

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 522150

(P2003 - 522150A)

(43)公表日 平成15年7月22日(2003.7.22)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 54数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 557571(P2001 - 557571)

(86)(22)出願日 平成13年2月12日(2001.2.12)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月12日(2002.8.12)

(86)国際出願番号 PCT/GB01/00561

(87)国際公開番号 W001/058461

(87)国際公開日 平成13年8月16日(2001.8.16)

(31)優先権主張番号 0003082.5

(32)優先日 平成12年2月10日(2000.2.10)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 グラクソ グループ リミテッド
GLAXO GROUP LIMITED

イギリス ミドルセックス ユービー6 0
エヌエヌ グリーンフォード パークレー
アベニュー グラクソ ウェルカム ハ
ウス (番地なし)

(72)発明者 ヘーゼル・マーガリート・ドックレル
イギリス、ダブリューシー1イー・1エイチ
ティ、ロンドン、ケッペル・ストリート、
ロンドン・スクール・オブ・ハイジーン・
アンド・トロピカル・メディスン

(74)代理人 弁理士 青山 稔 (外 2 名)

最終頁に続く

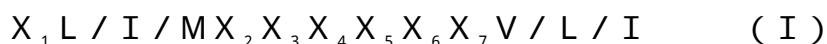
(54)【発明の名称】 マイコバクテリア A G 8 5 複合体特異性 T 細胞ペプチドおよびその診断および治療的用途における使用

(57)【要約】

(a) 式 (I) : $X_1 L / I / M X_2 X_3 X_4 X_5 X_6$
 $X_7 V / L / I$ [式中、 X_1 は G、 X_2 は P、 X_3 は V
、 X_4 は E、 X_5 は Y、 X_6 は L、 X_7 は Q であるか、
または X_1 は K または R、 X_2 は I または V、 X_3 は A
、 X_4 は N、 X_5 は N、 X_6 は T、 および X_7 は R であ
る] のエピトープ配列、または (I) の類似体であって
、 (I) を認識する C D 8 T 細胞により認識され得るエ
ピトープ配列を含むポリペプチド ; あるいは (b) 該ポ
リペプチド (a) の発現を提供できる調節配列と操作可
能に結合した該ポリペプチド (a) をコードするポリヌ
クレオチドを含む発現ベクターの、 C D 8 T 細胞応答を
刺激することによる、マイコバクテリアによる感染に対
する予防的または治療的ワクチン接種のための医薬の製
造における使用を提供する。さらに、マイコバクテリア
感染症の治療に用いることができるポリペプチド、発現
ベクターおよび細胞 ; ならびに上記したエピトープを認
識することができる T 細胞の検出方法も提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

(a)式(I):



[式中、 X_1 はGであり、 X_2 はPであり、 X_3 はVであり、 X_4 はEであり、 X_5 はYであり、 X_6 はLであり、 X_7 はQであるか、または X_1 はKもしくはRであり、 X_2 はIまたはVであり、 X_3 はAであり、 X_4 はNであり、 X_5 はNであり、 X_6 はTであり、 X_7 はRである]

のエピトープ配列、または(I)の類似体であって、(I)を認識するCD8T細胞により認識され得るエピトープ配列を含むポリペプチド；あるいは

(b)該ポリペプチド(a)の発現を提供できる調節配列と操作可能に結合した該ポリペプチド(a)をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの、CD8T細胞応答を刺激することによる、マイコバクテリアによる感染に対する予防的または治療的ワクチン接種のための医薬の製造における使用。

【請求項2】 ポリペプチドが50個までの長さのアミノ酸を有し、および/またはポリペプチドがAg85Aの配列の誘導體である配列を含む、請求項1記載の使用。

【請求項3】 ポリペプチドが2個またはそれ以上の該エピトープ配列のコピーを含む、請求項1または2記載の使用。

【請求項4】 ポリペプチドがまた、該エピトープ配列の免疫原性を向上させる配列を含んでいる、上記した請求項のいずれか1つに記載の使用。

【請求項5】 免疫原性を向上させる配列がB型肝炎コア抗原またはストレス蛋白から由来する、請求項4記載の使用。

【請求項6】 ポリペプチドまたは発現ベクターがCD8T細胞応答の刺激能を有するアジュバントまたはデリバリーシステムと関連している、上記した請求項のいずれか1つに記載の使用。

【請求項7】 ポリペプチドまたは発現ベクターが細胞中にある、上記した請求項のいずれか1つに記載の使用。

【請求項8】 細胞がプロフェッショナル抗原提示細胞である、請求項7記

載の使用。

【請求項9】 請求項1ないし8のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは発現ベクターと、CD8T細胞応答の刺激能を有するアジュバントまたはデリバリーシステムとを含む、ワクチン組成物。

【請求項10】 予め選択された宿主をワクチン接種してマイコバクテリア感染症に対するCD8T細胞応答を刺激する方法であって、該宿主に有効量の請求項1ないし8のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは発現ベクターあるいは請求項9に記載のワクチン組成物を投与する、ことを含む方法。

【請求項11】 請求項2ないし8のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは発現ベクター、あるいは請求項7または8に記載の細胞。

【請求項12】 マイコバクテリアによる感染症に対するワクチン接種において用いるための請求項11に記載のポリペプチド、発現ベクターまたは細胞。

【請求項13】 請求項1に記載のエピトープ配列を認識するT細胞受容体と選択的に結合する生成物であって、そのペプチド結合グループにおいてエピトープ配列の配列を有するペプチドを含むHLA分子またはそのフラグメントを含む生成物。

【請求項14】 請求項1に記載のエピトープ配列を認識するCD8T細胞の有無をT細胞の集団において検出する方法であって、

(i) CD8T細胞を含む細胞の集団を請求項1ないし8のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは請求項13に記載の生成物と接触させ、

(ii) CD8T細胞が該ポリペプチドまたは生成物を認識するかどうかを決定し、それにより該エピトープを認識するCD8T細胞の有無を決定する、ことを含む方法。

【請求項15】 工程(ii)がT細胞による一の物質の発現を検出することを含み、その物質の発現の検出がT細胞が該ポリペプチドを認識したことを示す、請求項14記載の方法。

【請求項16】 工程(ii)が該ポリペプチドが細胞表面に存在する細胞のT細胞による溶解を検出することを含み、その溶解の検出がT細胞が該ポリペプチドを認識したことを示す、請求項14記載の方法。

【請求項17】 マイコバクテリア感染症を診断する方法またはマイコバクテリア感染症に対するワクチン接種の有効性を試験する方法であって、CD8T細胞応答の存在が宿主がマイコバクテリアに感染しているかまたはワクチン接種が有効であることを示す、一の宿主における請求項1に記載のエピトープ配列に対するCD8T細胞応答の有無を決定することを含む方法。

【請求項18】 CD8T細胞応答の有無を、請求項14ないし16のいずれか1項に記載の方法を用いて宿主からの試料中にエピトープ配列を認識するT細胞の有無を同定することで決定する、請求項17記載の方法。

【請求項19】 請求項1に記載のエピトープ配列の認識能を有するT細胞。

【請求項20】 請求項1に記載のエピトープ配列との結合能を有するT細胞受容体またはそのフラグメント。

【請求項21】 マイコバクテリア感染症の治療法にて用いるための請求項19記載のT細胞。

【請求項22】 予め選択された宿主におけるマイコバクテリア感染症の治療法であって、該宿主に有効量の請求項19に記載のT細胞を投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、マイコバクテリア感染症に対する予防的または治療的ワクチン接種ならびにかかるワクチン接種に用いることができるポリヌクレオチドおよびポリペプチドに関する。

【0002】

(背景技術)

ヒト結核の病原因子であるマイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*) は世界的に主要な公衆衛生の危険要素である。現在、該疾患に対してヒトに利用できる唯一のワクチンは、エム・ボビスバシラスカルメット-ゲラン (BCG) である。しかしながら、その有効性は変動し、特に肺結核に限られている。有効であるワクチンについては、エム・ツベルクローシスに対して強力な免疫応答を生じさせなければならない。

CD4 T細胞により媒介される免疫応答の細胞アームはエム・ツベルクローシスに対する防御的免疫応答の基本的成分として確立されてきた。しかしながら、ヒトにより認識されるCD8 T細胞エピトープを有することが証明されているマイコバクテリア抗原はほとんどない。

【0003】

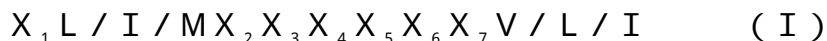
本発明者らは、ヒトにおいて強力なCD8 T細胞応答を発生させるマイコバクテリア抗原85A (Ag85A) タンパクにおいてエピトープを見いだした。該反応のCD8 T細胞は、異常に強力な応答を発生させることが知られている流行性感冒マトリックスタンパクエピトープに関して得られるものに匹敵する頻度において存在する。インビトロ分析を用いてCD8 T細胞応答を特徴づけることができる前に、これらを抗原(5~7日間インビトロ再刺激)の存在下で通常培養する必要がある。しかしながら、本発明者らにより見いだされたエピトープに対するCD8 T細胞応答は、ELISPOT分析において特徴づけられる前にかかる再刺激を必要としない。本発明者らは、エピトープを認識するCD8 T細胞は生エム・ツベルクローシスで感染したマクロファージを溶解させることができる

ことも見いだした。

【0004】

したがって、本発明は、

(a) 式(I) :



