬学的に許容され得る希釈剤または充填剤を含む組成物。

【請求項9】 少なくとも2つのDNA配列を含有する組成物であって、
該DNA配列のそれぞれは、ウシ型結核菌のカルメット ゲラン杆菌 (Bacille Calmette Guerin, BCG) 株の細胞のゲノムによってコードされるポリペプチドで

はないヒト型結核菌複合体のポリペプチドをコードし、前記DNA配列は脊椎動物細胞内で各前記ポリペプチドの発現を可能とする転写および翻訳調節配列に機能し得る形で連結されており、

前記DNA配列の少なくとも1つは請求項1記載のDNA分子である、上記組成物。

【請求項10】 少なくとも2つのDNA配列を含有する組成物であって、

該DNA配列のそれぞれは、ヒト型結核菌複合体のポリペプチドの機能的断片をコードし、前記DNA配列は脊椎動物細胞内で各前記ポリペプチドの発現を可能とする転写および翻訳調節配列に機能し得る形で連結されており、

前記DNA配列の少なくとも1つは請求項2記載のDNA分子である、上記組成物。

【請求項11】 図1に示すポリペプチドMTBN1、MTBN2、MTBN3、MTBN4、MTBN5、MTBN6、MTBN7およびMTBN8の配列からなる群より選択される第1アミノ酸配列、

または前記第1アミノ酸配列が保存的置換されたものと同ーである第2アミノ酸配列を有する単離ポリペプチドであって、

前記ポリペプチドは、ヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有するものである、上記単離ポリペプチド。

【請求項12】 請求項11記載のポリペプチドの単離セグメントであって、該セグメントは全長ポリペプチドよりも短く、且つヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有する、上記単離セグメント。

【請求項13】 請求項11記載のポリペプチド、および薬学的に許容され得る希釈剤または充填剤を含む組成物。

【請求項14】 請求項12記載のポリペプチドの機能的断片、および薬学的に許容され得る希釈剤または充填剤を含む組成物。

【請求項15】 ヒト型結核菌複合体の少なくとも2つのポリペプチドを含む組成物であって、該ポリペプチドのそれぞれはウシ型結核菌BCG株の細胞のゲノムにコードされるものではなく、該ポリペプチドの少なくとも1つは請求項1記載のポリペプチドである、上記組成物。

【請求項16】 ヒト型結核菌複合体の少なくとも2つのポリペプチドの機能的断片を含む組成物であって、該ポリペプチドのそれぞれはウシ型結核菌カル

メット ゲラン杆菌 (BCG) 株の細胞のゲノムによってコードされるものではなく、該ポリペプチドの少なくとも1つは請求項2記載のセグメントである、上記組成物。

【請求項17】 (a) ヒト型結核菌に感染したまたは感染し易いと考えられる被験体への請求項15記載の組成物を投与し、そして、

(b) 前記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記組成物に対する前記被験体の免疫応答を検出すること、を含む、診断方法。

【請求項18】 (a) ヒト型結核菌に感染したまたは感染し易いと考えられる被験体への請求項16記載の組成物を投与し、そして、

(b) 前記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、前記組成物に対する前記被験体の免疫応答を検出すること、を含む診断方法。

【請求項19】 (a) 被験体に由来するCD4Tリンパ球を含む細胞集団を用意し、

(b) 上記被験体によって発現される主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスII分子を発現する抗原提示細胞 (APC) を含む細胞集団を用意し、

(c) 請求項12記載のポリペプチドの存在下で (b) のAPCに (a) のCD4リンパ球を接触させ、そして、

(d) 上記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記ポリペプチドに対するCD4リンパ球の反応能力を測定すること、を含む診断方法。

【請求項20】 (a) 被験体に由来するCD4Tリンパ球を含む細胞集団を用意し、

(b) 上記被験体によって発現される少なくとも1つの主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラスII分子を発現する抗原提示細胞 (APC) を含む細胞集団を用意し、

(c) 請求項12記載のセグメントの存在下で (b) のAPCに (a) のCD4リンパ球を接触させ、そして、

(d) 上記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記ポリペプチドに対するCD4リンパ球の反応能力を測定すること、を含む診断方法。

【請求項21】 (a) 被験体に由来するCD4Tリンパ球を含む細胞集団を用意し、

(b) 上記被験体によって発現される少なくとも1つの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子を発現する抗原提示細胞(APC)を含む細胞集団を用意し、

(c) 請求項15記載の組成物の存在下で(b)のAPCに(a)のCD4リンパ球を接触させ、そして、

(d) 上記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記ポリペプチドに対するCD4リンパ球の反応能力を測定すること、を含む診断方法。

【請求項22】 (a) 被験体に由来するCD4Tリンパ球を含む細胞集団を用意し、

(b) 上記被験体によって発現される少なくとも1つの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子を発現する抗原提示細胞(APC)を含む細胞集団を用意し、

(c) 請求項16記載の組成物の存在下で(b)のAPCに(a)のCD4リンパ球を接触させ、そして、

(d) 上記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記ポリペプチドに対するCD4リンパ球の反応能力を測定すること、を含む診断方法。

【請求項23】 (a) 被験体の体液に請求項11記載のポリペプチドを接触させ、そして、

(b) 上記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記ポリペプチドへの抗体の結合の存在を検出すること、を含む診断方法。

【請求項24】 (a) 被験体の体液に請求項12記載のセグメントを接触

させ、そして、

(b) 上記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記ポリペプチドへの抗体の結合の存在を検出すること、を含む診断方法。

【請求項25】 (a) 被験体の体液に請求項15記載の組成物を接触させ、そして、

(b) 上記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記組成物への抗体の結合の存在を検出すること、を含む診断方法。

【請求項26】 (a) 被験体の体液に請求項16記載の組成物を接触させ、そして、

(b) 上記被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、上記組成物への抗体の結合の存在を検出すること、を含む診断方法。

【請求項27】 請求項7記載の組成物を被験体に投与することを含む、ワクチン接種方法。

【請求項28】 請求項8記載の組成物を被験体に投与することを含む、ワクチン接種方法。

【請求項29】 請求項9記載の組成物を被験体に投与することを含む、ワクチン接種方法。

【請求項30】 請求項10記載の組成物を被験体に投与することを含む、ワクチン接種方法。

【請求項31】 請求項13記載の組成物を被験体に投与することを含む、ワクチン接種方法。

【請求項32】 請求項14記載の組成物を被験体に投与することを含む、ワクチン接種方法。

【請求項33】 請求項15記載の組成物を被験体に投与することを含む、ワクチン接種方法。

【請求項34】 請求項16記載の組成物を被験体に投与することを含む、

ワクチン接種方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、結核の分野、特にヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に対する免疫応答を生じさせるためならびにヒト型結核菌にさらされた被験体における感染および疾患を診断するために有用な試薬に関する。

【0002】

発明の背景

結核感染は、引き続き世界的な健康問題となっている。この状況は、ヒト型結核菌の多剤耐性株の出現および国際的なAIDSの流行により、近年大きく悪化している。従って、ヒト型結核菌に対する効果的なワクチンおよび信頼性の高い診断試薬を作製することがますます重要となってきた。

【0003】

米国特許出願第08/796,792号は、本明細書中に参考として全て組み込まれる。

【0004】

発明の概要

本発明は、ヒト型結核菌のゲノム中に有り且つウシ型結核菌 (*M. bovis*) のカルメット-ゲラン桿菌 (BCG) 株のゲノム中には無いオープンリーディングフレーム (ORF) によりコードされるポリペプチドが、ヒト型結核菌に感染した動物において遅延型過敏症反応を引き出したのに、BCGで感作した動物においては当該反応を引き出さなかった、という本発明者の発見に基づく。したがって、ヒト型結核菌のゲノム中には存在するがBCGのゲノム中には存在しないORFによりコードされるタンパク質は、ヒト型結核菌とBCGとを区別するために、および特に、被験体のヒト型結核菌への曝露とBCGでのワクチン接種とを区別する診断方法 (例えばヒト型結核菌特異的抗体およびリンパ球反応性についての皮膚テストならびに *in vitro* アッセイ等) にとって有用な試薬となる。本発明は、これらのポリペプチド、その機能的セグメント、これらのポリペプチドまたは該機能的セグメントをコードするDNA分子、該DNA分子を含むベクター、該ベクターにより形質転換された細胞、上記ポリペプチド、機能的セグメントもしくはDNA分子のうちの1以上を含む組成物、ならびにこれらを用いた様々な診断的、治療的、および予防

的（ワクチン）方法論を特徴とする。

【0005】

具体的には、本発明は、第1アミノ酸配列または第2アミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA配列を含む単離DNA分子を特徴とする。この第1アミノ酸配列は、ポリペプチドMTBN1、MTBN2、MTBN3、MTBN4、MTBN5、MTBN6、MTBN7またはMTBN8のアミノ酸配列（図1に図示）であり得る。また第2アミノ酸配列は、該第1アミノ酸配列が保存的置換されたものと同じ配列である。このポリペプチドは、ヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有する。また、本発明には、上記DNA分子から単離した一部分も含まれる。該DNA分子の該一部分は、該ポリペプチドの全長ポリペプチドよりも短いセグメントをコードし、このセグメントは、ヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有する。本発明の他の実施形態は、上記DNA分子と該DNA配列に機能し得る形で連結された転写および翻訳調節配列とを含むベクターである。この調節配列は、該DNA配列によりコードされるポリペプチドまたは機能的セグメントを細胞内で発現させる。本発明は、上記ベクターで形質転換された細胞（例えば真核細胞および原核細胞等）を包含する。

【0006】

本発明は、上記ベクターのいずれかおよび製薬上許容可能な希釈剤もしくは充填剤を含む組成物を包含する。（例えばDNAワクチンとして使用される）他の組成物は、少なくとも2つ（例えば3、4、5、6、7、8、9、10、12、15または20種）のDNA配列（それぞれヒト型結核菌複合体のポリペプチドまたはその機能的セグメントをコードする）を含むことができ、これらのDNA配列は、該ポリペプチドの各々を脊椎動物の細胞内で発現させる転写および翻訳調節配列に機能し得る形で連結されている。このような組成物において、該DNA配列の少なくとも1つ（例えば2、3、4、5、6、7または8種）は、本発明の上記DNA分子のうちの1つである。コードされるポリペプチドは、好ましくは、ウシ型結核菌のBCG株の細胞のゲノムによってコードされないものである。

