

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-526742

(P2017-526742A)

(43) 公表日 平成29年9月14日 (2017.9.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/35 (2006.01)	C O 7 K 14/35 Z N A	4 B O 6 3
C07K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	4 C O 8 4
C07K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08	4 H O 4 5
A61K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A61P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く

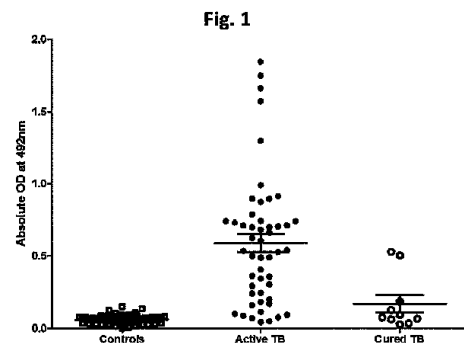
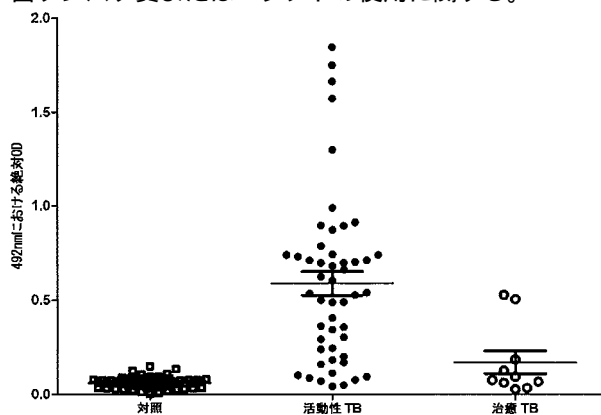
(21) 出願番号	特願2017-527980 (P2017-527980)	(71) 出願人	517049460
(86) (22) 出願日	平成27年8月14日 (2015.8.14)		オックスフォード イミューネック リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年3月27日 (2017.3.27)		英国 オーエックス14 4アールゼット
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/052362		オックスフォードジャー アビンドン
(87) 国際公開番号	W02016/024129		ミルトン パーク イノベーション ドライブ 94シー
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016.2.18)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	111804		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成26年8月15日 (2014.8.15)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	ブルガリア (BG)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	112045	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成27年6月30日 (2015.6.30)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	ブルガリア (BG)	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*) (M.tuberculosis) タンパク質、および免疫学的に活性のあるそれらの断片(ペプチドまたはミモトープペプチド)に関する。特に、本発明は、抗原性が高くかつ結核菌の臨床株に特有の結核菌タンパク質およびそれらのペプチドのグループに関する。従って、本発明は、さらに、結核菌群感染の診断、治療、または予防における、これらの結核菌タンパク質またはペプチドの使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(b)TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(c)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1つもしくは複数のその断片;(d)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片;(e)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数のその断片;(f)Rv1495(SEQ ID NO:5)または1つもしくは複数のその断片;および(g)Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)または1つもしくは複数のその断片の1つまたは複数に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む、対象において結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)(*M.tuberculosis*)群感染を診断するための方法。

【請求項 2】

(i)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(ii)TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(iii)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1つもしくは複数のその断片;(iv)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数のその断片;および(v)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片の1つまたは複数に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質に対する免疫応答をインビトロで検出する工程をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質がRD1タンパク質を含む、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

RD1タンパク質がCFP-10またはESAT-6である、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

断片の1つまたは複数のプールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含み、各プールが、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、Rv0840c(SEQ ID NO:6)、またはRv1677(SEQ ID NO:7)に由来する2つ以上の断片を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

プールの中の断片が、断片が由来するタンパク質の配列の少なくとも80%をカバーするタンパク質断片ライブラリーを形成する、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

プールの中の断片が、断片が由来するタンパク質の配列全体をカバーするタンパク質断片ライブラリーを形成する、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

各プールが、配列が重複する断片を含む、請求項8または9記載の方法。

【請求項 11】

配列が11アミノ酸重複する、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

前記1つもしくは複数の断片または2つ以上の断片が15アミノ酸長である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

断片の1つまたは複数が、断片が由来するタンパク質のT細胞エピトープまたはB細胞エピトープを含む、請求項7記載の方法。

【請求項 14】

T細胞エピトープがCD4エピトープである、請求項13記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

T細胞エピーブがCD8エピーブである、請求項13記載の方法。

【請求項 16】

免疫応答がインビトロ細胞性免疫応答である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

免疫応答がT細胞応答である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

T細胞応答がサイトカイン分泌またはT細胞増殖である、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

サイトカイン分泌がインターフェロンガンマ($\text{IFN}\gamma$)分泌である、請求項18記載の方法

10

【請求項 20】

免疫応答がB細胞応答である、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 21】

B細胞応答が抗体分泌またはB細胞増殖である、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

免疫応答が、請求項1記載の(a)～(g)の1つまたは複数に対する抗体の産生である、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項 23】

酵素結合免疫スポットアッセイ(ELISPOT)を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 24】

患者から得られた免疫細胞集団を、請求項1記載の(a)～(g)の1つまたは複数と接触させる工程を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 25】

請求項1記載の(a)～(g)の2つ以上に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含み、同じ免疫細胞集団を(a)～(g)の2つ以上と接触させる、請求項24記載の方法。

【請求項 26】

免疫細胞集団を、請求項4～6のいずれか一項記載の1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質とさらに接触させる、請求項24または25記載の方法。

30

【請求項 27】

請求項1記載の(a)～(g)の2つ以上に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含み、(a)～(g)の2つ以上のそれぞれを異なる免疫細胞集団と接触させる、請求項24記載の方法。

【請求項 28】

請求項4～6のいずれか一項記載の1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質に対する免疫応答をインビトロで検出する工程をさらに含み、さらなる結核菌タンパク質のそれぞれを異なる免疫細胞集団と接触させる、請求項24または27記載の方法。

【請求項 29】

請求項8～15のいずれか一項記載の断片の1つまたは複数を含む、対象において結核菌(M. tuberculosis)群感染を診断するためのキット。

40

【請求項 30】

免疫応答を検出するための手段をさらに備える、請求項29記載のキット。

【請求項 31】

対象における結核菌群感染の治療または予防において使用するための、請求項1記載の(a)～(g)の1つまたは複数を含む、組成物。

【請求項 32】

請求項1記載の(a)～(g)の1つまたは複数を対象に投与する工程を含む、対象において結核菌群感染を治療または予防する方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)(*M.tuberculosis*)タンパク質および免疫学的に活性のある、その断片(ペプチドまたはミモトープペプチド)に関する。特に、本発明は、抗原性が高く、かつ結核菌の臨床株に特有の結核菌タンパク質およびそのペプチドのグループに関する。従って、本発明は、さらに、結核菌群感染の診断、治療、または予防における、これらの結核菌タンパク質またはペプチドの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

結核は、結核菌(*M.tuberculosis*)群の一員によって引き起こされる、蔓延している感染症である。ほとんどの結核菌群感染は無症候性、すなわち潜伏性である。しかしながら、潜伏感染のおよそ1/10が最終的に活動性疾患(通常、肺結核)に進行し、未治療のままにしておくと50%超の個体が死に至る。

【0003】

結核菌群感染の効率的な検査室診断は結核蔓延の防止における重要な側面である。さらに、迅速な、かつ信頼性の高い診断があると、正しい治療法を適切なタイミングで実行することが可能になる。

【0004】

従来より、結核菌群感染は、(抗酸菌(*AFB*)株を用いた)鏡検を用いて、または微生物培養を用いて体液中のマイコバクテリアを実証することによって診断されてきた。しかしながら、鏡検の信頼性を高くするためには試料に高濃度のマイコバクテリア(すなわち、5~10000個/ml)がいなくてはならず、培養に基づく診断は時間がかかる。

【0005】

結核菌群感染を診断する新たな方法には、結核菌群感染に関連する免疫応答の検出が伴う。他のマイコバクテリアと同様に、結核菌は、インターフェロン(*IFN*)- γ および腫瘍壊死因子(*TNF*)- α などのサイトカインの分泌を伴う強力な1型炎症誘発様応答を誘発するようにCD4+T細胞およびCD8+T細胞を誘発し、他の免疫細胞も刺激する。*IFN*- γ 放出アッセイ(*IGRA*)を用いて、この遅延型過敏(*DTH*)応答を検出することができる。*IGRA*は、感作された(感染した)個体のT細胞が結核菌抗原に再び遭遇した時に*IFN*- γ を産生するという原理に基づいている。市販されている結核菌用*IGRA*には、オリジナルの*QuantiFERON-TB*、ならびにその強化バージョン*QuantiFERON-TB Gold*および*QuantiFERON-TB Gold In-Tube*アッセイ(*Cellestis International, Carnegie, Australia*)、酵素結合免疫スポット(*ELISPOT*)*T SPOT-TB*アッセイ(*Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom*)、ならびに様々な獣医学用特製品(*Bovigam*(登録商標)、*Cervigam*(登録商標)、*Primagam*(登録商標)、*Prionics, Schlieren-Zurich, Switzerland*)が含まれる。

【0006】

これらの*IGRA*の大きな利点は結核菌群感染に対する特異性が高いことである。これは、カルメット・ゲラン桿菌(*BCG*)ワクチンと、ほとんどの環境マイコバクテリアにはないゲノムセグメントである*region of difference*(*RD*)1にコードされる特異的な結核菌抗原を用いることによって成し遂げられた。*IGRA*において用いられる*RD1*抗原には*ESAT6*および*CFP10*が含まれる。このような抗原に対する免疫応答に基づく診断は有効であるが、診断検査において使用するための新たな代替の抗原を開発することは依然として必要とされている。例えば、ワクチン接種した対象について偽陽性結果が得られることを避けるために、診断検査において用いられる抗原は、ワクチンに用いられる抗原と異なることが重要である。特に、*ESAT6*は結核菌ワクチンに含まれている可能性がある。もちろん、効果のある新たな抗原も、結核菌群感染を予防または治療するためのワクチンに用いられる可能性がある。

【発明の概要】

【 0 0 0 7 】

本発明者らは、驚いたことに、結核菌の診断検査において特に有用な多数の結核菌抗原およびその断片を特定した。特定された抗原は、ヒト白血球抗原(HLA)分子に効果的に結合する多数のT細胞エピトープおよび/または抗体に効果的に結合するB細胞エピトープを含有する。従って、前記の抗原および断片を用いて抗結核菌免疫応答を検出することができ、従って、個体における結核菌群感染の存在または非存在を確かめることができる。前記の抗原および断片はまた個体において免疫応答を誘発することもでき、予防ワクチン接種または治療ワクチン接種に用いられる可能性がある。

【 0 0 0 8 】

従って、本発明は、(a)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(b)TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片、(c)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1つもしくは複数のその断片;(d)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片;(e)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数のその断片;(f)Rv1495(SEQ ID NO:5)または1つもしくは複数のその断片;および(g)Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)または1つもしくは複数のその断片の1つまたは複数に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む、対象における結核菌群感染を診断するための方法を提供する。

【 0 0 0 9 】

本発明はまた、
 - 本発明の断片の1つまたは複数を含む、対象において結核菌群感染を診断するためのキット;
 - 対象における結核菌群感染の治療または予防において使用するための、前記で定義した(a) ~ (g)の1つまたは複数を含む、組成物;および
 - 前記で定義した(a) ~ (g)の1つまたは複数を対象に投与する工程を含む、対象において結核菌群感染を治療または予防する方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

配列表の説明

SEQ ID NO:1は、TBFG_13463のアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:2は、Mtub2_17866のアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:3は、Rv2654cのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:4は、Rv3845のアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:5は、Rv1495のアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:6は、Rv0840cのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:7は、Rv1677のアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:8 ~ 10は、TBFG_13463に由来するHLAクラスIIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:11および12は、Mtub2_17866に由来するHLAクラスIIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:13 ~ 19は、Rv0840cに由来するHLAクラスIIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:20 ~ 24は、Rv3845に由来するHLAクラスIIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:25 ~ 27は、Rv2654cに由来するHLAクラスIIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:28 ~ 33は、Rv1677に由来するHLAクラスIIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:34 ~ 40は、Rv1495に由来するHLAクラスIIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:41 ~ 48は、TBFG_13463に由来するHLAクラスIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:49 ~ 52は、Mtub2_17866に由来するHLAクラスIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:53 ~ 58は、Rv2654cに由来するHLAクラスIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:59 ~ 64は、Rv3845に由来するHLAクラスIエピトープのアミノ酸配列である。
 SEQ ID NO:65 ~ 69は、Rv1495に由来するHLAクラスIエピトープのアミノ酸配列である。

SEQ ID NO:70～87は、Rv0840cに由来するHLAクラスIエピトープのアミノ酸配列である。
SEQ ID NO:88～100は、TBFG_13463に由来するB細胞エピトープのアミノ酸配列である。
SEQ ID NO:101～103は、Mtub2_17866に由来するB細胞エピトープのアミノ酸配列である。
SEQ ID NO:104は、Rv2654cに由来するB細胞エピトープのアミノ酸配列である。
SEQ ID NO:105～112は、Rv3845に由来するB細胞エピトープのアミノ酸配列である。
SEQ ID NO:113～120は、Rv1495に由来するB細胞エピトープのアミノ酸配列である。
SEQ ID NO:121～136は、Rv0840cに由来するB細胞エピトープのアミノ酸配列である。
SEQ ID NO:137～141は、Rv1677に由来するB細胞エピトープのアミノ酸配列である。
SEQ ID NO:142～145は、TBFG_13463に由来するさらなるT細胞エピトープである。
SEQ ID NO:146は、Mtub2_17866に由来するさらなるT細胞エピトープである。
SEQ ID NO:147および148は、Rv2654cに由来するさらなるT細胞エピトープである。
SEQ ID NO:149～152は、Rv3845に由来するさらなるT細胞エピトープである。
SEQ ID NO:153は、Rv1495に由来するさらなるT細胞エピトープである。
SEQ ID NO:154～157は、Rv0840cに由来するさらなるT細胞エピトープである。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】様々な群の血清(対照、LTBI、活動性TB、および治癒TB)と、本発明のタンパク質に由来する選択されたB細胞エピトーププールとの反応性を示す。

【図2A】T-SPOTアッセイにおけるパネルA、パネルB、およびパネルA/パネルB最大(Max)の比較を示す。n=183(87人のTB陽性、96人の健常ドナー)。

20

【図2B】ROC分析によって計算した、T-SPOT.TBアッセイにおけるパネルA/パネルB最大の感度および特異度を示す。n=183(87人のTB陽性、96人の健常ドナー)。

【図3A】T-SPOTアッセイにおけるCD4/CD8エピトーププールと、対応するペプチドライブラリーの比較を示す。A-Rv1495、B-TBFG_13463、C-Rv3845(87人のTB陽性ドナー)。

【図3B】T-SPOTアッセイにおけるCD4/CD8エピトーププールと、対応するペプチドライブラリーの比較を示す。A-Rv1495、B-TBFG_13463、C-Rv3845(87人のTB陽性ドナー)。

【図3C】T-SPOTアッセイにおけるCD4/CD8エピトーププールと、対応するペプチドライブラリーの比較を示す。A-Rv1495、B-TBFG_13463、C-Rv3845(87人のTB陽性ドナー)。

【図4A】T-SPOT.TBアッセイにおけるペプチドライブラリーの性能を示す。A-Mtub2_17866、B-Rv2654c、C-Rv1677、D-Rv0840c(87人のTB陽性ドナー)。

30

【図4B】T-SPOT.TBアッセイにおけるペプチドライブラリーの性能を示す。A-Mtub2_17866、B-Rv2654c、C-Rv1677、D-Rv0840c(87人のTB陽性ドナー)。

【図4C】T-SPOT.TBアッセイにおけるペプチドライブラリーの性能を示す。A-Mtub2_17866、B-Rv2654c、C-Rv1677、D-Rv0840c(87人のTB陽性ドナー)。

【図4D】T-SPOT.TBアッセイにおけるペプチドライブラリーの性能を示す。A-Mtub2_17866、B-Rv2654c、C-Rv1677、D-Rv0840c(87人のTB陽性ドナー)。

【図5】TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677 CD4/CD8エピトーププール最大と、TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677ペプチドライブラリー最大の比較を示す(n=183; TB陽性=87)。

【図6】CD4/CD8エピトーププール(TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677)を全て含む複合エピトーププールを用いたT-SPOT.TBアッセイのROC曲線を示す。

40

【図7】ESAT-6とRv0840cペプチドライブラリーとの交換を示す(n=183; 87人のTB陽性)。

【図8】CPF10とRv0840cペプチドライブラリーとの交換を示す(n=183; 87人のTB陽性)。

【図9】T-SPOT.TBアッセイにおけるパネルAおよびパネルBへのRv0840cの付加を示す。さらに具体的には、図8は、パネルA/パネルB最大のROC曲線とパネルA/パネルB/Rv0840cペプチドライブラリー最大のROC曲線の比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

発明の詳細な説明

50

開示された産物および方法の様々な用途が当技術分野における特定のニーズに合わせられ得ることを理解しなければならない。本明細書で使用する用語は本発明の特定の態様の説明を目的としているのにすぎず、限定することを目的としないことも理解しなければならない。

【0013】

さらに、本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる場合、単数形「1つの」、「ある」、および「その」は、文脈によってはっきりと示されていない限り複数の指示物を含む。従って、例えば、「1つの断片」への言及は「複数の断片」を含み、「1つの細胞」への言及は2つ以上のこのような細胞を含み、「1つの対象」への言及は2つ以上のこのような対象を含む。

10

【0014】

本明細書において引用される刊行物、特許、および特許出願は全て、前記であっても下記であっても、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0015】

本発明の方法

本発明者は、結核菌に対して免疫応答を誘発することができる結核菌抗原およびその断片を特定した。従って、これらの抗原は、対象において結核菌群感染(*M. tuberculosis* 群感染)を診断する方法において用いられ得る。前記抗原はまた、例えば、ワクチン接種によって、結核菌群感染を治療または予防するのに用いられ得る。結核菌群には、特に、結核菌、マイコバクテリウム・アフリカヌム(*Mycobacterium africanum*)、マイコバクテリウム・ボビス(*Mycobacterium bovis*)(カルメット・ゲラン杆菌株を含む)、マイコバクテリウム・ミクロティ(*Mycobacterium microti*)、マイコバクテリウム・カネティ(*Mycobacterium canettii*)、マイコバクテリウム・カブラエ(*Mycobacterium caprae*)、マイコバクテリウム・ピンニペディ(*Mycobacterium pinnipedii*)、マイコバクテリウム・スリカタエ(*Mycobacterium suricattae*)、およびマイコバクテリウム・ムンギ(*Mycobacterium mungi*)の1つまたは複数が含まれる。結核菌群には好ましくは結核菌が含まれる。

20

【0016】

本発明は、(a)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(b) TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(c)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1つもしくは複数のその断片;(d)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片;(e)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数のその断片;(f)Rv1495(SEQ ID NO:5)または1つもしくは複数のその断片;および(g)Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)または1つもしくは複数のその断片の1つまたは複数に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む、対象において結核菌(*M. tuberculosis*)群感染を診断するための方法を提供する。例えば、前記方法は、(a)~(g)の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含んでもよい。前記方法は、(a)~(g)の全てに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含んでもよい。

30

【0017】

上記で示した(a)~(g)の定義では、(a)~(g)の1つまたは複数の任意の組み合わせに対する免疫応答をインビトロで検出することができる。例えば、(a)~(g)のそれぞれの定義について、(a);(b);(c);(d);(e);(f);(g);(a)および(b);(a)および(c);(a)および(d);(a)および(e);(a)および(f);(a)および(g);(b)および(c);(b)および(d);(b)および(e);(b)および(f);(b)および(g);(c)および(d);(c)および(e);(c)および(f);(c)および(g);(d)および(e);(d)および(f);(d)および(g);(e)および(f);(e)および(g);(f)および(g);(a)、(b)、および(c);(a)、(b)、および(d);(a)、(b)、および(e);(a)、(b)、および(f);(a)、(b)、および(g);(a)、(c)、および(d);(a)、(c)、および(e);(a)、(c)、および(f);(a)、(c)、および(g);(a)、(d)、および(e);(a)、(d)、および(f);(a)、(d)、および(g);(a)、(e)、および(f);(a)、(e)、および(g);(a)、(f)、および(g);(b)、(c)、および(d);(b)、(c)、および(e);(b)、(c)、および(f);(b)、(c)、および(g);(b)、(d)、および(e);(b)、(d)

40

50

、および(f);(b)、(d)、および(g);(b)、(e)、および(f);(b)、(e)、および(g);(b)、(f)、
 、および(g);(c)、(d)、および(e);(c)、(d)、および(f);(c)、(d)、および(g);(c)、(e)、
 、および(f);(c)、(e)、および(g);(c)、(f)、および(g);(d)、(e)、および(f);(d)、(e)、
 、および(g);(d)、(f)、および(g);(e)、(f)、および(g);(a)、(b)、(c)、および(d);(a)、
 、(b)、(c)、および(e);(a)、(b)、(c)、および(f);(a)、(b)、(c)、および(g);(a)、(b)、
 、(d)、および(e);(a)、(b)、(d)、および(f);(a)、(b)、(d)、および(g);(a)、(b)、(e)、
 、および(f);(a)、(b)、(e)、および(g);(a)、(b)、(f)、および(g);(a)、(c)、(d)、お
 よび(e);(a)、(c)、(d)、および(f);(a)、(c)、(d)、および(g);(a)、(c)、(e)、および(
 f);(a)、(c)、(e)、および(g);(a)、(c)、(f)、および(g);(a)、(d)、(e)、および(f);(a)
)、(d)、(e)、および(g);(a)、(d)、(f)、および(g);(a)、(e)、(f)、および(g);(b)、(c)
)、(d)、および(e);(b)、(c)、(d)、および(f);(b)、(c)、(d)、および(g);(b)、(c)、(e)
)、および(f);(b)、(c)、(e)、および(g);(b)、(c)、(f)、および(g);(b)、(d)、(e)、お
 よび(f);(b)、(d)、(e)、および(g);(b)、(d)、(f)、および(g);(b)、(e)、(f)、および(
 g);(c)、(d)、(e)、および(f);(c)、(d)、(e)、および(g);(c)、(d)、(f)、および(g);(c)
)、(e)、(f)、および(g);(d)、(e)、(f)、および(g);(a)、(b)、(c)、(d)、および(e);(a)
)、(b)、(c)、(d)、および(f);(a)、(b)、(c)、(d)、および(g);(a)、(b)、(c)、(e)、お
 よび(f);(a)、(b)、(c)、(e)、および(g);(a)、(b)、(c)、(f)、および(g);(a)、(b)、(d)
)、(e)、および(f);(a)、(b)、(d)、(e)、および(g);(a)、(b)、(d)、(f)、および(g);(a)
)、(b)、(e)、(f)、および(g);(a)、(c)、(d)、(e)、および(f);(a)、(c)、(d)、(e)、お
 よび(g);(a)、(c)、(d)、(f)、および(g);(a)、(c)、(e)、(f)、および(g);(a)、(d)、(e)
 、(f)、および(g);(b)、(c)、(d)、(e)、および(f);(b)、(c)、(d)、(e)、および(g);(b)
 、(c)、(d)、(f)、および(g);(b)、(c)、(e)、(f)、および(g);(b)、(d)、(e)、(f)、お
 よび(g);(c)、(d)、(e)、(f)、および(g);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、および(f);(a)、(b)
 、(c)、(d)、(e)、および(g);(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、および(g);(a)、(b)、(c)、(e)
 、(f)、および(g);(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、および(g);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、お
 よび(g);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、および(g);または(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、
 および(g)に対する免疫応答をインピットロで検出することができる。このリストから(a)~
 (g)の組み合わせを独立して選択することができる。

10

20

30

40

50

【0018】

前記方法は、好ましくは、(i)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片
 ;(ii)TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(iii)Rv1677(SEQ ID NO:
 0:7)または1つもしくは複数のその断片;(iv)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数の
 のその断片;および(v)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片に対する
 免疫応答をインピットロで検出する工程を含む。上記で示した(i)~(v)の定義では、(i)~(
 iv)の1つまたは複数の任意の組み合わせに対する免疫応答をインピットロで検出すること
 ができる。例えば、(i)~(iv)のそれぞれの定義について、(i);(ii);(iii);(iv);(v);(i)お
 よび(ii);(i)および(iii);(i)および(iv);(i)および(v);(ii)および(iii);(ii)および(iv)
);(ii)および(v);(iii)および(iv);(iii)および(v);(iv)および(v);(i)、(ii)、および(i
 ii);(i)、(ii)、および(iv);(i)、(ii)、および(v);(i)、(iii)、および(iv);(i)、(iii)
 、および(v);(i)、(iv)、および(v);(ii)、(iii)、および(iv);(ii)、(iii)、および(v);
 (ii)、(iv)、および(v);(iii)、(iv)、および(v);(i)、(ii)、(iii)、および(iv);(i)、(
 ii)、(iii)、および(v);(i)、(ii)、(iv)、および(v);(i)、(iii)、(iv)、および(v);(ii)
)、(iii)、(iv)、および(v);または(i)、(ii)、(iii)、(iv)、および(v)に対する免疫応
 答をインピットロで検出することができる。このリストから(i)~(v)の組み合わせを独立し
 て選択することができる。

【0019】

前記方法は、(i)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(ii)TBFG_13
 463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(iii)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1
 つもしくは複数のその断片;および(iv)Rv2654c(SEQ ID NO:3)に対する免疫応答をインピ
 トロで検出する工程を含んでもよい。一局面において、前記方法は、Rv0840c(SEQ ID NO:

6)または1つもしくは複数のその断片に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む。

【0020】

断片

Rv0840c(SEQ ID NO:6)、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Rv1677(SEQ ID NO:7)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、またはMtub2_17866(SEQ ID NO:2)の断片は、親配列のN末端および/またはC末端を切断することによって得られた5以上のアミノ酸を含む配列でもよい。例えば、断片は、約5以上、約6以上、約7以上、約8以上、約9以上、約10以上、約11以上、約12以上、約13以上、約14以上、約15以上、約16以上、約17以上、約18以上、約19以上、約20以上、約21以上、約22以上、約23以上、約24以上、約25以上、約26以上、または約27以上のアミノ酸を含んでもよい。断片は、長さが約5～約27、約6～約26、約7～約25、約8～約24、約9～約23、約10～約22、約11～約21、約12～約20、約13～約19、約14～約18、約12～約18、約12～約15、約15～約18、約13～約17、約14～約16、約5～約10、約10～約15、約15～約20、約20～約25、または約10～約20アミノ酸でもよい。

10

【0021】

断片は、親タンパク質から、例えば、タンパク質分解切断によって化学的に得られてもよく、知的な意味では親タンパク質から、例えば、親タンパク質のアミノ酸配列を使用し、この配列に基づいて断片を合成することによって得られてもよい。断片は当技術分野において周知の方法を用いて合成することができる。

20

【0022】

「断片」という用語は、アミノ酸残基がペプチド(-CO-NH-)結合によってつながっている分子だけでなく、ペプチド結合が逆転している分子も含む。このようなレトロインベルソ(retro-inverso)ペプチドミメティックは、当技術分野において公知の方法、例えば、Mezriere et al(1997) J. Immunol.159, 3230-3237に記載の方法を用いて作製することができる。このアプローチは、バックボーンが関与する変化を含むが、側鎖の方向が関与する変化を含まないプソイドペプチドを作製することを伴う。Mezriere et al(1997)は、少なくとも、MHCクラスII細胞応答およびTヘルパー細胞応答にとって、これらのプソイドペプチドは有用であることを示している。CO-NHペプチド結合ではなくNH-CO結合を含むレトロインベルソペプチドはタンパク質分解耐性がかなり高い。

30

【0023】

同様に、アミノ酸残基の炭素原子間の間隔を保持する適切なリンカー部分が用いられるのであれば、ペプチド結合は完全に省かれてもよい。リンカー部分がペプチド結合と実質的に同じ電荷分布を有し、かつ実質的に同じ平面(planarity)を有するのであれば、こうすることが特に好ましい。エキソタンパク質分解(exoproteolytic)消化に対する感受性を小さくするのを助けるために、断片のN末端またはC末端を都合よくブロックできることも理解される。例えば、ペプチドのN末端アミノ基はカルボン酸と反応させることによって保護されてもよく、ペプチドのC末端カルボキシル基はアミンと反応させることによって保護されてもよい。例えば、断片の安定性を高めるために、断片のN末端および/またはC末端に1つまたは複数のさらなるアミノ酸残基も付加することができる。他の改変例にはグリコシル化およびリン酸化が含まれる。別の潜在的な改変は、RまたはKの側鎖アミンにある水素がメチレン基(-NH₂ → -NH(Me)または-N(Me)₂)と交換できることである。

40

【0024】

Rv0840c(SEQ ID NO:6)、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Rv1677(SEQ ID NO:7)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、またはMtub2_17866(SEQ ID NO:2)の断片には、インビボでの断片の半減期を長くする、または短くする断片変種も含まれ得る。本発明による断片の半減期を長くすることができる変種の例には、断片のペプチド類似体、断片のD-アミノ酸誘導体、およびペプチド-ペプチドハイブリッドが含まれる。断片はまた断片のD-アミノ酸型も含んでよい。L-アミノ酸ではなくD-アミノ酸を用いてポリペプチドを調製すると、正常代謝プロセスによる、このような薬剤の望まれない

50

分解が大幅に減少し、それによって、投与するのに必要な薬剤の量と、薬剤を投与する頻度が減少する。D-アミノ酸型の親タンパク質も用いられてもよい。

【0025】

本発明によって提供される断片は、親タンパク質鎖をコードする一次転写物の選択的スプライシングによって生じたmRNAによってコードされる、親タンパク質のスプライスバリエーションに由来してもよい。断片はまた、少なくとも、親タンパク質のMHC結合特性または抗体結合特性を保持している、親タンパク質のアミノ酸変異体、グリコシル化変種、および他の共有結合誘導体にも由来してもよい。例示的な誘導体には、本発明の断片が、置換、化学的手段、酵素的手段、または天然アミノ酸以外の部分を用いた他の適切な手段によって共有結合により改変された分子が含まれる。

10

【0026】

前記方法は、Rv0840c(SEQ ID NO:6)、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Rv1677(SEQ ID NO:7)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、またはMtub2_17866(SEQ ID NO:2)の1種または複数種の断片に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含んでもよい。例えば、前記方法は、Rv0840c(SEQ ID NO:6)、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Rv1677(SEQ ID NO:7)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、またはMtub2_17866(SEQ ID NO:2)の2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、19以上、20以上、25以上、または30以上の断片に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含んでもよい。前記方法が、特定のタンパク質に由来する2つ以上の断片に対する免疫応答を検出する工程を含むのであれば、そのタンパク質に由来する断片は全て同じでもよい。または、そのタンパク質に由来する断片の一部または全てが異なってもよい。例えば、前記方法が、Rv0840c(SEQ ID NO:6)に由来する3つの断片に対する免疫応答を検出する工程を含むのであれば、3つの断片は、(i)3つの同じ断片;(ii)2つの同じ断片および1つの異なる断片;または(iii)3つの異なる断片でもよい。

20

【0027】

一部の局面において、本発明の方法は、断片の1つまたは複数のプールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む。断片のプールは下記で詳細に説明する。

【0028】

試料

30

前記で定義した(a)~(g)の1つまたは複数に対する免疫応答のインビトロ検出は、対象から得られた試料を用いて行われる。試料は、体液、例えば、血液、血漿、血清、痰もしくは他の呼吸分泌物、唾液、尿、または脳脊髄液でもよい。試料は、好ましくは、血液、血漿、血清、または痰もしくは他の呼吸分泌物である。または、試料は生検材料または吸引液などの組織試料でもよい。例えば、試料はリンパ節吸引液でもよく、肉芽腫などの結核病変部の中または周囲から採取した試料でもよい。別の局面において、試料は体液または組織試料、例えば、細胞溶解産物にも由来してもよい。

【0029】

対象

40

本発明の方法は、任意の適切な対象において結核菌群感染を診断するのに使用することができる。対象は概してヒト対象である。または、対象は、作製された別の動物または哺乳動物、例えば、商業的に飼育されている動物、例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、もしくはブタ、実験動物、例えば、マウスもしくはラット、ペット動物、例えば、ネコ、イヌ、ウサギ、もしくはモルモット、または別の動物、例えば、鳥類もしくは霊長類でもよい。

【0030】

免疫応答

インビトロで検出される免疫応答は、(a)~(g)の1つまたは複数によって誘発される任意の応答でよい。免疫応答は任意のタイプの免疫細胞によって媒介されてもよい。例えば、免疫応答は、T細胞、B細胞、樹状細胞、好中球、好塩基球、マスト細胞、好酸球、自然リンパ球系細胞(ILC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、マクロファージ、および/また

50

は胸腺細胞によって媒介されてもよい。免疫応答は好ましくはT細胞応答である。T細胞応答は、好ましくはサイトカイン分泌、より好ましくはIFN-ガンマ(IFN γ)分泌である。T細胞応答はT細胞増殖でもよい。または、免疫応答はB細胞応答でもよい。B細胞応答はB細胞増殖でもよく、抗体の産生または分泌でもよい。免疫応答は、好ましくは、前記で定義した(a)~(g)の1つまたは複数に対する抗体の産生である。T細胞増殖、B細胞増殖、サイトカイン分泌、および抗体の分泌または産生を測定する方法は当技術分野において周知である。

【0031】

免疫応答はインビトロで起こってもよい。好ましくは、免疫応答はインビトロ細胞性免疫(CMI)応答である。下記でさらに詳細に説明するように、CMI応答は、抗体を伴わない免疫応答である。代わりに、CMI応答は、抗原に应答した、食細胞の活性化、細胞傷害性T細胞の活性化、様々なサイトカインの産生および/または様々なサイトカインの放出の増加を伴ってもよい。CMI応答をインビトロで検出するための方法は当技術分野において公知であり、下記でさらに詳細に説明する。

10

【0032】

または、免疫応答はインビボで起こってもよい。例えば、前記で定義した(a)~(g)の1つまたは複数に対する抗体はインビボで産生されるが、本発明の方法を用いてインビトロで検出されてもよい。例えば、抗体は対象において産生され、血液試料などの試料中で、対象から取り出されてもよい。次いで、例えば、酵素結合免疫測定法(ELISA)によって、抗体の存在を検出するために、および/または抗体を定量するために、試料(および抗体)を前記で定義した(a)~(g)の1つまたは複数と接触させてもよい。ELISAは下記の実施例1~3においてさらに詳細に説明する。インビボでのT細胞増殖およびB細胞増殖はまたインビトロで測定されてもよい。例えば、対象に由来する血液試料を(a)~(g)の1つまたは複数と接触させ、抗原特異的なT細胞および/またはB細胞の罹患率(prevalence)が測定されてもよい。

20

【0033】

本発明の方法によって、免疫応答の存在または非存在が検出される可能性がある。前記で定義した(a)~(g)の1つまたは複数に対する免疫応答の存在は、対象が結核菌に感染していることを示している可能性がある。前記で定義した(a)~(g)の1つまたは複数に対する免疫応答の非存在は、対象が結核菌に感染していないことを示している可能性がある。前記で定義した(a)~(g)の2つ以上に対する免疫応答を検出する工程を伴う方法において、(a)~(g)の1つまたは複数に対する免疫応答の存在は、下記でさらに詳細に議論するように感染を示している可能性がある。

30

【0034】

CMI 応答 アッセイ

個体の免疫状態を明らかにするために一般的には細胞性免疫(CMI)応答が用いられる。典型的に、臨床免疫学の分野においてCMI応答という用語は、インビボでの皮膚検査、リンパ球増殖アッセイ、および特異的抗原の存在下で末梢血単核球(PBMC)が産生したサイトカインのインビトロ検出を包含する。本発明の方法は、インビトロ細胞性免疫応答を検出する工程を含んでもよい。特に、本発明のタンパク質およびペプチドに対する、インビトロでのサイトカインに基づくCMI応答が検出されてもよい。このアッセイを下記では「CMIアッセイ」と呼ぶ。

40

【0035】

免疫系の細胞は、抗原で刺激された後にサイトカインなどの免疫エフェクター分子を産生することができる。CMIアッセイは、個体が、選択された抗原に対する細胞性免疫応答を生じる能力を指し示すために、細胞試料を抗原とインキュベートし、サイトカインなどの免疫エフェクター分子の存在(もしくは非存在)または量を測定することを伴う。CMIアッセイにおいて使用するための細胞には、リンパ球(特にT細胞)および抗原提示細胞(APC)の単離された集団が含まれる。APCは、それぞれのT細胞の表面にあるT細胞受容体が抗原を認識できるように抗原を処理することに関与する。抗原認識によってサイトカイン産生

50

が誘導されることがある。サイトカイン産生細胞はフローサイトメトリーによって特定することができる。フローサイトメトリーを用いて、サイトカイン産生細胞の頻度および/またはこの細胞によるサイトカイン産生の量を定量することができる。抗原によって誘導されるサイトカインはアッセイ培地に放出され、例えば、ELISA法によって直接検出されてもよく、酵素結合免疫スポットアッセイ(ELISPOT)を用いてサイトカイン分泌T細胞の頻度の点から定量されてもよい。本発明の方法は好ましくはELISPOTを含む。

【0036】

酵素結合免疫スポットアッセイ(ELISPOT)はフィルターイムノブランクアッセイ(filter immunoplaque assay)とも知られ、当初は、抗体分泌B細胞を一つ一つ検出および定量するために開発された。この技法が開発された時、従来のブランク形成細胞アッセイの代わりとなる迅速な、かつ汎用性のある技法となった。最近の改良により、1秒あたり100個と少ない特定のタンパク質分子を産生する細胞を検出できるようにELISPOTの感度が改善した。これにより、ELISPOTアッセイは従来のELISAアッセイよりかなり感度が高くなった。ELISPOTアッセイは、タンパク質分泌細胞のすぐ近くを取り囲んでいる環境において、比較的高い濃度の、ある特定のタンパク質性細胞産物(例えば、サイトカイン)を利用する。これらの細胞産物は高親和性抗体を用いて捕獲および検出される。ELISPOTアッセイは、Current Protocols in Immunology, Unit 6.19 pages 6.19. 1-8において概説される。

【0037】

ELISPOTアッセイは、典型的には、6つの工程:(1)膜がついているマイクロタイタープレートに、精製されたサイトカイン特異的抗体をコーティングする工程;(2)他のタンパク質の非特異的吸収を阻止するためにプレートをブロッキングする工程;(3)サイトカイン分泌細胞を適切な試薬とインキュベートする工程;(4)細胞および試薬を除去する工程;(5)標識された第2の抗サイトカイン抗体を添加する工程;ならびに(6)膜の表面にある抗体-サイトカイン複合体を検出する工程を伴う。

【0038】

本発明の方法は、好ましくは、T-SPOT TBアッセイ(Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom)を含む。T-SPOT TBアッセイは、ELISPOTアッセイ法の簡略化した変形である。T-SPOT TBアッセイは、結核菌に特異的な抗原による刺激に応答したエフェクターT細胞を検出するように設計されている。このアッセイは、活性化TB特異的T細胞を一つ一つ数え上げる。このアッセイは、年齢、性別、人種、療法、または免疫状態に関係なく、潜伏TB感染(LTBI)のリスクがある患者またはTB疾患があると疑われる患者全員と使用するのに適している。検査の感度を最適化するために、よく特徴付けられたRD1タンパク質ESAT-6およびCFP10をまねる2つの別々の抗原パネルが用いられる。

【0039】

結核菌タンパク質

一部の局面において、本発明の方法は、1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質を検出する工程をさらに含む。1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質は任意の結核菌タンパク質でよい。非常に多くの結核菌タンパク質が当技術分野において周知である。1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質はRD1タンパク質を含んでもよい。RD1タンパク質はCFP-10およびESAT-6の一方または両方を含んでもよい。

【0040】

断片のプール

本発明の方法は、断片の1つまたは複数のプールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含んでもよく、各プールは、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、Rv0840c(SEQ ID NO:6)、またはRv1677(SEQ ID NO:7)に由来する2つ以上の断片を含む。例えば、各プールは、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、Rv0840c(SEQ ID NO:6)、またはRv1677(SEQ ID NO:7)に由来する3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、15以上、20以上、25以上、50以上、75以上、100以上、200以上、または250以上の断片を含

んでもよい。

【0041】

前記方法は、1つまたは複数の、2以上の、3以上の、4以上の、5以上の、6以上の、7以上の、8以上の、9以上の、10以上の、11以上の、12以上の、13以上の、または14以上の、前記で定義した断片のプールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含んでもよい。前記方法が、2つ以上の断片プールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む場合、各プールは、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、Rv0840c(SEQ ID NO:6)、およびRv1677(SEQ ID NO:7)より選択される同じタンパク質または異なるタンパク質に由来する断片を含んでもよい。前記方法が、3以上の断片プールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む場合、各プールは、異なるタンパク質に由来する断片を含んでもよい。または、プールの一部または全ては、同じタンパク質に由来する断片を含んでもよい。例えば、前記方法が、3つの断片プールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含むのであれば、全てのプールが同じタンパク質に由来する断片を含んでもよい。または、プールのうち2つが同じタンパク質に由来する断片を含んでもよく、3番目のプールが異なるタンパク質に由来する断片を含んでもよい。または、3つのプールはそれぞれ、異なるタンパク質に由来する断片を含んでもよい。2つ以上のプールのうちどのプールも同じタンパク質に由来するのであれば、これらのプールは同じ断片または異なる断片を含んでもよい。

10

【0042】

下記に示したように、前記方法はまた、1つもしくは複数のタンパク質断片ライブラリーおよび/または1つもしくは複数のエピトーププールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程も含んでよい。前記方法が、1つまたは複数のタンパク質断片ライブラリーおよび1つまたは複数のエピトーププールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む場合、タンパク質断片ライブラリーに含まれる断片は、エピトーププールに含まれる断片と同じタンパク質に由来してもよく、2つ以上の異なるタンパク質に由来してもよい。

20

【0043】

タンパク質断片ライブラリー

本発明の一面において、プールの中の断片はタンパク質断片ライブラリーを形成する。タンパク質断片ライブラリーは、合わせて親タンパク質の配列の少なくとも10%、例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、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95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%を含む、親タンパク質(本発明の場合、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、Rv0840c(SEQ ID NO:6)、またはRv1677(SEQ ID NO:7))に由来する複数の断片を含む。本発明において、プールの中の断片は、好ましくは、断片が由来するタンパク質の配列の少なくとも80%をカバーするタンパク質断片ライブラリーを形成する。より好ましくは、プールの中の断片は、断片が由来するタンパク質の配列全体をカバーするタンパク質断片ライブラリーを形成する。

30

40

【0044】

タンパク質断片ライブラリーは、CD4+T細胞および/またはCD8+T細胞を刺激することができる断片を含んでもよい。好ましくは、タンパク質断片ライブラリーは、CD4+T細胞およびCD8+T細胞を両方とも刺激することができる断片を含む。CD4+T細胞およびCD8+T細胞の刺激に最適な断片サイズが異なることは当技術分野において公知である。約9アミノ酸(9mer)からなる断片は典型的にはCD8+T細胞しか刺激せず、約20アミノ酸(20mer)からなる断片は典型的にはCD4+T細胞しか刺激しない。大ざっぱに言うと、これは、CD8+T細胞が抗原を配列に基づいて認識する傾向があるのに対して、CD4+T細胞は抗原を高次構造に基づいて認識する傾向があるからである。しかしながら、約15アミノ酸(15mer)からなる断片はCD4+T細胞およびCD8+T細胞を両方とも刺激する可能性がある。従って、タンパク質断片

50

ライブラリーは、好ましくは、長さが約15アミノ酸、例えば、約12アミノ酸、約13アミノ酸、約14アミノ酸、約15アミノ酸、約16アミノ酸、約17アミノ酸、または約18アミノ酸の断片を含む。

【0045】

プールの中の断片は全て同じ長さでもよい。または、プールは異なる長さの断片を含んでもよい。断片の長さは上記で議論した。

【0046】

タンパク質断片ライブラリーは、配列が重複する断片を含んでもよい。従って、各プールは、配列が重複する断片を含んでもよい。前記配列は、1つまたは複数のアミノ酸分だけ、例えば、2アミノ酸以上、3アミノ酸以上、4アミノ酸以上、5アミノ酸以上、6アミノ酸以上、7アミノ酸以上、8アミノ酸以上、9アミノ酸以上、10アミノ酸以上、11アミノ酸以上、12アミノ酸以上、13アミノ酸以上、14アミノ酸以上、15アミノ酸以上、16アミノ酸以上、17アミノ酸以上、18アミノ酸以上、19アミノ酸以上、または20アミノ酸以上重複してもよい。好ましくは、前記配列は、9アミノ酸以上、例えば、10アミノ酸以上、11アミノ酸以上、または12アミノ酸以上重複する。なぜなら、これにより、CD8+T細胞を刺激することができる9merを含む断片の数が最大になるからである。より好ましくは、前記配列は11アミノ酸重複する。プールの中の重複断片は全て、同じ数のアミノ酸分だけ重複してもよい。または、プールは、異なる数のアミノ酸分だけ配列が重複する断片を含んでもよい。

10

【0047】

タンパク質断片ライブラリーは、9~12(例えば、9~11または10~12)アミノ酸分だけ重複する、長さが12~18(例えば、12~15、15~18、13~17、または14~16)アミノ酸の断片を含んでもよい。例えば、タンパク質断片ライブラリーは、(i)9アミノ酸、10アミノ酸、もしくは11アミノ酸分だけ重複する、長さが14アミノ酸の断片、(ii)9アミノ酸、10アミノ酸、もしくは11アミノ酸分だけ重複する、長さが15アミノ酸の断片、または(iii)9アミノ酸、10アミノ酸、もしくは11アミノ酸分だけ重複する、長さが16アミノ酸の断片を含んでもよい。タンパク質断片ライブラリーは、好ましくは、11アミノ酸分だけ重複する、長さが15アミノ酸の断片を含む。

20

【0048】

断片の大きな特性は上記で説明した。

30

【0049】

エピトーププール

エピトープは、免疫系によって認識される抗原部分である。具体的には、エピトープは、抗体、B細胞、またはT細胞によって認識される抗原部分である。従って、T細胞エピトープは、T細胞によって認識される抗原部分である。T細胞はT細胞受容体(TCR)を介して抗原を認識するので、T細胞エピトープは、T細胞受容体に結合する(すなわち、T細胞受容体によって認識される)抗原部分でもよい。同様に、B細胞エピトープは、B細胞によって認識される抗原部分である。B細胞はB細胞受容体(BCR)を介して抗原を認識するので、B細胞エピトープは、T細胞受容体に結合する(すなわち、T細胞受容体によって認識される)抗原部分でもよい。

40

【0050】

B細胞エピトープおよびT細胞エピトープは、それぞれ、BCRまたはTCRによる認識について、天然タンパク質全体および断片化された天然タンパク質を検査することによって特定されてもよく、組換え抗原性タンパク質を検査することによって特定されてもよい。B細胞エピトープおよびT細胞エピトープはまた、インシリコ法、例えば、本実施例にあるインシリコ法を用いて特定されてもよい。インシリコエピトープ特定の結果は、抗原性について、エピトープ配列を有するペプチドを検査することによって確かめることができる。抗原性を検査するための方法は当技術分野において周知である。例えば、エピトープに対する抗体が存在するかどうか、対象に由来する血液試料をELISAによってスクリーニングすることができる。

50

【0051】

本発明の一局面において、プールの中の断片の1つまたは複数は、断片が由来するタンパク質のT細胞エピトープまたはB細胞エピトープを含む。これは「エピトーププール」を生じる。断片の1つまたは複数はT細胞エピトープおよびB細胞エピトープを含んでもよい。同様に、断片の1つまたは複数は、1つまたは複数(例えば、2つ、3つ、もしくは4つ)のT細胞エピトープおよび/または1つまたは複数(例えば、2つ、3つ、もしくは4つ)のB細胞エピトープを含んでもよい。断片が複数のT細胞エピトープまたはB細胞エピトープを含むのであれば、これらのエピトープは同じでもよく異なってもよい。T細胞エピトープはCD4+T細胞エピトープでもよくCD8+T細胞エピトープでもよい。または、T細胞エピトープはCD4+T細胞およびCD8+T細胞両方のエピトープでもよい。表4は、本発明の例示的なCD4+T細胞エピトープを列挙する。表5は、本発明の例示的なCD8+T細胞エピトープを列挙する。表6は、本発明の例示的なB細胞エピトープを列挙する。プールの中の1つまたは複数の断片は、これらのエピトープのうちの任意のものを含んでもよい。プールの中の1つまたは複数の断片は、これらのエピトープのうちの任意の数および組み合わせを含んでもよい。

10

【0052】

断片の大まかな特性は上記で説明した。さらに、およびタンパク質断片ライブラリーを形成する断片に関連して上記で示したように、T細胞エピトープまたはB細胞エピトープを含む断片は、長さが約12アミノ酸、約13アミノ酸、約14アミノ酸、約15アミノ酸、約16アミノ酸、約17アミノ酸、または約18アミノ酸でもよい。断片は長さが好ましくは約15アミノ酸である。または、断片は、長さが少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも11アミノ酸、少なくとも12アミノ酸、少なくとも13アミノ酸、少なくとも14アミノ酸、少なくとも15アミノ酸、少なくとも16アミノ酸、少なくとも17アミノ酸、少なくとも18アミノ酸、少なくとも19アミノ酸、少なくとも20アミノ酸、少なくとも21アミノ酸、少なくとも22アミノ酸、少なくとも23アミノ酸、少なくとも24アミノ酸、または少なくとも25アミノ酸でもよい。プールの中の断片は全て同じ長さでもよく、プールは異なる長さの断片を含んでもよい。

20

【0053】

T細胞エピトープまたはB細胞エピトープを含む断片は重複配列を有してもよい。すなわち、各プールは、配列が重複する断片を含んでもよい。前記配列は、少なくとも1アミノ酸、例えば、少なくとも2アミノ酸、少なくとも3アミノ酸、少なくとも4アミノ酸、少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも11アミノ酸、少なくとも12アミノ酸、少なくとも13アミノ酸、少なくとも14アミノ酸、少なくとも15アミノ酸、少なくとも16アミノ酸、少なくとも17アミノ酸、少なくとも18アミノ酸、少なくとも19アミノ酸、または少なくとも20アミノ酸重複してもよい。好ましくは、前記配列は、9アミノ酸以上、例えば、10アミノ酸以上、11アミノ酸以上、または12アミノ酸以上重複する。最も好ましくは、前記配列は11アミノ酸重複する。プールの中の重複断片は全て同じ数のアミノ酸分だけ重複してもよい。または、プールは、異なる数のアミノ酸分だけ配列が重複する断片を含んでもよい。

30

【0054】

T細胞エピトープまたはB細胞エピトープを含む断片は、長さが12~18(例えば、12~15、15~18、13~17、もしくは14~16)アミノ酸でもよい、および/または9~12(例えば、9~11もしくは10~12)アミノ酸重複してもよい。例えば、前記断片は、(i)長さが14アミノ酸であり、9アミノ酸、10アミノ酸、または11アミノ酸重複してもよく、(ii)長さが15アミノ酸であり、9アミノ酸、10アミノ酸、または11アミノ酸重複してもよく、(iii)長さが16アミノ酸であり、9アミノ酸、10アミノ酸、または11アミノ酸重複してもよい。場合によっては、前記断片は好ましくは長さが15アミノ酸であり、11アミノ酸重複する。