[式中、 X_1 はGであり、 X_2 はPであり、 X_3 はVであり、 X_4 はEであり、 X_5 はYであり、 X_6 はLであり、 X_7 はQであるか、または X_1 はKもしくはRであり、 X_2 はIまたはVであり、 X_3 はAであり、 X_4 はNであり、 X_5 はNであり、 X_6 はTであり、 X_7 はRである]

のエピトープ配列、または(I)の類似体であって、(I)を認識するCD8T細胞により認識され得るエピトープ配列を含むポリペプチド ; あるいは

(b) 該ポリペプチド(a)の発現を提供できる調節配列と操作可能に結合した該ポリペプチド(a)をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの、CD8T細胞応答を刺激することによる、マイコバクテリアによる感染に対する予防的または治療的ワクチン接種のための医薬の製造における使用を提供する。

【0005】

本発明はさらに、前記定義のようなポリペプチドまたは発現ベクターおよびCD8T細胞応答を刺激できるアジュバントまたはデリバリーシステムを含むワクチン組成物を提供する。さらに :

宿主に有効量の前記定義のようなポリペプチド、発現ベクターまたはワクチン組成物を投与することを含む、マイコバクテリア感染症に対するCD8T細胞応答を刺激するために、あらかじめ選択された宿主にワクチン接種する方法 ;

マイコバクテリアによる感染症に対するワクチン接種において使用するのに好適な特異的新規ポリペプチド、発現ベクターおよび細胞 ;

式(I)のエピトープ配列などの前記定義のエピトープ配列を認識するT細胞受容体と選択的に結合する生成物であって、そのペプチド結合グループにおいてエピトープ配列の配列を有するペプチドを含むHLA分子、またはそのフラグメントを含む生成物 ;

式(I)のエピトープ配列などの前記定義のようなエピトープ配列を認識する

CD8 T細胞の存在または不在をT細胞の集団において検出する方法であって；
 (i) CD8 T細胞を含む細胞の集団をポリペプチドまたは生成物と接触させ、
 (ii) CD8 T細胞が前記ポリペプチドまたは生成物を認識するかどうかを決定し、それによりT細胞の存在または不在を決定することを含む方法；

マイコバクテリア感染症を診断する方法またはマイコバクテリア感染症に対するワクチン接種の有効性を試験する方法であって、宿主において、CD8細胞応答の存在が宿主がマイコバクテリアに感染しているかまたはワクチン接種が有効であることを示す、式(I)のエピトープ配列などの前記定義のようなエピトープ配列に対するCD8 T細胞応答の存在または不在を決定することを含む方法；

マイコバクテリア感染症の治療法において使用するのに好適な、式(I)のエピトープ配列などの前記定義のようなエピトープ配列を認識できるT細胞；

式(I)のエピトープ配列などの前記定義のようなエピトープ配列を結合できるT細胞受容体、またはそのフラグメント；および

宿主に有効量の前記定義のようなT細胞を投与することを含む、あらかじめ選択された宿主におけるマイコバクテリア感染症を治療する方法も提供される。

【0006】

図1は、合成20mer Ag85A8ペプチド(完全Ag85A配列におよぶ10aaが重複)での再刺激に反応したエム・ボビスBCG反応性CD8⁺T細胞によるIFN γ の分泌を示す。(A)は試験したすべてのドナーについて10⁵CD8⁺T細胞あたりのsfc(スポット形成細胞)の数の平均を示し、(B)は各ペプチドに対して正の反応、すなわち、50sfc/10⁵CD8⁺T細胞(n=12)を示すドナーの割合(%)。

図2は、FMP M1₅₈₋₆₆、P₄₈₋₅₆、P₂₄₂₋₂₅₀とともに、またはペプチドなしのいずれかで一夜PBMC刺激することによるIFN γ 産生を示す。結果を5×10⁵PBMCあたりのsfcの数の平均として表す。

図3はHLA-A*201ドナーからの短期細胞系(STCL)のAg85AペプチドP₄₈₋₅₆(A)およびP₂₄₂₋₂₅₀(B)特異性細胞溶解活性を示す。

図4は、Ag85A、エム・ボビスBCGまたはエム・ツベルクローシスを発

現する組み換えワクシニアウイルスで感染したオートローガスなマクロファージに対して測定されたペプチド特異性CD8⁺T細胞のCTL活性を示す。

【0007】

配列番号：1はAg85A₄₈₋₅₆のアミノ酸配列を示す。

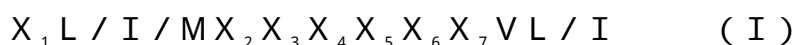
配列番号：2はAg85A₂₄₂₋₂₅₀のアミノ酸配列を示す。

配列番号：3はAg85AのDNAとアミノ酸配列を示す。

配列番号：4はAg85Aのアミノ酸配列を示す。

【0008】

本発明は、本質的に式(I)：



(式中、X₁はGであり、X₂はPであり、X₃はVであり、X₄はEであり、X₅はYであり、X₆はLであり、X₇はQであるか、あるいはX₁はKまたはRであり、X₂はIまたはVであり、X₃はAであり、X₄はNであり、X₅はNであり、X₆はTであり、X₇はRである)のエピトープ配列に関する。

別法として、ポリペプチドは本質的に式(I)の類似体であり、(I)を認識するCD8T細胞により認識できるエピトープ配列からなる。本発明はまた、かかるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターにも関し、該ポリヌクレオチドはポリペプチドを発現できる調節配列と操作可能に結合する。ポリペプチドおよび発現ベクターはマイコバクテリアによる感染に対して宿主をワクチン接種するのに有用である。かかるワクチン接種は、(マイコバクテリアに感染していない宿主の)予防であってもよいし、(マイコバクテリアに感染した宿主の)治療であってもよい。

【0009】

ワクチン接種される宿主は、一般に哺乳動物、例えば、ヒトまたは動物、典型的にはマイコバクテリアに自然または人工的に感染しうるものである。宿主は、霊長類、ウシまたはアナグマであってもよい。宿主は、栄養不良または他の病原体、例えばHIVによる感染のためにマイコバクテリア感染症にかかりやすい。

宿主がこれに対してワクチン接種されるマイコバクテリアは、Ag85Aタンパク、またはエピトープ配列を含む蛋白(配列番号：4として示されるAg85

A配列の相同体など)を発現する。マイコバクテリアは典型的には病原性であり、哺乳動物、例えば、前記のような哺乳動物に感染できる。マイコバクテリアは、典型的にはエム・ツベルクローシス(M. tuberculosis)、エム・マリヌム(M. marinum)、エム・カンサス(M. kansasii)、エム・ボビス(M. bovis)またはエム・アビウム(M. avium)である。

【0010】

ワクチン接種はエピトープに対するCD8T細胞応答((I)または(I)の類似体により定義される本発明の異なるエピトープに対する応答を含んでもよい)を刺激する。ワクチン接種はAg85Aにおける1またはそれ以上のエピトープ、または他のマイコバクテリアタンパクにおける1またはそれ以上のエピトープに対するCD8T細胞に至るかまたはそうではない。ワクチン接種はAg85Aあるいは1、2、3またはそれ以上の他のマイコバクテリアタンパクにおけるエピトープを認識する抗体応答にいたるかまたはそうではない。

エピトープ配列は式(I)の配列を有する。好ましくは、エピトープはGLPVEYLQV(配列番号:1)またはKLIANNTRV(配列番号:2)の配列を有する。エピトープは、(I)を認識するT細胞により認識される(I)の類似体(配列番号:1または2の類似体を包含する)である配列を有する。かかるT細胞認識は、T細胞受容体の類似体に対する結合を包含し、典型的にはT細胞の抗原特異的機能的活性化も包含する。

【0011】

したがって、典型的には、類似体の配列を有するペプチド(本明細書においては類似ペプチドと称する)は、T細胞受容体に対する配列(I)のペプチド(本明細書においてはペプチド(I)と称する)の結合を抑制できる。したがって、一般に類似ペプチドの存在下でT細胞受容体と結合できるペプチド(I)の量は減少する。これは、類似ペプチドがT細胞受容体と結合でき、したがって、T細胞受容体との結合についてエピトープと競合するためである。類似ペプチドのT細胞受容体に対する結合は特異的結合である。一般に前記結合中に、ペプチド(I)および類似ペプチドはMHCクラスI分子、例えば、HLA-A*0201と結合する。

【0012】

結合の抑制は、当該分野において一般的な技術あるいは本明細書において記載する任意の技術または条件を用いて定量することができる。用いられるT細胞受容体はペプチド(I)と特異的に結合する。かかる受容体を有するT細胞は、抗原ナীবT細胞をインビトロまたはインビボで、適当なHLA分子によりT細胞に対して一般に提示されるペプチド(I)で刺激することにより産生することができる。

類似ペプチドによるT細胞の抗原特異的機能活性化は、本明細書において記載する適当な技術を用いて測定することができる。一般に、類似ペプチドは、HLA-A*0201などのMHCクラスI分子と関連するT細胞に対して提示される場合にかかる活性化を引き起こす。

【0013】

類似ペプチド(またはより大きなペプチド内の類似配列)は、典型的には、例えばヒトまたは動物に(例えば、本明細書において言及される任意の形態において、または任意のアジュバントと共に)投与される場合に、ペプチド(I)に向けられるCD8T細胞応答を刺激することができる。かかる応答は動物モデルにおいてツベルクローシスに対して防御的であってもよいし、ヒト患者において治療的效果を有するものであってもよい。