【0007】

また本発明は、第1アミノ酸配列または第2アミノ酸配列を有する単離ポリペ

プチドを特徴とする。この第1アミノ酸配列は、ポリペプチドMTBN1、MTBN2、MTBN3、MTBN4、MTBN5、MTBN6、MTBN7またはMTBN8（図1に図示）の配列であり得る。また第2アミノ酸配列は、該第1アミノ酸配列が保存的置換されたものと同じ配列である。該ポリペプチドは、ヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有する。また本発明には、このポリペプチドの単離セグメントも含まれる。該セグメントは、その全長ポリペプチドよりも短く、ヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有する。他の実施形態は、該ポリペプチドまたは機能的セグメントならびに製薬上許容可能な希釈剤または充填剤を含む組成物である。また本発明の組成物は、ヒト結核菌複合体の少なくとも2つ（例えば3、4、5、6、7、8、9、10、12、15または20種）のポリペプチドまたはその機能的セグメントを含むことができ、この少なくとも2つのポリペプチドのうち少なくとも1つ（例えば2、3、4、5、6、7または8種）のポリペプチドは、本発明の上記ポリペプチドのうちの1つの配列を有するものである。該ポリペプチドは、好ましくは、ウシ型結核菌のBCG株の細胞のゲノムによってコードされないものである。

【0008】

また本発明は、診断方法も特徴とする。1つの実施形態は、(a)上記ポリペプチド組成物の1つを、ヒト型結核菌に感染したもしくは感染し易いと考えられる被験体に投与すること、および(b)その被験体がヒト型結核菌に感染しているまたは感染し易いことを示す指標として、該組成物に対するその被験体の免疫応答を検出すること、を含む方法である。このような方法の一例は、皮膚テストである。皮膚テストでは、テスト物質（例えばMTBN1～MTBN8のうちの1以上を含む組成物）を被験体に皮内注射し、そして皮膚の遅延型過敏症反応を検査する。他の実施形態は、(a)被験体に由来するCD4Tリンパ球を含む細胞集団を用意し、(b)該被験体により発現される主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子を発現する抗原提示細胞(APC)を含む細胞集団を用意し、(c)本発明のポリペプチド、機能的セグメント、および/またはポリペプチド組成物のうちの1以上の存在下で(b)のAPCに(a)のCD4リンパ球を接触させ、そして、(d)その被験体がヒト型結核菌に感染しているもしくは感染し易いことを示す指標として

、該ポリペプチドに対するCD4リンパ球の反応能力を測定すること、を含む方法である。本発明の他の診断方法は、(a)本発明のポリペプチド、機能的セグメント、またはポリペプチド/機能的セグメント組成物を被験体の体液に接触させ、(b)その被験体がヒト型結核菌に感染しているもしくは感染し易いことを示す指標として、該ポリペプチド、機能的セグメント、またはポリペプチド/機能的セグメント組成物への抗体の結合の存在を検出すること、を含む。

【0009】

また本発明には、ワクチン接種方法も包含される。これらの方法は、上記ポリペプチド、機能的セグメント、またはDNA組成物のいずれかの被験体への投与を含む。該組成物は、単独でまたは1以上の他の組成物と共に投与することができる。

【0010】

本明細書中で使用される「単離DNA分子」とは、以下に挙げるもののうち一方または両方のDNAである：そのDNAが由来する生物の天然ゲノム中においてそれがすぐ隣に隣接しているコード配列の一方または両方（すなわち一方は5'側末端にあるもの、他方は3'側末端にあるもの）とすぐ隣に隣接していないもの；あるいはそのDNAが由来する生物において一緒に生じるDNA配列を実質的に含まないもの。この用語は、例えば、ベクター中（例えば自律複製型プラスミドもしくはウイルス中、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中）に組み込まれた組換えDNA、あるいは他のDNA配列から独立した別個の分子（例えばcDNAまたはPCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ処理により生成されたゲノム断片）として存在する組換えDNAを含む。また単離DNAとは、更なるヒト型結核菌ポリペプチド配列をコードするハイブリッドDNAの一部である組換えDNAも含む。

【0011】

「DNA分子」とは、cDNA、ゲノムDNA、および合成（例えば化学合成）DNAを含む。一本鎖の場合、DNA分子は、センス鎖であってもアンチセンス鎖であってもよい。

【0012】

本発明の「単離ポリペプチド」は、天然に生じる対応物を持たないポリペプチ

ド、または（例えばヒト型結核菌中で）天然においてそれに付随する成分から分離もしくは精製されたポリペプチドである。典型的には、該ポリペプチドは、それに天然において付随しているタンパク質および天然に生じる有機分子が乾燥重量で少なくとも70%除かれている場合、「単離されている」とみなされる。好ましくは本発明のポリペプチドの調製物は、乾燥重量で少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%および最も好ましくは少なくとも99%の本発明のペプチドを含む。化学合成されるポリペプチドは、天然においてそれに付随する成分からもともと分離されているので、合成ポリペプチドは「単離された」ものである。

【0013】

本発明の単離ポリペプチドは、例えば天然源（例えばヒト型結核菌細菌等）からの抽出、該ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現、または化学合成により得ることができる。それが自然に生じた起源とは異なる細胞系において産生されるポリペプチドは、天然においてそれに付随する成分から分離されるため、「単離された」ものである。単離度または純度は、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、またはHPLC分析等の任意の適切な方法によって測定することができる。

【0014】

該ポリペプチドは、本明細書中に開示されるものを改変した第1次アミノ酸配列を含み得る。好ましくは、これらの改変は、保存的アミノ酸置換からなる。保存的置換とは、典型的には、以下に挙げる基内の置換を含む：グリシンおよびアラニン；バリン、イソロイシン、およびロイシン；アスパラギン酸およびグルタミン酸；アスパラギンおよびグルタミン；セリンおよびトレオニン；リジンおよびアルギニン；ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。

【0015】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書中において、長さまたは翻訳後修飾（例えばグリコシル化またはリン酸化等）にかかわらず、任意のアミノ酸鎖を述べるために使用される。このように、「ヒト型結核菌ポリペプチド」という用語は、天然に生じる全長ヒト型結核菌タンパク質、および天然に生じる全長ヒト型結核菌タンパク質または天然に生じるタンパク質の特定の

ドメインもしくは部分に対応する組換えまたは合成により生成されたポリペプチドを含む。またこの用語は、(原核生物細胞における発現に有用な)アミノ末端メチオニンまたはアフィニティークロマトグラフィーによるタンパク質精製に有用な任意の短いアミノ酸配列(例えば金属キレートクロマトグラフィーによる精製の場合はポリヒスチジン等)が付加された成熟ヒト型結核菌ポリペプチドを包含する。

【0016】

本明細書中で使用される「免疫原性」とは、一次免疫応答または記憶免疫応答を活性化することができることを意味する。免疫応答には、CD4+Tリンパ球、CD8+Tリンパ球およびB-リンパ球の応答が含まれる。Tリンパ球の場合、このような応答は、増殖型および/またはサイトカイン(例えばインターロイキン(IL)-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IL-13、IL-15、腫瘍壊死因子-(TNF-)、またはインターフェロン-(IFN-))-産生型であってもよい。あるいはこれらの応答は、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の産生をもたらすものであってもよい。B-リンパ球反応は、反応するBリンパ球による抗体産生をもたらすものであってもよい。

【0017】

本明細書中で使用される「抗原性」とは、抗体分子または活性化されたエフェクターT細胞(例えばサイトカイン産生T細胞またはCTL等)上の抗原特異的T細胞受容体(TCR)により認識されることができることを意味する。

【0018】

このように、「ヒト型結核菌特異的抗原性」を有するポリペプチドは、(a)ヒト型結核菌生物または野生型ヒト型結核菌分子(例えばポリペプチド等)に反応して誘導される抗体によって認識されこれに結合することができるポリペプチド;または(b)適当な抗原提示細胞(APC)によるポリペプチドのプロセッシングおよび適当な主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子への結合後に、ヒト型結核菌生物または野生型ヒト型結核菌分子(例えばポリペプチド)に反応して誘導されるエフェクターT細胞上のTCRによって認識されこれに結合することができる部分配列を含むポリペプチドである。

【0019】

本明細書中で使用される、「ヒト型結核菌特異的免疫原性」を有するポリペプチドとは、(a) ヒト型結核菌生物または野生型ヒト型結核菌分子（例えばポリペプチド等）を認識し、これに結合する抗体の産生を誘導することができるポリペプチド；または(b) 適当な抗原提示細胞（APC）によるポリペプチドのプロセッシングおよびAPC表面上の適当な主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子への結合後に、ヒト型結核菌生物または野生型ヒト型結核菌分子（例えばポリペプチド）のAPCによるプロセッシングによって得られてAPC表面上のMHC分子に結合するペプチド断片を認識しこれに結合するTCRを有するT細胞を活性化する部分配列を含むポリペプチドである。免疫原性ポリペプチドに反応して引き起こされる免疫応答は、好ましくは防御的なものである。本明細書中で使用される「防御的」とは、病気の感染もしくは発病の定着（establishment）を予防すること、または被験体の病気の重症度を軽減することを意味する。「予防する」とは、発病を遅らせること、および病気の進行を一部または完全に遮断することを含み得る。

【0020】

本明細書で使用される「ヒト型結核菌ポリペプチドの機能的セグメント」とは、ヒト型結核菌に特異的な抗原性および免疫原性を有するポリペプチドのセグメントである。

【0021】

ヒト型結核菌感染またはこのような感染への罹り易さを検査する目的で、ポリペプチド、ポリペプチドの機能的セグメント、またはポリペプチドおよび/または機能的セグメントの混合物が（例えば皮内注射などにより）被験体に投与された場合、「免疫応答を検出する」とは、投与された物質に対する免疫学的反応の兆候（例えば皮内注射部位における皮膚の赤みまたは腫れ）について被験体を検査することを意味する。被験体が投与された物質に対する抗体を有する場合、反応は一般には急速である（例えば1分～24時間）。一方、被験体の体内の事前に免疫化されたTリンパ球のメモリーもしくは活性化T細胞反応は一般に遅く、24時間後にやっと現れ、24～96時間で最大になる。

【0022】

本明細書中において「被験体」とは、ヒト被験体または非ヒト哺乳動物（例えば非ヒト霊長類、ウマ、ウシ科動物、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラットまたはマウス等）であってよい。