40

【0055】

細胞

一局面において、本発明の方法は、対象から得られた免疫細胞集団を、前記で定義した

50

(a) ~ (g)の1つまたは複数と接触させる工程を含む。(a) ~ (g)の1つまたは複数、上記で議論した1つもしくは複数のタンパク質断片ライブラリーおよび/または1つもしくは複数のエピトーププールを構成してもよい。

【0056】

(a) ~ (g)の1つまたは複数に対する免疫応答を生じさせるために、前記集団を、典型的には、十分な量の(a) ~ (g)の1つまたは複数と接触させる。前記集団を、任意の量の(a) ~ (g)の1つまたは複数、例えば、約1ng/ml、約5ng/ml、約10ng/ml、約50ng/ml、約100ng/ml、約500ng/ml、約1 μ g/ml、約5 μ g/ml、約10 μ g/ml、約50 μ g/ml、約100 μ g/ml、約500 μ g/ml、1mg/ml、約5mg/ml、約10mg/ml、約50mg/ml、約100mg/ml、または約500mg/mlの(a) ~ (g)の1つまたは複数と接触させてもよい。

10

【0057】

免疫細胞集団は、T細胞、B細胞、樹状細胞、好中球、好塩基球、マスト細胞、好酸球、自然リンパ球系細胞(ILC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、マクロファージ、および胸腺細胞より選択される1つまたは複数のタイプの免疫細胞を含んでもよい。前記集団は、これらのタイプの免疫細胞の全てを含んでもよい。一局面において、免疫細胞集団はT細胞を含む。好ましくは、免疫細胞集団は、T細胞および抗原提示細胞、例えば、B細胞、樹状細胞、またはマクロファージを含む。別の局面において、免疫細胞集団はB細胞を含む。

【0058】

免疫細胞集団を、前記で定義した1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質とさらに接触させてもよい。前記集団を、1種または複数種の結核菌タンパク質に対する免疫応答を生じるのに十分な1種または複数種の結核菌タンパク質と接触させてもよい。例えば、前記集団を、約1ng/ml、約5ng/ml、約10ng/ml、約50ng/ml、約100ng/ml、約500ng/ml、約1 μ g/ml、約5 μ g/ml、約10 μ g/ml、約50 μ g/ml、約100 μ g/ml、約500 μ g/ml、1mg/ml、約5mg/ml、約10mg/ml、約50mg/ml、約100mg/ml、または約500mg/mlの1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質と接触させてもよい。例えば、免疫細胞集団を2種以上のさらなる結核菌タンパク質とさらに接触させてもよい。前記集団を2種以上のさらなる結核菌タンパク質と接触させる場合、2種以上のさらなる結核菌タンパク質に同時に、または連続して接触させてもよい。さらに、前記集団を、(a) ~ (g)の1つもしくは複数または2つ以上、および1種もしくは複数種の結核菌タンパク質または2種以上の結核菌タンパク質に同時に、または連続して接触させてもよい。前記集団を同じ量または異なる量の2種以上のさらなる結核菌タンパク質と接触させてもよい。結核菌タンパク質の量は上記で議論した。

20

30

【0059】

別の局面において、本発明の方法は、前記で定義した(a) ~ (g)の2つ以上に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む。この場合、同じ免疫細胞集団を(a) ~ (g)の2つ以上と接触させる。(a) ~ (g)の2つ以上は、上記で議論した、1つもしくは複数のタンパク質断片ライブラリーおよび/または1つもしくは複数のエピトーププールを構成してもよい。前記集団を(a) ~ (g)の2つ以上に同時に、または連続して接触させてもよい。前記集団を同じ量または異なる量の(a) ~ (g)の2つ以上と接触させてもよい。(a) ~ (g)の量は上記で議論した。

40

【0060】

この局面において、免疫細胞集団を、前記で定義した1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質とさらに接触させてもよい。例えば、免疫細胞集団を2種以上のさらなる結核菌タンパク質とさらに接触させてもよい。前記集団を2種以上のさらなる結核菌タンパク質と接触させる場合、2種以上のさらなる結核菌タンパク質に同時に、または連続して接触させてもよい。さらに、前記集団を、(a) ~ (g)の1つもしくは複数または2つ以上、および1種もしくは複数種の結核菌タンパク質または2種以上の結核菌タンパク質に同時に、または連続して接触させてもよい。前記集団を同じ量または異なる量の2種以上のさらなる結核菌タンパク質と接触させてもよい。結核菌タンパク質の量は上記で議論した。

50

【0061】

さらなる局面において、本発明の方法は、前記で定義した(a)～(g)の2つ以上に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む。(a)～(g)の2つ以上をそれぞれ、異なる免疫細胞集団と接触させる。(a)～(g)の2つ以上は、上記で議論した1つもしくは複数のタンパク質断片ライブラリーおよび/または1つもしくは複数のエピトーププールを構成してもよい。それぞれの免疫細胞集団は同じタイプの免疫細胞を含んでもよい。または、それぞれの免疫細胞集団は異なるタイプの免疫細胞を含んでもよい。例示的な免疫細胞は上記で詳述した。さらに、(a)～(g)の2つ以上を異なる免疫細胞集団に同時に、または連続して接触させてもよい。それぞれの異なる集団を同じ量または異なる量の(a)～(g)の2つ以上と接触させてもよい。(a)～(g)の量は上記で議論した。

10

【0062】

このさらなる局面において、前記方法は、前記で定義した1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質に対する免疫応答をインビトロで検出する工程をさらに含んでもよい。さらなる結核菌タンパク質をそれぞれ、異なる免疫細胞集団と接触させる。例えば、2種以上のさらなる結核菌タンパク質をそれぞれ、異なる免疫細胞集団と接触させてもよい。それぞれの免疫細胞集団は同じタイプの免疫細胞を含んでもよい。または、それぞれの免疫細胞集団は異なるタイプの免疫細胞を含んでもよい。例示的な免疫細胞は上記で詳述した。さらに、2種以上のさらなる結核菌タンパク質を異なる免疫細胞集団に同時に、または連続して接触させてもよい。それぞれの異なる集団を、同じ量または異なる量の2種以上のさらなる結核菌タンパク質と接触させてもよい。結核菌タンパク質の量は上記で議論した。

20

【0063】

接触は任意の適切な体積で行うことができる。試料の代表的な体積は、約10 μ l～約1ml、好ましくは約50 μ l～約500 μ l、より好ましくは約100 μ l～約200 μ lである。典型的には、細胞を(a)～(g)の1つまたは複数(任意で、1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質)と接触させる時間の長さは、約5分～約50時間、例えば、約10分～約40時間、約20分～約30時間、約30分～約20時間、約45分～約12時間、約1時間～約6時間、好ましくは、約10分～約2時間である。前記細胞を抗原と一晚接触させてもよい。

【0064】

前記細胞は任意の適切な温度で抗原と接触させることができる。適切な温度は、典型的には、細胞が得られたヒトまたは動物の正常体温と同じ範囲である。典型的には、インキュベーションは約4℃～約38℃、好ましくは約20℃～約38℃のある決まった温度、より好ましくは約37℃で行われる。

30

【0065】

前記細胞は典型的にはウェルに存在する。前記細胞は、好ましくは、平らなプレートのウェルに存在する。平らなプレートは、好ましくは、膜がついているプレートである。前記細胞は、より好ましくは、標準的な96ウェルプレートまたは384ウェルプレートのウェルに存在する。このようなプレートは、市販のFisher scientific、VWR供給業者、Nunc、Starstedt、またはFalconである。ウェルの容積は、典型的には、約25 μ l～約250 μ l、約30 μ l～約200 μ l、約40 μ l～約150 μ l、または約50～100 μ lである。対象から得られた細胞を培養した後に、前記方法において使用することができる。これにより、アッセイされている各試料中に、等しい数の付着細胞が存在することが可能になる。または、細胞が固定化または捕獲されれば、新鮮な血球などの細胞をプレーティング前に計数することができる。細胞を捕獲するための技法は当業者に周知である。前記細胞は、典型的には、37℃、5%CO₂の標準的な条件下で、血清が加えられた培地中で培養される。

40

【0066】

前記細胞は任意の適切なフラスコまたは容器の中で培養し、次いで、ウェルに移すことができる。前記細胞は典型的にはウェルの中で培養される。前記細胞は、好ましくは、2つ以上のウェルを備える平らなプレート、例えば、標準的な96ウェルプレートまたは384ウェルプレートの中で培養される。前記細胞をマーカーと共にインキュベートする工程は

50

、典型的には、それぞれのウェルの中にある培養培地を、マーカーを含む適切な溶液と交換する工程を伴う。適切な溶液は当業者に周知である。

【0067】

結果の解釈

上記で示したように、本発明の方法は、1種または複数種の結核菌抗原に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む。免疫応答が検出されることは、対象が結核菌群感染を有することを示している。免疫応答が検出されない(すなわち、免疫応答の検出が存在しない)ことは、対象が結核菌群感染を有さないことを示している。従って、本発明の方法は、好ましくは、1種または複数種の結核菌抗原に対する免疫応答の存在または非存在をインビトロで検出する工程を含む。

10

【0068】

言い換えると、1種または複数種の結核菌抗原に対する免疫応答が検出される、すなわち存在することは、対象が結核菌群感染を有することを示している。1種または複数種の結核菌抗原に対する免疫応答が検出されない、すなわち存在しないことは、対象が結核菌群感染を有さないことを示している

【0069】

陽性検査結果(すなわち、対象における結核菌群感染の存在)を確かめるために様々な判断基準が適用されることがある。第一に、前記で定義した(a)~(g)のいずれか1つまたは複数に対する免疫応答が検出されれば、陽性検査結果が得られる。第二に、前記で定義した(a)~(g)のいずれか1つまたは複数に対する免疫応答が検出され、前記で定義したさらなる結核菌抗原のいずれか1つまたは複数に対する免疫応答が検出されれば、陽性検査結果が得られる。(a)~(g)の1つまたは複数に対する免疫応答と、該当する場合には、1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質に対する免疫応答は、上記で議論されたように、同じ細胞集団において検出されてもよく異なる細胞集団において検出されてもよい(同じ細胞集団において検出されなくてもよく異なる細胞集団において検出されなくてもよい)。

20

【0070】

好ましい態様において、本発明は、対象が結核菌(*M. tuberculosis*)群感染を有するかどうか確かめるための方法であって、(a)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(b)TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(c)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1つもしくは複数のその断片;(d)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片;(e)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数のその断片;(f)Rv1495(SEQ ID NO:5)または1つもしくは複数のその断片;および(g)Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)または1つもしくは複数のその断片の1つまたは複数に対する免疫応答の存在または非存在をインビトロで検出する工程を含み、免疫応答の存在が、対象が結核菌(*M. tuberculosis*)群感染を有することを示し、免疫応答の非存在が、対象が結核菌(*M. tuberculosis*)群感染を有さないことを示す、方法を提供する。

30

【0071】

キット

本発明はまた、容器に入れられてキットの形で包装される、本発明の治療における使用に適した本明細書に記載の成分の組み合わせに関する。

40

【0072】

具体的には、本発明は、(a)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(b)TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(c)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1つもしくは複数のその断片;(d)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片;(e)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数のその断片;(f)Rv1495(SEQ ID NO:5)または1つもしくは複数のその断片;および(g)Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)または1つもしくは複数のその断片の1つまたは複数を含む、対象において結核菌(*M. tuberculosis*)群感染を診断するためのキットを提供する。好ましくは、キットは、タンパク質断片ライブラリーまたはエピトーププールに関して前記で定義したように1つまたは複数の断片を含

50

む。

【0073】

キットは、免疫応答を検出するための手段をさらに備えてもよい。例えば、キットは、ELISAまたはELISPOTを行うための必要な機器または試薬の一部または全てを備えてもよい。特に、キットは、1つまたは複数の標準的な96ウェルまたは384ウェルの平底プレートまたは膜がついているプレートを備えてもよい。キットは、関係のあるプレートをコーティングするための、および/または非特異的な吸収を阻止するためにプレートをブロッキングするための必要な試薬の1つまたは複数を用意してもよい。キットは、サイトカインまたは他の免疫産物を検出するための抗体または標識抗体を備えてもよい。キットは、標識抗体を検出するための1種または複数種の検出試薬を備えてもよい。

10

【0074】

医用薬剤、方法、および治療上の使用

本発明は、対象における結核菌群感染の治療または予防において使用するための、前記で定義した(a)~(g)の1つまたは複数を含む組成物を提供する。さらに、本発明は、前記で定義した(a)~(g)の1つまたは複数を対象に投与する工程を含む、対象において結核菌群感染を治療または予防する方法を提供する。

【0075】

結核菌群感染は活動性感染でもよく潜伏感染でもよい。

【0076】

適切な組成物の処方標準的な製剤化学および方法を用いて行うことができる。標準的な製剤化学および方法は全て当業者が容易に利用することができる。

20

【0077】

例えば、(a)~(g)の1つまたは複数は1種または複数種の薬学的に許容される賦形剤またはビヒクルと組み合わせることができる。賦形剤またはビヒクル中には補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などが存在してもよい。これらの賦形剤、ビヒクル、および補助物質は、概して、前記組成物が与えられた個体において免疫応答を誘導せず、過度の毒性なく投与され得る薬物である。薬学的に許容される賦形剤には、液体、例えば、水、食塩水、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、グリセロール、チオグリセロール、およびエタノールが含まれるが、これに限定されない。薬学的に許容される賦形剤の中には、薬学的に許容される塩、例えば、鉱酸塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩など;および有機酸塩、例えば、酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩なども含めることができる。薬学的に許容される賦形剤、ビヒクル、および補助物質の徹底的な議論が、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)において入手できる。

30

【0078】

このような組成物は、ボーラス投与または連続投与に適した形で調製されてもよく、包装されてもよく、販売されてもよい。注射用組成物は、単位剤形で、例えば、アンプル、または防腐剤を含有するマルチドーズ容器に入れられて調製されてもよく、包装されてもよく、販売されてもよい。組成物には、懸濁液、溶液、油性ビヒクルまたは水性ビヒクルに溶解したエマルジョン、ペースト、および移植可能な持続放出または生分解性の製剤が含まれるが、これに限定されない。このような組成物は、懸濁剤、安定化剤、または分散剤を含むが、これに限定されない1種または複数種のさらなる成分をさらに含んでもよい。非経口投与用組成物の一態様において、活性成分は、適切なビヒクル(例えば、滅菌した、発熱物質のない水)を用いて再構成した後に、再構成された組成物を非経口投与するために乾燥した形(例えば、粉末または顆粒の場合)で提供される。前記組成物は、滅菌した注射用の水性または油性の懸濁液または溶液の形で調製されてもよく、包装されてもよく、販売されてもよい。この懸濁液または溶液は公知の技術に従って処方することができ、活性成分に加えて、本明細書に記載のさらなる成分、例えば、分散剤、湿潤剤、または懸濁剤を含んでもよい。このような滅菌注射用製剤は、例えば、水または1,3-ブタンジオールなどの無毒の非経口的に許容される希釈剤または溶媒を用いて調製されてもよい。他

40

50

の許容される希釈剤および溶媒には、リンガー溶液、等張性塩化ナトリウム溶液、および不揮発性油、例えば、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドが含まれるが、これに限定されない。

【0079】

有用な他の非経口投与可能な組成物には、微結晶の形をした活性成分を含むか、リボソーム調製物の中に活性成分を含むか、または生分解性ポリマー系の成分として活性成分を含む組成物が含まれる。持続放出用または移植用の組成物は、薬学的に許容されるポリマー材料または疎水性材料、例えば、エマルジョン、イオン交換樹脂、やや溶けにくいポリマー、またはやや溶けにくい塩を含んでもよい。

【0080】

または、(a)～(g)の1つまたは複数はカプセルに入れられてもよく、粒子担体に吸着されてもよく、粒子担体と結合されてもよい。適切な粒子担体には、ポリメチルメタクリレートポリマーに由来する粒子担体、ならびにポリ(ラクチド)およびポリ(ラクチド-co-グリコリド)に由来するPLG微粒子が含まれる。例えば、Jeffery et al. (1993) Pharm. Res. 10:362-368を参照されたい。他の粒子系およびポリマー、例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジン、ならびにこれらの分子の結合体などのポリマーも使用することができる。

【0081】

前記組成物の製剤は、前記組成物中の物質がどういったものであるか、および送達方法などの要因に左右される。前記組成物は様々な剤形で投与することができる。前記組成物は非経口投与されてもよく、皮下投与されてもよく、静脈内投与されてもよく、筋肉内投与されてもよく、経皮投与されてもよく、皮内投与されてもよく、骨内投与されてもよく、注入法によって投与されてもよい。医師は、特定の個体一人一人について、必要とされる投与経路を決定することができる。

【0082】

投与される組成物は、有害反応を引き起こさずに効果のある適切な濃度の(a)～(g)の1つまたは複数を含む。典型的に、前記組成物中にある、それぞれのタンパク質の濃度は0.03～200nmol/mlの範囲であり、より好ましくは、0.3～200nmol/ml、3～180nmol/ml、10～150nmol/ml、50～200nmol/ml、または30～120nmol/mlの範囲である。前記の組成物または製剤は95%もしくは98%を上回る純度または少なくとも99%の純度を有さなければならない。

【0083】

前記組成物はまたアジュバントも含んでよい。アジュバントは、好ましくは、(a)～(g)の1つまたは複数の効果を増大させるのに十分な量で投与される。アジュバントまたは他の治療剤は、(a)～(g)の1つまたは複数の効果を増強する薬剤でもよい。例えば、他の薬剤は、(a)～(g)の1つまたは複数に対する応答を強化する免疫調節性分子またはアジュバントでもよい。

【0084】

一態様において、(a)～(g)の1つまたは複数は1種または複数種の他の治療剤と組み合わせて用いられる。前記薬剤は別々に投与されてもよく、同時に投与されてもよく、連続して投与されてもよい。前記薬剤は、(a)～(g)の1つまたは複数と同じ組成物または異なる組成物に入れられて投与されてもよい。従って、本発明の方法において、対象はまた、さらなる治療剤を用いて治療されてもよい。

【0085】

従って、組成物は(a)～(g)の1つまたは複数を用いて処方されてもよく、1種または複数種の他の治療用分子も用いて処方されてもよい。または、(a)～(g)の1つまたは複数併用治療の一部として1種または複数種の他の治療用組成物と同時に、連続して、または別々に用いられてもよい。

【0086】

アジュバントの非限定的な例には、ミョウバン、モノホスホリルリピド、オリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチド、コレラ毒素、およびフロイント不完全アジュバントが含まれる。

【0087】

(a) ~ (g) の1つまたは複数の投与は前記の任意の適切な方法によるものでよい。(a) ~ (g) の1つまたは複数の適切な量は経験的に確かめることができるが、典型的には、下記で示した範囲内にある。結核菌群感染の予防の場合、患者に有益な効果を及ぼすには組成物の単回投与で十分な場合がある。しかしながら、組成物が対象に2回以上投与されれば、有益な効果はさらに大きくなる場合があることが理解される。この場合、代表的な投与計画は、例えば、6ヶ月ごとに2~4週間にわたって週1回もしくは週2回でもよく、4~6ヶ月ごとに1週間にわたって1日1回でもよい。

【0088】

投与のための投与量は、組成物がどういったものであるか、投与経路ならびに投与計画のスケジュールおよびタイミングを含む多数の要因によって決まる。適切な用量は、1回の投与につき15 μ gまで、20 μ gまで、25 μ gまで、30 μ gまで、50 μ gまで、100 μ gまで、500 μ gまで、またはそれより多い用量の順でもよい。適切な用量は15 μ g未満でもよいが、少なくとも1ng、または少なくとも2ng、または少なくとも5ng、または少なくとも50ng、または少なくとも100ng、または少なくとも500ng、または少なくとも1 μ g、または少なくとも10 μ gでもよい。一部の分子については、用量は上記より多い用量でもよく、例えば、1mgまで、2mgまで、3mgまで、4mgまで、5mgまで、またはこれより多くてもよい。このような用量は、液体製剤の形で、選択された経路による投与に適した体積をとるのに適した濃度で提供されてもよい。

【0089】

組成物の中に入れて投与される(a) ~ (g) の1つまたは複数の用量は、様々なパラメータに従って、特に、治療しようとする対象の年齢、体重、および状態;投与経路;ならびに必要とされるレジメンに従って決定され得る。医師は、どの特定の対象についても、必要とされる投与経路および投与量を決定することができる。代表的な一日量は、特定の阻害剤の活性、治療しようとする対象の年齢、体重、および状態、ならびに頻度および投与経路に応じて約0.1~50mg/kg体重である。用量は単一用量として提供されてもよく、複数用量として提供されてもよく、例えば、定期的に、例えば、1時間に2用量、3用量、または4用量が投与されてもよい。

【0090】

本発明の組成物または前記で定義した(a) ~ (g) は1日で対象に投与されてもよい。または、本発明の組成物または前記で定義した(a) ~ (g) は、少なくとも2日、例えば、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも8日、少なくとも9日、または少なくとも10日で対象に投与されてもよい。出来事の間隔は1~28日、例えば、3~25日、6~22日、9~18日、または12~15日でもよい。好ましくは、出来事の間隔は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、22日、23日、24日、25日、26日、27日、または28日である。

【0091】

対象において結核菌群感染を治療または予防する方法が、前記で定義した(a) ~ (g) の2つ以上を対象に投与する工程を含む場合、(a) ~ (g) の2つ以上はそれぞれ、単独で、または組み合わせで対象に投与されてもよい。

【0092】

本発明の組成物または前記で定義した(a) ~ (g) は任意の適切な対象に投与することができる。対象は概してヒト対象である。対象は、診断方法に関して前述した任意の動物または哺乳動物でよい。

【0093】

対象は乳児、年少者、または成人でもよい。対象は結核があることが分かっているてもよい、または結核があると疑われる。対象は結核に対する感受性があってもよく、結核のリスクがあってもよい。例えば、対象は結核に遺伝的になりやすくてよく、高リスク地域

10

20

30

40

50

に住んでいてもよく、免疫系が弱まってもよい。対象はHIVに感染していてもよく、AIDSにかかっていてもよい。

【 0 0 9 4 】

本発明は、結核を治療または予防する他の手段および結核を治療または予防するための物質と組み合わせて用いられてもよい。場合によっては、本発明の組成物または前記で定義した(a)～(g)は、結核の治療もしくは結核の症状の寛解または疼痛緩和を目的とする他の物質と同時に、連続して、または別々に投与されてもよい。前記組成物または前記で定義した(a)～(g)は、既存の結核治療法と組み合わせて用いられてもよく、例えば、単に、このような治療法と混ぜ合わされてもよい。従って、本発明は、既存の疾患治療法の効力を高めるために用いられてもよい。

10

【 実施例 】

【 0 0 9 5 】

実施例1

プラットフォームNeutraCorpを用いた結核菌ゲノムの分析

Proxagenが開発したイムノインフォマティクス(immunoinformatics)プラットフォーム(登録商標: BG Per.No.85788, 2013年8月27日)を用いて結核菌ゲノムを分析した。免疫原性タンパク質抗原を特定するために、臨床分離株から得たゲノムを分析した。合計44個のMTB完全ゲノムをGOLDデータベースから入手した。

【 0 0 9 6 】

(表1) 使用したMTB株ゲノムのリスト

20

GOLDデータベース 番号	MTB 株の名称
Gc00015	結核菌 H37Rv (実験室株)
Gc00063	結核菌 CDC1551
Gc00577	結核菌 H37Ra
Gc00578	結核菌 F11 (ExPEC)
Gc01079	結核菌 KZN 1435 (MDR)
Gc01851	結核菌 KZN 4207 (DS)
Gc01885	結核菌 CCDC5079
Gc01886	結核菌 CCDC5180
Gc01929	結核菌 CTRI-2
Gc02147	結核菌 UT205
Gi00385	結核菌 210
Gi01205	結核菌 C
Gi01206	結核菌 Haarlem
Gi01904	結核菌 KZN 605 (XDR)
Gi02498	結核菌 GM 1503
Gi02503	結核菌 94_M4241A
Gi02507	結核菌 02_1987
Gi02511	結核菌 T17
Gi02512	結核菌 T46
Gi02513	結核菌 T92
Gi02519	結核菌 EAS054
Gi02522	結核菌 K85
Gi02888	結核菌 CPHL_A
Gi03342	結核菌 H37Ra
Gi03359	結核菌 98-R604 INH-RIF-EM
Gi04656	結核菌 KZN 4207
Gi04663	結核菌 KZN R506
Gi04664	結核菌 KZN V2475
Gi05081	結核菌 T85
Gi05949	結核菌 SUMu012
Gi05950	結核菌 SUMu011
Gi05951	結核菌 SUMu010
Gi05952	結核菌 SUMu009
Gi05953	結核菌 SUMu008
Gi05954	結核菌 SUMu007
Gi05955	結核菌 SUMu006
Gi05956	結核菌 SUMu005
Gi05957	結核菌 SUMu004
Gi05958	結核菌 SUMu003
Gi05959	結核菌 SUMu002
Gi05960	結核菌 SUMu001
Gi12481	結核菌 OSDD071
Gi12482	結核菌 OSDD504
Gi12483	結核菌 OSDD518