類似ペプチドは典型的にはペプチド(I)と実質的に類似した形状、大きさ、柔軟性または電子配置を有する。典型的にはペプチド(I)の誘導体である。

【0014】

前記のようにT細胞受容体を結合するのと同様に、類似ペプチドはペプチド(I)と結合する他の特異的結合物質とも結合できる。かかる物質はHLA-A*0201である。類似ペプチドは、典型的にはペプチド(I)に対して特異的な抗体と結合し、したがってペプチド(I)のかかる抗体に対する結合を抑制する。類似ペプチドであってもよいし、ペプチドでなくてもよく、あるいはペプチド部分と非ペプチド部分の両方を含んでもよい。かかるペプチドまたはペプチド部分はペプチド(I)と相同性(例えば、配列番号:1または2との相同性)を有する。

【0015】

類似配列は、1、2、3、4またはそれ以上の非天然アミノ酸、例えば、天然のアミノ酸と異なる側鎖を有するアミノ酸を含んでもよい。一般に、非天然アミノ酸は、N末端および/またはC末端を有する。非天然アミノ酸はL-またはD-アミノ酸である。

典型的には、類似配列は1またはそれ以上の修飾を含むペプチド配列である。修飾は、本発明のポリペプチド上に存在できる本明細書において記載されたいずれのものであってもよい。修飾は、類似配列のアミノ酸のいずれか、例えばMHC分子の結合の原因であるかまたはT細胞による認識中にT細胞受容体と接触する任意のアミノ酸上に存在し得る。

【0016】

類似配列は典型的にはコンピューター手段により設計または選択され、その後、当該分野において一般的な方法を用いて合成される。別法として、類似体は化合物のライブラリーから選択することができる。類似配列が選択されるライブラリーは、典型的にはペプチド、例えばHLA-A*0201結合モチーフを有するペプチドを含むライブラリーである。

ライブラリーはコンビナトリアルライブラリーであってもよいし、または微生物ディスプレイライブラリー、例えばファージディスプレイライブラリーであってもよい。化合物のライブラリーはディスプレイライブラリーにおいてMHCクラスI分子、例えばHLA-A*0201と結合した形態において発現することができる。

【0017】

類似ペプチドまたは配列は前記の特徴のいずれか、例えばペプチド(I)の結合特性を模倣する能力、例えば、T細胞受容体、HLA-A*0201またはペプチド(I)を認識する抗体を結合させる能力に基づいてライブラリーから選択することができる。類似体はペプチド(I)を認識するT細胞の抗原特異性機能活性を引き起こす能力に基づいて選択することができる(例えば、前記の適当な技術を用いて)。

【0018】

ポリペプチドは一般に8～2000アミノ酸の長さ、例えば9～1000、10～500、11～200、12～100または15～50個のアミノ酸の長さである。典型的には、ポリペプチドは50個のアミノ酸までの長さを有する。ポリペプチドは典型的には天然に存在しない蛋白、例えば、同一または異なる蛋白由来の配列を含む融合蛋白である。好ましい融合蛋白は下記のAg85Aの配列の誘導体を含む。

【0019】

ポリペプチドはAg85Aの配列の誘導体である配列（例えば、配列番号：3において示すようなもの）を含んでもよい。ポリペプチドが誘導体配列以外の配列を含む場合、かかる配列は典型的にはAg85Aの配列の誘導体（本明細書に記載する任意の方法に従って定義される誘導体）ではない。誘導体配列は、典型的にはエピトープ配列を含む。かかる誘導体はAg85Aのフラグメントであってもよい。一例において、フラグメントはエピトープ配列の近くにあるAg85A配列だけ、例えば43～61、38～66、28～76、236～254、231～259または221～269からなるかまたはこの位置に含まれる配列のみを含む。一例において、フラグメントはエピトープ配列のみを含む。

【0020】

Ag85A配列の誘導体は前記Ag85A配列の全体またはそのフラグメントと相同性であってもよい。

ポリペプチドは典型的には1、2、3、4、または5～10、あるいはそれ以上のエピトープ配列を含み、これらは同一であってもよいし、異なってもよい。典型的には、ポリペプチドにおいて、リンカー配列はエピトープ配列を分離してもよいし、またはしなくてもよく、および/またはペプチドのN末端またはC末端に追加の（非エピトープ）配列が存在してもよいし、しなくてもよい。典型的には、ペプチドは、1、2、3またはそれ以上のリンカーを含む。該リンカーは典型的には1、2、3、4またはそれ以上のアミノ酸の長さである。したがって、ペプチドにおいて、エピトープ配列のうちの1、2またはそれ以上、あるいは全部は互いに連続していてもよいし、あるいは互いに分離されていてもよい。

。

【0021】

ポリペプチドは、エピトープ配列の免疫原性を向上させる配列を含んでもよい。かかる配列は以下に記載する。

ポリペプチドは、1、2、3、4または5～10、あるいはそれ以上の他のエピトープ配列、たとえば他のCD8T細胞エピトープ配列（異なるT細胞により認識される）、CD4T細胞エピトープまたは抗体エピトープを含んでもよい。ポリペプチドまたは発現ベクターを宿主に投与する場合、免疫応答もこれらのエピトープに対して生じる。他のエピトープはマイコバクテリアエピトープ（例えば、Ag85A以外のマイコバクテリアタンパク由来のエピトープ）であってもよい。他のエピトープは、別の病原体、例えば、ウイルス性病原体（例えばHIV）のものであってもよい。他のエピトープは、クロストリジウム（例えば、クロストリジウム・テタニ（*Clostridium tetani*）神経毒フラグメントC由来のもの）、B型肝炎（例えば、コアまたは表面タンパク由来のもの）のものであってもよい。他のエピトープは、人工またはコンセンサスエピトープ（例えば、PADRE）、例えば、Guercioら（1997）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11786-91に記載されているものであってもよい。

【0022】

一例において、ポリペプチドは例えば天然の翻訳後修飾（例えば、グリコシル化）または人為的修飾により修飾される。ペプチドは、それが真核生物（例えばヒト）または原核生物（例えば、*E. coli*）細胞において発現された場合に起こる修飾を含んでもよい。一例において、ペプチドはグリコシル化が欠失している。修飾は、化学的部分（典型的には水素、例えばC-H結合水素の置換による）、例えば、アミノ、アセチル、ヒドロキシまたはハロゲン（例えばフッ素）基または炭水化物基を提供する。典型的には修飾はNまたはC末端上に存在する。

【0023】

ポリペプチドは典型的にはペプチド（ペプチド（I）または類似のペプチド）を細胞結合MHCクラスI分子の表面上に提供するために細胞のクラスI抗原提示経路により加工できる。典型的にはかかる細胞はT細胞に対してペプチドを提示できる。

ポリペプチドは合成により産生できるか、または組み換え系において発現することができる。固相または液相合成法を用いることができる。固相合成において、所望のペプチドのアミノ酸配列は不溶性樹脂に結合したC末端アミノ酸配列から連続して構築される。所望のペプチドが産生されたら、これを樹脂から開裂させる。液相合成において、所望のペプチドを再びC末端アミノ酸から構築する。このアミノ酸のカルボキシ基は、適当な保護基により終始ブロックされ、該保護基は合成の最後に除去される。

【0024】

固相合成および液相合成のいずれにおいても、反応系に添加される各アミノ酸は典型的には保護されたアミノ酸および活性化されたカルボキシ基を有する。官能性側鎖も保護される。合成の各段階の後に、アミノ保護基は除去される。側鎖官能基は一般に合成の最後に除去される。

ポリペプチドを発現できる発現ベクターは、ポリヌクレオチド、典型的にはDNAまたはRNAであり、典型的には一本鎖または二本鎖である。ポリヌクレオチドは直鎖状であってもよいし、または環状（例えば、プラスミド）であってもよい。一般に、発現ベクターがRNAである場合、これはポリペプチドを提供するために直接翻訳することができる（典型的には転写を助ける下記の配列を含まない）。該ベクターはポリペプチドをコードする配列を含み、これは典型的にはコーディング配列の発現を提供できる調節配列と操作可能に結合される。したがって、典型的には、ベクターは、コーディング配列の転写および/または翻訳を助けるなど発現を助けるコーディング配列の5'および3'を含む。典型的には、ベクターはプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、ポリアデニル化シグナル、poly Aテール、イントロン、翻訳開始コドンまたは翻訳停止コドンを含む。

【0025】

発現ベクターはポリペプチドを発現できる。一例において、ベクターは宿主の細胞においてポリペプチドを発現できる（宿主細胞転写および翻訳メカニズムを用いて）。もう一つの例において、発現ベクターは細胞ベクター（下記）内にあり、したがって、細胞ベクターにおいてポリペプチドを発現できる（細胞ベクタ

一の転写および翻訳メカニズムを用いて)。

ベクターはポリペプチドの免疫原性を向上させる物質(例えば、本明細書において記載する任意のかかる物質)も発現できる。一例において、ベクターは2またはそれ以上のコーディング配列を含み、2またはそれ以上の本発明の異なるポリペプチドを発現できる。