【0023】

特に定義しない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、この発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。不一致の場合は、定義を含む本明細書が優先する。好適な方法および物質を以下に記載するが、本発明の実施または試験において、本明細書中に記載されるものに類似したまたはこれらと同等な方法および物質を用いることができる。特に断らない限り、これらの物質および方法は単に例示的なものであり、限定的なものではない。本明細書中に記載される全ての出版物、特許出願、特許および他の引用文献は単に例示として挙げたものであり、限定的なものではない。

【0024】

本発明（例えばヒト型結核菌感染の診断方法等）の他の特徴および利点は、以下の説明、図面および特許請求の範囲から明らかである。

【0025】

詳細な説明

ヒト型結核菌[Coleら(1998) Nature 393:537-544]のゲノムは、非病原性BCG株には欠失しているオープンリーディングフレーム(ORF)を含む。本明細書中において、これらのORFによりコードされるポリペプチドは「ヒト型結核菌BCG陰性(M.tuberculosis BCG Negative)」ポリペプチド(「MTBN」)と呼ばれ、そのORFは「mtbn」と呼ばれる。本発明は、MTBNポリペプチド(MTBN4)がヒト型結核菌に感染した動物において皮膚反応を引き起こすが、BCGまたはトリ型結核菌(マイコバクテリアの非ヒト型結核菌複合体株)のいずれかに感作させた動物においてはこれを引き起こさない(以下の実施例1参照)、という発見に基づく。これらの発見により、ヒト型結核菌複合体およびBCG以外の両方のマイコバクテリアへの暴露からヒト型結核菌による被験体の感染を区別する診断テストにおいてMTBN(例えばMTBN1~MTBN8等)を用いることができる、ということを示す。ヒト型結核菌複合体には、ヒト型結核菌、ウシ型結核菌、ネズミ型結核菌およびアフリ

カ結核菌が含まれる。このように、これらは、ヒト型結核菌にさらされた(したがって潜在的に結核菌を有するまたは有するおそれのある)被験体を、(最も広く用いられている結核菌ワクチンである)BCGでワクチン接種した被験体から区別するために使用することができる。このような区別が可能な診断アッセイは、判別精度の低い診断テストにおいて陽性結果が出た被験体における更なる診断テストおよび/または治療処置により生じる無駄な努力およびそれに伴うコストを大きく低減するであろう大きな進歩を提供するものである。さらに、実施例1の結果は、全ての生存可能なヒト型結核菌生物により発現されるMTBN4が、この生物に感染した被験体において強力な免疫応答を誘導することができ、従ってワクチンとなり得る可能性があることを示す。

【0026】

本発明のMTBNポリペプチドには、例えば、ヒト型結核菌ゲノムのRD1、RD2およびRD3領域内にコードされるポリペプチドが含まれる[Mahairasら, (1996) J. Bacteriol. 178:1274-1282]。特に関心が持たれるものとして、ヒト型結核菌ゲノムのRD1領域内のORFによりコードされるポリペプチドが挙げられる。しかし、本発明は、RD1、RD2およびRD3領域によりコードされるポリペプチドに限定されず、ヒト型結核菌ゲノムの1以上のメンバーのゲノム中に含まれるがBCGのゲノム中には含まれないORFによりコードされるあらゆるポリペプチドを含む。MTBN1~MTBN8のアミノ酸配列は図1に、およびmtbn1~tmbn8のヌクレオチド配列は図2に示す。

【0027】

本発明は以下に挙げるものを包含する：(a) MTBNポリペプチド(例えばMTBN1~MTBN8)をコードするmtbn配列(例えばmtbn1~mtbn8)を含む単離DNA分子ならびに抗原性および免疫原性を有するポリペプチドセグメント(すなわち機能的セグメント等)をコードするこのようなDNA分子の単離部分；(b) MTBNポリペプチド自体(例えばMTBN1~MTBN8)およびこれらの機能的セグメント；(c) MTBNポリペプチド(例えばMTBN1~MTBN8)に結合する抗体(このような抗体の抗原結合フラグメント、例えばF(ab')₂、Fab、Fv、および一本鎖Fvフラグメント等を含む)およびその機能的セグメント；(d) mtbn(例えばmtbn1~mtbn8)配列の1

以上を含み且つ発現することができる核酸分子（例えばベクター等）およびDNA分子の一部；（e）このようなベクターにより形質転換された細胞（例えば細菌、酵母、昆虫または哺乳動物細胞等）；（f）MTBN（例えばMTBN1～MTBN8）ポリペプチド（またはその機能的セグメント）および先に記載したヒト型結核菌ポリペプチド（例えばESAT-6、14kDa抗原、MPT63、19kDa抗原、MPT64、MPT51、MTC28、38kDa抗原、45/47kDa抗原、MPB70、Ag85複合体、MPT53およびKatG等（米国特許出願第08/796,792号も参照されたい））の両方を含む1以上のヒト型結核菌ポリペプチド（またはそのセグメント）をコードするベクターを含む組成物；（g）本発明のポリペプチドおよび先に記載したヒト型結核菌ポリペプチド（上記記載のもの等）の両方を含む1以上のヒト型結核菌ポリペプチド（またはその機能的セグメント）を含む組成物；（h）（c）に記載された抗体のうち1以上を含む組成物；（i）（1）ヒト型結核菌に感染したことまたは感染し易いと考えられる被験体への上記ポリペプチド組成物のいずれかの（例えば皮内注射による）投与、（2）このような被験体に由来するリンパ球（B-リンパ球、CD4 T-リンパ球、およびCD8 T-リンパ球）の、上記ポリペプチド組成物のいずれかに対する反応性についての（例えば細胞増殖、抗体産生、サイトカイン産生またはCTL活性の測定による）in vitroテスト、（3）体液（例えば血液、唾液、血漿、血清、尿または精液、あるいは気管支肺胞洗浄、膣洗浄、または下部消化管洗浄などの洗浄等）の、MTBNポリペプチド（例えばMTBN1～MTBN8）またはその機能的セグメント、あるいは上記ポリペプチド組成物に対する抗体についてのテスト、（4）（c）に記載した抗体を用いたアッセイにおける、ヒト型結核菌、MTBN（例えばMTBN1～MTBN8）ポリペプチドまたはその機能的セグメント、あるいは上記ポリペプチド組成物の存在についての体液（例えば上記）のテスト、および（5）MTBNポリペプチド（例えばMTBN1～MTBN8）をコードする核酸分子（DNAやRNA等）（またはこのような核酸分子の一部）の存在についての、該核酸分子、該核酸分子の一部またはこのような分子の相補体のヌクレオチド配列を有する核酸プローブまたはプライマーを用いた組織（例えば肺や気管支の組織等）または体液（例えば上記）の検査のいずれかを含む診断方法；ならびに（j）（f）、（g）もしくは（h）のいずれかまたはこれらの組成物のうち2つまたは3つの組み合わせを含む組成

物の被験体への投与を含むワクチン接種法。

【0028】

診断に関して、精製MTBNタンパク質、このようなタンパク質の機能的セグメント、またはタンパク質および/もしくは機能的断片の混合物は、ヒト型結核菌による感染を、他の細菌（特に非病原性マイコバクテリア）による感染またはBCGへの（例えばワクチン接種による）暴露から区別するという上記利点を有する。更に、該タンパク質、該タンパク質の機能的セグメント、または該タンパク質および/もしくは機能的セグメントの混合物を含む組成物により、より優れた品質管理が可能となる。これは、「バッチ毎の（batch-to-batch）」の変動性が、結核菌の精製タンパク質誘導体（PPD）等の複合混合物に比較して大幅に削減されるからである。

【0029】

また、ワクチン接種のための上記ポリペプチドおよび核酸試薬の使用は、特異性および効果の高い免疫化も提供する。非病原性BCGにはない遺伝子によってコードされる病原性ヒト型結核菌ポリペプチドは、病原性の媒介物質となる可能性があるため、これらに対する免疫性は、防御的能力の点で言えば特に効力がある可能性がある。核酸分子を用いてワクチン接種を行う場合、*in vivo*法および *ex vivo*法の両方を用いることができる。*In vivo*法は核酸自体の被験体への投与を含み、*ex vivo*法は、被験体から細胞（例えば骨髄細胞または線維芽細胞）を得ること、この細胞に該核酸を形質導入すること、好ましくは首尾良く形質導入された細胞を選択もしくは増殖させること、および該形質導入細胞をその被験体に投与することを含む。あるいは、形質導入されて被験体に投与される細胞は、他の被験体に由来するものであってもよい。ワクチン接種および診断の方法については、米国特許出願第08/796,792号（本明細書中に参考として全て組み込まれる）により詳しく記載されている。

【0030】

以下の実施例は、本発明を例示するためのものであってこれを限定するためのものではない。

【0031】

実施例1：MPBN4は、ヒト型結核菌に感染したモルモットにおいて特異的な皮膚反応を誘引する

4グループの非近交系雌モルモット（1グループ=18匹）を用いて、ヒト型結核菌特異的診断試薬としてのMTBN4ポリペプチドの有用性を試験した。これら4つのグループは以下のように処理した。

【0032】

グループ1の動物には、約100個のヒト型結核菌株H37Rv細胞を用いてエアロゾルにより感染させた。

【0033】

グループ2の動物には、 10^6 個のウシ型結核菌日本BCG生細胞を用いて皮内で感作を行った。

【0034】

グループ3の動物には、 10^6 個のトリ型結核菌生細胞を用いて皮内で感作を行った。

【0035】

グループ4の動物には、生理食塩水の皮内注射により疑似感作を行った。

【0036】

感染または感作を行った7週間後、 $1\mu\text{g}$ のPPD（各グループから6匹ずつ）、 $2\mu\text{g}$ の精製組換えMPT64（各グループから6匹ずつ）、または $2\mu\text{g}$ のMTBN4（各グループから6匹ずつ）を用いて皮内注射を行った。24時間後に、生じた紅斑の直径を測定した。データは紅斑の平均径（mm）で示し、平均偏差を示す（図3）。

【0037】

どのテスト物質で処理してもグループ4の動物では紅斑は検出されなかったの
で、このグループについてはデータは示していない。一方、グループ1の動物（
黒塗りの棒）は3つのテスト物質全てで有意な反応を示した。グループ2の動物
（白抜きの棒）はPPDおよびMPT64に対して有意な反応を示したが、MTBN4に對し
ては示さなかった。グループ3の動物は、PPDのみに有意な反応を示した（斜線
の棒）。