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

結核菌ゲノムの分析およびタンパク質の選択

T細胞エピトープおよび連続B細胞エピトープいずれかの抗原特性をもつ可能性のある全てのタンパク質断片を特定するために、NeutraCorp(登録商標: BG Per.No.85788, 2013年8月27日)イムノインフォマティクスプラットフォームを用いて、本発明者らはMTBゲノムを完全に分析した。各ゲノムにおいて、インシリコ親和性が理論値の1%より大きい少なくとも1つの利用可能なエピトープ(T細胞エピトープおよびB細胞エピトープの両方)をもつタンパク質を選択した。これらのタンパク質は、表2のように、TB発症に対する感受性

または防御に関連するHLA-DR対立遺伝子または対立遺伝子群に対するT細胞エピトープが存在するかどうか分析されている。

【 0 0 9 8 】

(表 2)

	活動性TBの発症と 正の関連	活動性TBの発症と 負の関連
HLA-DR 対立遺伝子(4桁) または群 (2桁+XX)	<u>DRB1*08XX, DRB1*14XX,</u> <u>DRB1*1501, DRB1*16XX</u>	DRB1*03XX, DRB1*04XX, DRB1*0701, DRB1*10XX, DRB1*11XX, DRB1*13XX

10

【 0 0 9 9 】

TBに対する防御に関連するHLAについて、活動性TBをもつHLA関連対立遺伝子または群に対して有意に高い(全対立遺伝子に対する各タンパク質のエピトープの平均の>3 SD)多数のエピトープを提示するタンパク質を選択した。

20

【 0 1 0 0 】

特定した全タンパク質のオーソロジー分析を、EGM2ソフトウェア(Nucl. Acids Res. 2011 doi: 10.1093/nar/gkrl261)を用いて行った。20種を超える一般的な分析済み臨床株ゲノムに存在する選択されたタンパク質を選択した。これにより、表3のように7種のタンパク質のリストが得られた。

【 0 1 0 1 】

(表 3)

Seq ID NO	タンパク質の名称	配列
Seq ID#1	TBFG_13463	MTINNQFDDADTHGATSDFWCDAEWAGLRGPVAAGLGRA ALVGYSVPQGWTEANQANLAAGTEAEPNQUALGWLPMQDI DAAAEAAQPSHALGWLPIEEIDAAASDDGEVSSSPQLPPRP FMMPHTPSGG
Seq ID#2	Mtub2_17866	MIDDRHKSTRRTC�HGGITWRVAATSARSARSLATTHPEAG HYGLATWFTRMDAMTAPT
Seq ID#3	Rv2654c	MSGHALAARTLLAAADELVGGPPVEASAAALAGDAAGAW RTAAVELARALVRAVAESHGVA AVLFAATAAAAAA VDRG DPP
Seq ID#4	Rv3845	MDRVRRVVTDRDSGAGALARHPLAGRRTDPQLAAFYHRLM TTQRHCHTQATIAVARKLAERTRVTITTGRPYQLRDTNGDP VTARGAKELIDAHYHVDTRTHPHNRAHTDTMQNSKPAR
Seq ID#5	Rv1495	MNAPLRGQVYRCDLGYGAKPWLIVSNNARNRHTADVAV RLTTTRRTIPTWVAMGPSDPLTGYVNADNIETLGKDELGDY LGEVTPATMNKINTALATALGLPWP
Seq ID#6	Rv0840c	MEGTIAVPGGRVWFQRI GGPGRPLL VVHGGPGLPHNYLAP LRRLSDEREVIFWDQLGCGNSACPSD VDLWTMNRSAEMA TVAEALALTRFHIFSHSWGMLAQYVLDKAPDAVSLTIAN STASIPEFSASLVSLKSCLDVATRSAIDRHEAAGTTHSAEYQA AIRTWNETYLCRTRPWPRELTEAFANMGTEIFETMFGPSDFR IVGNVRDWDVVDRLADIAVPTLLVVGRFDECSPEHMREM Q GRIAGSRLEFFESSHMPFIEEPARFDRVMREFLRLHDI
Seq ID#7	Rv1677	VTHSRLIGALT VVAIIVTACGSQPKSQPAVAPTGDAAAATQV PAGQTVPAQLQFSAKTLDGHDFHGESLLGKPAVLWFWAPW CPTCQGEAPVVGQVAASHPEVTFVGVAGLDQVPAMQEFVN KYPVKTFTQLADTDGSVWANFGVTQQPAYAFVDPHGNVDV VRGRMSQDELTRRV TALT SR

10

20

30

【 0 1 0 2 】

最終的なT細胞エピトープの特定およびペプチド設計

T細胞エピトープを特定および設計するために、特定した7種のタンパク質配列を、イムノインフォマティクスプラットフォーム NeutraCorp(商標)(登録商標: BG Per.No.85788, 2013年8月27日)を用いてスクリーニングした。

40

【 0 1 0 3 】

具体的には、7種全てのタンパク質にある、可能性のある高親和性T細胞エピトープ(任意のHLAクラスI対立遺伝子およびHLAクラスII対立遺伝子と最も良く結合したペプチドの1%に相当する親和性)をタンパク質配列中に特定した。T細胞分析のための可能性のある試薬として、多エピトープおよび/またはHLA-プロミスカス(promiscuous)断片を含有するタンパク質領域を選択した。クラスII HLA分子に対するT細胞エピトープとして合計33個のペプチドを設計した(表4)。

【 0 1 0 4 】

50

(表4)

Seq ID NO	参照タンパク質	HLAクラスIIエピトープの配列
Seq ID#8	TBFG_13463	AALVGYLSVPQGWT
Seq ID#9	TBFG_13463	QALGWLPMQDIDAAA
Seq ID#10	TBFG_13463	RPFMMPHTPSGGaa
Seq ID#11	Mtub2_17866	GGITWRVAATSARSA
Seq ID#12	Mtub2_17866	GHYGLATWFRMDAMTAPT
Seq ID#13	Rv0840c	VWFQRIGGGPGRPLL VHGGPGPLPH
Seq ID#14	Rv0840c	HSWGGMLAQYVLDKAPDAVS
Seq ID#15	Rv0840c	VSLTIANSTASIP
Seq ID#16	Rv0840c	ASLVSLKSCLDVA
Seq ID#17	Rv0840c	SDFRIVGNVRDWD
Seq ID#18	Rv0840c	SRLEFFESSHMP
Seq ID#19	Rv0840c	DRVMREFRLRLHDI
Seq ID#20	Rv3845	MDRVRRVVTDRDSGAGA
Seq ID#21	Rv3845	PQLAAFYHRLMTTQRHC
Seq ID#22	Rv3845	ATIAVARKLAERT
Seq ID#23	Rv3845	RPYQLRDTNGDPV
Seq ID#24	Rv3845	AHYHVDTRTHPHN
Seq ID#25	Rv2654c	DELVGGPPVEASAA
Seq ID#26	Rv2654c	GAWRTAAVELARALVRAVAESHGV
Seq ID#27	Rv2654c	AAVLFAATAAAAAA
Seq ID#28	Rv1677	SRLIGALTVVAIIVTACGSQPK
Seq ID#29	Rv1677	APVVGQVAASHPEV
Seq ID#30	Rv1677	PEVTFVGVAGLDQVP
Seq ID#31	Rv1677	QEFVNKYPVKTFQTQLADTD
Seq ID#32	Rv1677	SVWANFGVTQQPA
Seq ID#33	Rv1677	VDVVRGRMSQDELTRRVLTALTSR
Seq ID#34	Rv1495	QVYRCDLGYGAKPWLIVSNNARNRHTA
Seq ID#35	Rv1495	QVYRCDLGYGAKPWLIV
Seq ID#36	Rv1495	KPWLIVSNNARNRHTA
Seq ID#37	Rv1495	ADVVAVRLTTTRRTIP
Seq ID#38	Rv1495	PTWVAMGPSDPLT
Seq ID#39	Rv1495	TGYVNADNIETLGK
Seq ID#40	Rv1495	ATMKNKINTALATALGL

10

20

30

40

【0105】

クラスI HLA分子に対するT細胞エピトープとして合計47個のペプチドを設計した(表5)

50

【 0 1 0 6 】

(表 5)

Seq ID NO	参照タンパク質	HLAクラスIIエピトープの配列
Seq ID#41	TBFG_13463	ADTHGATSDFW
Seq ID#42	TBFG_13463	GPVAAGLGRAAL
Seq ID#43	TBFG_13463	VGYLSPQGW
Seq ID#44	TBFG_13463	TEAEPNQALGWLPM
Seq ID#45	TBFG_13463	AEAAAQPSHALGWL
Seq ID#46	TBFG_13463	LPIDEEIDAAASD
Seq ID#47	TBFG_13463	GEVSSSPQLPPRPFMM
Seq ID#48	TBFG_13463	RPFMMPHTPSGG
Seq ID#49	Mtub2_17866	STRRTC�HGGITWR
Seq ID#50	Mtub2_17866	ITWRVAATSARSAR
Seq ID#51	Mtub2_17866	ATTHTPEAGHYGL
Seq ID#52	Mtub2_17866	EAGHYGLATWFTR
Seq ID#53	Rv2654c	HALAARTLAAA

10

20

Seq ID#54	Rv2654c	TLLAAADELV
Seq ID#55	Rv2654c	AALAGDAAGAW
Seq ID#56	Rv2654c	RTAAVELARALVRV
Seq ID#57	Rv2654c	AESHGVA AVLFAA
Seq ID#58	Rv2654c	VLFAATAAAAAVDR
Seq ID#59	Rv3845	RRTDPQLAAFYHR
Seq ID#60	Rv3845	HTQATI AVARKLAER
Seq ID#61	Rv3845	RTRVTITTGRPYQLR
Seq ID#62	Rv3845	KELIDAHYHVDTR
Seq ID#63	Rv3845	DTRTHPHNRAHT
Seq ID#64	Rv3845	RAHTDTMQNSKPAR
Seq ID#65	Rv1495	VYRCDLGYGAKPWL
Seq ID#66	Rv1495	HTADV VAVRLTTTR
Seq ID#67	Rv1495	LTTTRRTIPTWVA
Seq ID#68	Rv1495	YLGEVTPATMNKI
Seq ID#69	Rv1495	ALATALGLPW
Seq ID#70	Rv0840c	GTIAVP GGRVWFQR
Seq ID#71	Rv0840c	LPHNYLAPLRR
Seq ID#72	Rv0840c	NSACPSD VDLWTMNR
Seq ID#73	Rv0840c	AEMATVAEALALTR
Seq ID#74	Rv0840c	AEALALTRFHIFS
Seq ID#75	Rv0840c	LTRFHIFSHSW
Seq ID#76	Rv0840c	GMLAQ QYVLDK
Seq ID#77	Rv0840c	LTIANSTASIPEFSA
Seq ID#78	Rv0840c	IPEFSASLVSLK
Seq ID#79	Rv0840c	HSAEYQAAIRTW
Seq ID#80	Rv0840c	RTWNETYLCRTRPW
Seq ID#81	Rv0840c	ETYLCRTRPWPR
Seq ID#82	Rv0840c	RPWPRELTEAFANM
Seq ID#83	Rv0840c	TEAFANMGTEIF
Seq ID#84	Rv0840c	FETMFGPSDFRI
Seq ID#85	Rv0840c	LEFFESSSHMPF
Seq ID#86	Rv0840c	MPFIEEPARF
Seq ID#87	Rv0840c	DRVMREFLRLHDI

10

20

30

40

【 0 1 0 7 】

最終的なB細胞エピトープの特定およびペプチド設計

線状B細胞エピトープが存在するかどうか、特定した7種のタンパク質を、開発したイムノインフォマティクスプラットフォーム NeutraCorp(商標)(登録商標: BG Per.No.85788,

50

2013年8月27日)を用いてスクリーニングした。

【 0 1 0 8 】

連続B細胞エピトープの場合、抗体と潜在的に反応する7アミノ酸長のタンパク質領域を線状タンパク質配列タンパク質の中で特定した。複数の特定した断片を含有するホットスポットのあるタンパク質配列の領域は1つしかないものと考えた。それぞれのタンパク質について可能性のある断片を設計した。

【 0 1 0 9 】

不連続B細胞エピトープの予測およびペプチドミモトープの設計の場合、最初に、本発明者らは、Swiss-Prot機能を用いることによって、6種のタンパク質の3D構造を相同性モデルによって決定した。この3Dモデルを、開発したNeutracorpイムノインフォマティクスプラットフォームモジュールを用いて評価し、可能性のある抗原性の部分を3D構造に沿って特定した。不連続B細胞エピトープを構成する様々な断片が特定された後、それに続く工程は、ミモトープとも呼ばれる、B細胞エピトープ全体の構造を模倣する(miming)ペプチドの設計であった。この目的のために、それぞれの不連続B細胞エピトープについて、3Dタンパク質構造モデルを手作業で検査することによって、エピトープに含まれる様々な線状断片を空間的に特定することができた。単一断片の距離および方向を決定し、様々な線状部分の中で適切な距離および角度をとるためにグリシンおよびプロリンの適切なスペーサーを含めた。

【 0 1 1 0 】

B細胞抗原として合計48個のペプチドエピトープおよびミモトープをタンパク質配列上および構造上に設計した(表6)。

【 0 1 1 1 】

(表 6)

Seq ID NO	参照タンパク質	HLAクラスIIエピトープの配列
Seq ID#88	TBFG_13463	ANLAAGTEAEPN
Seq ID#89	TBFG_13463	AAASDDGEVSSSPQLPPRPF
Seq ID#90	TBFG_13463	AAGTEAEPNQALG
Seq ID#91	TBFG_13463	DIDAAAEAAAQPSHA
Seq ID#92	TBFG_13463	EIDAAASDDGEV
Seq ID#93	TBFG_13463	FMPHPTPSGG
Seq ID#94	TBFG_13463	GEVSSSPQLPPRPFMM
Seq ID#95	TBFG_13463	GTEAEPNQALG

10

20

30

Seq ID#96	TBFG_13463	GWTEANQANLA
Seq ID#97	TBFG_13463	MTINNQFDDADTHGA
Seq ID#98	TBFG_13463	SVPQGWTEANQ
Seq ID#99	TBFG_13463	TINNQFDDADTHG
Seq ID#100	TBFG_13463	WLPMQDIDAAA
Seq ID#101	Mtub2_17866	KSTRRTC�HGG
Seq ID#102	Mtub2_17866	VAATSARSARSLA
Seq ID#103	Mtub2_17866	MIDDRHKSTRRT
Seq ID#104	Rv2654c	AALAGDAAGAWRT
Seq ID#105	Rv3845	AGRRTDPQLA
Seq ID#106	Rv3845	DTRTHPHNRAHTDTMQNSKPAR
Seq ID#107	Rv3845	GDPVTARGAKE
Seq ID#108	Rv3845	PLAGRRTDPQLAA
Seq ID#109	Rv3845	RDTNGDPVTARG
Seq ID#110	Rv3845	RVVTDRDSGAGAL
Seq ID#111	Rv3845	TTGRPYQLRDTNGDPVT
Seq ID#112	Rv3845	VARKLAERTRVTI
Seq ID#113	Rv1495	AMGPSDPLTGYVNADN
Seq ID#114	Rv1495	CDLGYGAKPWLIV
Seq ID#115	Rv1495	MNAPLRGQVYR
Seq ID#116	Rv1495	SNNARNRHTAD
Seq ID#117	Rv1495	LRGQVYGGEVTPATMNKINGGVSNN
Seq ID#118	Rv1495	LGYRCDLGYGAKGRLTT
Seq ID#119	Rv1495	TTTRRTIPTWVAMGPSDPLT
Seq ID#120	Rv1495	YRCDGGGDGTLGKDELGD
Seq ID#121	Rv0840c	MEGTIAVPGGRVWFQRGGGNSA
Seq ID#122	Rv0840c	MQRIGGPGRGGRRLSDE
Seq ID#123	Rv0840c	VSLKSCLDVATRSAIDRPEYQAAIRT
Seq ID#124	Rv0840c	ETYLCRTRPWPRELTE
Seq ID#125	Rv0840c	MEGTIAVPGGRVWFQRGGGNSA
Seq ID#126	Rv0840c	MQRIGGPGRGGRRLSDE
Seq ID#127	Rv0840c	VSLKSCLDVATRSAIDRPEYQAAIRT
Seq ID#128	Rv0840c	ETYLCRTRPWPRELTE
Seq ID#129	Rv0840c	DVATRSAIDRHE

10

20

30

40

Seq ID#130	Rv0840c	GNVRDWDVVDR
Seq ID#131	Rv0840c	GRVWFQRI GGPGRPL
Seq ID#132	Rv0840c	HMREMQGRIAGS
Seq ID#133	Rv0840c	MREMQGRIAGSR
Seq ID#134	Rv0840c	QLGCGNSACPSD
Seq ID#135	Rv0840c	QQYVLDKAPDAVS
Seq ID#136	Rv0840c	REMQGRIAGSR

10

【 0 1 1 2 】

ペプチド合成

特定された遊離末端ペプチドの化学合成は標準的なFmoc化学(Espikem, Prato, Italy)によって行われている。ペプチドを>90%純度で生成した。

【 0 1 1 3 】

選択したMTBタンパク質の抗原性を検証するための、血清バイオバンク(biobank)を用いた合成ペプチドバンクのスクリーニング

Proxagenは、競争力プロジェクト助成金(competitiveness project grant)「Development of a rapid test prototype for the diagnosis of active tuberculosis」(プロジェクト番号BG161P0003-1.1.01-0220, 2011年12月28日)のためのEU地域基金の結果としてTB患者および対照の血清バンクを利用することができた。

20

【 0 1 1 4 】

特定されたタンパク質および断片の免疫原性を確かめるために、以下の群からの血清試料が検査されている。

- 健常対照(N=60)
- 活動性TB(N=50)
- 治癒TB(N=10)

【 0 1 1 5 】

多重ペプチドELISAアッセイ用の標準的な操作手順によるペプチドID#88～ID#136の検査手順:

30

a. 試薬

- 滅菌PBS 1X
- コーティング緩衝液-Na₂CO₃/NaHCO₃ pH9.3
- 洗浄緩衝液-PBS 1x
- ブロッキング緩衝液-PBS+BSA 1%
- アッセイ緩衝液-PBS+BSA 1%
- 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合(HRP)抗ヒトIgG(Zymed)
- 基質-(0.04mg/ml o-フェニレンジアミン(Sigma))
- 停止溶液-1N H₂SO₄
- 発色緩衝液-尿素+H₂O₂ 錠剤(Sigma)

40

b. ELISAプレートにコーティングする:

- ペプチドをコーティング緩衝液で100g/mlまで希釈する
- 1ウェルにつき50μlの希釈ペプチドをELISAプレートに移す
- プレートを密閉し、室温で1時間、4℃で一晩インキュベートする

c. プレートをブロッキングする:

- 1ウェルにつき200μlのブロッキング溶液(PBS+BSA 1%)を添加する。
- 室温で1時間インキュベートする
- ELISAプレートの内容物を捨てる

d. ELISA工程1: 試料を添加する

- プール血清をアッセイ緩衝液(PBS+BSA 1%)で1:100に希釈する

50

- 50 μ lの希釈血清を、スキームのように、検査されている各ELISAプレートに移す
- 37 で2時間インキュベートする
- PBS(200 μ l/ウェル)で3回洗浄する

e.ELISA工程2:抗体結合体を希釈し、ELISAプレートに添加する

- HRP-抗ヒトIgGをアッセイ緩衝液(PBS+BSA 1%)で1:4000に希釈する
- スキームのように、マルチチャンネルピペットを用いて1ウェルにつき50 μ lをELISAプレートに移す
- 室温で1時間インキュベートする
- 洗浄緩衝液(200 μ l/ウェル)で5回洗浄する

f.ELISA工程3:基質を添加し、プレートを読み取る

- 1個の尿素錠剤を20mlのdH₂Oに添加して発色緩衝液を調製する
- 1個のOPD錠剤を20mlの発色緩衝液に添加して基質緩衝液を調製する
- 1ウェルにつき50 μ lの基質緩衝液を添加し、暗所で室温で15分間インキュベートする
- 50 μ lの1N硫酸を用いて反応を停止する
- ELISAプレートリーダーを用いて492nmで吸光度を読み取る

【0116】

結果:

図1は、様々な群の血清を用いて得られた結果を示す。6種のタンパク質に由来するエピトープ群を抗原として用いた時に、活動性TB対象における抗体レベルは他の群と比較して有意に高い。このことは、この試薬の抗原性と、診断検査におけるその用途を証明している。

【0117】

実施例2

拡大した抗原性スクリーニング

イムノバイオインフォマティクス(immuno-bioinformatic)分析によって特定したB細胞エピトープペプチドの抗原性を確かめるために、ペプチドSEQ ID NO:88~SEQ ID NO:141に対して作られた抗体が存在するかどうか、微生物学的に確かめられた活動性結核菌群感染をもつ対象、IGRAによって確かめられた潜伏結核菌群感染(LTBI)をもつ対象、および健康対照対象に由来する血清をELISAによってスクリーニングした。

【0118】

ELISA手順

a.試薬

- 滅菌PBS 1X
- コーティング緩衝液-Na₂CO₃/NaHCO₃ pH9.3
- 洗浄緩衝液-PBS 1x
- ブロッキング緩衝液-PBS+BSA 1%
- アッセイ緩衝液-PBS+BSA 1%
- 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合(HRP)抗ヒトIgG(Zymed)
- 基質-(0.04mg/ml o-フェニレンジアミン(Sigma))
- 停止溶液-1N H₂SO₄
- 発色緩衝液-尿素+H₂O₂錠剤(Sigma)

b.ELISAプレートをコーティングする:

- ペプチドをコーティング緩衝液で1 μ g/mlまで希釈する
- 1ウェルにつき50 μ lの希釈ペプチドをELISAプレートに移す
- プレートを密閉し、室温で1時間、4 で一晩インキュベートする

c.プレートをブロッキングする:

- 1ウェルにつき200 μ lのブロッキング溶液(PBS+BSA 1%)を添加する。
- 室温で1時間インキュベートする
- ELISAプレートの内容物を捨てる

d.ELISA工程1:試料を添加する

10

20

30

40

50

- プール血清をアッセイ緩衝液(PBS+BSA 1%)で1:100に希釈する
- 50 μ lの希釈血清を、スキームのように、検査されている各ELISAプレートに移す
- 37℃で2時間インキュベートする
- PBS(200 μ l/ウェル)で3回洗浄する
- e. ELISA工程2: 抗体結合体を希釈し、ELISAプレートに添加する
- HRP-抗ヒトIgGをアッセイ緩衝液(PBS+BSA 1%)で1:4000に希釈する
- スキームのように、マルチチャンネルピペットを用いて1ウェルにつき50 μ lをELISAプレートに移す
- 室温で1時間インキュベートする
- 洗浄緩衝液(200 μ l/ウェル)で5回洗浄する
- f. ELISA工程3: 基質を添加し、プレートを読み取る
- 1個の尿素錠剤を20mlのdH₂Oに添加して発色緩衝液を調製する
- 1個のOPD錠剤を20mlの発色緩衝液に添加して基質緩衝液を調製する
- 1ウェルにつき50 μ lの基質緩衝液を添加し、暗所で室温で15分間インキュベートする
- 50 μ lの1N硫酸を用いて反応を停止する
- ELISAプレートリーダーを用いて492nmで吸光度を読み取る

10

【0119】

結果

表21は、B細胞エピトープペプチドSEQ ID NO:88~SEQ ID NO:141の抗原性および予備感度データを立証するために、ELISAによって検査した、それぞれのペプチド/血清組み合わせの光学密度(ODデータ)を示す。ODデータは、ペプチド含有(すなわち、検査)ウェルについて1種の各血清の反応性を2回繰り返して求めたものから、ペプチドを含まない(すなわち、負の対照)ウェルの同一血清の基礎反応性を引いた絶対値である。

20

【0120】

対照の99thパーセンタイルまたは平均+3SDを立証することによって、微生物学的に確かめられた活動性結核菌群感染をもつ対象に由来する検査血清(活動性TB血清)全体にわたって、それぞれのペプチドに対する反応性に陽性スコアを付けるカットオフを規定することができる。これにより、それぞれのペプチドに対する、または1種のタンパク質に由来するそれぞれのペプチドパネルに対する活動性TB血清の反応性を確かめることが可能になる。もっと詳しい内容については、

30

- TB対対照のマンホイットニー検定p値は、大まかに言うと、それぞれのペプチドの結果が有意であることを示す。
- 対照データ分布の99thパーセンタイルカットオフは単純なカットオフ閾値を示し、これより大きいと活動性TB血清は陽性とみなされる。
- 対照データ分布の平均+3SDカットオフは、理論上の誤り率が<1%になる、さらに控えめなカットオフを示す。
- カットオフ99th%を用いた検査TB間のN個の陽性は、99thパーセンタイルカットオフに従う、それぞれのペプチドに対する活動性TB血清間の陽性結果の数を示す。
- カットオフ99th%でのTB間の%陽性は、99thパーセンタイルカットオフに従う、陽性結果をもつ活動性TB血清のパーセントを示す。
- カットオフ平均+3SDを用いた検査TB間のN個の陽性は、平均+3SDカットオフに従う、それぞれのペプチドに対する活動性TB血清間の陽性結果の数を示す。
- カットオフ平均+3SDでのTB間の%陽性は、平均+3SDに従う、陽性結果をもつ活動性TB血清のパーセントを示す。
- N個の陽性>TB平均は、ペプチドに対する全ての活動性TB血清の平均(average)(平均(mean))ODより大きなODをもつ活動性TB血清(本質的には、ペプチドに対する上位の反応血清)の数を示す。
- %陽性>TB平均は、ペプチドに対する全ての活動性TB血清の平均(平均)ODより大きなODをもつ活動性TB血清(本質的には、ペプチドに対する上位の反応血清)のパーセントを示す。