【0026】

ベクターは、ベクターの送達または発現を助ける部分と関連する(例えば、含まれる)。好ましくは、かかる部分はベクターにより発現されるポリペプチドをクラスIプロセッシングおよび提示経路へ送達するのを助ける。かかる部分はウイルスであってもよいし、細胞であってもよい。したがって、一例において、ベクターはウイルスベクター(すなわち、ウイルス性ベクター)、例えばCD8T細胞応答を刺激できるウイルス(例えば、ワクシニアウイルス)中に存在する。ウイルスは典型的にはその野生型が宿主に感染できるものである。ベクターが存在し得る細胞は原核細胞(例えば細菌)であってもよいし、真核細胞であってもよい。典型的には、宿主に感染できる病原体の細胞である。かかる病原体はその野生型形態において有毒である。一例において、細胞はマイコバクテリア属(例えば、エム・ボビスバシラスカルメット-ゲランを包含する本明細書において記載する任意のもの)である。細胞は宿主の種のものであってもよいし、あらかじめ宿主から抽出された(そして所望によりインビトロで培養および/または複製された)細胞であってもよい。かかる細胞は本明細書において記載する任意の種類のものであってもよく、典型的にはプロフェッショナル抗原提示細胞である。

【0027】

本発明のポリペプチドをコードする配列を含む組み換え複製可能なポリヌクレオチドベクターも記載する。一例において、これは本発明の発現ベクターと同一である。ベクターは適合性細胞中に複製することができる。したがってもう一つの例において、本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を複製可能なベクター中に導入し、該ベクターを適合性細胞中に導入し、ベクターを複製する条件下で細胞を成長させることにより本発明のベクターを産生する方法を提供する。ベクターは細胞から回収することができる。適当な細胞を

以下に記載する。

好ましくは、ポリペプチドをコードする配列は細胞によりコーディング配列を発現することができる調節配列と操作可能に結合する。

【0028】

「操作可能に結合する」なる用語は、並列を意味し、ここに、記載した成分は意図する方法においてそれらが機能できる関係にある。コーディング配列と「操作可能に結合した」調節配列を、コーディング配列の発現が調節配列と適合する条件下で達成されるようなやり方で結紮する。

かかるベクターを適当な細胞中に形質転換して、本発明のポリペプチドを発現することができる。したがって、本発明のポリペプチドは、ポリペプチドが発現される条件下で前記のベクターで形質転換またはトランスフェクションされた細胞を培養し、発現されたポリペプチドを回収することにより得ることができる。

【0029】

ベクターは、例えば、複製の起源、所望によりコーディング配列の発現のプロモーターおよび所望によりプロモーターのレギュレーターを備えたプラスミド、ウイルスまたはファージベクターである。ベクターは1またはそれ以上の選択可能なマーカー遺伝子、例えば、バクテリアプラスミドの場合はアンピシリン耐性遺伝子を含んでもよい。プロモーターおよび他の発現調節シグナルは、ベクターが設計された細胞と適合するように選択することができる。

該ベクターで形質転換（またはトランスフェクション）された細胞は前記ベクターと適合するように選択され、好ましくはイー・コリなどのバクテリアである。別法として、これらはヒトまたは動物細胞系、例えば、CHOまたはCOS細胞、あるいは酵母または昆虫細胞であってもよい。細胞はヒト以外の動物、例えば、ヒツジまたはウサギあるいは植物細胞であってもよい。

【0030】

前記のように、ポリペプチドはエピトープの免疫原性を向上させる配列を含んでもよい。ポリペプチドまたは発現ベクターは、ある物質（ペプチドであってもよいし、ペプチド以外の物質であってもよい）と関連してもよく、あるいはエピトープの免疫原性を向上させることができる形態であってもよい。一般に、これ

はエピトープに対するCD8 T細胞応答の速度および/または大きさを向上させ、したがって一般にワクチン接種後、エピトープについて特異的な多数のCD8 T細胞が宿主中(例えば、末梢血中)に存在する。

物質(ポリペプチド中に存在する配列を含む)はアジュバントとして作用するか、またはペプチドを抗原提示細胞(APC)または抗原プロセッシング経路におけるコンパートメントに向かわせ、例えば、キャリアタンパクとして作用する。配列はTヘルパー応答、例えばCD8 T細胞応答に有利な応答を刺激し、したがってTヘルパー(例えばTh1)細胞エピトープを含んでもよい。

【0031】

免疫原性を向上させる好ましい物質は、B型肝炎コア抗原から得られる配列、ストレス蛋白から得られる配列またはクロストリジウム・テタニ神経毒フラグメントCから得られる配列を含む。ストレス蛋白は、典型的にはバクテリア(例えば、マイコバクテリア)熱ショック蛋白(HSP)またはかかる蛋白、例えば、HSP60およびHSP70科のマイコバクテリアまたはイー・コリ蛋白(例えば、マイコバクテリアのHSP65またはHSP71)と相同性を有する蛋白または哺乳動物の相同体(例えば、マウスまたはヒトのgp96、Anthonyら(1999) Vaccine 17,373-83)である。

【0032】

該物質はポリペプチドまたはベクターを粒子形態にすることができる。該物質はウイルスまたはウイルス様粒子である(例えば、酵母Ty粒子、例えば、Allsopp et al (1996) Eur. J. Immunol. 26, 1951-9に記載されているようなもの)。該物質はサイトカイン、例えば、MHCクラスI限定T細胞応答を刺激するか、またはMHCクラスII限定T細胞応答に有利なサイトカイン(例えば、IL2、IL-7、IL-12、IFN- またはGM-CSF)であってもよい。該物質は、例えば、CFA、ムラミルジペプチド(例えば、マイコバクテリア細胞壁の)、モノホスホリルリピッドA、リポポリサッカライド(例えば、ビー・アボータス(B. abortus)から得られるもの)、リポソーム、SAF-1、サポニン(例えば、QUi1A)、キーホールリンペットヘモシアニン、2-ミクログロブリン、マンナン(例えば、酸化マンナン)、アクリル系マイクロビーズ、ま

たはエマルジョン（例えば、水中油または油中水）、例えば、大豆エマルジョン（例えば、Hioe et al(1996) Vaccine 14, 412-8に記載）であってもよい。

【0033】

用いられる特定の投与経路は、CD8 T細胞応答の刺激を助け、したがってポリペプチドベクターはかかる経路により投与されるのに好適な形態において提供することができる。筋肉内経路またはバイオリスティック（biolistic）手段による送達が好ましい。

一般に、低用量の抗原はCD8 T細胞応答の発生に有利である。したがって、適当な低用量のポリペプチドまたはベクターを投与することができる。ポリペプチドまたはベクターはしたがって適当な低用量を提供するための投与に適した量および濃度である。好ましい例において、ベクターは「裸のDNA（naked DNA）」の形態において投与される。

【0034】

本発明の生成物は、本発明のT細胞のT細胞受容体と、典型的には可逆的方法において選択的に結合する。かかる生成物は一般的にT細胞受容体に対するエピトープペプチド（例えば、MHC分子と結合）の結合を抑制する。

前記のように、該生成物は、そのペプチド結合グループにおいてエピトープ配列の配列を有するペプチドを含むHLA分子、またはそのフラグメントを含む。HLA分子は一般にMHCクラスI分子（例えば、HLA-A*0201）である。かかる分子は、鎖および鎖を含む。フラグメントはHLA分子の細胞外領域のみを含んでもよい。フラグメントは細胞膜と結合できても、できなくてもよい。HLA分子の一例において、天然に存在しない鎖および鎖は典型的には天然に存在する鎖（例えば、HLA-A*0201）と相同性を有する。

【0035】

一例において、2、3、4またはそれ以上の生成物は、マルチマーにおいて結合する。マルチマーにおける生成物は、共有結合または非共有手段により結合させることができる。好ましい例において、生成物はストレプトタビジン-ビオチン相互作用（streptavidin-biotin interaction）により結合し、したがって典型的には該生成物は（典型的には該産物と化学的に結合しているかまたは該産物と

の融合蛋白中の) ビオチン部分を含み、これにより該生成物はストレプトアビジンにより結合することが許容される。

マルチマーは一般に該生成物よりも本発明のT細胞受容体に対して高い親和性を有する。マルチマーは検出可能な標識、例えば放射活性または光検出可能な(例えば蛍光)標識を含んでもよい。標識によりマルチマーはフローサイトメトリー(例えば、マルチマーが本発明のT細胞上に存在するT細胞受容体と結合している場合)により分類できる。

【0036】

マルチマーは可溶性マルチマーであってもよいし、あるいは細胞膜と結合できるものであってもよい。一例において、マルチマーは固体支持体、例えば、マイクロタイタープレートに結合されている。

前記のように、本発明はエピトープ配列を認識するCD8T細胞(前記の生成物の形態であってもよい)の存在または不在を検出する方法を提供する。一例において、T細胞がエピトープ配列を認識するかどうかの決定は、エピトープ配列の存在下でT細胞の状態の変化を検出するかまたはT細胞がエピトープ配列と結合するかどうかを決定することにより行われる。状態の変化は一般に、T細胞受容体がエピトープ配列と結合した後に細胞の抗原特異性機能活性により引き起こされる。一般に、エピトープ配列と結合する場合に、エピトープ配列はMHCクラスI分子と結合し、これは典型的にはAPC(抗原提示細胞)の表面上に存在し、典型的には適当なHLA分子により提示される。

【0037】

T細胞の状態における変化はT細胞における物質の発現および/またはサイトカイン(例えば、IFN-、IL-2またはTNF-)などのT細胞からの物質の分泌の始まりであるかまたはその増加である。IFN-発現または分泌の定量は特に好ましい。物質は典型的には、これを特異的結合物質と結合させ、次に特異的結合物質/物質複合体の存在を測定することにより検出される。特異的結合物質は、典型的には抗体、例えばポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。サイトカインに対する抗体は商業的に入手可能であるか、または標準的技術を用いて調製できる。