【0038】

このように、ヒト型結核菌複合体ならびに他のマイコバクテリア株に共通する抗原性/免疫原性分子を含むPPDは、ヒト型結核菌複合体（ヒト型結核菌およびBCG）のマイコバクテリアならびに他の非病原性マイコバクテリウム（トリ型結核菌）で感染させたまたはこれに感作させた動物において反応を誘導した、という意味において、最も小さな差別的結果が得られた。ヒト型結核菌およびBCGの両方によってコードされ、発現されるMPT64は、トリ型結核菌に感染した動物において反応を引き出さなかったが、ヒト型結核菌に感染した動物およびBCGで感作した動物の両方においては反応を引き出した。最後に、MTBN4は、ヒト型結核菌動物のみにおいて反応を誘導した。このようにMTBN4は最も特異的な反応を誘導し、そして最も重要なことに、ヒト型結核菌に感染した動物とBCGに感作させた動物との区別を可能とした。

【0039】

本発明は現在の好適な実施形態に関して記載したが、本発明の精神を逸脱することなく様々な修正を加えることが可能であることを理解されたい。従って、本発明は特許請求の範囲によってのみ限定される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ヒト型結核菌ポリペプチドMTBN1～MTBN8のアミノ酸配列を示したものである。

【図2】

図2は、MTBN1～MTBN8をコードするコード領域（mtbn1～mtbn8）のヌクレオチド配列を示したものである。

【図3】

図3は、ヒト型結核菌に感染させた雌モルモットまたはBCGもしくはトリ型結核菌で感作した雌モルモットにおいて、3つの異なるテスト試薬の皮内注射により誘導された遅延型過敏症反応を示す棒グラフを示す。

【図1】

MTBN1

MTAEPEVRTLREVVLDDQLGTAESRAYKMWLPLPLTNVPLNELIARDRRQPLRFALGIMDE
PRRHLDQVWGVVDVSGAGGNIGGGAPQTGKSTLLQTMVMSAAATHSPRNVQFYCIDLGGG
GLIYLENLPHVGGVANRSEPKVNRVVAEMQAVMRQRETTTFKEHRVGSIGMYRQLRDDPS
QPVASDPYGDVFLIIDGWPGFVGEFFDLEGQVQDLAAQGLAFGVHVIISTPRWTELKSRV
RDYLGTKIEFRLGDVNETQIDRITREIPANRPGRAVSMKHHMLIGVPRFDGVHSADNLV
EAITAGVTQIASQHTEQAPPVRLPERIHLHELDPNPPGPESDYRTRWEIPIGLRETDLT
PAHCHMHTNPHELLIFGAAKSGKTTIAHAIAARAI CARNSPQOVRPMLADYRSGLLDAVPDT
HLLGAGAINRNSASLDEAVQALAVNLKKRLPPTDLTTAQLRSRSWWSGFDVLLVDDWHM
IVGAAGGMPPMAPLAPLLPAAADIGLHIIVTCQMSQAYKATMDKFEVGAAFGSGAPTMFLS
GEKQEFPSSEFKVKRRPPGOAFLVSPDGKEVIQAPYIEPPEEVFAAPPSAG*

MTBN2

MEKMSHDP IAADIGTQVSDNALHCVTAGSTALTSVTGLVPAGADEVSAQAATAFTSEGIQ
LLASNASAQDQLHRAGEAVQDVARTYSQIDDGAGVFAE*

MTBN3

MLWHAMPPELNTARLMAGAGPAPMLAAAAGWQTL SAAALDAQAVELTARLNSLGEAWTGGG
SDKALAAATPMVVWLQTASTQAKTRAMQATAQAAAAYTQAMATTPSLPEIAANHI TQAVLT
ATNFFGINTIPIALTEMDYFIRMWNQAALAMEVYQAE TAVNTLFEKLEPMASILDPGASQ
STTNPFIGMPSPGSSTFVGQLPPAATQTLGQLGEMSGPMQQLTQPLQOVTSLFSQVCGCT
GGNPADEEAAQMGLLGTSELSNHPLAGGSGPSAGAGLLRAESLPGAGGSLTRTPLMSQLI
EKPVAPSVMPAAAAGS SATGGAAPVGAGAMGQGAQSGGSTRPGLVAPAPLAQEREDDED
DWDEEDDW*

MTBN4

MAEMKTDAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQAAVVRFQE
AANKQKQELDEISTNIRQAGVQYSRADEEQQALSSQMGF*

MTBN5

MAADYDKLFRPHEGMEAPDDMAAQFFDPSASFPPAPASANLPKPNGQTPPPTSDDLSE
FVSAPPPPPPPPPPPPTPMPIAAGEPPSPEPAASKPPTPPMPIAGPEPAPPKPTPPMP
IAGPEPAPPKPTPPMPIAGPAPTPTESQLAPPRPPTPQTPTGAPQQPESPAPHVPSHG?
HQPRRTAPAPPWAKMP IGEPPPAPSRPSASPAEPTTRPAPQHSRRARRGHRYRTDTERNV
GKVATGPSIQARLRAEEASGAQLAPGTEPSPAPLQPRSYLAPPTRPAPTEPPPSPSQR
NSGRRERRVHPDLAAQHAAAQPDSTI TAATTGRRRKRAAPDL DATQKSLRPAAKGPKVK
KVKPQKPKATKPKVVSQRGWRHWVHALTRINLGLSPDEKYELDLHARVRRNPRGSYQIA
VVGLKGGAGKTTLTAALGSTLAQVRADRI LALDADPGAGNLADRVGROSGATTIADVLAEK
ELSHYNDI RAHTSVNAVNLVLPAPYSSAQRALSDADWHFIADPASRFYNLVLADCGAG
FEDPLTRCVLSTVSGVVVVASV SIDGAQQASVALDWLRNNGYQDLASRACVVINHIMPGE
PNVAVKDLVRHFEQQVQGRVVVMPWDRHIAAGTEI SLDLLDPIYKRKVLLELAAALSDDF
ERAGR*

【図2】

mtbn1

1	atgactgctg	aaccggaagt	acggacgctg	cgcgaggttg	tgctggacca
51	gctcggcact	gctgaatcgc	gtgcgtaaaa	gatgtggetg	ccgcccgttg
101	ccaatccggt	cccgtcaac	gagctcatcg	cccgtgatcg	gcgacaaccc
151	ctgcgatttg	ccctggggat	catggatgaa	ccgcccgcgc	atctacagga
201	tgtgtggggc	gtagacgttt	ccggggccgg	eggcaacatc	ggtattgggg
251	gcgacacctca	aaccgggaag	tcgacgctac	tcgacagcat	ggtgatgtcg
301	gcccgcgcca	cacactcacc	gcgcaacggt	cagttctatt	gcactgacct
351	aggtggcggc	gggctgatct	atctcgaaaa	ccttccacac	gtcgggtggg
401	tagccaatcg	gtccgagccc	gacaagggtca	accgggtggt	cgcagagatg
451	caagccgtca	tgccgcaacg	ggaaaccacc	ttcaaggaac	accgagtggg
501	ctcgatcggg	atgtaccggc	agctgcggtga	cgatccaagt	caaccocggt
551	cgtecgatcc	atacggcgac	gtctttctga	tcategaegg	atggcccggg
601	tttgtcggcg	agttccccga	cottgagggg	caggttcaag	atctggccgc
651	ccaggggctg	gcgttcggcg	tcacgctcat	catctccacg	ccacgctgga
701	cagagctgaa	gtcgcgtggt	cgcgactacc	tcggcaccac	gatcgagttc
751	cggtttggtg	acgtcaatga	aaccagatc	gaccggatta	cccgcgagat
801	cccggcgaat	cgccggggtc	gggcagtgct	gatggaaaag	caccatctga
851	tgatcggcgt	gcccaggttc	gacgcgctgc	acagegcgca	taacctgggtg
901	gagccgatca	ccgcccgggt	gacgcagatc	gcttcccagc	acaccgaaca
951	ggcacctccg	gtgcccgggt	tgcccggagcg	tatccacctg	cacgaactcg
1001	accggaaccc	gcccgggacc	gagtcgact	accgactcgc	ctgggagatt
1051	ccgatcggct	tgccgcgagac	ggacctgacg	ccggctcact	gccacatgca
1101	cacgaacccg	cacctactga	tcttcgggtgc	ggccaaatcg	ggcaagacga
1151	ccattgccca	cgcgatecgc	cgcccatttt	gtgcccgaac	cagtccccag
1201	caggtgcccgt	tcattgctcgc	ggactaccgc	tcgggcccgc	tggaocgggt
1251	gcccggacacc	catctgctgg	gcgcccggcg	gatcaaacgc	aacagocggt
1301	cgctagacga	ggccgttcaa	gcaactggcg	tcaacctgaa	gaagcgggtg
1351	ccgcccagccg	acctgacgac	ggcgcagcta	cgctcgcggt	cgctgggtgg
1401	cggatttgac	gtcgtgcttc	tggtcgacga	ttggcacatg	atcgtgggtg
1451	ccgcccggggg	gatgcccgcg	atggcaccgc	tgcccocggt	attgcccggg
1501	gcggcagata	tcgggttgca	catcattgtc	acctgtcaga	tgagcccaggc
1551	ttacaaggca	accatggaca	agttcgtcgg	cgccgcattc	gggtcggggc
1601	ctccagacaat	gttcccttcg	ggcgagaagc	aggaattccc	atccagtgag
1651	ttcaagggtca	agcggcgccc	ccctggccag	gcatttctcg	tctcgccaga
1701	cggcaaaagag	gtcatccagg	cccctacat	cgagcctcca	gaagaagtgt
1751	tcgacgaccc	cccaagcggc	gggttaa		

mtbn2

1	atggaaaaaa	tgteacatga	tcgatcgcct	gccgacattg	gcacgcaagt
51	gagcgcacaac	gctctgcacg	gcgtgacggc	cgctcgcacg	gcgctgacgt
101	cggtgaccgg	gctgggtccc	gcgggggccc	atgaggtctc	cgcccgaagc
151	gcgacggcgt	tcacatcgga	gggcatccaa	ttgctggctt	ccaatgcac
201	ggcccgaagac	cagctccacc	gtcggggcga	agcgggtccag	gacgtcgccc
251	gcacctattc	gcaaatcgac	gacggcgccg	ccggcgtctt	cgccctaatg

mtbn3

1	atgctgtggc	acgcaatgcc	accggagcta	aataccgcac	ggctgatggc
51	cggcgcgggt	ccggctccaa	tgcttgccgc	ggccgcggga	tgccagacgc
101	tttcggcggc	tctggacgct	caggccgctc	agttgaccgc	gcgcccgaac