40

50

【0121】

それぞれのタンパク質について、そのタンパク質に由来するペプチドを全て含むパネルの仮説上の性能が計算されている。これは平均+3SDカットオフおよび活動性TB血清の平均ODを用いて計算されているので(すなわち、首尾一貫して陽性の結果)、対照血清の仮説上の性能は示していない。

【0122】

表20のOD値から、活動性結核菌群感染をもつ対象におけるSEQ ID NO:88~SEQ ID NO:141に対する抗体レベルは対照対象(すなわち、健常個体またはLTBIをもつ対象)と比較して有意に高いことが分かる。これらの結果はペプチドSEQ ID NO:88~SEQ ID NO:141の抗原性を裏付けている。

10

【0123】

さらに、結果から、ペプチドSEQ ID NO:88~SEQ ID NO:141を個々に、またはタンパク質パネルで用いて、活動性結核菌群感染をもつ対象に由来する血清を特定する、すなわち、活動性結核菌群感染を診断する可能性があることが証明された。

【0124】

実施例3

多重ペプチドELISA

例えば、遺伝的背景により反応に個体差がある場合があるので、多重ペプチドに対する反応性に基づく診断検査は、1種のペプチドに対する反応性に基づく検査より感度が高いことが多い。従って、大きな一組の対照血清(IGRA陰性および/またはIGRA陽性)、活動性結核菌群感染をもつ対象に由来する血清(活動性TB)、ならびに24ヶ月以上にわたって結核菌群感染が治癒した患者に由来する血清(治癒TB)と反応するかどうか、実施例2でスクリーニングしたペプチドを含むペプチドプールをスクリーニングした。各群の試料の数は以下の通りであった。

20

- 健常対照(IGRA陰性)(N=74)

- MTBに感染した健常対照(LTBI、IGRA陽性、および活動性TBの他の徴候なし)(N=30)

- 活動性TB(N=66)

- 治癒TB(N=10)

【0125】

ペプチドプールに含めるために、実施例2でスクリーニングした最も良く働くペプチドを選択することが必要であった。特に、あまりに多くのペプチドを含めると、吸収工程の間に結合部位に対する競合が導入されることがあるので、多重ペプチドELISAの1個のウェルに含めることができるペプチドの数はおよそ15~20に限定される。従って、感度を最適化するために、実施例2からの最も反応性の高いペプチドと、活動性TB血清に対して補完的な反応性を示すペプチドを選択した。具体的には、プールは、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:95、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:101、SEQ ID NO:104、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:110、SEQ ID NO:115、SEQ ID NO:122、SEQ ID NO:129、およびSEQ ID NO:134からなった。

30

【0126】

プレートを1つ1つのペプチドではなくペプチドプールでコーティングした以外は、ELISA手順を実施例2に従って行った。

40

【0127】

結果

表7は、ペプチドプールで検査した各血清の光学密度(ODデータ)を示す。ODデータは、多重ペプチド含有(すなわち、検査)ウェルについて1種の各血清の反応性を2回繰り返して求めたものから血清モック(mock)値を引いた絶対値である。

【0128】

表8は、表7に含まれるデータの記述統計、記述的な様々なカットオフ、および結果のマノホイットニー比較を示す。データセットは十分に大きいので、示されたパーセントは予備的な感度および特異度のデータと解釈することができる。

【0129】

50

(表 7)

OD 492nm - 絶対値(血清プールペプチド検査値-血清モック値)			
対照 - IGRA 陰性	対照 - IGRA 陽性	活動性 TB	治癒 TB (>24 ヶ月)
0.012		0.897	0.033
0.028		0.200	0.184
0.085		1.748	0.074
0.080		1.572	0.092
0.057		0.743	0.066
0.073		0.989	0.125
0.033		0.712	0.528

0.006		0.787	0.061
0.068		0.343	0.027
0.038		0.101	0.505
0.048		0.086	
0.081		0.169	
0.093		0.113	
0.094		0.303	
0.051		0.682	
0.134		0.699	
0.030		0.712	
0.077		0.405	
0.039		0.069	
0.066		0.703	
0.084		0.739	
0.059		1.297	
0.080		0.873	
0.075		0.732	
0.026		0.048	
0.070		0.490	
0.041		0.244	
0.063		0.357	
0.049		0.362	
0.064		0.093	
0.025		0.540	
0.000		0.605	
0.060		0.489	
0.030		0.740	
0.040		0.076	
0.073		0.182	
0.084		0.662	
0.085		0.536	
0.043		0.501	
0.124		0.238	
0.022		0.158	
0.069		1.845	
0.031		0.895	
0.057		0.292	
0.075		0.625	
0.051		0.527	
0.071		1.662	
0.067		0.913	
0.018		0.042	
0.061		0.699	
0.033			

10

20

30

40

0.055			
0.105			
0.106			
0.059			
0.148			
0.036			
0.087			
0.046			
0.075			
0.088	0.105	0.267	
0.035	0.067	0.098	
0.048	0.124	0.587	
0.079	0.148	0.696	
0.074	0.047	0.198	
0.104	0.068	0.066	
0.065	0.131	0.138	
0.094	0.057	0.235	
0.067	0.038	0.959	
0.037	0.069	0.635	
0.087	0.151	0.102	
0.091	0.089	0.207	
0.108	0.105	0.087	
0.044	0.124	0.178	
	0.054	0.501	
	0.039	0.055	
	0.005		
	0.078		
	0.167		
	0.157		
	0.068		
	0.076		
	0.089		
	0.098		
	0.086		
	0.124		
	0.109		
	0.086		
	0.068		
	0.084		

10

20

30

40

【 0 1 3 0 】

(表 8)

	対照 - IGRA 陰性	対照 - IGRA 陽性	活動性 TB	治癒 TB (>24 ヶ月)
N	74	30	66	10
平均	0.063	0.090	0.523	0.170
中央値	0.065	0.086	0.496	0.083
SD	0.029142772	0.038559836	0.425356087	0.188509505
95-パーセンタイル	0.1067	0.1543	1.50325	0.51765
99th-パーセンタイル	0.13778	0.1641	1.78195	0.52593
平均+3SD	0.150414804	0.206046173		
N 陽性 >95th パーセンタイル IGRAneg	4	9	54	4
N 陽性 >99th パーセンタイル IGRAneg	1	4	53	3
N 陽性 >平均+3SD IGRAneg	0	3	52	3
N 陽性 >95th パーセンタイル IGRApos	0	2	52	3
N 陽性 >99th パーセンタイル IGRApos	0	1	51	3
N 陽性 >平均+3SD IGRApos	0	0	46	2
% 陽性 >95th パーセンタイル IGRAneg	5.41%	30.00%	81.82%	40.00%
% 陽性 >99th パーセンタイル IGRAneg	1.35%	13.33%	80.30%	30.00%
% 陽性 >平均+3SD IGRAneg	0.00%	10.00%	78.79%	30.00%
% 陽性 >95th パーセンタイル IGRApos	0.00%	6.67%	78.79%	30.00%
% 陽性 >99th パーセンタイル IGRApos	0.00%	3.33%	77.27%	30.00%
% 陽性 >平均+3SD IGRApos	0.00%	0.00%	69.70%	20.00%

【 0 1 3 1 】

実施例 4

候補T細胞抗原の特定

1. 序論

本調査は、T-SPOT.TBアッセイ用の可能性のある新たな抗原を特定するように設計した、ならびに新たな抗原がESAT-6抗原およびCFP10抗原にとって代わることができるかどうか、またはこのアッセイに加えて、現行のT-SPOT(登録商標).TBアッセイの感度を高めることができるかどうか計算するように設計した、実現の可能性を探るための初期調査であった。これを実現するために、87人のTB確認ドナーおよび96人の健常ドナーを用いたT-SPOT(登録商標).TBアッセイにおいて一組の新たなTB抗原をスクリーニングした。

【 0 1 3 2 】

2. 方法

TB確認ドナー(GeneXpert(登録商標)MTB/RIFアッセイによって確認した)および健常ドナーから単離した末梢血単核球(PBMC)を、T-SPOT.TBパネルA(PA)、T-SPOT.TBパネルB(PB)、および24種の代替TB抗原を用いたT-SPOT.TBアッセイにおいて検査した。GeneXpert(登録商標)MTB/RIFアッセイは、Cepheidが製造した結核用核酸増幅検査である。これは、TBが蔓延している国々において使用するために世界保健機関による支援を受けており、培養によって確かめられたTBドナーにおける主張された感度は92.2%であり(675/732)、TBがないドナーにおける特異度は99.2%である(604/609)。Boehme, C. (2011)。

【0133】

検査した抗原を表9に列挙した。

【0134】

10

(表9)

抗原	ペプチドの数
T-SPOT.TB パネル A	-
T-SPOT.TB パネル B	-
Massi プール CD4+8	91
CD4/CD8エピトーププール TBFG_13463	15
CD4/CD8エピトーププール Mtub2_17866	7
CD4/CD8 エピトーププール Rv2654c	11
CD4/CD8エピトーププール Rv3845	15
CD4/CD8エピトーププール Rv1495	12
CD4/CD8 エピトーププール Rv0840c	25
CD4/CD8エピトーププール Rv1677	6
Rv2654c ペプチドライブラリー	18
TBFG_13463 ペプチドライブラリー	30
Rv0840c ペプチドライブラリー	69
Rv3845 ペプチドライブラリー	27
Rv1677 ペプチドライブラリー	43
Rv1495 ペプチドライブラリー	24
Mtub2_17866 ペプチドライブラリー	12

20

【0135】

それぞれのエピトーププールの中にあるCD4/CD8エピトープを表10～16に列挙した。

【0136】

30

(表10) CD4/CD8エピトーププールTBFG_13643

AALVGYLSVPQGW
QALGWLPMQDIDAAA
RPFMMPHTPSGGAA
DTHGATSDFW
HGATSDFW
GPVAAGLGRAAL
VGYSVPQGW
TEAEPNQALGWLPM
EPNQALGWLPM
AEAAAQPSHALGWL
LPIEEIDAAASD
GEVSSSPQLPPRPF
SSSPQLPPRPFMM
RPFMMPHTPSG
FMMMPHTPSGG

40

【0137】

(表11) CD4/CD8エピトーププールMtub2_17866

GGITWRVAATSARSA
GHYGLATWFTRMDAMTAPT
STRRTC�HGGITWR
ITWRVAATSARSAR
ATTHPEAGHYGL
EAGHYGLATWF
HYGLATWFTR

【 0 1 3 8 】

(表12) CD4/CD8エピトーププールRv2654c

10

DELVGGPPVEASAA
GAWRTAAVELARALVRAVAESHGV
ELARALVRAV
AAVLFAATAAAAAA
HALAARTLAAA
TLLAAADELV
AALAGDAAGAW
RTAAVELARALV
AESHGVA AVLFAA
VLFAATAAAAAV
ATAAAAAVDR

20

【 0 1 3 9 】

(表13) CD4/CD8エピトーププールRv3845

MDRVRRVVTDRDSGAGA
PQLAAFYHRLMTTQRHC
ATIAVARKLAERT
RPYQLRDTNGDPV
AHYHVDTRTHPHN
RRTDPQLAAFYHR
QLAAFYHRL
HTQATIAVARK
ATIAVARKLAER
RTRVTITTGRPY
TITTGRPYQLR
KELIDAHYHVDTR
DTRTHPHNRAHT
RAHTDTMQNSK
TMQNSKPAR

30

40

【 0 1 4 0 】

(表14) CD4/CD8エピトーププールRv1495

QVYRCDLGYGAKPWLIVSNNARNRHTA
QVYRCDLGYGAKPWLIV
DLGYGAKPWL
KPWLIVSNNARNRHTA
ADVVAVRLTTTRRTIP
PTWVAMGPSDPLT
TGYVNADNIETLGK
ATMNKINTALATALGL
VYRCDLGYGAKPW
LTTRRTIPTWVA
YLGEVTPATMNKI
ALATALGLPW

10

【 0 1 4 1 】

(表15) CD4/CD8エピトーププールRv0840c

VWFQRIGGGPGRPLLWHGGPGLPH
HSWGGMLAQQYVLDKAPDAVS
VSLTIANSTASIP
ASLVSLKSCLDVA
SDFRIVGNVRDWD
SRLEFFESSHMP
DRVMREFLRLHDI
GTIAVPGGRVWFQR
GGRVWFQR
NSACPSDVDLWTM
DVDLWTMNR
AEMATVAEALAL
TVAEALALTR
LTRFHIFSHSW
GMLAQQYVLDK
LTIANSTASIPEF
STASIPEFSA
HSAEYQAAIRTW
RTWNETYLCRTPW
ETYLCRTRPWPR
RPWPRELTEAFAN
TEAFANMGTEIF
LEFFESSHMPF
MPFIEEPARF
DRVMREFLRLHDI

20

30

40

【 0 1 4 2 】

(表16) CD4/CD8エピトーププールRv1677

SRLIGALTVVAIIVTACGSQPK
APVVGQVAASHPEV
PEVTFVGVAGLDQVP
QEFVNKYPVKITFTQLADTD
SVWANFGVTQQPA
VDVVRGRMSQDELTRRVLTALTSR

【 0 1 4 3 】

Massi プールCD4+8は、TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677用のCD4/CD8エピトーププールにおいて用いられるCD4/CD8エピトープを全て含有する。TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677用のペプチドライブラリープールは、11アミノ酸重複をもち、エピトープ選択において用いられたタンパク質の全アミノ酸配列をカバーする15merを含有する。

10

【 0 1 4 4 】

3. 結果

3.1 ドナー

3.1.1 TB陽性ドナー

University of Cape Townにおいて120人のドナーをT-SPOTアッセイで検査した。TB感染状況をGeneXpert MTB/RIFアッセイによって確かめた。120人のドナーのうち93人がGeneXpert陽性であった(8/120人はGeneXpert陰性であり、19/120人はGeneXpertで検査しなかった)。93人のGeneXpert陽性ドナーのうち4/93人のドナーは細胞数が少なく($<2.0 \times 10^6$ 細胞/mL)、2/93人のドナーはハイネガティブコントロール(high negative control)であった(>10個のスポット)。従って、これらのドナーを除外した。残りの87人のTB陽性ドナーを本実施例に使用した。

20

【 0 1 4 5 】

3.1.2 健常ドナー

Oxford Immunotec UKにおいて107人の健常ドナーをT-SPOTアッセイで検査した。TB感染リスクが高いという理由で、この群から11人のドナーを除外した(8人のドナーは、TBが蔓延している地域が出身地であるために、またはTBが蔓延している地域に渡航して過ごした期間があるために除外した。1人のドナーは、TB感染個体と密接に接触したことがあるために除外した。2人のドナーは、以前にT-SPOT.TBアッセイにおいて陽性応答があった経歴があるために除外した)。残りの96人のドナーを分析に含めた。

30

【 0 1 4 6 】

抗原不足のために、96人のドナー全員が17種全ての抗原を用いて検査されたわけではなかった。それぞれの抗原を用いて検査した数を表17に列挙した。

【 0 1 4 7 】

(表 17)

抗原	検査した健常ドナーの数
パネル A	96
パネル B	96
Massi プール CD4+8	96
CD4/CD8 エピトーププール TBFG_13463	92
TBFG_13463 ペプチドライブラリー	80
CD4/CD8 エピトーププール Mtub2_17866	94
Mtub2_17866 ライブラリー	95
CD4/CD8 エピトーププール Rv2654c	96
Rv2654c ペプチドライブラリー	95
CD4/CD8 エピトーププール Rv3845	95
Rv3845 ライブラリー	93
CD4/CD8 エピトーププール Rv1495	94
Rv1495 ライブラリー	96
CD4/CD8 エピトーププール Rv0840c	93
Rv0840c ペプチドライブラリー	93
CD4/CD8 エピトーププール Rv1677	93
Rv1677 ライブラリー	96

【 0 1 4 8 】

3.2 受信者動作特性(ROC)曲線

GraphPad Prism6ソフトウェアを用いてデータを解析した。健常ドナーの基準化スポット数を対照値としてプロットした。TB確認ドナーの基準化スポット数を患者値としてプロットした。

【 0 1 4 9 】

現行のT-SPOT.TBアッセイでは、アッセイ読み取り値としてパネルAまたはパネルBからの最大スポット数を利用する。例えば、ドナー1がパネルA=4スポット、パネルB=10スポットである場合、T-SPOT.TBの検査結果=10スポットになる。この分析は、異なる抗原の組み合わせを用いた時のアッセイ性能を算出するのに適用されてきた。この分析を使用したことは、列挙された抗原の後ろにある最大という用語によって示される。

【 0 1 5 0 】

3.3 統計解析

ROC曲線はMedCalcソフトウェアを用いて比較されている。HanleyおよびMcNeilの方法(Hanley, J, McNeil B J. (1983))は、同じ患者群間に由来する曲線間の曲線下面積(AUC)の違いを比較するために用いられている($p < 0.05$ =曲線間の有意差)。

【 0 1 5 1 】

3.4 T-SPOT.TBアッセイ性能

現行のT-SPOT.TBアッセイ性能のROC曲線を図2Aに示した。パネルA/パネルB最大の様々なカットオフでのアッセイ感度および特異度を図2Bに示した。本検査におけるT-SPOT.TBアッセイ性能は6スポットカットオフでは感度94.2%および特異度97.9%であった。これらの性能の数字は、U.S.A T-SPOT.TBアッセイ添付文書において以前に公表した性能と似ている(感度=95.6% (175/183)、特異度=97.1% (297/306)、PI-TB-US-V4、2013年3月)。パネルA/パネルB抗原を用いて検査して陽性であった健常ドナーは2/96人であった。これらのドナーは、この結果が正しいか確かめるためにT-SPOT.TBアッセイで再検査することになっている。カットオフを3スポットまで減らしても感度は影響を受けなかったが、アッセイの特異度は87.5%まで低下しただろう。

【 0 1 5 2 】

3.5 CD4/CD8の選択されたエピトープと、全タンパク質配列をカバーするペプチドライブラリーとの比較

本検査のこの部門(arm)では、Mtbゲノムから、CD4/CD8エピトープの可能性があるとインシリコで特定したペプチド配列を合成し、CD4/CD8エピトープが得られたMtbタンパク質に従ってプールした。これと同時に、Mtbタンパク質配列のコピーを入手し、ペプチドライブラリー(11アミノ酸重複をもつ15mer)を合成し、それぞれのタンパク質についてプー

10

20

30

40

50

ルした。これらのペプチドプールセットを両方とも、T-SPOT.TBアッセイにおいてパネルAおよびパネルBと比較して検査した。結果を図3および図4に示した。

【 0 1 5 3 】

図3は、Rv1495、TBFG_13463、およびRv3845についてCD4/CD8エピトーププールとペプチドライブラリーを比較したものである。ROC曲線の統計学的比較から、Aでは、CD4/CD8エピトーププールと、対応するペプチドライブラリーとの間には性能に有意差があったことが分かる($p=0.0267$)。この場合、前記のペプチドライブラリーは、その対応するCD4/CD8エピトーププールより性能が優れていた。BおよびCでは、CD4/CD8エピトーププールとその対応するタンパク質ライブラリーとの間には性能に有意差がなかった(それぞれ、0.3208および $p=0.1850$)。

10

【 0 1 5 4 】

図4は、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv1677、およびRv0840cペプチドライブラリーについてペプチドライブラリーのROC曲線を示す。表18は、様々なカットオフを用いたT-SPOT.TBにおけるRv0840cの感度および特異度を示す($n=180$; TB陽性=87; 健常ドナー=93)。

【 0 1 5 5 】

(表 1 8)

カット オフ	感度 %	95% CI	特異度 %	95% CI	尤度比
> 0.5000	89.66	81.27%～95.16%	66.67	56.13%～76.11%	2.690
> 1.500	87.36	78.50%～93.52%	88.17	79.82%～93.95%	7.386
> 2.500	80.46	70.57%～88.19%	93.55	86.48%～97.60%	12.47
> 3.500	78.16	68.02%～86.31%	98.92	94.15%～99.97%	72.69
> 4.500	74.71	64.25%～83.42%	98.92	94.15%～99.97%	69.48
> 5.500	73.56	63.02%～82.45%	100.0	96.11%～100.0%	
> 6.500	72.41	61.79%～81.46%	100.0	96.11%～100.0%	
> 7.500	65.52	54.56%～75.39%	100.0	96.11%～100.0%	
> 8.500	63.22	52.20%～73.31%	100.0	96.11%～100.0%	
> 9.500	60.92	49.87%～71.21%	100.0	96.11%～100.0%	

20

【 0 1 5 6 】

表19は、6スポットカットオフを用いた、TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677のCD4/CD8エピトーププールおよびペプチドライブラリー、ならびにMassiプールCD4+8の個々の感度および特異度をまとめたものである。

30

【 0 1 5 7 】

(表 1 9)

抗原	6スポットカットオフ	
	感度	特異度
MassiプールCD4+8	57.47 (50/87)	95.77(93/96)
CD4/CD8エピトーププールTBFG_13463	44.8 (39/87)	97.9 (90/92)
TBFG_13463 ペプチドライブラリー	67.8 (59/87)	100 (80/80)
CD4/CD8エピトーププールMtub2_17866	28.7 (25/87)	98.9 (93/94)
Mtub2_17866ライブラリー	42.5 (37/87)	100 (95/95)
CD4/CD8エピトーププールRv2654c	31.03 (27/87)	100 (96/96)
Rv2654c ペプチドライブラリー	58.6 (51/87)	97.9 (93/95)
CD4/CD8エピトーププールRv3845	44.8 (39/87)	100 (95/95)
Rv3845ライブラリー	55.2 (48/87)	97.8 (91/93)
CD4/CD8エピトーププールRv1495	49.4(43/87)	100 (94/94)
Rv1495ライブラリー	48.3 (42/87)	95.8 (92/96)
CD4/CD8エピトーププール Rv0840c	8 (7/87)	100 (93/93)
Rv0840c ペプチドライブラリー	73.6 (64/87)	100 (93/93)
CD4/CD8エピトーププールRv1677	29.9 (26/87)	100 (93/93)
Rv1677ライブラリー	67.8 (59/87)	97.8 (94/96)

【 0 1 5 8 】

図5は、TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677 CD4/CD8エピトーププール最大と、TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677ペプチドライブラリー最大の比較を示す。上記の「最大」の定義に従って、それぞれのエピトーププールおよびペプチドライブラリーを個々にT-SPOT.TBアッセイにおいて検査した。CD4/CD8エピトーププール最大とペプチドライブラリー最大との間には有意差があった($p=0.0033$)。

【 0 1 5 9 】

図6は、CD4/CD8エピトーププール(TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677)を全て含む単一の複合エピトーププールの結果を示す。

【 0 1 6 0 】

3.6 パネルA(ESAT-6)またはパネルB(CFP10)の交換

本検査の始めに提起された主な質問の1つは、T-SPOT.TBアッセイにおいて現在用いられているESAT-6(パネルA)またはCFP10(パネルB)プールのうちの1つを、アッセイ性能に影響を及ぼさずに交換できるかどうかということであった。この分析では、ESAT-6およびCFP10はRv0840cペプチドライブラリーと交換されており、結果をROC曲線としてプロットした。図7は、ESAT-6を交換した結果を示す。図8は、CFP10を交換した結果を示す。ESAT-6またはCFP10をRv0840cペプチドライブラリーと交換した時の感度および特異度は高いことが分かる。

【 0 1 6 1 】

3.7 アッセイ感度を高めるために現行のT-SPOT.TBアッセイに抗原を加える

本検査の始めに提起された最後の質問は、現行のT-SPOT.TBアッセイに抗原を加えることによってT-SPOT.TBアッセイの感度を高めることができるかどうかであった。本研究において作成されたデータおよび上述の「最大」分析を用いて、ペプチドライブラリーをT-SPOT.TBアッセイに加えた結果が確かめられている。図9は、パネルA/パネルB最大およびパネルA/パネルB/Rv0840cペプチドライブラリー最大のROC曲線の比較を示す。表20は、パネルA/パネルB最大およびパネルA/パネルB/Rv0840cペプチドライブラリー最大の感度および特異度をまとめたものである。

【 0 1 6 2 】

(表20)最大分析を用いたT-SPOT.TBアッセイにおいてパネルAおよびパネルBにRv0840cを加える

10

20

30

40

					6スポットカットオフ	
					感度(%)	特異度(%)
パネルA	パネルB			MA	94.2 (82/87)	97.9 (94/96)
パネルA	パネルB	Rv0840c			96.5 (84/87)	97.8 (91/93)

【 0 1 6 3 】

T-SPOT.TBアッセイにRv0840cを含めると、現行のT-SPOT.TBアッセイでは検出されなかったと思われる2人のさらなるTB確認ドナーが検出された。Rv0840cを含めると、T-SPOT.TBアッセイの感度は96.5% (84/87) に増加した。

【 0 1 6 4 】

10

4. 結論

本検査は、T-SPOT.TBアッセイにおけるESAT-6抗原およびCFP10抗原に取って代わる、可能性のある候補抗原を特定するように設計された、ならびに/または現行のT-SPOT.TBアッセイの感度を高めるように設計された、実現の可能性を探るための初期調査であった。パネルA、パネルB、TBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677 CD4/CD8エピトーププール、ならびにTBFG_13463、Mtub2_17866、Rv2654c、Rv3845、Rv1495、Rv0840c、およびRv1677ペプチドライブラリーを用いたT-SPOT.TBアッセイにおいて、87人のTB陽性ドナーおよび96人までの健常ドナーを検査した。

【 0 1 6 5 】

前記ペプチドライブラリーとCD4/CD8エピトーププールは両方ともT-SPOT.TBアッセイにおいて良好な特異度を達成した。場合によっては、前記ペプチドライブラリー(15mer/11アミノ酸重複)は、対応するCD4/CD8エピトーププールより性能が優れていた。結果から、特に、Rv0840cペプチドライブラリーは、現行のT-SPOT.TBアッセイの感度を高める、またはESAT-6もしくはCFP10に取って代わる有望な候補であることが分かる。