【0038】

典型的には、特異的結合物質は固体支持体上に固定される（したがって、該方法は物質の分泌を検出するためのELISPOT分析に基づく）。物質を結合させた後、固体支持体は所望により洗浄して、該物質と特異的に結合しない物質を除去することができる。物質/物質複合体は、複合体と結合する第二の結合物質を用いて検出することができる。典型的には第二の物質は第一の物質が結合する部位と異なる部位で物質と結合する。第二の物質は、好ましくは抗体であり、検出可能な標識により直接または間接的に標識される。

したがって、第二の物質は典型的には検出可能な標識により直接または間接的に標識される第三の物質により検出できる。例えば、第二の物質はビオチン部分を含み、検出可能な標識としてストレプトタビジン部分および典型的にはアルカリホスファターゼを含む第三の物質により検出できる。

【0039】

別法として、測定できるT細胞の状態における変化はT細胞による物質の取り込み、例えばチミジンの取り込みの増加である。状態における変化はT細胞の大きさの増加、またはT細胞の増殖、またはT細胞上の細胞表面マーカーにおける変化である。

状態における変化はエピトープ配列を提示する細胞を（T細胞により）殺すことであってもよい。したがって、T細胞がペプチドを認識するかどうかの決定は、CTL分析を用いて行うことができる。

【0040】

一例において、該方法において接触されるT細胞は血液サンプルにおいて宿主から採取されるが、T細胞を含有する他のタイプのサンプルも用いることができる。サンプルを分析に直接添加してもよいし、まず処理してもよい。典型的には、処理は、サンプルを培地または緩衝液で希釈することを含む。典型的には、サンプルは1.5～100倍、例えば2～50または5～10倍に希釈される。

処理は、サンプルの成分を分離することを含む。典型的には、単核細胞（MC）をサンプルから分離する。MCは、T細胞およびAPCを含む。したがって、この方法において、分離されたMCにおいて存在するAPCは、T細胞に対して

ペプチドを提示することができる。もう一つの例において、T細胞だけ（一例においてはCD8 T細胞のみ）をサンプルから精製することができる。PBMC（末梢血単核細胞）、MCおよびT細胞は当該分野において一般的な技術を用いてサンプルから分離することができる。

【0041】

分析において用いられるT細胞は、未処理の形態または希釈されたサンプルであってよく、あるいは新たに単離されたT細胞（例えば、新たに単離されたMCまたはPBMCの形態）であり、これは直接エキソビボで用いられる。すなわち、これらは該方法において用いられる前に培養されない。しかしながら、より典型的には、T細胞は使用前に、例えばエピトープ配列、および一般に外因性成長促進サイトカインの存在下で培養される。培養中、エピトープ配列は典型的には該方法において用いられるAPCなどのAPCの表面上に存在する。T細胞の予備培養は方法の感度を増大させる。

【0042】

該方法において典型的に用いられるAPCは、T細胞と同じ宿主から得られるものであるか、または異なる宿主から得られるものである。APCは非プロフェッショナルAPCであり得るが、典型的にはプロフェッショナルAPC、例えば本明細書において記載する任意のAPCである。APCは人工的APCであって、もよい。APCはT細胞に対してペプチドを提示できる細胞である。典型的には、T細胞と同じサンプルから分離され、典型的にはT細胞と同時に精製される。したがって、APCはMCまたはPBMCにおいて存在する。APCは典型的には新たに単離されたエキソビボ細胞または培養された細胞である。これは細胞系、例えば、短期または固定化細胞系の形態であってもよい。APCはエンブテューMHCクラスI分子をその表面上に発現できる。

【0043】

一例において、ポリペプチドはT細胞およびAPCを含む分析に本質的に直接添加される。これは直接APCの表面上に吸収される（特に、APCがエンブテューMHCクラスI分子をその表面上に発現する場合）。一例において、ポリペプチドはT細胞の不在下でAPCに提供される。APCはその後、典型的にはエ

エピトープ配列をその表面上に提示させた後にT細胞に提供される。

エピトープ配列がT細胞と接触する期間は、ペプチドの認識を測定するために用いられる方法によって変わる。典型的には、用いられるT細胞の濃度は $10^3 / \text{ml} \sim 10^9 / \text{ml}$ であり、好ましくは $10^5 / \text{ml} \sim 10^7 / \text{ml}$ である。ポリペプチドが分析に直接添加される場合、その濃度は典型的には $0.1 \sim 1000 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、好ましくは $10 \sim 100 \mu\text{g} / \text{ml}$ である。典型的には、T細胞が分析においてインキュベートされる時間の長さは4～24時間であり、好ましくは6～16時間、一例においては少なくとも40、120または180時間である。

【0044】

T細胞によるエピトープ配列の認識の測定は、エピトープ配列とT細胞との結合を測定することにより行うことができる。典型的には、ペプチドと結合するT細胞を計数し、例えばFACSマシンを用いてこの結合に基づいて分類することができる。ペプチドを用いて同定される細胞の度数が「対照」値を越える（すなわち、エピトープ配列を認識する抗原ナীবT細胞の度数を越える）ならばペプチドを認識するT細胞が存在すると考えられる。病気中の特定のエピトープについて特異的な抗原経験T細胞は全CD8T細胞の5～60%の間であると予想される。

【0045】

前記のように、本発明はマイコバクテリア感染症を診断する方法またはマイコバクテリア感染症に対するワクチン接種の有効性を試験する方法を提供する。マイコバクテリア感染症による、またはワクチン接種によるエピトープに対するCD8T細胞応答を有する宿主を区別することは不可能である。エピトープに対してCD8T細胞応答（または免疫防御/無効化のために十分でないCD8T細胞応答のレベル）を有さないことが判明している宿主を、かかるT細胞応答を刺激するため（例えば、本明細書に記載されるワクチン接種法による）のワクチン接種のために選択することができる。

本発明の診断法またはワクチン接種の有効性を試験する方法において、CD8T細胞応答の存在または不在は、典型的には前記のCD8T細胞応答を同定する

方法により定量される。

【0046】

本発明はさらに、エピトープ配列を認識するCD8T細胞も提供する。すなわち、T細胞のTCRはエピトープ配列のペプチドと結合できる（典型的には、ペプチドが適当なHLA分子と結合し、細胞上に提示される場合）。一般に、T細胞はエピトープ配列の結合に際して抗原特異的機能活性化を受けることができる。T細胞は典型的にはIFN- γ を産生し、典型的にはIL-4、IL-10またはTGF- β を産生しない。T細胞は細胞毒性であり、典型的にはパーフォリン、グランザイムおよびグラニュリシンを含む細胞障害性顆粒細胞を含む。好ましくは、T細胞は、マイコバクテリア（例えば、本明細書に記載される任意のマイコバクテリア）に感染したオートローガスなマクロファージに対して細胞障害性である。一般に、T細胞は免疫抑制性でない。

【0047】

典型的には、T細胞はあらかじめ同じ宿主から抽出され、インビトロで複製されている。かかる複製は、エピトープ配列（典型的には、細胞の表面上に提示される）の存在下で培養することを含む。該細胞はマイコバクテリア感染症を治療する方法において用いることができる。

本発明はT細胞受容体（TCR）、またはそのフラグメントを提供し、これはエピトープ配列と結合できる。TCRは本発明のT細胞上に存在するTCRの任意の特性を有する。したがって、エピトープ配列は一般にTCRとの結合中にMHC分子と結合する。

【0048】

本発明のポリペプチド、発現ベクター、細胞（T細胞を含む）、生成物およびTCR（またはそのフラグメント）は実質的に精製された形態であってもよい。これらは実質的に単離された形態であってもよく、この場合、これらは一般に調製物中少なくとも80%、例えば少なくとも90、95、97または99%のポリペプチド、ポリヌクレオチド、細胞または乾燥物質を含む。ポリペプチド、発現ベクター、生成物またはTCR（またはそのフラグメント）は典型的には実質的に他の細胞成分を含まないか、または他のマイコバクテリア成分を含まないか

、または(他の)ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含まない。ポリペプチド、発現ベクター、細胞または生成物は本明細書において記載される本発明の任意の態様において前記形態のいずれかにおいて用いられる。

【0049】

任意の形態または他の薬剤と結合した前記のポリペプチドおよび発現ベクターは下記の「ワクチン接種剤(vaccination agent)」なる用語に含まれる。有効な非毒性量のかかるワクチン接種剤を、あらかじめ選択された宿主、例えばヒトまたはヒト以外に投与することができる。ワクチン接種剤は、個体がマイコバクテリア感染症を発症するのを防止するために予防的にマイコバクテリア感染を有さない宿主に投与することができる。ワクチン接種剤は、感染を治療するために(疾患の症状の改善を含む)、マイコバクテリア感染を有する宿主に治療的に投与することができる。本発明のT細胞は、有効な非毒性量において、それを必要とする患者、例えばマイコバクテリア感染症にかかった患者に投与することができる。

【0050】

したがって、本発明は、ヒトまたは動物を療法により治療する方法、およびマイコバクテリア感染症の治療用医薬の製造において用いられるワクチン接種剤およびT細胞を提供する。