【図2 - 1】

図2 (続き)

```

151  tctctgggag aagcctggac tggaggtggc agcgacaagg cgcttgcggc
201  tgcaacgccg atggtggtct ggctacaaac cgcgtcaaca caggccaaga
251  cccgtgogat gcaggcgacg gcgcaagccg cggcatacac ccaggccatg
301  gccacgacgc cgtcgtctgc ggagatcgcc gccaacacac tcaccaggc
351  cgtccttacg gccaccaact tcttcgggat caacacgac cccgatcgct
401  tgaccgagat ggattatttc atccgtatgt ggaaccaggc agccctggca
451  atggaggtct accaggccga gaccgcggtt aacacgcttt tcgagaagct
501  cgagccgatg gcgtcgatcc ttgatcccgg cgcgagccag agcacgacga
551  acccgatctt cggaatgccc tcccctggca gctcaacacc ggttggccag
601  ttgcccggcg cggctacce gaccctcggc caactgggtg agatgagcgg
651  cccgatgcag cagctgacce agccgctgca gcaggtgacg tcgttgttea
701  gccaggtggg cggcacccgg gcgggcaacc cagccgacga ggaagccggc
751  cagatgggcc tgctcggcac cagtccgctg tcgaaccatc cgtggctgg
801  tggatcaggc cccagcggcg gcgcgggcct gctgcgcgcg gagtcgctac
851  ctggcgcagg tgggtcgttg accgcacgc cgtgatgtc tcagctgatc
901  gaaaagccgg ttgccccctc ggtgatgccc gcggtgctg ccggatcgtc
951  ggogacgggt ggcgccgctc cggtggtgtc gggagcgatg ggccagggtg
1001 cgcattccgg cggctccacc aggcgggtc tggtecgcc ggccaccgctc
1051 gcgcaggagc gtgaagaaga cgacgaggac gactgggacg aagaggacga
1101 ctggtga

```

mtbn4

```

1  atggcagaga tgaagaccga tgccgctacc ctgcgcgagg aggcaggtaa
51  tttegagcgg atctccggcg acctgaaaac ccagatcgac cagggtggagt
101  cgaaggcagg ttcgttgcag ggccagtggc gcggcgccgg ggggacggcc
151  gcccaggccg cggtggtgcg cttccaagaa gcagccaata agcagaagca
201  ggaactcgac gagatctcga cgaatatctg tcaggccggc gtccaatact
251  cgagggccga cgaggagcag cagcaggcgc tgtectcgca aatgggcttc
301  tga

```

mtbn5

```

1  atggcgcccg actacgacaa gctcttccgg ccgcacgaag gtatggaagc
51  tcgggacgat atggcagcgc agccgttctt cgaccccagt gcttcgtttc
101  cgccggcgcc cgcacggca aacctaccga agcccaacgg ccagactccg
151  cccccgacgt ccgacgacct gtccgagcgg ttctgtgctg ccccgcgcgc
201  gccaccccca cccccacctc cgcctcggcc aactccgatg ccgatcgccg
251  caggagagcc gccctcggcg gaaccggccg catctaaacc acccacacc
301  cccatgcccc tcgcccggacc cgaaccggcc ccacccctaac caccacacc
351  cccatgccc atcgccggae ccgaaccggc cccacccaaa ccaccacac
401  ctccgatgoc catcgccgga cctgcaacca ccccaacoga atcccagttg
451  gcgcccccca gaccaccgac accacaaacg ccaaccggag cgcgcagca
501  accggaatca cggcgcccc acgtaccctc gcacgggcca catcaacccc
551  ggogcaccgc accagcaccg ccctgggcaa agatgccaat cggcgaacc
601  ccgcccgtc cgtccagacc gtctgcgtcc cggccgaac caccgacccg
651  gcctgcccc caacactccc gacgtgcgcg cgggggtcac cgtatcgca
701  cagacaccga acgaaacgtc gggaggttag caactggctc atccatccag
751  gcgcccgtgc gggcagagga agcatccggc gcgcagctcg ccccggaac
801  ggagccctcg ccagcgcgct tgggccaacc gagatcgtat ctggctccgc
851  ccacccgccc cgcgcccgaca gaacctccc ccagcccctc gcgcagcgc
901  aactccggte ggcggtgccc gcgacgcgtc caccctcgatt tagccgcca

```

【図2-2】

図2 (続き)

```

951  acatgccgcg  gcgcaacctg  attcaattac  ggccgcaacc  actggcggtc
1001  gtcgccgcaa  gcgtgcagcg  ccggatctcg  acgcgacaca  gaaatcctta
1051  aggccggcgg  ccaaggggcc  gaagggtgaag  aagggtgaage  ccagaaacc
1101  gaaggccacg  aagccgccca  aagtggtgtc  gcagcgcggc  tggcgacatt
1151  ggggtgcatgc  gttgacgcga  atcaacctgg  gcctgtcacc  cgacgagaag
1201  tacgagctgg  acctgcacgc  tcgagtcocg  cgcaatcccc  gcgggtcgta
1251  tcagatcgcc  gtcgtcggtc  tcaaagggtg  ggctggcaaa  accacgctga
1301  cagcagcgtt  ggggtcgacg  ttggctcagg  tgcgggccga  ccggatcctg
1351  gctctagaag  cggatccagg  cgccggaaac  ctcccgatc  gggtagggcg
1401  acaatcgggc  gcgaccatcg  ctgatgtgct  tgcagaaaaa  gagctgtcgc
1451  actacaacga  catccgcgca  cacactagcg  tcaatgcggt  caatctggaa
1501  gtgctgccgg  caccggaaat  cagctcggcg  cagcgcgcgc  tcagcgaocg
1551  cgactggcat  ttcatcgcgc  atcctgcgct  gaggttttac  aacctcgtct
1601  tgctgattg  tggggccggc  ttcttcgacc  cgctgacccg  cggcgtgctg
1651  tccacgggtg  ccgggtgctg  ggtcgtggca  agtgtctcaa  tcgacggcgc
1701  acaacaggcg  tcggctcgct  tggactgggt  gcgcaacaac  ggttaccaag
1751  atttggcgag  ccgcgcacgc  gtggtcacca  atcacatcat  gccgggagaa
1801  cccaatgtcg  cagttaaaga  cctgggtcgg  catttcgaac  agcaagttca
1851  acccggccgg  gtcgtggtea  tgccgtggga  caggcacatt  gcggccggaa
1901  ccgagatttc  actcgacttg  ctcgacccta  tctacaagcg  caaggtcctc
1951  gaattggccg  cagcgcctat  cgacgatttc  gagagggctg  gacgtcgttg
2001  a

```

mtbn6

```

1  ttgagcgcac  ctgctgttgc  tgcctggtcct  accgccgcgg  gggcaaccgc
51  tgcgcggcct  gccaccacc  ggggtgacgat  cctgaccggc  agacggatga
101  ccgatttggg  actgccagcg  gcggtgocga  tggaaactta  tattgacgac
151  accgtcgcgg  tgctttccga  ggtggtggaa  gacacgcocg  ctgatgtact
201  cggcggtctc  gactttaccg  cgcaaggcgt  gtgggcgttc  gctcgtcccg
251  gatcgccgcc  gctgagctc  gaccagtcac  tcgatgacgc  cggggtggtc
301  gacgggtcac  tgctgactct  ggtgteagtc  agtcgcaccg  agcgtaccg
351  accgttggtc  gaggatgtca  tcgacgcgat  cgccgtgctt  gacgagtcac
401  ctgagttcga  ccgcacggca  ttgaatcgct  ttgtgggggc  ggcgatcccg
451  cttttgaccg  cgcccgctat  cgggatggcg  atgcgggcgt  ggtgggaaac
501  tgggcgtagc  ttgtggtggt  cgttggcgat  tggcatcctg  gggatcgctg
551  tgctggtagg  cagcttcgtc  gcgaacaggt  tctaccagag  cggccacctg
601  gccgagtgcc  tactggtcac  gacgtatctg  ctgatcgcaa  ccgccgcagc
651  gctggccgtg  ccgttgccgc  gcggggtcaa  ctcgttgggg  gcgccacaag
701  ttgccggcgc  cgctacggcc  gtgctgtttt  tgacctgat  gacgcggggc
751  ggccctcgga  agcgtcatga  gttggcgtcg  ttgcccgtga  tcaccgctat
801  cgcggtcate  gcggccgcgc  ctgccttcgg  ctatggatac  caggactggg
851  tccccgcggg  ggggatcgca  ttccggctgt  tcattgtgac  gaatgcggcc
901  aagctgaccg  tcgcggtcgc  gcggatcgcg  ctgcgcgca  ttcgggtacc
951  cggcgaaacc  gtggacaacg  aggagtgtct  cgatcccgtc  gcgccccgg
1001  aggctaccag  cgaagaaacc  ccgacctggc  aggccatcat  cgcgtcggtg
1051  ccgcgctccg  cggctccgct  caccgagcgc  agcaaactgg  ccaagcaact
1101  totgatcgga  tacgtcacgt  cgggcaccct  gattctggct  gccggtgcca
1151  tcgcggtcgt  ggtgcgcggg  cacttctttg  tacacagcct  ggtggtcgcg
1201  ggtttgatca  cgaccgtctg  cggatttcgc  tcgoggcttt  acgccgagcg
1251  ctgggtgtcg  tgggcgttgc  tggcggcgac  ggtcgcgatt  ccgacgggtc
1301  tgacggccaa  actcatcate  tggtaaccgc  actatgcctg  gctgttgttg

```

【図2-3】

図2 (続き)

```

1351 agcgtctacc tcacggtagc cctgggtgcg ctcggtggtg tegggtegat
1401 ggetcaccgtc cggcgcggtt caccggtcgt aaaacgaact ctggaattga
1451 tcgacggcgc catgatecgt gccatcattc ccatgctgct gtggatcacc
1501 ggggtgtagc acacggtcgc caatatccgg ttctga