20

【 0 1 6 6 】

(表 2 1)

				活動性TB血清(微生物学的に確かめられた)													
Seq ID NO	参照 タンパク質	ペプチド 配列	エピトープ タイプ	TB- RM013	TB- RM021	TB- RM02 2	TB- RM02 3	TB- RM02 7	TB- RM03 0	TB- RM03 3	TB- RM03 4	TB- RM03 5	TB- RM03 7	TB- S014	平均	中央値	
Seq ID#88	TBFG_13463	ANLAAG TEAEPN	連続	0.401	0.252	0.184	0.299	1.271	0.288	0.334	0.444	0.423	0.450	0.145	0.408	0.334	
Seq ID#89	TBFG_13463	AAASDD GEVSSSP QLPPRP	連続	0.045	0.040	0.045	0.031	0.025	0.058	0.066	0.148	0.077	0.093	0.073	0.064	0.058	
Seq ID#90	TBFG_13463	AAGTEA EPNQAL G	連続	0.091	0.056	0.067	0.045	0.141	0.112	0.125	0.141	0.140	0.209	0.035	0.105	0.112	
Seq ID#91	TBFG_13463	DIDAAAE AAAQPS HA	連続	0.037	0.005	0.044	0.033	0.352	0.032	0.057	0.052	0.079	0.063	0.033	0.071	0.044	
Seq ID#92	TBFG_13463	EIDAAAS DDGEV	連続	0.276	0.014	0.060	0.045	0.090	0.053	0.067	0.103	0.106	0.091	0.048	0.086	0.067	
Seq ID#93	TBFG_13463	FMMPHT PSGG	連続	0.039	0.011	0.061	0.036	0.074	0.060	0.064	0.048	0.102	0.026	0.028	0.050	0.048	
Seq ID#94	TBFG_13463	GEVSSSP QLPPRP MM	連続	0.066	0.019	0.173	0.049	0.114	0.075	0.148	0.107	0.093	0.160	0.042	0.095	0.093	
Seq ID#95	TBFG_13463	GTEAEPN QALG	連続	0.173	0.147	0.106	0.244	0.111	0.080	0.133	0.241	0.139	0.283	0.347	0.182	0.147	

10

20

30

40

活動性TB血清 (微生物学的に確かめられた)																
Seq ID NO	参照 タンパク質	ペプチド 配列	エпитープ タイプ	TB- RM013	TB- RM021	TB- RM02 2	TB- RM02 3	TB- RM02 7	TB- RM03 0	TB- RM03 3	TB- RM03 4	TB- RM03 5	TB- RM03 7	TB- S014	平均	中央値
Seq ID#96	TBFG_13463	GWTEAN QANLA	連続	0.101	0.044	0.089	0.058	0.087	0.088	0.144	0.098	0.130	0.245	0.042	0.102	0.089
Seq ID#97	TBFG_13463	MTNNQF DDADTH GA	連続	0.053	0.031	0.064	0.046	0.064	0.069	0.081	0.077	0.108	0.154	0.030	0.070	0.064
Seq ID#98	TBFG_13463	SVPQGW TEANQ	連続	0.248	0.225	0.152	0.139	0.177	0.108	0.138	0.169	0.180	0.334	0.533	0.218	0.177
Seq ID#99	TBFG_13463	TINNQFD DADTHG	連続	0.284	0.048	0.075	0.057	0.088	0.070	0.087	0.112	0.111	0.234	0.138	0.118	0.088
Seq ID#100	TBFG_13463	WLPMQD IDAAA	連続	0.078	0.038	0.090	0.065	0.100	0.082	0.154	0.131	0.121	0.226	0.044	0.102	0.090
Seq ID#101	Mtub2_17866	KSTRRTC NHGG	連続	0.186	0.102	0.089	0.056	0.217	0.069	0.098	0.097	0.104	0.161	0.102	0.116	0.102
Seq ID#102	Mtub2_17866	VAATSA RSARSLA	連続	0.098	0.165	0.067	0.052	0.070	0.054	0.083	0.083	0.065	0.162	0.039	0.085	0.070
Seq ID#103	Mtub2_17866	MIDDRH KSTRRT	連続	0.095	0.062	0.063	0.073	0.070	0.047	0.179	0.185	0.087	0.141	0.056	0.096	0.073

10

20

30

40

				活動性TB血清 (微生物学的に確かめられた)													
Seq ID NO	参照タンパク質	ペプチド配列	エピソードタイプ	TB-RM013	TB-RM021	TB-RM02 2	TB-RM02 3	TB-RM02 7	TB-RM03 0	TB-RM03 3	TB-RM03 4	TB-RM03 5	TB-RM03 7	TB-S014	平均	中央値	
Seq ID#104	Rv2654c	AALAGD AAGAWR T	連続	0.117	0.082	0.128	0.103	0.227	0.082	0.079	0.150	0.123	0.211	0.248	0.141	0.123	
Seq ID#105	Rv3845	AGRRTD PQLA	連続	0.162	0.285	0.065	0.052	0.209	0.081	0.165	0.127	0.144	0.182	0.188	0.151	0.162	
Seq ID#106	Rv3845	DTRTHPH NRAHTD TMQNSK PAR	連続	0.043	0.027	0.059	0.040	0.089	0.055	0.055	0.074	0.097	0.123	0.025	0.062	0.055	
Seq ID#107	Rv3845	GDPVTA RGAKE	連続	0.072	0.037	0.069	0.043	0.082	0.067	0.107	0.098	0.107	0.184	0.047	0.083	0.072	
Seq ID#108	Rv3845	PLAGRRT DPQLAA	連続	0.053	0.032	0.077	0.059	0.098	0.076	0.144	0.118	0.112	0.198	0.040	0.091	0.077	
Seq ID#109	Rv3845	RDTNGD PVTARG	連続	0.129	0.050	0.188	0.048	0.103	0.084	0.138	0.163	0.160	0.209	0.038	0.119	0.129	
Seq ID#110	Rv3845	RVVTDR DSGAGA I	連続	0.101	0.059	0.110	0.134	0.259	0.095	0.184	0.273	0.150	0.300	0.054	0.156	0.134	

10

20

30

40

				活動性TB血清(微生物学的に確かめられた)															
Seq ID NO	参照タンパク質	ペプチド配列	エпитープタイプ	TB-RM013	TB-RM021	TB-RM02 2	TB-RM02 3	TB-RM02 7	TB-RM03 0	TB-RM03 3	TB-RM03 4	TB-RM03 5	TB-RM03 7	TB-S014	平均	中央値			
Seq ID#111	Rv3845	TTGRPYQ LRDTNG DPVT	連続	0.049	0.033	0.058	0.034	0.090	0.058	0.097	0.084	0.076	0.128	0.029	0.067	0.058			
Seq ID#112	Rv3845	VARKLA ERTRVTI	連続	0.027	0.037	0.044	0.029	0.073	0.040	0.060	0.066	0.090	0.090	0.028	0.053	0.044			
Seq ID#113	Rv1495	AMGPSD PLTGYV NADN	連続	0.085	0.060	0.087	0.054	0.116	0.090	0.131	0.097	0.110	0.178	0.040	0.095	0.090			
Seq ID#114	Rv1495	CDLGYG AKPWLV	連続	0.034	0.000	0.048	0.031	0.065	0.031	0.062	0.050	0.083	0.045	0.000	0.041	0.045			
Seq ID#115	Rv1495	MNAPLR GQVYR	連続	0.045	0.000	0.177	0.104	0.105	0.254	0.095	0.083	0.093	0.084	0.239	0.116	0.095			
Seq ID#116	Rv1495	SNNARN RHTAD	連続	0.076	0.023	0.074	0.051	0.129	0.066	0.129	0.095	0.122	0.153	0.038	0.087	0.076			
Seq ID#117	Rv1495	LRGQVY GGEVTP ATMNKI NGGVSN N	不連続	0.187	0.025	0.070	0.045	0.213	0.070	0.081	0.085	0.134	0.095	0.028	0.094	0.081			

10

20

30

40

活動性TB血清(微生物学的に確かめられた)																
Seq ID NO	参照タンパク質	ペプチド配列	エпитープタイプ	TB-RM013	TB-TB-RM021	TB-TB-RM02 2	TB-TB-RM02 3	TB-TB-RM02 7	TB-TB-RM03 0	TB-TB-RM03 3	TB-TB-RM03 4	TB-TB-RM03 5	TB-TB-RM03 7	TB-TB-S014	平均	中央値
Seq ID#118	Rv1495	LGYRCD LGYGAK GRLTT	不連続	0.045	0.022	0.037	0.031	0.085	0.065	0.051	0.075	0.118	0.045	0.013	0.053	0.045
Seq ID#119	Rv1495	TTTRRTI PTWVAM GPSDPLT	不連続	0.071	0.091	0.051	0.052	0.123	0.073	0.219	0.072	0.120	0.166	0.061	0.100	0.073
Seq ID#120	Rv1495	YRCDGG GDGTLG KDELGD	不連続	0.041	0.070	0.041	0.043	0.109	0.068	0.051	0.084	0.112	0.077	0.027	0.065	0.068
Seq ID#121	Rv0840c	MEGTIAV PGGRVW FQGGGG NSA	不連続	0.027	0.014	0.056	0.031	0.195	0.058	0.057	0.061	0.068	0.028	0.045	0.058	0.056
Seq ID#122	Rv0840c	MQRIGGP GRGGRR LSDE	不連続	0.162	0.120	0.101	0.050	0.164	0.166	0.153	0.086	0.279	0.224	0.228	0.157	0.162
Seq ID#123	Rv0840c	VSLKSCL DVATRS AIDRPEY QAAIRT	不連続	0.068	0.036	0.037	0.032	0.131	0.870	0.061	0.065	0.092	0.037	0.011	0.131	0.061

10

20

30

40

活動性TB血清(微生物学的に確かめられた)																
Seq ID NO	参照 タンパク質	ペプチド 配列	エピートープ タイプ	TB- RM013	TB- RM021	TB- RM02 2	TB- RM02 3	TB- RM02 7	TB- RM03 0	TB- RM03 3	TB- RM03 4	TB- RM03 5	TB- RM03 7	TB- S014	平均	中央値
Seq ID#124	Rv0840c	ETVLCRT RPWP PREL TE	不連続	0.030	0.167	0.081	0.024	0.080	0.020	0.045	0.552	0.058	0.133	0.019	0.110	0.058
Seq ID#125	Rv0840c	MEGTIAV PGGRVW FQRRGG NSA	不連続	反復	Seq ID#121											
Seq ID#126	Rv0840c	MQRIGGP GRGGRR LSDE	不連続	反復	Seq ID#122											
Seq ID#127	Rv0840c	VSLKSCL DVATRS AIDRPEY QAAIRT	不連続	反復	Seq ID#123											
Seq ID#128	Rv0840c	ETVLCRT RPWP PREL TE	不連続	反復	Seq ID#124											
Seq ID#129	Rv0840c	DVATRS AIDRHE	連続	0.073	0.569	0.085	0.176	0.185	0.099	0.095	0.143	0.119	0.127	0.055	0.157	0.119
Seq ID#130	Rv0840c	GNVRDW DVVDR	連続	0.092	0.061	0.066	0.057	0.137	0.067	0.136	0.083	0.124	0.149	0.042	0.092	0.083

10

20

30

40

			活動性TB血清(微生物学的に確かめられた)														
Seq ID NO	参照 タンパク質	ペプチド 配列	エピソード タイプ	TB- RM013	TB- RM021	TB- RM02 2	TB- RM02 3	TB- RM02 7	TB- RM03 0	TB- RM03 3	TB- RM03 4	TB- RM03 5	TB- RM03 7	TB- S014	平均	中央値	
Seq ID#131	Rv0840c	GRVWFQ RIGGGPG RPL	連続	0.067	0.070	0.052	0.042	0.052	0.045	0.044	0.097	0.093	0.115	0.019	0.063	0.052	
Seq ID#132	Rv0840c	HMREMQ GRIAGS	連続	0.043	0.020	0.033	0.039	0.124	0.058	0.087	0.097	0.082	0.068	0.273	0.084	0.068	
Seq ID#133	Rv0840c	MREMQG RIAGSR	連続	0.053	0.023	0.084	0.189	0.142	0.079	0.131	0.090	0.161	0.146	0.034	0.103	0.090	
Seq ID#134	Rv0840c	QLGCGN SACPSD	連続	0.130	0.065	0.093	0.066	0.173	0.123	0.128	0.129	0.134	0.239	0.114	0.126	0.128	
Seq ID#135	Rv0840c	QQYVLD KAPDAV S	連続	0.188	0.042	0.086	0.081	0.126	0.082	0.138	0.072	0.108	0.195	0.035	0.105	0.086	
Seq ID#136	Rv0840c	REMQGRI AGSR	連続	0.078	0.037	0.091	0.221	0.170	0.139	0.145	0.113	0.126	0.134	0.046	0.118	0.126	
SEQ ID#137	Rv1677	TACGSQP KSQPAV APT	連続	0.234	0.040	0.058	0.052	0.219	0.047	0.107	0.120	0.201	0.105	0.055	0.112	0.105	
SEQ ID#138	Rv1677	TQVPAG QTVPAQ LOFSAK	連続	0.063	0.036	0.037	0.033	0.067	0.081	0.077	0.065	0.079	0.191	0.020	0.068	0.065	

10

20

30

40

				活動性TB血清(微生物学的に確かめられた)													
Seq ID NO	参照 タンパク質	ペプチド 配列	エピソード タイプ	TB- RM013	TB- RM021	TB- RM02 2	TB- RM02 3	TB- RM02 7	TB- RM03 0	TB- RM03 3	TB- RM03 4	TB- RM03 5	TB- RM03 7	TB- S014	平均	中央値	
SEQ ID#139	Rv1677	SAKTLD GHDFHG ES	連続	0.051	0.039	0.063	0.037	0.058	0.030	0.097	0.082	0.067	0.106	0.049	0.062	0.058	
SEQ ID#140	Rv1677	MQEFVN KYPVKTF TQ	連続	0.035	0.003	0.057	0.039	0.082	0.041	0.170	0.139	0.075	0.070	0.034	0.067	0.057	
SEQ ID#141	Rv1677	NFGVTQ QPAYAF VDPHGN VDV	連続	0.053	0.016	0.090	0.060	0.148	0.081	0.121	0.109	0.122	0.102	0.053	0.087	0.090	

10

20

30

40

TB 血清										対照血清-IGRA陰性								
Seq ID NO	標準 偏差	マン ホイットニー 検定 p値対対照	N 陽性 カットオフ 99th %	N 陽性 カットオフ 平均+3 SD	%- 陽性 カットオフ 99th %	%- 陽性 カットオフ 平均+3SD	N 陽性 >TB 平均	%- 陽性 >TB 平均	CTR- RM00 1	CTR- RM00 2	CTR- RM00 3	CTR- RM00 4	CTR- RM00 5	CTR- RM00 6	CTR- RM00 7	CTR- RM00 8		
Seq ID#88	0.304	0.00003	9	8	81.82%	72.73%	4	36.36%	0.098	0.115	0.135	0.120	0.045	0.064	0.071	0.081		
Seq ID#89	0.035	0.00150	4	2	36.36%	18.18%	5	45.45%	0.041	0.029	0.021	0.023	0.010	0.000	0.039	0.017		
Seq ID#90	0.053	0.00055	7	6	63.64%	54.55%	6	54.55%	0.014	0.047	0.053	0.011	0.030	0.005	0.047	0.021		
Seq ID#91	0.095	0.07773	2	1	18.18%	9.09%	2	18.18%	0.058	0.043	0.027	0.042	0.019	0.000	0.016	0.025		
Seq ID#92	0.069	0.04558	3	1	27.27%	9.09%	5	45.45%	0.052	0.047	0.041	0.070	0.021	0.023	0.023	0.048		
Seq ID#93	0.026	0.11506	1	1	9.09%	9.09%	5	45.45%	0.033	0.036	0.030	0.037	0.021	0.004	0.007	0.045		
Seq ID#94	0.051	0.00551	6	5	54.55%	45.45%	5	45.45%	0.039	0.054	0.054	0.045	0.025	0.030	0.000	0.049		
Seq ID#95	0.085	0.00001	11	10	100.00%	90.91%	4	36.36%	0.048	0.043	0.055	0.069	0.035	0.020	0.000	0.009		

10

20

30

40

TB 血清										対照血清-IGRA陰性							
Seq ID NO	標準 偏差	マン ホイットニー 検定 p値対照	N 陽性 カットオフ 99th %	N 陽性 カットオフ 平均 +3 SD	%- 陽性 カットオフ 99th %	%- 陽性 カットオフ 平均 +3SD	N 陽性 >TB 平均	%- 陽性 >TB 平均	CTR- RM00 1	CTR- RM00 2	CTR- RM00 3	CTR- RM00 4	CTR- RM00 5	CTR- RM00 6	CTR- RM00 7	CTR- RM00 8	
Seq ID#96	0.057	0.00065	8	5	72.73%	45.45%	3	27.27%	0.061	0.046	0.052	0.044	0.021	0.007	0.000	0.055	
Seq ID#97	0.036	0.00683	5	2	45.45%	18.18%	4	36.36%	0.067	0.049	0.041	0.063	0.016	0.002	0.000	0.045	
Seq ID#98	0.122	0.00001	11	10	100.00%	90.91%	4	36.36%	0.048	0.009	0.010	0.019	0.039	0.015	0.018	0.033	
Seq ID#99	0.075	0.00003	9	7	81.82%	63.64%	3	27.27%	0.036	0.039	0.041	0.007	0.024	0.013	0.038	0.033	
Seq ID#100	0.054	0.00022	9	6	81.82%	54.55%	4	36.36%	0.040	0.046	0.039	0.062	0.021	0.001	0.006	0.028	
		タンパク質反応性	11.000			100.00%	11	100.00%									
Seq ID#101	0.050	0.00001	11	9	100.00%	81.82%	3	27.27%	0.022	0.044	0.019	0.055	0.027	0.010	0.033	0.030	
Seq ID#102	0.042	0.00013	8	5	72.73%	45.45%	3	27.27%	0.021	0.041	0.039	0.052	0.030	0.006	0.061	0.024	
Seq ID#103	0.049	0.00003	9	5	81.82%	45.45%	3	27.27%	0.043	0.038	0.035	0.037	0.017	0.007	0.058	0.026	

10

20

30

40

TB 血清							対照血清-IGRA陰性									
Seq ID NO	標準 偏差	マン ホイットニー 検定 p値対照	N 陽性 カットオフ 99th%	N 陽性 カットオフ 平均 +3 SD	%- 陽性 カットオフ 99th%	%- 陽性 カットオフ 平均 +3SD	N 陽性 >TB 平均	%- 陽性 >TB 平均	CTR- RM00 1	CTR- RM00 2	CTR- RM00 3	CTR- RM00 4	CTR- RM00 5	CTR- RM00 6	CTR- RM00 7	CTR- RM00 8
		タンパク質反応性		9.000		81.82%	6	54.55%								
Seq ID#104	0.061	0.00001	11	11	100.00%	100.00%	4	36.36%	0.018	0.056	0.034	0.048	0.021	0.045	0.023	0.053
		タンパク質反応性		11.000		100.00%	4	36.36%								
Seq ID#105	0.068	0.00002	10	8	90.91%	72.73%	6	54.55%	0.011	0.009	0.037	0.044	0.026	0.007	0.007	0.035
Seq ID#106	0.031	0.00091	4	3	36.36%	27.27%	4	36.36%	0.036	0.033	0.022	0.023	0.015	0.000	0.045	0.032
Seq ID#107	0.042	0.00018	7	4	63.64%	36.36%	4	36.36%	0.027	0.002	0.032	0.018	0.019	0.000	0.003	0.034
Seq ID#108	0.050	0.00038	5	5	45.45%	45.45%	5	45.45%	0.003	0.042	0.005	0.029	0.011	0.000	0.036	0.035
Seq ID#109	0.059	0.00050	8	6	72.73%	54.55%	6	54.55%	0.000	0.049	0.048	0.007	0.020	0.005	0.024	0.035
Seq ID#110	0.087	0.00002	9	9	81.82%	81.82%	4	36.36%	0.000	0.019	0.008	0.000	0.000	0.004	0.000	0.024

10

20

30

40

TB 血清										対照血清-IGRA陰性							
Seq ID NO	標準 偏差	マン ホイットニー 検定 p値対照	N 陽性 カットオフ 99th %	N 陽性 カットオフ 平均+3 SD	%- 陽性 カットオフ 99th %	%- 陽性 カットオフ 平均+3SD	N 陽性 >TB 平均	%- 陽性 >TB 平均	CTR- RM00 1	CTR- RM00 2	CTR- RM00 3	CTR- RM00 4	CTR- RM00 5	CTR- RM00 6	CTR- RM00 7	CTR- RM00 8	
Seq ID#111	0.031	0.00015	5	5	45.45%	45.45%	5	45.45%	0.012	0.036	0.022	0.026	0.006	0.000	0.048	0.021	
Seq ID#112	0.024	0.00065	4	3	36.36%	27.27%	5	45.45%	0.030	0.037	0.022	0.009	0.003	0.000	0.036	0.022	
		タンパク質反応性	11.000			100.00%	9	81.82%									
Seq ID#113	0.039	0.00009	8	5	72.73%	45.45%	5	45.45%	0.010	0.000	0.044	0.005	0.034	0.012	0.013	0.016	
Seq ID#114	0.025	0.04558	3	1	27.27%	9.09%	6	54.55%	0.021	0.000	0.014	0.027	0.016	0.001	0.050	0.017	
Seq ID#115	0.077	0.00042	9	9	81.82%	81.82%	3	27.27%	0.025	0.000	0.037	0.051	0.022	0.018	0.006	0.028	
Seq ID#116	0.042	0.00010	9	7	81.82%	63.64%	5	45.45%	0.031	0.000	0.022	0.049	0.025	0.017	0.010	0.027	
Seq ID#117	0.061	0.00150	8	5	72.73%	45.45%	4	36.36%	0.036	0.012	0.033	0.038	0.037	0.004	0.011	0.041	

10

20

30

40

TB 血清										対照血清-IGRA陰性							
Seq ID NO	標準 偏差	マン ホイットニー 検定 p値対照	N 陽性 カットオフ 99th%	N 陽性 カットオフ 平均+3 SD	%- 陽性 カットオフ 99th%	%- 陽性 カットオフ 平均+3SD	N 陽性 >TB 平均	%- 陽性 >TB 平均	CTR- RM00 1	CTR- RM00 2	CTR- RM00 3	CTR- RM00 4	CTR- RM00 5	CTR- RM00 6	CTR- RM00 7	CTR- RM00 8	
Seq ID#118	0.030	0.00787	4	3	36.36%	27.27%	4	36.36%	0.037	0.023	0.026	0.025	0.014	0.000	0.000	0.034	
Seq ID#119	0.053	0.00004	9	5	81.82%	45.45%	4	36.36%	0.049	0.037	0.036	0.008	0.021	0.001	0.009	0.052	
Seq ID#120	0.028	0.00009	6	6	54.55%	54.55%	6	54.55%	0.028	0.009	0.027	0.012	0.020	0.004	0.007	0.032	
		タンパク質反応性	11.000			100.00%	9	81.82%									
Seq ID#121	0.049	0.00117	7	2	63.64%	18.18%	4	36.36%	0.006	0.004	0.023	0.035	0.023	0.008	0.043	0.025	
Seq ID#122	0.068	0.00004	10	8	90.91%	72.73%	6	54.55%	0.011	0.058	0.048	0.013	0.036	0.034	0.014	0.044	
Seq ID#123	0.247	0.00013	6	6	54.55%	54.55%	2	18.18%	0.008	0.003	0.014	0.030	0.002	0.000	0.052	0.002	

10

20

30

40

TB 血清							対照血清-IGRA陰性									
Seq ID NO	標準偏差	マンホイットニー検定p値対照	N 陽性カットオフ 99th %	N 陽性カットオフ 平均 +3 SD	%-陽性カットオフ 99th %	%-陽性カットオフ 平均 +3SD	N 陽性 >TB 平均	%-陽性 >TB 平均	CTR-RM00 1	CTR-RM00 2	CTR-RM00 3	CTR-RM00 4	CTR-RM00 5	CTR-RM00 6	CTR-RM00 7	CTR-RM00 8
Seq ID#124	0.154	0.00059	7	6	63.64%	54.55%	3	27.27%	0.035	0.021	0.011	0.017	0.005	0.004	0.036	0.019
Seq ID#125																
Seq ID#126																
Seq ID#127																
Seq ID#128																
Seq ID#129	0.142	0.00004	9	5	81.82%	45.45%	3	27.27%	0.007	0.047	0.050	0.006	0.040	0.020	0.000	0.000
Seq ID#130	0.038	0.00176	6	4	54.55%	36.36%	4	36.36%	0.035	0.044	0.058	0.080	0.026	0.013	0.000	0.024