ワクチン接種剤またはT細胞は、宿主に1回またはそれ以上の投与において投与することができる。典型的には、初期投与の後に、「追加免疫(booster)」をすることができる。典型的には、宿主に1、2、3またはそれ以上の独立した投与を行い、そのそれぞれは少なくとも12時間、1日、2日、7日、14日、1ヶ月またはそれ以上間隔をあける。

【0051】

ワクチン接種剤またはT細胞は、ワクチン接種剤またはT細胞および医薬的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物の形態であってもよい。好適な担体および希釈剤は、等張塩溶液、例えばリン酸塩緩衝塩溶液を含む。典型的には、投与は非経口、静脈内、筋肉内、皮下、経皮、皮内、経口、鼻内、腔内、または直腸内投与である(したがって、組成物はそのために処方される)。

ワクチン接種剤（特に発現ベクターの場合）を送達するための好ましい方法は、バイオリスティック手段（粒子媒介法）による。かかる技術において、薬剤は典型的には当該分野において一般的なさまざまな技術を用いて担体粒子上にコートされる。遺伝子ガン装置(gene gun device)からの（例えば、細胞内）送達に典型的に用いられる粒子サイズの範囲において適当な密度を有する物質から担体粒子が選択される。最適な担体粒子サイズは、もちろん所望の標的に依存する（例えば標的細胞の直径）。

【0052】

本発明の目的に関して、タングステン、金、白金およびイリジウム担体粒子を用いることができる。タングステンおよび金粒子が好ましい。タングステン粒子は直径0.5～2.0 μmの平均サイズにおいて容易に利用可能である。かかる粒子は粒子加速デリバリー法(particle acceleration delivery methods)において使用するのに最適な密度を有し、DNAで非常に有効なコーティングが可能になる。金粒子または微結晶金（例えば、金粉A 1570、Engelhard Corp., East Newark, NJから入手可能）は均一なサイズを提供し（粒子サイズ1～3 μmでAlpha Chemicalsから入手可能、または粒子サイズ0.95 μmを含む範囲でDegussa, South Plainfield, NJから入手可能）、タングステンよりも毒性が低い。微結晶金は多様な、典型的には0.5～5 μmの範囲の粒子サイズ分布を提供する。

【0053】

薬剤を粒子上にコーティングすることおよび沈殿させることについて多くの方法が公知であり、記載されている（例えば、所定の量の金またはタングステンをプラスミドDNA、CaCl₂およびスペルミジンと組み合わせる）。結果として得られる溶液をコーティング工程中連続して攪拌して、反応混合物を確実に均一にする。薬剤が沈殿した後、コートされた粒子を適当な膜に移すことができ、使用前に乾燥させ、サンプルモジュールまたはカセットの表面上にコートするか、または特定の遺伝子ガン装置において使用するためのデリバリーカセット中に入れる。

【0054】

形成後、粒子媒介デリバリー技術を用いて薬剤でコートされた粒子を送達する。好適な粒子加速装置は当該分野において公知である。典型的には、標的に向けてコートされた粒子を推進するために、かかる装置は爆発性放電、放電またはガス放電を用いる。コートされた粒子はそれ自体取り外し可能に可動性キャリアシートに取り付けることができるか、または気体流がそれに沿って流れる表面に取り外し可能に取り付けることができ、該粒子が表面から浮き上がり、これらは標的に向かって加速される。ガス放電装置の一例は、米国特許第5204253号に記載されている。爆発型装置は、米国特許第4945050号に記載されている。放電型粒子加速装置の一例は、ACCELL装置 (Geniva, Madison, WI) であり、この装置は、米国特許第5120657号に記載されている。本発明における使用に好適なもう一つの放電装置は、米国特許第5149655号に記載されている。

【0055】

一回の投与は、1以上の遺伝子ガン用量、例えば2～6遺伝子ガン用量を含む。

投与されるワクチン接種剤の量は、さまざまなパラメータにより、特に用いられる物質；治療される患者の年齢、体重および症状；投与経路；および必要な養生法にしたがって決定することができる。医師は特定の患者に必要な投与経路および用量を決めることができる。しかしながら、好適な用量は、10 μ g～10g、例えば、100 μ g～1gのワクチン接種剤およびT細胞である。これらの値は全体的な治療法において投与される合計量を表すか、または養生法における独立した投与のそれぞれを表すものであってもよい。

【0056】

本発明のポリペプチドは中性または塩形態としてワクチン中に処方することができる。医薬的に許容される塩は、酸付加塩（ペプチドの遊離アミノ基と形成される）および塩酸またはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸およびマレイン酸などの有機酸と形成されるものを包含する。遊離カルボキシル基と形成される塩は、例えば水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルア

ミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジンおよびプロカインなどの有機塩基由来のものであってもよい。

【0057】

発現ベクターの場合、細胞による発現ベクターの吸収を向上させるためにトランスフェクション剤を投与することができる。好適なトランスフェクション剤の例としては、カチオン性薬剤（例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストラン）およびリポフェクタント（例えば、リポフェクタムおよびトランスフェクタム）が挙げられる。

ワクチン接種剤がウイルスベクターの形態である場合、投与されるウイルスの量は $10^4 \sim 10^{12}$ pfu、好ましくは $10^7 \sim 10^{10}$ pfu（例えば、アデノウイルスベクターについて）、より好ましくはヘルペスウイルスベクターについては約 10^8 pfuである。ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）も典型的には前記用量の任意のもので用いることができる。注射される場合、医薬的に許容される適当な担体または希釈剤中典型的には1~2mlのウイルスが投与される。細胞は典型的には $10^5 \sim 10^{13}$ 個、好ましくは $10^8 \sim 10^{11}$ 個が投与される。

【0058】

ホモローガスな配列

（ポリペプチドまたはポリペプチド内の）ホモローガスな配列を記載する。かかる配列は、典型的には関連する配列と、例えば少なくとも15、20、40、100またはそれ以上の連続した（ホモローガスな配列の）アミノ酸の領域にわたって少なくとも70%の相同性、好ましくは少なくとも80%、90%、95%、97%、99%の相同性を有する。蛋白相同性を測定する方法は当該分野において一般的であり、本明細書において相同性はアミノ酸同一性（「ハードホモロジー（hard homology）」という場合もある）に基づいて計算されることは当業者により理解されるであろう。

【0059】

例えば、UWGC Gパッケージは、相同性を計算するために用いることができる（例えば、デフォルトセッティングに関して用いられる）BESTFITプロ

グラムを提供する (Devereux et al (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395)。P I L E U P および B L A S T アルゴリズムを、例えば、Altschul S.F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F et al (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10に記載されているように相同性またはラインアップ配列を計算するために用いることができる (典型的にはそのデフォルトセッティングに関して)。

【0060】

B L A S T 分析を行うためのソフトウェアは National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から公的に入手可能である。このアルゴリズムは、まず、データベース配列において同じ長さのワードと並べた場合に正の値の閾値スコアと適合するかまたは満足する問い合わせ配列における長さ W の短ワードを同定することにより高スコアの配列対 (H S P) を同定する。T は隣接ワードスコア閾値と称する (Altschul et al、前出)。これらの初期隣接ワードヒットはこれらを含む H S P を見いだすための検索を開始するためのシード (seed) として機能する。ワードヒットは各配列に沿って両方向に、累積配列スコアが増大するまで延長される。各方向におけるワードヒットの伸長は、累積配列スコアがその最大値から X だけ減少する場合に停止し；累積スコアは、1 またはそれ以上の負の残留配列の累積のために 0 またはそれ以下になり；どちらかの配列の末端に達する。B L A S T アルゴリズムパラメータ W 、 T および X は、配列の感度および速度を決定する。B L A S T プログラムはデフォルトとしてワード長さ (W) 11、B L O S U M 6 2 スコアリングマトリックス (Heinkoff and Heinkoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) 配列 (B) 50、期待値 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = 4$ 、および両鎖の比較を用いる。

【0061】

B L A S T アルゴリズムは 2 つの配列間の類似性の統計的分析を行う。例えば、Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 参照。B L A S T アルゴリズムにより提供される類似性の尺度のひとつは、最小の確率合計 ($P(N)$) であり、これは 2 つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の適合が偶然起こる確率の指標を提供する。例えば、第一の配列の第二の配列との

比較における最小合計確率が約1より小さい場合、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合に配列は互いに類似していると考えられる。

【0062】

ホモローガスな配列は典型的には少なくとも2、5、10、15、20（またはそれ以下）の突然変異（置換、欠失または挿入）により関連する配列と異なる。これらの突然変異は相同性の計算に関連してすでに記載した領域にわたって計算することができる。置換は好ましくは「保存的」である。これらは下記の表にしたがって定義される。第二段の同じブロックの、好ましくは第三段の同じ列のアミノ酸は互いに置換することができる。

【0063】

【表1】

脂肪性	非極性	GAP
		ILV
	極性－非荷電	CSTM
		NQ
	極性－荷電	DE
		KR
芳香性		HFWY

【0064】

類似配列の場合において、これは典型的にはエピトープ配列（例えば、配列番号：1または2）と少なくとも1、2、3、4またはそれ以上の突然変異（挿入、欠失または置換（例えば、保存的置換））により異なる。

本明細書において記載されるホモローガスな配列は、関連するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリッド形成するポリヌクレオチドによりコードすることができ、典型的にはバックグラウンドよりも有意に高いレベルで選択的にハイブリッド形成する。選択的ハイブリダイゼーションは典型的には高い