```

mtbn7

```

1 atggctgaac cgttggccgt cgatcccacc ggcttgagcg cagcggccgc
51 gaaattggcc ggccctcgtt ttccgcagcc tcggcgcccg atcgcggtca
101 gcggaacgga ttccggtggtg gcagcaatca acgagaccat gccaaagcatc
151 gaatcgctgg tcagtgcagg gctgcccggc gtgaaagccg ccctgactcg
201 aacagcatcc aacatgaacg cggcggcgga cgtctatgcg aagaccgatc
251 agtcaactgg aaccagtttg agccagtatg cattcggctc gtccggcgaa
301 ggcctggctg gcgtcgccctc ggtcgggtgt cagccaagtc aggctacca
351 gctgctgagc acaccctgtg cacaggtcac gaccagctc ggcgagacgg
401 ccgctgagct ggcaccccgt gttgttgcca cgggtgcgca actcgttcag
451 ctggctccgc acgcccgtca gatgtcgcaa aacgcatacc ccatcgctca
501 gacgatcagt caaacgccc caccggcccg aacaggcccg ccagagcccg caggccggca
551 gcggcccaat gcccgcacag ctgtccagcg ctgaaaaacc ggccaccgag
601 caagcggagc cggccacgga agtgacaaac gacgatcagg gaccaccagg
651 cgacgtgcag ccggccgagg tcggtgcccg ggcaegtgc gaaggcccg
701 gcgcatcacc gggccagcag cccggcgggg gcgttcccg gcaagccatg
751 gataccggag ccggtgcccg cccagcggcg agtccgctgg cggcccccgt
801 cgatecgtcg actccggcac cctcaacaac cacaacggtg tag

```

mtbn8

```

1 atgagtatta ccaggccgac gggcagctat gccagacaga tgctggatcc
51 gggcggctgg gtggaagccg atgaagacac ttctatgac cgggcccg
101 aatatagcca gttttgcaa agggtcaccg atgtatgga cacctgccgc
151 cagcagaaag gccacgtctt cgaaggcggc ctatggtccg gcggcgccgc
201 caatgctgcc aacggcgccc tgggtgcaaa catcaatcaa ttgatgacgc
251 tgcaggatta tctcgccacg gtgattacct ggcacaggca tattgcccgg
301 ttgattgagc aagctaaatc cgatatcggc aataatgtgg atggcgtca
351 acgggagatc gatatcctgg agaatgacc tagcctggat gctgatgagc
401 gccataccgc catcaattca ttggtcacgg cgacgcattg ggccaatgtc
451 agtctggtcg ccgagaccgc tgagcgggtg ctggaatcca agaattggaa
501 acctccgaag aacgcaotcg aggatttget tcagcagaag tcgccgccac
551 ccccagacgt gctaccctg gtcgtgccat cccggggcac accgggcaca
601 ccgggaaccc cgatcaccoc gggaaacccc atcaccocgg gaaccccaat
651 cacaccate ccgggagcgc cggtaactcc gatecaccca acgcccggca
701 ctcccgtcac gccggtgacc ccgggcaagc cggtcacccc ggtgaccccg
751 gtcaaaccgg gcacaccagg cgagccaacc ccgatcacgc cggtcacccc
801 cccggctgcc ccggccacac cggcaacccc ggccaacccc gttaccccag
851 ctcccgtcc acaccgcag ccggctccgg caccggcgcc atcgccctgg
901 ccccagccgg ttacaccgga cactcccggc cegtctggtc dagcaacacc
951 gggcaccoca gggggcgagc cggcgccgca cgtcaaacc gggcgttgg
1001 cggagcaacc tgggtgtgccc ggccagcatg cgggcggggg gacgcagtgc
1051 gggcctgccc atgcccagca atccgcccgc tcggtgacgc cggctgcccg
1101 gtcccgtgct ccgggcgcac gggcggcggc cgcgcgcgc agcggatccg
1151 ccgtgggagc gggcgcgcgt tcgagcgtgg gtacggccc ggcctcgggc
1201 gcggggtcgc atgctgccc tgggcggggc ccggtggcta cctcggacaa

```

【図2 - 4】

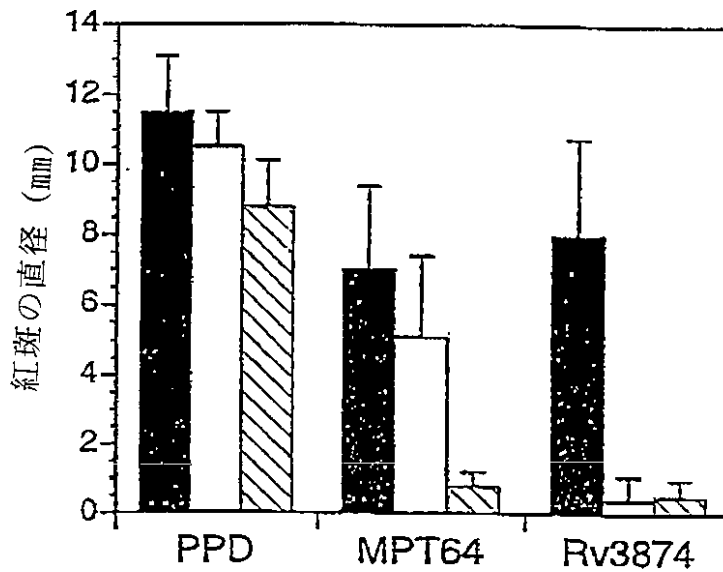
図2 (続き)

```

1251 ggcgggcgga cggagcaegc gggcgggcctc ggcgcggaag gcacctcctg
1301 cccgcccgcg gtcgaccgat cacatcgaca aacccgatcg cagcgagtct
1351 gcagatgacg gtacgccggg gtcgatgate ccgggtgtcgg cggctcgggc
1401 ggcacgcgac gccgccactg cagctgccag cgcccgccag cgtggccgcg
1451 gtgatgcgct gcggttggcg cgacgcacgc cggcggcgct caacgcgtcc
1501 gacaacaacg cgggogacta cgggttcttc tggatcaccg cggtgaccac
1551 cgacggttcc atcgtcgtgg ccaacagcta tgggtgggc tacatacccg
1601 acgggatgga attgcccgaat aagggtgact tggccagcgc ggatcacgca
1651 atcccggttg acgaaattgc acgctgtgcc acctaccggg ttttggccgt
1701 gcaagcctgg gcggctttcc acgacatgac gctgcgggcg gtgatcggta
1751 ccgoggagca gttggccagt tggatcccg gtgtggcnaa gattgtgctg
1801 gagccagatg acattccgga gagcggcaaa atgacgggce ggtcgcggct
1851 ggaggtcgtc gacccctcgg cggcggtcca gctggccgac actaccgatc
1901 agcgtttgct cgacttggtg ccgcccggcg cgggtggatgt caatccaccg
1951 ggcgatgagc ggcacatgct gtggttcgag ctgatgaagc ccatgaccag
2001 caccgctacc ggccgcgagg ccgctcatct gggggcgttc cgggcctacg
2051 ctgcccactc acaggagatt gccctgcacc aagcgcacac tgcgactgac
2101 ggggcccgtc agcgtgtggc cgtcggggac tggctgtact ggcaatacgt
2151 caccgggttg ctcgaccggg ccctggccgc cgcattgctga

```

【図3】



【**手続補正書**】

【**提出日**】平成14年3月18日(2002.3.18)

【**手続補正1**】

【**補正対象書類名**】図面

【**補正対象項目名**】図2

【**補正方法**】変更

【**補正の内容**】

【図2】

図2

mtbn1

```

1      atgactgctg aaccggaagt acggacgctg cgcgaggttg tgctggacca
51     gctcggcact gctgaatcgc gtgcgtacaa gatgtggctg ccgccgttga
101    ccaatccggg cccgctcaac gagctcatcg cccgtgatcg gcgacaacc
151    ctgcgatttg ccctggggat catggatgaa ccgcgcgcc atctacagga
201    tgtgtggggc gtagacgttt ccggggcccg cggcaacatc ggtattgggg
251    gcgcacctca aaccgggaag tcgacgctac tgcagacgat ggtgatgtcg
301    gccgccgcca cacactcacc gcgcaacggt cagttctatt gcatcgacct
351    aggtggcggc gggctgatct atctcgaaaa ccttccacac gtcgggtggg
401    tagccaatcg gtccgagccc gacaaggcca accgggtggg cgcagagatg
451    caagccgtca tgcggcaacg ggaaccacc ttcaaggaac accgagtggg
501    ctcgatcggg atgtaccggc agctgcgtga cgatccaagt caacccggtg
551    cgtccgatcc atacggcgac gtctttctga tcatcgacgg atggcccggg
601    tttgtcggcg agttccccga ccttgagggg caggttcaag atctggccgc
651    ccaggggctg gcgttcggcg tccagctcat catctccacg ccacgctgga
701    cagagctgaa gtgcgctgtt cgcgactacc tcggcaccaa gatcgagttc
751    cggcttggtg acgtcaatga aaccagatc gaccggatta cccgcgagat
801    cccggcgaat cgtccgggtc gggcagtgtc gatggaaaag caccatctga
851    tgatcggcgt gccaggttc gacggcgtgc acagcgccga taacctggtg
901    gaggcgatca ccgcgggggt gacgcagatc gcttcccagc acaccgaaca
951    ggcacctccg gtgcgggtcc tgcgggagcg tatccacctg cacgaactcg
1001   acccgaacc cccgggacca gagtccgact accgcactcg ctgggagatt
1051   ccgatcggct tgcgcgagac ggacctgacg ccggctcact gccacatgca
1101   cacgaaccg cactactga tcttcgggtg ggccaaatcg ggcaagacga
1151   ccattgccc cgcgatecgc cgcgccattt gtgcccgaaa cagtcccag
1201   caggtgctgg tcatgctcgc ggactaccgc tcgggcctgc tggacgctg
1251   gccggacacc catctgctgg gcgcccgcgc gatcaaccgc aacagcgcgt
1301   cgtagacca ggcggtcaa gcactggcgg tcaacctgaa gaagcggttg
1351   ccgccgacc acctgacgac ggcgagcta cgctcgcgtt cgtggtggag
1401   cggatttgac gtcgtgcttc tggtcgacga ttggcacatg atcgtgggtg
1451   ccgccgggg gatgccgccc atggcaccgc tggcccgtt attgccggc
1501   gcggcagata tcgggttgca catcattgtc acctgtcaga tgagccaggc
1551   ttacaaggca accatggaca agttcgtcgg cgcgcattc gggtcggg
1601   ctccgacaat gttccttctg ggcgagaagc aggaattccc atccagtgag
1651   ttcaagggtc agcggcggc ccctggccag gcatttctcg tctcgccaga
1701   cggcaagag gtcattccagg cccctacat cgagcctcca gaagaagtgt
1751   tcgagcacc cccaagcggc ggttaa