10

20

30

40

TB 血清										対照血清-IGRA陰性						
Seq ID NO	標準 偏差	マン ホイットニー 検定 p値対照	N 陽性 カットオフ 99th %	N 陽性 カットオフ 平均 +3 SD	%- 陽性 カットオフ 99th %	%- 陽性 カットオフ 平均 +3SD	N 陽性 >TB 平均	%- 陽性 >TB 平均	CTR- RM00 1	CTR- RM00 2	CTR- RM00 3	CTR- RM00 4	CTR- RM00 5	CTR- RM00 6	CTR- RM00 7	CTR- RM00 8
Seq ID#131	0.029	0.00077	5	3	45.45%	27.27%	5	45.45%	0.043	0.041	0.021	0.024	0.013	0.004	0.023	0.030
Seq ID#132	0.070	0.00127	5	4	45.45%	36.36%	4	36.36%	0.009	0.003	0.045	0.023	0.031	0.013	0.007	0.021
Seq ID#133	0.055	0.00206	5	5	45.45%	45.45%	5	45.45%	0.009	0.014	0.051	0.066	0.028	0.004	0.000	0.000
Seq ID#134	0.049	0.00002	9	8	81.82%	72.73%	6	54.55%	0.008	0.004	0.023	0.012	0.045	0.029	0.012	0.052
Seq ID#135	0.053	0.00018	9	5	81.82%	45.45%	5	45.45%	0.011	0.023	0.053	0.000	0.035	0.014	0.009	0.039
Seq ID#136	0.054	0.00006	9	8	81.82%	72.73%	6	54.55%	0.013	0.005	0.051	0.001	0.023	0.022	0.017	0.052
		タンパク質反応性	11.000	100.00%	100.00%	100.00%	10	90.91%								
SEQ ID#137	0.073	0.00006	6	6	54.55%	54.55%	4	36.36%	0.053	0.035	0.008	0.001	0.004	0.000	0.026	0.012
SEQ ID#138	0.046	0.00513	7	3	63.64%	27.27%	4	36.36%	0.035	0.050	0.048	0.056	0.029	0.003	0.028	0.017

10

20

30

40

TB 血清							対照血清-IGRA陰性									
Seq ID NO	標準 偏差	マン ホイットニー 検定 p値対照	N 陽性 カットオフ 99th%	N 陽性 カットオフ 平均 +3 SD	%- 陽性 カットオフ 99th%	%- 陽性 カットオフ 平均 +3SD	N 陽性 >TB 平均	%- 陽性 >TB 平均	CTR- RM00 1	CTR- RM00 2	CTR- RM00 3	CTR- RM00 4	CTR- RM00 5	CTR- RM00 6	CTR- RM00 7	CTR- RM00 8
SEQ ID#139	0.025	0.00027	6	3	54.55%	27.27%	5	45.45%	0.051	0.039	0.018	0.014	0.017	0.000	0.029	0.020
SEQ ID#140	0.049	0.00328	5	4	45.45%	36.36%	5	45.45%	0.044	0.000	0.033	0.040	0.021	0.000	0.059	0.021
SEQ ID#141	0.039	0.00022	10	7	90.91%	63.64%	6	54.55%	0.013	0.000	0.039	0.045	0.019	0.031	0.029	0.043
		タンパク質反応性	8.000			72.73%	7	63.64%								

10

20

30

40

対照血清-IGRA陽性					対照			カットオフ閾値						
Seq ID NO	CTR- RM00 9	CTR- RM01 0	CTR- RM01 1	CTR- RM01 2	LTBI- S015	LTBI- S016	LTBI- S017	LTBI- RM00 7	LTBI- RM00 8	平均	中央値	標準 偏差	99th パーセンタイル	平均 + 3SD
Seq ID#88	0.057	0.108	0.099	0.029	0.188	0.121	0.177	0.214	0.059	0.105	0.099	0.052	0.210	0.260
Seq ID#89	0.020	0.016	0.001	0.004	0.015	0.049	0.053	0.075	0.034	0.026	0.021	0.020	0.071	0.087
Seq ID#90	0.046	0.040	0.017	0.017	0.049	0.068	0.048	0.065	0.035	0.036	0.040	0.019	0.068	0.093
Seq ID#91	0.020	0.019	0.011	0.015	0.040	0.066	0.052	0.058	0.028	0.031	0.027	0.019	0.065	0.089
Seq ID#92	0.044	0.038	0.034	0.038	0.069	0.093	0.089	0.079	0.057	0.051	0.047	0.022	0.092	0.118
Seq ID#93	0.037	0.029	0.015	0.018	0.053	0.085	0.047	0.048	0.041	0.034	0.036	0.019	0.079	0.092
Seq ID#94	0.038	0.044	0.027	0.046	0.066	0.084	0.047	0.060	0.035	0.043	0.045	0.019	0.081	0.099
Seq ID#95	0.045	0.043	0.031	0.051	0.038	0.061	0.048	0.039	0.048	0.040	0.043	0.018	0.068	0.093

10

20

30

対照血清-IGRA陽性					対照			カットオフ閾値						
Seq ID NO	CTR- RM00 9	CTR- RM01 0	CTR- RM01 1	CTR- RM01 2	LTBI- S015	LTBI- S016	LTBI- S017	LTBI- RM00 7	LTBI- RM00 8	平均	中央値	標準 偏差	99th パーセンタイル	平均+ 3SD
Seq ID#96	0.039	0.040	0.025	0.044	0.044	0.024	0.059	0.067	0.038	0.039	0.044	0.019	0.066	0.095
Seq ID#97	0.050	0.036	0.016	0.041	0.037	0.059	0.044	0.041	0.044	0.038	0.041	0.019	0.066	0.096
Seq ID#98	0.053	0.067	0.037	0.056	0.081	0.069	0.061	0.108	0.053	0.046	0.048	0.027	0.104	0.127
Seq ID#99	0.033	0.030	0.023	0.031	0.025	0.062	0.045	0.062	0.027	0.033	0.033	0.014	0.062	0.077
Seq ID#100	0.036	0.029	0.028	0.047	0.041	0.044	0.051	0.024	0.049	0.035	0.039	0.016	0.060	0.082
Seq ID#101	0.042	0.027	0.008	0.042	0.026	0.051	0.054	0.039	0.041	0.033	0.033	0.014	0.055	0.076
Seq ID#102	0.025	0.023	0.020	0.035	0.054	0.046	0.051	0.044	0.035	0.036	0.035	0.015	0.060	0.080
Seq ID#103	0.023	0.018	0.006	0.040	0.034	0.046	0.037	0.061	0.033	0.033	0.035	0.016	0.061	0.079

10

20

30

対照血清-IGRA陽性					対照			カットオフ閾値						
Seq ID NO	CTR- RM00 9	CTR- RM01 0	CTR- RM01 1	CTR- RM01 2	LTBI- S015	LTBI- S016	LTBI- S017	LTBI- RM00 7	LTBI- RM00 8	平均	中央値	標準 偏差	99th パーセンタイル	平均+ 3SD
Seq ID#104	0.024	0.031	0.031	0.034	0.031	0.044	0.044	0.037	0.050	0.037	0.034	0.012	0.055	0.072
Seq ID#105	0.037	0.038	0.034	0.004	0.053	0.038	0.048	0.044	0.056	0.031	0.037	0.017	0.055	0.082
Seq ID#106	0.023	0.015	0.021	0.022	0.017	0.047	0.019	0.068	0.028	0.027	0.023	0.016	0.065	0.074
Seq ID#107	0.009	0.026	0.022	0.044	0.037	0.049	0.044	0.071	0.039	0.028	0.027	0.019	0.067	0.084
Seq ID#108	0.019	0.026	0.019	0.038	0.047	0.041	0.035	0.092	0.045	0.031	0.035	0.022	0.085	0.096
Seq ID#109	0.040	0.037	0.024	0.005	0.074	0.082	0.055	0.065	0.052	0.036	0.037	0.025	0.081	0.111
Seq ID#110	0.029	0.000	0.045	0.041	0.044	0.057	0.063	0.031	0.048	0.024	0.024	0.022	0.062	0.091

10

20

30

対照血清-IGRA陽性					対照			カットオフ 閾値						
Seq ID NO	CTR- RM00 9	CTR- RM01 0	CTR- RM01 1	CTR- RM01 2	LTBI- S015	LTBI- S016	LTBI- S017	LTBI- RM00 7	LTBI- RM00 8	平均	中央値	標準 偏差	99th パーセンタイル	平均+ 3SD
Seq ID#111	0.013	0.000	0.009	0.024	0.026	0.022	0.024	0.064	0.030	0.022	0.022	0.016	0.061	0.072
Seq ID#112	0.012	0.016	0.008	0.008	0.014	0.030	0.016	0.008	0.067	0.020	0.016	0.017	0.062	0.069
Seq ID#113	0.024	0.041	0.016	0.025	0.062	0.009	0.049	0.079	0.046	0.028	0.024	0.022	0.076	0.094
Seq ID#114	0.020	0.017	0.008	0.008	0.017	0.039	0.041	0.056	0.028	0.022	0.017	0.016	0.055	0.070
Seq ID#115	0.007	0.026	0.022	0.026	0.037	0.061	0.021	0.042	0.039	0.027	0.026	0.016	0.059	0.075
Seq ID#116	0.003	0.038	0.023	0.038	0.036	0.016	0.014	0.007	0.047	0.024	0.023	0.015	0.048	0.068
Seq ID#117	0.028	0.029	0.006	0.012	0.037	0.054	0.044	0.065	0.049	0.031	0.036	0.017	0.063	0.084

10

20

30

対照血清-IGRA陽性					対照			カットオフ閾値						
Seq ID NO	CTR- RM00 9	CTR- RM01 0	CTR- RM01 1	CTR- RM01 2	LTBI- S015	LTBI- S016	LTBI- S017	LTBI- RM00 7	LTBI- RM00 8	平均	中央値	標準 偏差	99th パーセンタイル	平均+ 3SD
Seq ID#118	0.021	0.020	0.006	0.014	0.021	0.057	0.044	0.048	0.030	0.024	0.023	0.016	0.055	0.072
Seq ID#119	0.034	0.033	0.018	0.049	0.044	0.060	0.036	0.054	0.029	0.033	0.036	0.017	0.059	0.085
Seq ID#120	0.030	0.027	0.011	0.011	0.058	0.006	0.032	0.002	0.031	0.020	0.020	0.014	0.053	0.064
Seq ID#121	0.021	0.001	0.004	0.005	0.012	0.039	0.031	0.022	0.035	0.020	0.022	0.014	0.042	0.061
Seq ID#122	0.058	0.019	0.008	0.047	0.062	0.056	0.047	0.078	0.053	0.040	0.047	0.021	0.075	0.103
Seq ID#123	0.005	0.024	0.020	0.000	0.002	0.030	0.033	0.004	0.005	0.014	0.005	0.015	0.049	0.059

10

20

30

対照血清-IgRA陽性					対照				カットオフ閾値					
Seq ID NO	CTR- RM00 9	CTR- RM01 0	CTR- RM01 1	CTR- RM01 2	LTBI- S015	LTBI- S016	LTBI- S017	LTBI- RM00 7	LTBI- RM00 8	平均	中央値	標準 偏差	99th パーセンタイル	平均+ 3SD
Seq ID#124	0.027	0.017	0.014	0.006	0.029	0.031	0.001	0.006	0.008	0.017	0.017	0.011	0.036	0.051
Seq ID#125														
Seq ID#126														
Seq ID#127														
Seq ID#128														
Seq ID#129	0.007	0.043	0.009	0.034	0.080	0.070	0.073	0.082	0.039	0.036	0.039	0.029	0.082	0.121
Seq ID#130	0.003	0.009	0.002	0.037	0.065	0.068	0.072	0.083	0.036	0.038	0.036	0.028	0.082	0.123

対照血清-IGRA陽性					対照			カットオフ閾値						
Seq ID NO	CTR- RM00 9	CTR- RM01 0	CTR- RM01 1	CTR- RM01 2	LTBI- S015	LTBI- S016	LTBI- S017	LTBI- RM00 7	LTBI- RM00 8	平均	中央値	標準 偏差	99th パーセンタイル	平均+ 3SD
Seq ID#131	0.009	0.018	0.017	0.026	0.018	0.041	0.032	0.070	0.051	0.028	0.024	0.017	0.067	0.078
Seq ID#132	0.035	0.034	0.028	0.031	0.032	0.071	0.063	0.007	0.005	0.027	0.028	0.020	0.070	0.085
Seq ID#133	0.001	0.033	0.031	0.028	0.058	0.092	0.077	0.084	0.048	0.037	0.031	0.031	0.090	0.128
Seq ID#134	0.007	0.041	0.040	0.006	0.044	0.010	0.053	0.082	0.009	0.028	0.023	0.022	0.077	0.095
Seq ID#135	0.049	0.041	0.037	0.031	0.066	0.045	0.019	0.068	0.040	0.034	0.037	0.019	0.068	0.092
Seq ID#136	0.042	0.024	0.031	0.044	0.004	0.031	0.006	0.019	0.052	0.026	0.023	0.017	0.052	0.078
SEQ ID#137	0.006	0.012	0.002	0.010	0.015	0.035	0.038	0.062	0.024	0.020	0.012	0.019	0.061	0.076
SEQ ID#138	0.018	0.025	0.004	0.039	0.034	0.047	0.035	0.022	0.041	0.031	0.034	0.015	0.055	0.077

10

20

30

Seq ID NO	CTR- RM00 9	CTR- RM01 0	CTR- RM01 1	CTR- RM01 2	対照血清-IGRA陽性					対照			カットオフ閾値	
					LTBI- S015	LTBI- S016	LTBI- S017	LTBI- RM00 7	LTBI- RM00 8	平均	中央値	標準 偏差	99th パーセンタイル	平均 + 3SD
SEQ ID#139	0.017	0.011	0.004	0.007	0.037	0.029	0.035	0.057	0.030	0.024	0.020	0.016	0.056	0.072
SEQ ID#140	0.028	0.020	0.007	0.016	0.028	0.023	0.015	0.045	0.025	0.025	0.023	0.016	0.057	0.072
SEQ ID#141	0.047	0.037	0.050	0.032	0.027	0.037	0.036	0.038	0.033	0.033	0.036	0.013	0.049	0.070

【 0 1 6 7 】

本発明のさらなる局面

- 1) 結核菌の感染または疾患を検出するためのインビトロ検査におけるバイオマーカーとしての、結核菌に由来し、かつ少なくとも1つのT細胞エピトープまたはB細胞エピトープを単独で、もしくはグループで含む7種のタンパク質のうちの任意のタンパク質の使用、または7種のタンパク質のうちの任意のタンパク質と他の結核菌タンパク質との使用であって、前記タンパク質がSeqID#1～#7からなる群より選択される、使用。
- 2) 7種のタンパク質にある任意のT細胞エピトープが、結核菌の感染または疾患を検出するためのインビトロ検査におけるバイオマーカーとして、単一の抗原として単独で、もしくはグループで、または他のタンパク質抗原と共同で用いられ、前記タンパク質エピトープがSeqID#8～#87からなる群より選択される、項目1記載の使用。
- 3) 7種のタンパク質にある任意のB細胞エピトープ(連続もしくは不連続)または任意のミトトープエピトープが、結核菌の感染または疾患を検出するためのインビトロ検査における

10

20

30

40

50

バイオマーカーとして、単一の抗原として単独で、もしくはグループで、または他のタンパク質抗原と共同で用いられ、前記タンパク質エピトープがSeqID#88～#136からなる群より選択される、項目1記載の使用。

4) タンパク質のホモログまたはオルソログが全体、一部、断片、または80%もしくは80%超の配列相同性をもつ相同性断片として用いられる、項目1、2、および3記載の使用。相同性は以下のように定義される:

a. 最適にアラインメントされた後に、項目1～3にあるタンパク質もしくはペプチドの1つと比較して少なくとも80%の類似性をもつアミノ酸配列;または

b. B細胞エピトープおよび/またはT細胞エピトープ(seqID#8-136)またはその化学的類似体を含む、項目1～3において定義されたタンパク質およびペプチドのペプチド断片。

5) 対象においてマイコバクテリウム(*Mycobacterium*)感染を検出するためのインビトロ検査における項目1～4のいずれか一項記載の使用。

6) マイコバクテリウム種が、結核菌(*M. tuberculosis*)、*M. bovis* (*M. bovis*)、*M. bovis* BCG、*M. africanum* (*M. africanum*)、*M. canettii* (*M. canettii*)、*M. caprae* (*M. caprae*)、*M. microti* (*M. microti*)、*M. pinnipedii* (*M. pinnipedii*)、*M. avium* (*M. avium*)、*M. avium paratuberculosis* (*M. avium paratuberculosis*)、*M. avium silvaticum* (*M. avium silvaticum*)、*M. avium*・「*hominissuis*」(*M. avium "hominissuis"*)、*M. colombiense* (*M. colombiense*)、*M. asiaticum* (*M. asiaticum*)、*M. gordonae* (*M. gordonae*)、*M. gastri* (*M. gastri*)、*M. kansasii* (*M. kansasii*)、*M. hiberniae* (*M. hiberniae*)、*M. nonchromogenicum* (*M. nonchromogenicum*)、*M. terrae* (*M. terrae*)、*M. triviale* (*M. triviale*)、*M. ulcerans* (*M. ulcerans*)、*M. pseudoshottsii* (*M. pseudoshottsii*)、*M. shottsii* (*M. shottsii*)、*M. triplex* (*M. triplex*)、*M. genavense* (*M. genavense*)、*M. florentinum* (*M. florentinum*)、*M. lentiflavum* (*M. lentiflavum*)、*M. palustre* (*M. palustre*)、*M. kubicae* (*M. kubicae*)、*M. parascrofulaceum* (*M. parascrofulaceum*)、*M. heidelbergense* (*M. heidelbergense*)、*M. interjectum* (*M. interjectum*)、*M. simiae* (*M. simiae*)、*M. branderi* (*M. branderi*)、*M. cookii* (*M. cookii*)、*M. celatum* (*M. celatum*)、*M. bohemum* (*M. bohemum*)、*M. haemophilum* (*M. haemophilum*)、*M. malmoense* (*M. malmoense*)、*M. szulgai* (*M. szulgai*)、*M. leprae* (*M. leprae*)、*M. lepraemurium* (*M. lepraemurium*)、*M. lepromatosis* (*M. lepromatosis*)、*M. africanum*、*M. botniense* (*M. botniense*)、*M. chimaera* (*M. chimaera*)、*M. conspicuum* (*M. conspicuum*)、*M. doricum* (*M. doricum*)、*M. farcinogenes* (*M. farcinogenes*)、*M. heckeshornense* (*M. heckeshornense*)、*M. intracellulare* (*M. intracellulare*)、*M. lacus* (*M. lacus*)、*M. marinum* (*M. marinum*)、*M. monacense* (*M. monacense*)、*M. montefiorensis* (*M. montefiorensis*)、*M. murale* (*M. murale*)、*M. nebraskense* (*M. nebraskense*)、*M. saskatchewanense* (*M. saskatchewanense*)、*M. scrofulaceum* (*M. scrofulaceum*)、*M. shimoidei* (*M. shimoidei*)、*M. tusciae* (*M. tusciae*)、*M. xenopi* (*M. xenopi*)、*M. intermedium* (*M. intermedium*)、*M. abscessus* (*M. abscessus*)、*M. chelonae* (*M. chelonae*)、*M. bolletii* (*M. bolletii*)、*M. fortuitum* (*M. fortuitum*)、*M. fortuitum* subsp. *acetamidolyticum* (*M. fortuitum subsp. acetamidolyticum*)、*M. boenickei* (*M. boenickei*)、*M. peregrinum* (*M. peregrinum*)、*M. porcinum* (*M. porcinum*)、*M. senegalense* (*M. senegalense*)、*M. septicum* (*M. septicum*)、*M. neworleansense* (*M. neworleansense*)、*M. houstonense* (*M. houstonense*)、*M. mucogenicum* (*M. mucogenicum*)、*M. mageritense* (*M. mageritense*)、*M. brisbanense* (*M. brisbanense*)、*M. cosmeticum* (*M. cosmeticum*)、*M. parafortuitum* (*M. parafortuitum*)、*M. austroafricanum* (*M. austroafricanum*)、*M. diernhoferi* (*M. diernhoferi*)、*M. hoderli* (*M. hoderli*)、*M. neoaurum* (*M. neoaurum*)、*M. frederiksbergense* (*M. frederiksbergense*)、*M. aurum* (*M. aurum*)、*M. vaccae* (*M. vaccae*)、*M. chitae* (*M. chitae*)、*M. fallax* (*M. fallax*)、*M. confluentis* (*M. confluentis*)、*M. flavescens* (*M. flavescens*)、*M. madagascariensis* (*M. madagascariensis*)、*M. phlei* (*M. phlei*)、*M. smegmatis* (*M. smegmatis*)、*M. goodii* (*M. goodii*)、*M. wolinskyi* (*M. wolinskyi*)、*M. thermoresistibile* (*M. thermoresistibile*)、*M. gadium* (*M. gadium*)、*M. komossense* (*M. komossense*)、*M. obuense* (*M. obuense*)、*M. sf*

10

20

30

40

50

アグニ (M.sphagni)、M. アグリ (M.agri)、M. アイキエンス (M.aichiense)、M. アルベイ (M.alvei)、M. アルペンス (M.arupense)、M. ブルマエ (M.brumae)、M. カナリアセンス (M.canariase)、M. チュブエンス (M.chubuense)、M. コンセプトチオネンス (M.conceptionense)、M. ドゥバリ (M.duvalii)、M. エレファンティス (M.elephantis)、M. ギルバム (M.gilvum)、M. ハシアカム (M.hassiacum)、M. ホルサチカム (M.holsaticum)、M. イムノゲナム (M.immunogenum)、M. マシリエンス (M.massiliense)、M. モリオカエンス (M.moriokaense)、M. サイクロトレランス (M.psychrotolerans)、M. ピレニボランス (M.pyrenivorans)、M. ヴァンバレニ (M.vanbaalenii)、M. プルベリス (M.pulveris)、M. アロシエンス (M.ariosiense)、M. アブバグネンス (M.aubagnense)、M. カブラエ (M.caprae)、M. クロロフェノリカム (M.chlorophenolicum)、M. フルオロアンテナボランス (M.fluoroanthenivorans)、M. クマモトネンス (M.kumamotonense)、M. ノボカストレンス (M.novocastrense)、M. パルメンス (M.parmense)、M. フォカイカム (M.phocaicum)、M. ポリフェラエ (M.poriferae)、M. ロデシアエ (M.rhodesiae)、M. セオウレンス (M.seoulense)、および M. トカイエンス (M.tokaiense) より選択される、項目5記載の使用。

10

7) マイコバクテリウム種が結核菌群のうちの任意の種である、項目5および6記載の使用

8) 対象がヒトである、項目5～7記載の使用。

9) 対象が非ヒト動物である、項目5～7記載の使用。

10) 項目1記載のタンパク質または項目2および3記載のペプチドをコードする、単離された核酸分子。

11) 項目10記載の核酸分子を含む、ベクター。

20

12) 容器を備えるキットであって、容器が、項目1、2、3、10、11記載の少なくとも1種のタンパク質もしくはペプチドまたは得られた核酸配列を含む、キット。

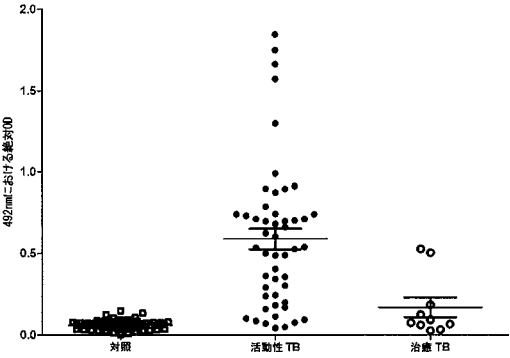
13) 項目1および2について選択された少なくとも1種のバイオマーカーの存在下で、前記対象に由来するリンパ球を含む血液試料をインキュベートする工程を含む、対象または動物においてマイコバクテリウム種による感染をインビトロ診断するための方法。

14) 項目1、3記載のタンパク質、ペプチド、またはミモトープの抗体特異的検出によってインビトロ診断するための方法。

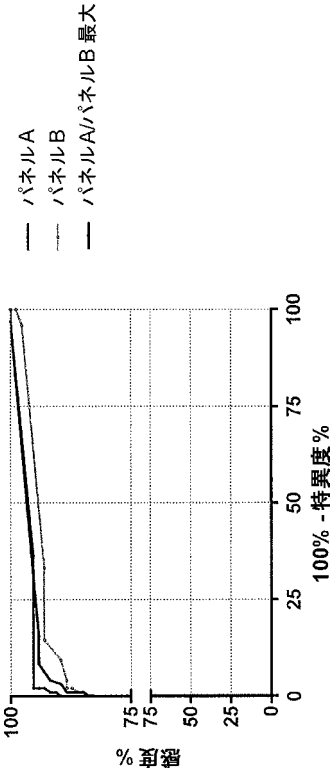
15) 項目1～4について選択された少なくとも1種の薬剤を含むか、または項目1～4について選択された少なくとも1種の薬剤からなる、マイコバクテリウム種による感染を治療または予防するためのワクチン。