厳密性の培地条件（例えば、0.03 M塩化ナトリウムおよび0.003 Mクエン酸ナトリウム、約50 ~ 約60 ）を用いて達成される。しかしながら、かかるハイブリダイゼーションは当該分野において一般的な任意の好適な条件下で行うことができる（例えば、Sambrook et al (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual）。例えば、高い厳密性が必要とされるならば、好適な条件は、60 で0.2 × SSCを含む。低い厳密性が必要とされるならば、好適な条件は60 で2 × SSCを含む。

【0065】

次の実施例で本発明を説明する。

実施例1

手法

M. bovis BCG およびM. tuberculosis の培養

Middlebrookes ADCエンリッチメント (Difco) および0.05% Bacto-Glycerol (Difco) を補足したMiddlebrookes 7H9培地 (Detroit, Michigan, USA) 中でM. bovis BCG (Glaxo Evans株; Evans Medical, Leatherhead, UK) およびM. tuberculosis (H37Rv) を増殖させて対数期に至らしめた。細菌を集め、-70 で凍結した。OADCエンリッチメント (Difco) を補足したMiddlebrookes 7H10寒天またはADCエンリッチメント (Difco) を補足した液状7H9寒天中のいずれかで増殖させてCFUsをカウントすることにより細菌カウント数を調べた。バイアル内容物を融解させ、RPMI-1640 (Gibco-BRL, Paisley, UK) で1回洗浄し、ウォーターバスソニケーター (Grant XB2; Fisons, Leicester, UK) 中で10秒間超音波処理して固まりを破壊してから使用した。

【0066】

組み換えワクシニアウイルスの構築

Ag85A蛋白を発現するM. tuberculosis由来の組み換えワクシニアウイルスはHarboe et al (1998) Infect. Immun. 66, 717-23に記載されている。トランスファープラスミドp1108を用いて野生型ワクシニアウイルスの非必須チミンキナーゼ遺伝子座中にAg85A蛋白のコーディング配列をクローン化し；

無関係なコーディング配列を有する p 1 1 0 8 プラスミドを用いることにより陰性対照組み換えワクシニアウイルスを構築した。チミジンキナーゼ欠損骨肉種細胞系 1 4 3 (T K 1 4 3) 中に、野生型ワクシニアウイルスとともにプラスミドを同時トランスフェクションすることにより組み換えワクシニアウイルスを得て、次いで、組み換えウイルスに関して選択を行った。得られた組み換えウイルスをブランク精製し、感染 T K 1 4 3 細胞の P C R およびウェスタンブロットにより蛋白発現を確認した。

【 0 0 6 7 】

T H P - 1 細胞培養

ヒト単球細胞系 T H P - 1 を T 7 5 組織培養フラスコ (Nunc lon, Roskilde, Denmark) 中で維持した。使用した増殖培地は 2 m M L - グルタミン (Gibco-BRL) および 1 0 % 熱不活性化 F C S (Gibco-BRL) を補足した R P M I - 1 6 4 0 であった。

【 0 0 6 8 】

P B M C の分離

Ficoll-Histopaque (Sigma Chemical Co., Poole, Dorset, UK) 上での密度勾配遠心分離によりヘパリン処理した静脈血から P B M C を単離した。プラスチックへの付着により非付着性細胞 (N A C) および単球を分離した。 1×10^6 個 / m l の密度で P B M C を R P M I - 1 6 4 0 に再懸濁し、96 ウェル丸底組織培養プレートに 200 μ l / ウェルで撒いた。細胞を 37 で 1 時間インキュベーションし、次いで、上清をピペティングすることにより N A C を除去した。次いで、付着性単球を培地 (C M) に再懸濁し、5 % C O₂ 下、37 でインキュベーションし、C T L アッセイにおける標的細胞として用いた。C M は、2 m M L - グルタミン (Gibco-BRL)、50 μ g / m l アンピシリン (Sigma) および 1 0 % 自己由来血漿を補足した R P M I - 1 6 4 0 からなっていた。ペプチド特異的短期細胞系 (S T C L) を得るために N A C を使用した。

【 0 0 6 9 】

C D 8⁺ T 細胞系の取得

N A C 単独の細胞ペレットに 50 μ M のペプチドを 1 時間プレパルスし、次い

で、 25 ng/ml のrhIL-7 (R&D Systems, Abingdon, UK)を補足したCMで 1×10^6 個/mlまで希釈し、96ウェル丸底組織培養プレートに $100 \mu\text{l}$ /ウェルで撒いた。 10% Lymphocult-T (Biotest, Soilhull, UK)を含有する培地を3~4日間隔で各ウェルに添加した。M. bovis BCG細胞系を得るために、PBMCの一部を $100 \mu\text{l}$ /ウェルの割合で取り、ウェル1個あたり 2×10^4 個のbacilliに感染させた。ペプチド特異的細胞系に関して細胞を培養した。

【0070】

CD8⁺T細胞の分離

MACSシステム (Miltenyi Biotech, Bergish-Gladbach, Germany)を用いるポジティブエンリッチメントにより抗原特異的CD8⁺T細胞を調製した。簡単に説明すると、4のインキュベーションバッファー (PBS / 0.5% BSA / 2 mM EDTA ; $80 \mu\text{l}$ /細胞 10^7 個)中でPBMCをCD8マイクロビーズ (Miltenyi Biotech, Bergish-Gladbach, Germany)で15分間標識した。細胞を1回洗浄した後、インキュベーションバッファー (1mlバッファー/細胞 10^7 個)中に再懸濁し、製造者の指示に従ってLS⁺カラムおよびMidi MACS磁石を用いてエンリッチメントを行なった。表面マーカーTCR、CD3、CD8に関するフローサイトメトリー分析により調べたところ、得られたCD8⁺T細胞集団は 95% よりも純粋であり、CD4およびCD56がコンタミネーションしていた。

【0071】

IFN- γ に関するELISPOTアッセイ

96ウェルフッ化ポリビニリデン (PVDF) 内部処理プレート (MAIP S45; Millipore, Bedford, UK)を $15 \mu\text{l}$ の抗-IFN- γ mAb (1-D1K; Mabtech, Stockholm, Sweden)にて4で一晚プレコートした。次いで、プレートをRPMI-1640で6回洗浄し、 10% 熱不活性化FCSを補足したRPMI-1640にて 37°C で1時間ブロックした。

【0072】

短期細胞系から精製されたCD8⁺T細胞をRPMI-1640で2回洗浄し

、L-グルタミンおよび10%自己由来血漿を補足したRPMI-1640に再懸濁し、次いで、2系の同じウェルに既知数のインプット細胞を分注した。ペプチドを上清に直接添加して最終濃度2 μ Mとし、プレートを37 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベーションした。次いで、細胞を振盪して脱落させ、PBS 0.05% Tween 20 (Sigma) で6回洗浄した。次いで、第2のビオチン化抗-IFN- γ mAb (7-B6-1-ビオチン 1 μ g/ml ; Mabtech) とともにプレートを37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベーションした。PBS 0.05% Tween 20でのさらなる洗浄を行ない、次いでストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼ抱合体 (Mabtech) の1:1000希釈物を2時間添加した。

【0073】

ウェルをさらに6回洗浄し、100 μ lの発色性アルカリ性ホスファターゼ基質 (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK) を各ウェルに添加した。30分後、水道水で洗浄することにより発色反応を終了させ、プレートを風乾した。乾燥スポットをカウントした。

【0074】

51 Cr 放出細胞毒性アッセイ

自己由来の単球由来マクロファージまたは細胞系THP-1を、96ウェル丸底プレートに10000個/ウェルの割合で撒き、細胞毒性アッセイにおける標的細胞として使用した。CM (マクロファージに関してはL-グルタミンおよび10%自己由来血漿を補足、あるいはTHP-1細胞系に関しては10%熱不活性化されプールされたヒトAB血清を補足) 中で標的細胞を37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションし、抗原 (10 μ g/mlペプチド; 10:1 (CFU/マクロファージ) M. bovis BCGまたはM. tuberculosis; 25:1 (pfu/マクロファージ) Ag 85A発現rVV; または抗原なし) をロードし、次いで、2 μ Ciの 51 Crをパルスした。

【0075】

標的細胞をRPMIで3回洗浄し、細胞毒性アッセイ使用する前に5 μ g/mlのw6/32 mAb (Sigma) で処理するか、あるいはCMのみの中に再懸濁した。精製CD8⁺T細胞をエフェクター細胞として種々のE:T比 (50:1

、5 : 1、0 : 1) で96ウェルプレートに添加して、最終体積100 μ l / ウェルとし、37 $^{\circ}$ C で6時間インキュベーションした。上清(50 μ l)を取り、ガンマカウンターを用いて 51 Cr放出を測定した。残りの上清を除去し、100 μ l / ウェルの5% SDS (Sigma) にて37 $^{\circ}$ C で1時間置換し、残った細胞を溶解させた。

【0076】

標的細胞のみが入ったウェルにおける自発的放出を測定した。下式に従って特異的溶解のパーセント値を計算した：

%アイソトープ放出

$$= [\text{cpm上清} / (\text{cpm上清} + \text{cpmペレット})] \times 100$$

%特異的溶解

$$= \% \text{アイソトープ放出試験ウェル} - \% \text{アイソトープ放出対照ウェル}$$

【0077】

実施例2

CD8⁺T細胞反応性ペプチドの同定

M. bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) 接種をすでに受けている10人の健康なドナーからのPBMCを、IL-2およびIL-7の存在下においてM. bovis BCG (Glaxo Evans Strain; Evans Medical, Leatherhead, UK) で14日間刺激してBCG反応性STCLを得た。MACSポジティブ選択によりCD8⁺T細胞をラインから精製し、センシティブIFN- γ ELISPOTアッセイに使用して単一細胞サイトカインの産生を検出した。Ag85A由来の33種の20量体重複ペプチド(1種につき2 μ M)を用いてCD8⁺T細胞を一晩刺激して、いずれのペプチドがCD8⁺T細胞反応性エピトープを含むのかを調べた。