```

mtbn2

```

1      atggaaaaaa tgtcacatga tccgatcgtt gccgacattg gcacgcaagt
51     gagcgacaac gctctgcacg gcgtgacggc cggctcgacg gcgctgacgt
101    cggtgaccgg gctggttccc gcgggggccc atgaggtctc cgcccaagcg
151    gcgacggcgt tcacatcgga gggcatcaa ttgctggctt ccaatgcate
201    ggcccaagac cagctccacc gtgcgggcca agcgggtccag gacgtcgccc
251    gcacctattc gcaaatcgac gacggcggcc ccggcgtctt cgccgaatag

```

mtbn3

```

1      atgctgtggc acgcaatgcc accggagcta aataccgcac ggctgatggc
51     cggcgcgggt ccggctccaa tgcttgcggc ggccgcggga tggcagacgc
101    tttcggcggc tctggacgct caggccgctg agttgaccgc gcgcctgaac

```

図2(続き)

```

151  tctctgggag aagcctggac tggaggtggc agcgacaagg cgcttgccgc
201  tgcaacgccg atggtggtct ggctacaaac cgcgtcaaca caggccaaga
251  cccgtgcatg gcaggcgacg gcgcaagccg cggcatacac ccaggccatg
301  gccacgacgc cgtcgtctgc ggagatcgcc gccaaccaca tcaccaggc
351  cgtccttacg gccaccaact tcttcggtat caacacgata ccgatcgcgt
401  tgaccgagat ggattatctc atccgtatgt ggaaccaggc agccctggca
451  atggaggtct accaggccga gaccgcggtt aacacgcttt tcgagaagct
501  cgagccgatg gcgtcgatcc ttgatcccgg cgcgagccag agcacgacga
551  acccgatctt cggaatgccc tcccctggca gctcaacacc ggttggccag
601  ttgccgccgg cggctaccca gaccctcggc caactgggtg agatgagcgg
651  cccgatgcag cagctgaccc agccgctgca gcaggtgacg tcgttggtca
701  gccaggtggg cggcaccggc ggcggaacc cagccgacga ggaagccgcg
751  cagatgggccc tgctcggcac cagtcgctg tcgaaccatc cgctggctgg
801  tggatcaggc cccagcgcgg gcgcgggccc gctgcgcgcg gagtcgctac
851  ctggcgcagg tgggtcgttg accgcacgc cgctgatgtc tcagctgatc
901  gaaaagccgg ttgccccctc ggtgatgccg gcggctgctg ccgatcgtc
951  ggcgacgggt ggcgccgctc cggtggtgtc gggagcgatg ggccagggtg
1001 cgcaatccgg cggctccacc aggcggggtc tggtcgcgcc ggcaccgctc
1051 gcgagcagc gtgaagaaga cgacgaggac gactgggacg aagaggacga
1101 ctgggtga

```

mtbn4

```

1  atggcagaga tgaagaccga tgccgctacc ctgcgcgagg aggcaggtaa
51  ttctgagcgg atctccggcg acctgaaaac ccagatcgac caggtggagt
101  cgacggcagg ttcggtgcag ggccagtggc gcggcgccgg ggggacggcc
151  gcccaggccg cggtggtgcg cttccaagaa gcagccaata agcagaagca
201  ggaactcgac gagatctcga cgaatattcg tcaggccggc gtccaatact
251  cgagggccga cgaggagcag cagcaggcgc tgtcctcgca aatgggcttc
301  tga

```

mtbn5

```

1  atggcggccc actacgacaa gctcttcggy ccgcacgaag gtatggaagc
51  tccggacgat atggcagcgc agccgttctt cgaccccagt gcttcgtttc
101  cgccggcgcc cgcacggcca aacctaccga agcccaacgg ccagactccg
151  cccccgacgt ccgacgacct gtcggagcgg ttcgtgtcgg ccccgccgcc
201  gccacccccca cccccacctc cgcctcggcc aactccgatg ccgatcggcg
251  caggagagcc gccctcggcg gaaccggccg catctaaacc acccacacc
301  cccatgcccc tcgcccggacc cgaaccggcc ccacccaaa caccacacac
351  cccatgccc atcgcgggac ccgaaccggc ccacccaaa caccacacac
401  ctccgatgcc catcgccgga cctgcaccca cccaaccgga atcccagttg
451  gcgcccccca gaccaccgac accacaaacg ccaaccggag cgccgcagca
501  accggaatca ccggcgcccc acgtaccctc gcacgggcca catcaacccc
551  ggcgcaccgc accagcaccg ccctgggcaa agatgccaat cggcgaaccc
601  ccgcccgcctc cgtccagacc gtctgcgtcc ccggccgaac caccgacccg
651  gcctgcccc caacactccc gacgtgcgcg ccggggtcac cgctatcgca
701  cagacaccga acgaaacgtc gggaaagtag caactggtcc atccatccag
751  gcgcggtctg gggcagagga agcatccggc gcgcagctcg cccccggaac
801  ggagccctcg ccagcgcctg tgggccaacc gagatcgtat ctggctccgc
851  ccacccgccc cgcgccgaca gaacctcccc ccagcccctc gccgcagcgc
901  aactccggtc ggcgtgcccga gcgacgcgtc caccgccatt tagccgccca

```

図2(続き)

951 acatgcccgcg gcgcaacctg attcaattac ggccgcaacc actggcggtc
 1001 gtcgccgcaa gcgtgcagcg ccggatctcg acgcgacaca gaaatcctta
 1051 aggccggcgg ccaaggggcc gaaggtgaag aaggtgaagc cccagaaacc
 1101 gaaggccacg aagccgccca aagtgggtgc gcagcgcggc tggcgacatt
 1151 gggtagcatgc gttgacgcga atcaacctgg gcctgtcacc cgacgagaag
 1201 tacgagctgg acctgcacgc tcgagtccgc cgcaatcccc gcgggtcgta
 1251 tcagatcgcc gtcgtcggtc tcaaaggtgg ggctggcaaa accacgctga
 1301 cagcagcgtt ggggtcgacg ttggctcagg tgcgggcccga ccggatcctg
 1351 gctctagacg cggatccagg cgccggaaac ctgcgccgatc gggtagggcg
 1401 acaatcgggc gcgaccatcg ctgatgtgct tgcagaaaaa gagctgtcgc
 1451 actacaacga catccgcgca cacactagcg tcaatgcggt caatctggaa
 1501 gtgctgccgg caccggaata cagctcggcg cagcgcgcgc tcagcgcgc
 1551 cgactggcat ttcacgcgcg atcctgcgtc gaggttttac aacctcgtct
 1601 tggctgattg tggggccggc ttcttcgacc cgctgaccog cggcgtgctg
 1651 tccacggtgt ccggtgtcgt ggtcgtggca agtgtctcaa tcgacggcgc
 1701 acaacaggcg tcggtcgcgt tggactggt gcgcaacaac ggttaccag
 1751 atttggcgag ccgcgcatgc gtggatca atcacatcat gccgggagaa
 1801 cccaatgtcg cagttaaaga cctgggtcgg catttgaac agcaagtca
 1851 acccggccgg gtcgtggtca tgccgtggga caggcacatt gcggccggaa
 1901 ccgagatttc actcgacttg ctcgacccta tctacaagcg caaggctctc
 1951 gaattggccg cagcgtatc cgacgatttc gagagggctg gacgtcgttg
 2001 a

mtbn6

1 ttgagcgcac ctgctgttgc tgctggctct accgcccggg gggcaaccgc
 51 tgcgcggcct gccaccacc gggtagcgat cctgaccggc agacggatga
 101 ccgatttggg actgccagcg gcggtgccga tggaaactta tattgacgac
 151 accgtcgcgg tgctttccga ggtgttggaa gacacgcccg ctgatgtact
 201 cggcggcttc gactttaccg cgcaaggcgt gtgggcgttc gctcgtcccg
 251 gatcgcccgc gctgaagctc gaccagtcac tcgatgacgc cggggtggtc
 301 gacgggtcac tgctgactct ggtgtcagtc agtcgcaccg agcgtaccg
 351 accgttggtc gaggatgtca tcgacgcgat cgcctgtctt gacgagtcac
 401 ctgagttcga ccgcacggca ttgaatcgct ttgtgggggc gccgatcccg
 451 cttttgaccg cgcccgtcat cgggatggcg atgcgggcgt ggtgggaaac
 501 tgggcgtagc ttgtggtggc cgttggcgat tggcatcctg gggatcgctg
 551 tgctggtagg cagcttcgtc gcgaacagg tctaccagag cggccacctg
 601 gccgagtgcc tactggtcac gacgtatctg ctgatcgcaa ccgccgcagc
 651 gctggcccgt cggttgcgc gcgggggtcaa ctcgttgggg gcgccacaag
 701 ttgccggcgc cgctacggcc gtgctgttt tgacctgat gacgcggggc
 751 ggccctcgga agcgtcatga gttggcgtcg tttgccgtga tcaccgctat
 801 cgcggtcatc gcggccgcgg ctgccttcgg ctatggatac caggactggg
 851 tcccgcggg ggggatcgca ttccggctgt tcatttgtgac gaatgcggcc
 901 aagctgaccg tcgcggtcgc gcggatcgcg ctgcccgcga ttccggtagc
 951 cggcgaaacc gtggacaacg aggagttgct cgatcccgtc gcgaccccgg
 1001 aggctaccag cgaagaaacc ccgacctggc aggccatcat cgcgtcgggtg
 1051 cccgcgtccg cggtccggct caccgagcgc agcaaaactgg ccaagcaact
 1101 tctgatcgga tacgtcacgt cgggcaccct gattctggct gccggtgcca
 1151 tcgcccgtcg ggtgcgcggg cacttctttg tacacagcct ggtggtcgcg
 1201 ggtttgatca cgaccgtctg cggatttcgc tcgcccgttt acgcccagcg
 1251 ctggtgtgcg tgggcgttgc tggcggcgac ggtcgcgatt ccgacgggtc
 1301 tgacggccaa actcatcatc tggtagccgc actatgctg gctgttgttg

図2(続き)