30

【図 1】



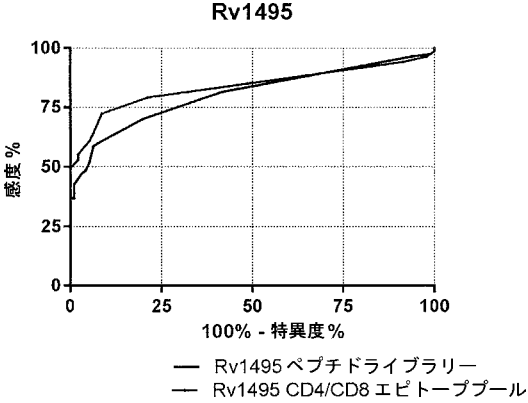
【図 2 A】



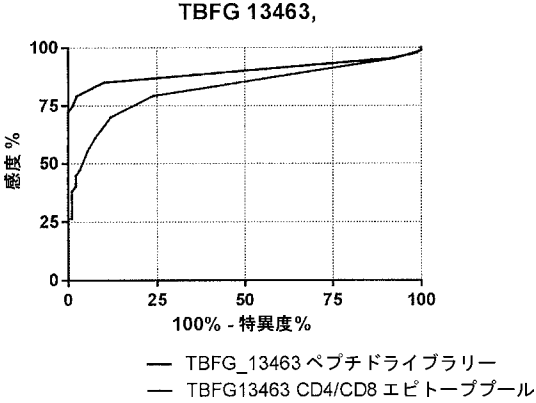
【図 2 B】

カットオフ	感度 %	95%信頼区間 (CI)	特異度 %	95% CI	尤度比
> -0.5000	100	95.85% ~ 100.0%	3.125	0.6491% ~ 8.862%	1.032
> 0.5000	95.4	88.64% ~ 98.73%	63.54	53.09% ~ 73.13%	2.617
> 1.500	95.4	88.64% ~ 98.73%	83.33	74.35% ~ 90.16%	5.724
> 2.500	95.4	88.64% ~ 98.73%	87.5	79.18% ~ 93.37%	7.632
> 3.500	95.4	88.64% ~ 98.73%	93.75	86.89% ~ 97.67%	15.26
> 4.500	95.4	88.64% ~ 98.73%	97.92	92.68% ~ 99.75%	45.79
> 6.000	94.25	87.10% ~ 98.11%	97.92	92.68% ~ 99.75%	45.24
> 7.500	93.1	85.59% ~ 97.43%	97.92	92.68% ~ 99.75%	44.69
> 8.500	91.95	84.12% ~ 96.70%	98.96	94.33% ~ 99.97%	88.28
> 9.500	90.8	82.68% ~ 95.95%	98.96	94.33% ~ 99.97%	87.17
> 11.00	89.66	81.27% ~ 95.16%	100	96.23% ~ 100.0%	

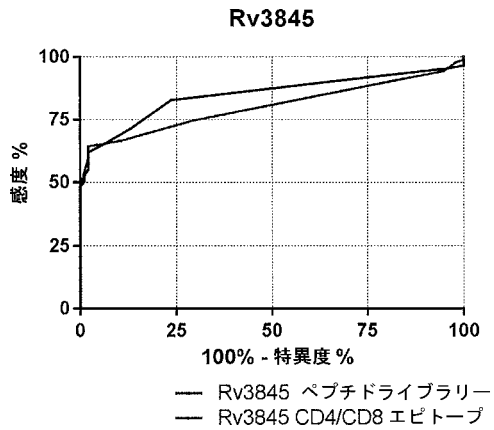
【図 3 A】



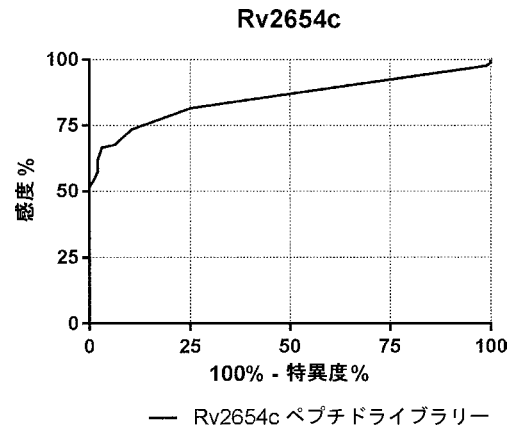
【図 3 B】



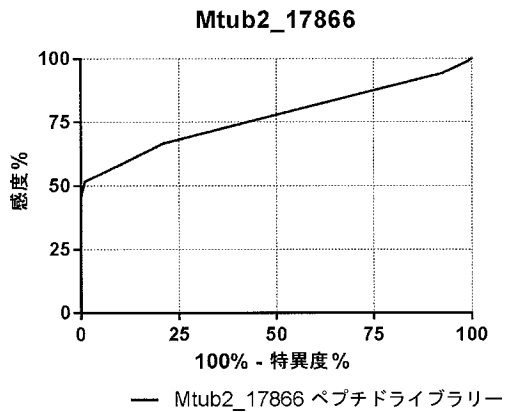
【図 3 C】



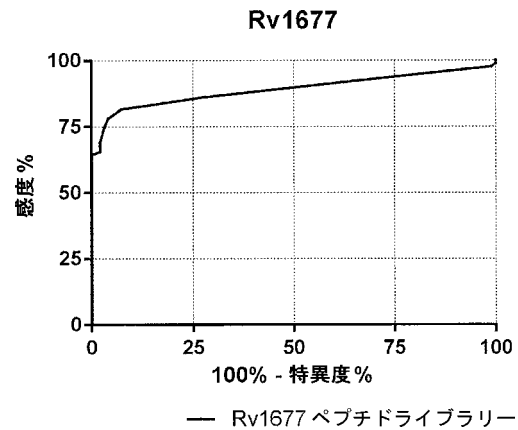
【図 4 B】



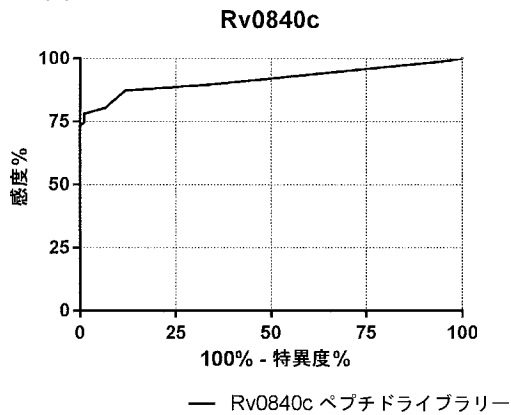
【図 4 A】



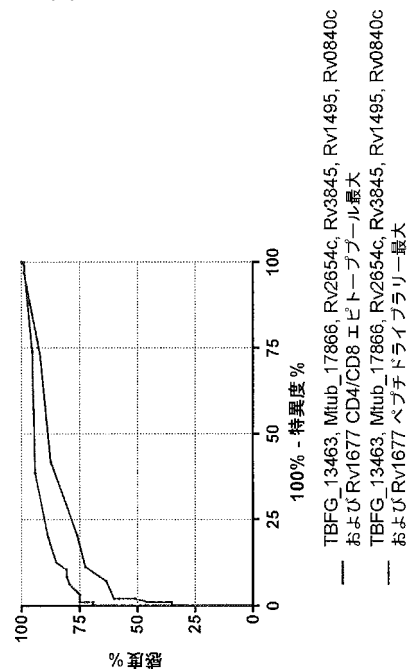
【図 4 C】



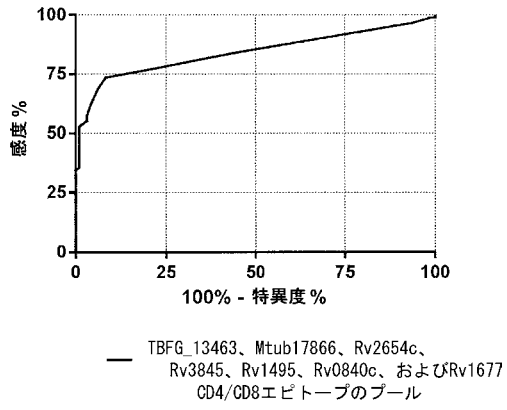
【図 4 D】



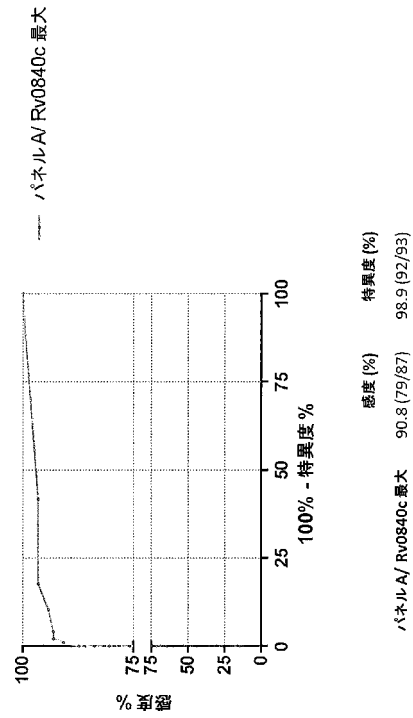
【図 5】



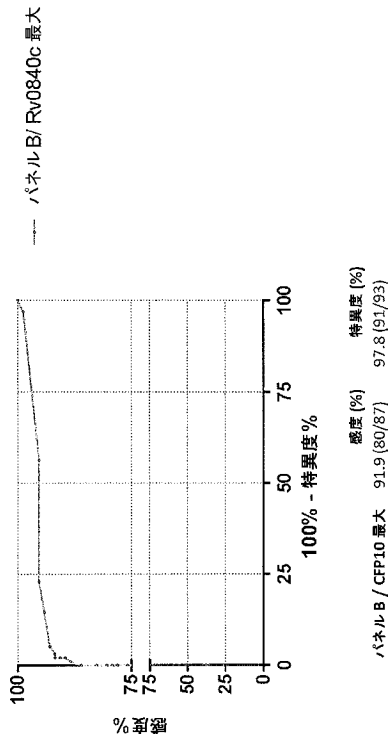
【図 6】



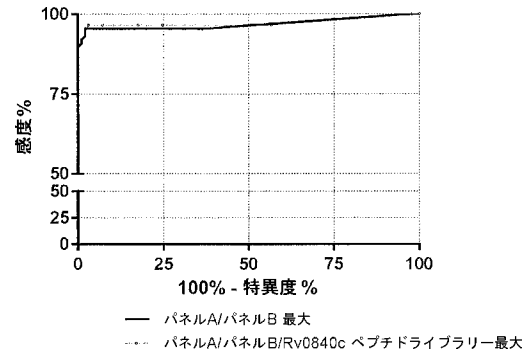
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2017526742000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年4月17日(2017.4.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0141

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0141】

(表15) CD4/CD8エピトーププールRv0840c

VWFQRIGGGPGRPLLVVHGGPGLPH
HSWGGMLAQYVLDKAPDAVS
VSLTIANSTASIP
ASLVSLKSCLDVA
SDFRIVGNVRDWD
SRLEFFESSHMP
DRVMREFLRLHDI
GTIAVPGGRVWFQR
GGRVWFQR
NSACPSDVDLWTM
DVDLWTMNR
AEMATVAEALAL
TVAEALALTR
LTRFHIFSHSW
GMLAQYVLDK
LTIANSTASIPEF
STASIPEFSA
HSAEYQAAIRTW
RTWNETYLCRTRPW
ETYLCRTRPWPR
RPWPRELTEAFAN
TEAFANMGTEIF
LEFFESSHMPF
MPFIEEPARF
DRVMREFLRLHDI

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

本発明はまた、

- 本発明の断片の1つまたは複数を含む、対象において結核菌群感染を診断するためのキット;
- 対象における結核菌群感染の治療または予防において使用するための、前記で定義した(a) ~ (g)の1つまたは複数を含む、組成物;および
- 前記で定義した(a) ~ (g)の1つまたは複数を対象に投与する工程を含む、対象において結

核菌群感染を治療または予防する方法
を提供する。

[本発明1001]

(a)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(b)TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(c)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1つもしくは複数のその断片;(d)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片;(e)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数のその断片;(f)Rv1495(SEQ ID NO:5)または1つもしくは複数のその断片;および(g)Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)または1つもしくは複数のその断片の1つまたは複数に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む、対象において結核菌(Mycobacterium tuberculosis)(M.tuberculosis)群感染を診断するための方法。

[本発明1002]

(i)Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片;(ii)TBFG_13463(SEQ ID NO:1)または1つもしくは複数のその断片;(iii)Rv1677(SEQ ID NO:7)または1つもしくは複数のその断片;(iv)Rv3845(SEQ ID NO:4)または1つもしくは複数のその断片;および(v)Rv2654c(SEQ ID NO:3)または1つもしくは複数のその断片の1つまたは複数に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

Rv0840c(SEQ ID NO:6)または1つもしくは複数のその断片に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含む、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質に対する免疫応答をインビトロで検出する工程をさらに含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1005]

1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質がRD1タンパク質を含む、本発明1004の方法。

[本発明1006]

RD1タンパク質がCFP-10またはESAT-6である、本発明1005の方法。

[本発明1007]

断片の1つまたは複数のプールに対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含み、各プールが、TBFG_13463(SEQ ID NO:1)、Mtub2_17866(SEQ ID NO:2)、Rv2654c(SEQ ID NO:3)、Rv3845(SEQ ID NO:4)、Rv1495(SEQ ID NO:5)、Rv0840c(SEQ ID NO:6)、またはRv1677(SEQ ID NO:7)に由来する2つ以上の断片を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1008]

プールの中の断片が、断片が由来するタンパク質の配列の少なくとも80%をカバーするタンパク質断片ライブラリーを形成する、本発明1007の方法。

[本発明1009]

プールの中の断片が、断片が由来するタンパク質の配列全体をカバーするタンパク質断片ライブラリーを形成する、本発明1008の方法。

[本発明1010]

各プールが、配列が重複する断片を含む、本発明1008または1009の方法。

[本発明1011]

配列が11アミノ酸重複する、本発明1010の方法。

[本発明1012]

前記1つもしくは複数の断片または2つ以上の断片が15アミノ酸長である、前記本発明のいずれかの方法。

[本発明1013]

断片の1つまたは複数が、断片が由来するタンパク質のT細胞エピトープまたはB細胞エピトープを含む、本発明1007の方法。

[本発明1014]

T細胞エピトープがCD4エピトープである、本発明1013の方法。

[本 発 明 1015]

T細胞エピートープがCD8エピートープである、本発明1013の方法。

[本 発 明 1016]

免疫応答がインビトロ細胞性免疫応答である、前記本発明のいずれかの方法。

[本 発 明 1017]

免疫応答がT細胞応答である、前記本発明のいずれかの方法。

[本 発 明 1018]

T細胞応答がサイトカイン分泌またはT細胞増殖である、本発明1017の方法。

[本 発 明 1019]

サイトカイン分泌がインターフェロンガンマ (IFN γ) 分泌である、本発明1018の方法。

[本 発 明 1020]

免疫応答がB細胞応答である、本発明1001～1015のいずれかの方法。

[本 発 明 1021]

B細胞応答が抗体分泌またはB細胞増殖である、本発明1020の方法。

[本 発 明 1022]

免疫応答が、本発明1001の(a)～(g)の1つまたは複数に対する抗体の産生である、本発明1001～1015のいずれかの方法。

[本 発 明 1023]

酵素結合免疫スポットアッセイ (ELISPOT) を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本 発 明 1024]

患者から得られた免疫細胞集団を、本発明1001の(a)～(g)の1つまたは複数と接触させる工程を含む、前記本発明のいずれかの方法。

[本 発 明 1025]

本発明1001の(a)～(g)の2つ以上に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含み、同じ免疫細胞集団を(a)～(g)の2つ以上と接触させる、本発明1024の方法。

[本 発 明 1026]

免疫細胞集団を、本発明1004～1006のいずれかの1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質とさらに接触させる、本発明1024または1025の方法。

[本 発 明 1027]

本発明1001の(a)～(g)の2つ以上に対する免疫応答をインビトロで検出する工程を含み、(a)～(g)の2つ以上のそれぞれを異なる免疫細胞集団と接触させる、本発明1024の方法。

[本 発 明 1028]

本発明1004～1006のいずれかの1種または複数種のさらなる結核菌タンパク質に対する免疫応答をインビトロで検出する工程をさらに含み、さらなる結核菌タンパク質のそれぞれを異なる免疫細胞集団と接触させる、本発明1024または1027の方法。

[本 発 明 1029]

本発明1008～1015のいずれかの断片の1つまたは複数を含む、対象において結核菌 (*M. tuberculosis*) 群感染を診断するためのキット。

[本 発 明 1030]

免疫応答を検出するための手段をさらに備える、本発明1029のキット。

[本 発 明 1031]

対象における結核菌群感染の治療または予防において使用するための、本発明1001の(a)～(g)の1つまたは複数を含む、組成物。

[本 発 明 1032]

本発明1001の(a)～(g)の1つまたは複数を対象に投与する工程を含む、対象において結核菌群感染を治療または予防する方法。

【 手 続 補 正 3 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2017526742000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2015/052362

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/35 A61K38/16 G01N33/569 G01N33/68 ADD.		
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) C07K A61K G01N		
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) EP0-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/004520 A2 (MICROBIOLOGICAL RES AUTHORITY [GB]; JAMES BRIAN WILLIAM [GB]; MARSH PH) 16 January 2003 (2003-01-16) page 11 - page 13; claims 2,25,26; examples 16,17; table 2; sequences 67,68 -----	1-32
Y	WO 2010/010179 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; GLAXO GROUP LTD [GB]; BROWN JAMES [US]) 28 January 2010 (2010-01-28) page 27 - page 30; claims 1-30,60-68,98-103 page 76 - page 79; examples 1-5 -----	1-32
Y	WO 2005/090988 A2 (ISIS INNOVATION [GB]; LALVANI AJIT [GB]) 29 September 2005 (2005-09-29) page 2 - page 3; claims 1-22; table 2 ----- -/--	1-32
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 application or patent but 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
3 November 2015		18/01/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmidt-Yodlee, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/052362

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/000045 A1 (PROTEOME SYSTEMS INTELLECTUAL [AU]; HARCOURT REBECCA LOUISE [AU]; COLE) 5 January 2006 (2006-01-05) page 7 - page 8; claims 32-36,87,88; examples 3,4,6-8 -----	1-32
Y	WO 2007/131293 A1 (PROTEOME SYSTEMS LTD [AU]; COLE ROBERT [AU]; PEDERSEN SUSANNE [AU]) 22 November 2007 (2007-11-22) claims 22-40,79-82; examples 3,7,9-12 -----	1-32
Y	US 2008/171345 A1 (BELISLE JOHN T [US] ET AL) 17 July 2008 (2008-07-17) claims 1-37; examples V, VI -----	1-32
Y	US 7 785 607 B2 (GOLETTI DELIA [IT] ET AL) 31 August 2010 (2010-08-31) claims 1-4; examples 1-3 -----	1-32
Y	N. Y. AL-KHODARI ET AL: "Identification, Diagnostic Potential, and Natural Expression of Immunodominant Seroreactive Peptides Encoded by Five Mycobacterium tuberculosis-Specific Genomic Regions", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 18, no. 3, 1 March 2011 (2011-03-01), pages 477-482, XP055225013, US ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00405-10 the whole document -----	1-32
Y	DAVID M. LEWINSON ET AL: "Human Mycobacterium tuberculosis CD8 T Cell Antigens/Epitopes Identified by a Proteomic Peptide Library", PLOS ONE, vol. 8, no. 6, 21 June 2013 (2013-06-21), page e67016, XP055225006, DOI: 10.1371/journal.pone.0067016 the whole document -----	1-32
Y	JENNIFER E. GRIFFIN ET AL: "High-Resolution Phenotypic Profiling Defines Genes Essential for Mycobacterial Growth and Cholesterol Catabolism", PLOS PATHOGENS, vol. 7, no. 9, 29 September 2011 (2011-09-29), page e1002251, XP055095126, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002251 the whole document ----- -/--	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/052362

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GUSTAVO A DE SOUZA ET AL: "Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway", JOURNAL OF PROTEOMICS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 75, no. 2, 18 August 2011 (2011-08-18), pages 502-510, XP028124876, ISSN: 1874-3919, DOI: 10.1016/J.JPROT.2011.08.016 [retrieved on 2011-09-05] abstract; table 2 -----	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2015/052362

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
3(completely); 1, 2, 4-32(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2015/052362

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 3(completely); 1, 2, 4-32(partially)

method for diagnosing Mycobacterium tuberculosis complex infection in a subject comprising detecting in vitro an immune response to at least Rv0840c (SEQ ID NO: 6) and fragments thereof, kit, composition and medical treatment using at least Rv0840c (SEQ ID NO: 6) and fragments thereof

2. claims: 1, 2, 4-32(all partially)

method for diagnosing Mycobacterium tuberculosis complex infection in a subject comprising detecting in vitro an immune response to at least TBFG 13463 (SEQ ID NO: 1) and fragments thereof, kit, composition and medical treatment using at least TBFG 13463 (SEQ ID NO: 1) and fragments thereof

3. claims: 1, 2, 4-32(all partially)

method for diagnosing Mycobacterium tuberculosis complex infection in a subject comprising detecting in vitro an immune response to at least Rv1677 (SEQ ID NO: 7) and fragments thereof, kit, composition and medical treatment using at least Rv1677 (SEQ ID NO: 7) and fragments thereof

4. claims: 1, 2, 4-32(all partially)

method for diagnosing Mycobacterium tuberculosis complex infection in a subject comprising detecting in vitro an immune response to at least Rv2654c (SEQ ID NO: 3) and fragments thereof, kit, composition and medical treatment using at least Rv2654c (SEQ ID NO: 3) and fragments thereof

5. claims: 1, 2, 4-32(all partially)

method for diagnosing Mycobacterium tuberculosis complex infection in a subject comprising detecting in vitro an immune response to at least Rv3845 (SEQ ID NO: 4) and fragments thereof, kit, composition and medical treatment using at least Rv3845 (SEQ ID NO: 4) and fragments thereof

6. claims: 1, 4-32(all partially)

method for diagnosing Mycobacterium tuberculosis complex infection in a subject comprising detecting in vitro an immune response to at least Rv1495 (SEQ ID NO: 5) and fragments thereof, kit, composition and medical treatment

International Application No. PCT/GB2015/052362

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

using at least Rv1495 (SEQ ID NO: 5) and fragments thereof

7. claims: 1, 4-32(all partially)

method for diagnosing Mycobacterium tuberculosis complex
infection in a subject comprising detecting in vitro an
immune response to at least Mtub2 17866 (SEQ ID NO: 2) and
fragments thereof, kit, composition and medical treatment
using at least Mtub2 17866 (SEQ ID NO: 2) and fragments
thereof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/052362

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03004520	A2	16-01-2003	AU 2002314358 B2 14-08-2008
		AU 2008243118 A1 27-11-2008	
		CA 2453173 A1 16-01-2003	
		EP 1404706 A2 07-04-2004	
		EP 2196473 A1 16-06-2010	
		JP 2005508613 A 07-04-2005	
		US 2004241826 A1 02-12-2004	
		US 2009082296 A1 26-03-2009	
		US 2012034689 A1 09-02-2012	
		WO 03004520 A2 16-01-2003	
WO 2010010179	A1	28-01-2010	AU 2009273132 A1 28-01-2010
		CA 2731547 A1 28-01-2010	
		CN 102165064 A 24-08-2011	
		CO 6351811 A2 20-12-2011	
		EA 201100070 A1 31-10-2011	
		EP 2315834 A1 04-05-2011	
		IL 210589 A 31-05-2015	
		JP 2011528896 A 01-12-2011	
		KR 20110049834 A 12-05-2011	
		UA 107329 C2 25-12-2014	
		US 2011206712 A1 25-08-2011	
		US 2014086948 A1 27-03-2014	
		US 2014314802 A1 23-10-2014	
		WO 2010010179 A1 28-01-2010	
WO 2005090988	A2	29-09-2005	AU 2005224434 A1 29-09-2005
		DK 1735623 T3 13-01-2014	
		EP 1735623 A2 27-12-2006	
		ES 2440470 T3 29-01-2014	
		US 2008305503 A1 11-12-2008	
		WO 2005090988 A2 29-09-2005	
WO 2006000045	A1	05-01-2006	NONE
WO 2007131293	A1	22-11-2007	NONE
US 2008171345	A1	17-07-2008	NONE
US 7785607	B2	31-08-2010	AT 464565 T 15-04-2010
		EP 1723426 A2 22-11-2006	
		US 2007196878 A1 23-08-2007	
		WO 2005080990 A2 01-09-2005	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
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 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 アミコサンテ マッシモ
イタリア共和国 ローマ ヴィア デイ ノーチ 26

(72) 発明者 デュラント イアン
英国 エイチピー 22 5 ユーージェイ バッキンガムシャー ストーク マンデヴィル エスクデール ロード 46

(72) 発明者 タスカー スコット
英国 オーエックス 3 3 ジェイエックス オックスフォードシャー オックスフォード ライマーズ レーン 43

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA06 QA19 QQ96 QR48 QS32 QX01
4C084 AA02 AA03 BA20 BA21 BA22 CA04 NA14 ZB352
4H045 AA11 AA30 BA10 BA14 BA16 BA17 BA18 BA19 BA20 BA21
CA11 DA86 EA20 EA52 FA30

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017526742A5	公开(公告)日	2018-09-20
申请号	JP2017527980	申请日	2015-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	牛津免疫科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛津Imyunotekku有限公司		
[标]发明人	アミコサンテマッシモ デュラントイアン タスカースコット		
发明人	アミコサンテ マッシモ デュラント イアン タスカー スコット		
IPC分类号	C07K14/35 C07K7/06 C07K7/08 A61K38/16 A61P31/06 G01N33/53 G01N33/569 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/5695 G01N2333/35 A61K38/164 A61P31/06 C07K14/35 A61K39/04 G01N33/5091 G01N33/6866 G01N2333/57 G01N2333/70514 G01N2333/70517 G01N2469/10		
FI分类号	C07K14/35.ZNA C07K7/06 C07K7/08 A61K38/16 A61P31/06 G01N33/53.D G01N33/569.F C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QA19 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS32 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/CA04 4C084/NA14 4C084/ZB352 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA20 4H045/BA21 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA52 4H045/FA30		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	111804 2014-08-15 BG 112045 2015-06-30 BG		
其他公开文献	JP2017526742A		

摘要(译)

本发明涉及结核分枝杆菌 (M.tuberculosis) 蛋白及其免疫活性片段 (肽或模拟表位肽) 。 特别地，本发明涉及高抗原性并且对于结核分枝杆菌的临床菌株而言是独特的一组结核分枝杆菌蛋白及其肽。 因此，本发明进一步涉及这些结核分枝杆菌蛋白或肽在诊断，治疗或预防结核分枝杆菌复合体感染中的用途。