1351 agcgtctacc tcacggtagc cctggttgcg ctcggtggtg tcgggtcgat
 1401 ggctcacgtc cggcgcgttt caccggtcgt aaaacgaact ctggaattga
 1451 tcgacggcgc catgatcgct gccatcattc ccatgctgct gtggatcacc
 1501 ggggtgtacg acacggtcgg caatatccgg ttctga

mtbn7

1 atggctgaac cgttggccgt cgatcccacc ggcttgagcg cagcggccgc
 51 gaaattggcc ggctcgttt ttccgcagcc tccggcgccg atcgcggtca
 101 gcggaacgga ttcggtggtg gcagcaatca acgagaccat gccaaagcatc
 151 gaatcgctgg tcagtgcagg gctgcccggc gtgaaagccg ccctgactcg
 201 aacagcatcc aacatgaacg cggcggcggg cgtctatgcg aagaccgatc
 251 agtcactggg aaccagtttg agccagtatg cattcggctc gtccggcgaa
 301 ggcttgctg gctgcgctc ggtcgggtgt cagccaagtc aggctacca
 351 gctgctgagc acaccgctgt cacaggtcac gaccagctc ggcgagacgg
 401 ccgctgagct ggcaccccgt gtgtgtgcca cggtgccgca actcgttcag
 451 ctggctccgc acgcccgtta gatgtcgcaa aacgcattcc ccatcgctca
 501 gacgatcagt caaacgcgcc aacaggccgc ccagagcgcg cagggcggca
 551 cgggcccaat gcccgcacag cttgccagcg ctgaaaaacc ggccaccgag
 601 caagcggagc cgggtccacga agtgacaaac gacgatcagg gcaagcagg
 651 cgacgtgcag cggccgagg tcggtgccgc ggcacgtgac gaagggcggc
 701 gcgcatcacc gggccagcag ccggcggggg gcggtcccgc gcaagccatg
 751 gataccggag ccggtgcccg ccagcggcg agtcgctgg cggccccgt
 801 cgatccgctc actccggcac cctcaacaac cacaacgttg tag

mtbn8

1 atgagtatta ccaggccgac gggcagctat gccagacaga tgctggatcc
 51 gggcggctgg gtggaagccg atgaagacac tttctatgac cgggcccagg
 101 aatatagcca ggttttgcaa agggtcaccg atgtattgga cacctgccgc
 151 cagcagaaag gccacgtctt cgaaggcggc ctatgggtccg gcggcgccgc
 201 caatgctgcc aacggcgccc tgggtgcaaa catcaatcaa ttgatgacgc
 251 tgcaggatta tctcgccacg gtgattacct ggcacaggca tattgcccgg
 301 ttgattgagc aagctaaatc cgatatcggc aataatgtgg atggcgctca
 351 acgggagatc gatatcctgg agaatgacce tagcctggat gctgatgagc
 401 gccataccgc catcaattca ttgggtcacgg cgacgcatgg ggccaatgtc
 451 agtctggctc ccgagaccgc tgagcgggtg ctggaatcca agaattggaa
 501 acctccgaag aacgcactcg aggatttgct tcagcagaag tcgccgccac
 551 ccccagacgt gcctaccctg gtcgtgccat ccccgggcac accgggcaca
 601 ccgggaacce cgatcacccc gggaaacccg atcacacca acgcccggca
 651 cacaccatc ccgggagcgc cggtaactcc gatcacacca acgcccggca
 701 ctcccgtcac gccggtgacc ccgggcaagc cggtcacccc ggtgacccc
 751 gtcaaaccgg gcacaccagg cgagccaacc ccgatcacgc cggtcacccc
 801 cccggctgcc ccggccacac cggcaacccc ggccacgccc gttaccccag
 851 ctcccgtctc acaccgcgag ccggctccgg caccggcgcc atcgctggg
 901 ccccagccgg ttacaccggc cactcccggg ccgtctggtc cagcaacacc
 951 gggcacccca gggggcgagc cggcgccgca cgtcaaaccg gcggcgttgg
 1001 cggagcaacc tgggtgtgcc ggccagcatg cgggcggggg gacgcagtgc
 1051 gggcctgccc atgcccagca atccgcgcgc tcggtgacgc cggctgccc
 1101 gtccggtgtc ccgggcgcac gggcgccggc cgccgcgccc agcggatccg
 1151 ccgtgggagc gggcgccgct tcgagcgtgg gtacggccgc ggctcgggc
 1201 cgggggtcgc atgctgccc tgggcggggc ccggtggcta cctcggacaa

図2(続き)

```
1251 ggcggcggca ccgagcacgc gggcggcctc ggcgeggacg gcacctcctg
1301 cccgcccgcc gtcgaccgat cacatcgaca aacccgatcg cagegagtct
1351 gcagatgacg gtacgccggt gtcgatgatc ccggtgtcgg cggctcgggc
1401 ggcacgacgc gccgccactg cagctgccag cgcccgccag cgtggccgcg
1451 gtgatgacgt gcggttggcg cgacgcacgc cggcggcgtc caacgcgtcc
1501 gacaacaacc cgggcgacta cgggttcttc tggatcaccg cggtgaccac
1551 cgacggttcc atcgtcgtgg ccaacagcta tgggctggcc tacataaccg
1601 acgggatgga attgccgaat aaggtgtact tggccagcgc ggatcacgca
1651 atcccggttg acgaaattgc acgctgtgcc acctaccggg ttttggccgt
1701 gcaagcctgg gcggttttcc acgacatgac gctgcgggcg gtgatcggta
1751 ccgcgagca gttggccagt tcggatcccg gtgtggccaa gattgtgctg
1801 gagccagatg acattccgga gagcggcaaa atgacgggcc ggtcgcggct
1851 ggaggtcgtc gaccctcgg cggcggctca gctggccgac actaccgatc
1901 agcgtttgct cgacttggtg ccgcccgcgc cggtggatgt caatccaccg
1951 ggcgatgagc ggcacatgct gtggttcgag ctgatgaagc ccatgaccag
2001 caccgctacc ggccgcgagg ccgctcatct gcgggcgttc cgggcctacg
2051 ctgcccactc acaggagatt gccctgcacc aagcgcacac tgcgactgac
2101 gcggccgtcc agcgtgtggc cgtcgcggac tggctgtact ggcaatacgt
2151 caccgggttg ctcgaccggg ccctggccgc cgcgatgctga
```

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/12257
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Biosis, caba, caplus, embase, lifesci, medline, scisearch, uspatfull, japio		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COLANGELI, R. et al. MTSA-10, the product of the Rv3874 gene of Mycobacterium tuberculosis, elicits tuberculosis-specific, delayed-type hypersensitivity in guinea pigs. Infection and Immunity. February 2000, Volume 68, Number 2, pages 990-993, entire article.	1-18
Y	LYASHCHENKO, K., et al. Use of Mycobacterium tuberculosis complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis. Infection and Immunity. August 1998, Volume 66, Number 8. pages 3606-3610, entire article.	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 AUGUST 2000		Date of mailing of the international search report 14 SEP 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer BODNEY P. SWARTZ, PH.D. Telephone No. (703)308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/12257

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MANCA, C., et al. MTC28, a novel 28-kilodalton proline-rich secreted antigen specific for the Mycobacterium tuberculosis complex. Infection and Immunity. December 1997. Volume 65, Number 12. pages 4951-4957, entire article.	1-18
Y	MANCA, C., et al. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immunity. January 1997. Volume 65, Number 1. pages 16-23, entire article.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/12257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

A16K 39/00, 39/02, 39/04; A61K 38/00; C07H 21/02, 21/04; C07K 1/00; C12P 21/06; C12N 1/00, 1/12;

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

424/185.1, 190.1, 234.1, 248.1; 435/69.1, 253.1, 863; 530/300, 350; 536/23.1, 23.7

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING
This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-18, drawn to DNA, vector, transformed cells, polypeptides, and a first method of use for diagnosis in vivo.

Group II, claims 19-22, drawn to second method of use for diagnosis in vitro using cells.

Group III, claims 23-26, drawn to third method of use for diagnosis in vitro using antibodies.

Group IV, claims 27-34, drawn to fourth method of use for vaccination.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the DNA is a single inventive concept, and as such the corresponding vectors, transformed cells, polypeptides encoded by the DNA, and a first method of use of the polypeptides are included in the first invention. The remaining Groups II-IV are additional methods of use, not requiring the DNA, but can utilize isolated and purified polypeptides obtained from *M. tuberculosis*.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーム(参考)			
C 0 7 K	14/35	C 1 2 N	1/15	4 C 0 8 6		
C 1 2 N	1/15		1/19	4 H 0 4 5		
	1/19		1/21			
	1/21	C 1 2 Q	1/02			
	5/10	G 0 1 N	33/53	D		
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 N	15/00	Z N A A		
G 0 1 N	33/53		5/00	A		
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , T J , T M , T R , T T , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A					
Fターム(参考)	4B024	AA01	AA11	BA31	CA04	CA11
		DA01	DA02	DA05	DA11	EA04
		GA11	HA01			
	4B063	QA01	QA19	QQ01	QQ08	QR08
		QR33	QR42	QR48	QR59	QR62
		QR77	QR80	QS05	QS25	QS36
		QX02				
	4B065	AA36Y	AA90X	AA93X	AB01	
		BA02	CA24	CA45		
	4C084	AA02	AA03	AA13	AA17	BA35
		CA04	MA17	MA66	NA14	ZB352
	4C085	AA03	BA09	BB11	CC07	DD62
		EE01	GG01	GG04	GG05	
	4C086	AA01	AA02	AA03	EA16	MA01
		MA17	MA66	NA14	ZB35	
	4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10
		CA11	DA86	EA31	FA72	FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003519467A5	公开(公告)日	2007-06-21
申请号	JP2000615041	申请日	2000-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	公共卫生研究所的纽约市, Inc.的		
申请(专利权)人(译)	公共卫生研究所纽约市的公司的		
当前申请(专利权)人(译)	公共卫生研究所纽约市的公司的		
[标]发明人	ジェナロマリアエル		
发明人	ジェナロ、マリア、エル.		
IPC分类号	C12N15/09 A61K31/711 A61K39/04 A61K48/00 A61P31/06 C07K14/35 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/53 C12N5/10		
CPC分类号	A61K39/00 C07K14/35 G01N33/5695 A61K39/04 Y10S435/863 G01N33/5091 A61K2039/53 A61K38/00 A61K49/0006 G01N2333/35 G01N2333/57 G01N2800/26		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/711 A61K39/04 A61K48/00 A61P31/06 C07K14/35 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/53.D C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ08 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA36Y 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA35 4C084/CA04 4C084/MA17 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/BA09 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG04 4C085/GG05 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA17 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/132505 1999-05-04 US		
其他公开文献	JP4820489B2 JP2003519467A		

摘要(译)

本发明提供由存在于结核分枝杆菌基因组中但不存在于BCG基因组中的开放阅读框编码的多肽, 以及使用这些多肽的诊断和预防方法。