【0078】

33種のペプチドのうち5種(ペプチド5、15、16、24および25)に応答したIFN- γ 産生が観察された(図1)。p5およびp25に対して最強の応答が観察され、10⁵個のCD8⁺T細胞あたりのスポット形成細胞の平均数(sfc's)は、ペプチド5については135、ペプチド25については1

27であった。これら2つのペプチドのより精密な配列分析により、これらのペプチド中のHLA-A*201結合モチーフが明らかとなった。これらのペプチドに対する反応性を示したドナーの組織タイピングにより、これらの対象がHLA-A*201であることが明らかとなった。

【0079】

実施例3

M. tuberculosis由来のペプチドに反応したIFN-放出

2つのCD8⁺T細胞エピトープがp5およびp24/25中において同定された。各ペプチドに対して反応性のある循環しているCD8⁺T細胞の存在頻度を調べるために、新鮮PBMCsをELISPOTによりスクリーニングした。M. bovis BCG STCLsがペプチド5および25に反応したHLA-2ドナーからの未培養PBMCsは、Ag85A中の2種の9量体(P₄₈₋₅₆およびP₂₄₂₋₂₅₀)に反応したIFN- γ を分泌した。5×10⁵個のPBMCsから数えたIFN- γ s f c ' sの平均数は、P₄₈₋₅₆に関しては27、P₂₄₂₋₂₅₀に関しては22であり、対照ウェルにおいては3であった。P₄₈₋₅₆およびP₂₄₂₋₂₅₀に特異的なIFN- γ s f c ' sの出現頻度はHLA-A*201-制限インフルエンザマトリックスエピトープFMP M1に関するSFCsと同じオーダーの大きさであった(図2)。

【0080】

実施例4

M. tuberculosis由来のペプチドに対するCTL反応

これら2種のエピトープの組織制限を確認するために、9量体ペプチド(P₄₈₋₅₆およびP₂₄₂₋₂₅₀)を用いて、5人のHLA-A2ドナーからのSTCLを増殖させた。陽性選択されたCD8⁺T細胞を、ペプチドをパルスされたヒトHLA-A2制限単球細胞系THP-1に対するその細胞毒性活性に関して分析した。刺激から2週間後、両方の細胞系において対応ペプチドに対するCTL活性が検出された。

【0081】

図3Aに示すように、P₄₈₋₅₆により刺激されたCD8⁺T細胞は、P4

8-56をパルスされたTHP-1細胞に対して強いCTL活性(50:1のE:T比において76%の特異的溶解)を示したが、FMP M1₅₈₋₆₆またはP₂₄₂₋₂₅₀をパルスした標的のいずれに対しても有意な溶解を示さなかった(50:1のE:T比において<10%の特異的溶解)。逆に、P₂₄₂₋₂₅₀反応性CD8⁺T細胞は、P₂₄₂₋₂₅₀をパルスされたTHP-1細胞に対して強力なCTL活性(50:1のE:T比において79%の特異的溶解)を示したが、FMP M1₅₈₋₆₆またはP₄₈₋₅₆をパルスした標的に対しては有意な溶解を示さなかった。これらのAg-特異的CD8⁺CTLsの細胞毒性活性は、抗-MHCクラスI mAbの添加により完全に阻害された(図3Aおよび3B)。このmAbでのブロッキングにより、未感染標的に対して観察されたレベルよりも溶解レベルが低下した。これらの結果は、ペプチド特異的CD8⁺T細胞がHLA-A2制限であることを示す。

【0082】

実施例5

ペプチド特異的CD8⁺CTLsは内因性の合成されたAgを認識する

ペプチド特異的CTLsの内因性エピトープ認識能を調べるために、自己由来の単球由来マクロファージをM. bovis BCG、M. tuberculosis bacilli、またはAg 85A蛋白全体を発現するrVVに急性感染させた。図4は、P₄₈₋₅₆およびP₂₄₀₋₂₅₀特異的CTLが、ペプチドをパルスされた標的のほかにM.

bovis BCG、M. tuberculosis、およびrVV 85Aに感染したマクロファージを認識し、溶解する能力があることを示す。さらに、T細胞は、STCLを生じさせるために用いたペプチドに特異的であることが示され、FMP M1₅₈₋₆₆に対する認識はなかった。M. bovis BCGおよびM. tuberculosis bacilliに対して観察された溶解は、mAb w6/32を用いたブロッキングにより、MHCクラスI制限であることが示された。これらの結果は、ペプチド特異的CTLsはMHCクラスI制限様式で内因性のペプチドを認識しうることを示す。

【0083】

実施例6

トランスジェニックマウスモデルにおいてHLA-A2制限ペプチド特異的CD

8⁺T細胞を誘導するための粒子により媒介されるDNAデリバリーの使用

H L A - A 2 トランスジェニック C 5 7 B 1 / 6 マウスに下記接種スケジュールに従って接種した：

(a) 遺伝子銃 - 非重複部位における M. tuberculosis の A g 8 5 A をコードする約 0 . 5 μ g の DNA をそれぞれ含む 2 つのカートリッジ (すなわち合計 1 μ g の DNA) を遺伝子銃で投与する前にマウス腹部を剃毛した；

(b) 筋肉内投与 - M. tuberculosis の A g 8 5 A をコードする 1 0 0 μ g の DNA を含む 5 0 μ l の P B S を大腿四頭筋に投与した；あるいは

(c) 皮内 B C G - 1 0 ⁴ c f u を含有する 5 0 μ l を尾の付け根に投与した；
あるいは

(d) 皮下ペプチド - 0 . 2 m l の不完全フロイントのアジュバント (I F A) / ペプチドエマルジョンを 2 つの部位 (左右の横腹) 間に分けた。ペプチドを 1 0 0 μ g / 1 0 0 μ l の濃度で処方し、接種直前にボルテックスミキサーを用いて I F A 中 1 : 1 の割合で乳化させた。使用ペプチドは：

P₄₈₋₅₆ および P₂₄₂₋₂₅₀ であった。

【 0 0 8 4 】

タイムゼロにおいて 1 回だけ接種した B C G 群を除き、2 週間間隔で 3 回マウスに接種した。2 回目および 3 回目の接種から 7 日後の E L I S p o t 分析 (脾臓) のために 1 群あたり 3 匹のマウスをサンプリングした。さらなる分析のためにリンパ節もマウスから集めた。

【 0 0 8 5 】

セルストレイナーによる物理的破壊により脾臓およびリンパ節細胞を単離した。1 μ M の上記ペプチドおよび 1 0 n g / m l の I L - 2 の存在下においてそれらの細胞をインビトロで 7 日間刺激した。ペプチドをパルスした 1 × 1 0 ⁵ 個の照射された自己由来フィーダー (feeders) の存在下において、抗 - I F N 抗体で被覆した E L I S p o t プレートに 4 × 1 0 ⁵ 個 / ウェルの細胞を添加した。c o n A の場合、フィーダーをペプチドでプレパルスせず、c o n A を 1 μ g / m l とし添加した。陰性対照は刺激不存在下のものであった。プレートを一晩インキュベーションし、標準的方法に従ってスポットを発達させた。画像分析

ソフトウェアを用いてスポットをカウントした。

【0086】

第1の時点(1回目のブーストから7日後)において、いずれの接種動物においても脾臓においてIFN産生細胞は観察されなかった。しかしながら、IFA中のペプチドを接種した動物のリンパ節においてP₂₄₂₋₂₅₀に対する応答が見られた。野生型C57B1/6マウス由来のフィーダー細胞を用いた場合にはペプチドが認識されなかったため、この応答はHLA-A2制限であった。

【0087】

2回目のブーストから7日後に、リンパ節中にはIFN産生細胞は観察されなかった。しかしながら、IFN産生T細胞が脾臓において観察された。筋肉内および粒子により媒介されるデリバリーの両方によるDNA接種により、有意なペプチド特異的応答が生じた。ペプチド特異的応答を誘発する場合、BCG接種はDNA接種よりも有効ではなかった。この時点でのペプチド接種によりP₄₈₋₅₆応答が生じた。

【0088】

議論

ELISPOTにより確認されたように、M. bovis BCG反応性CD8⁺T細胞は、Ag85A中の5種のペプチドに反応して防御的な1型サイトカインINFを認識し、産生することが示された。ペプチド5および25に対して最強の応答が観察され、これらのペプチドのそれぞれに反応するT細胞反応性の非競争的増殖が存在するように思われた。異なったエピトープに反応性のT細胞の類似の非競争的増殖がマウスのListeria monocytogenes感染に関して見られた。これらのペプチドそれぞれに対して反応性を有するCD8⁺T細胞の存在頻度は、M. bovis BCG刺激から14日後に約1:500であった。M. bovis BCGにより産生される分泌蛋白数が大きいため、この数は著しく大きいものである。実際、ペプチド5および25に対して反応性のCD8⁺T細胞が比較的高頻度で循環PBMC集団中に観察された。

【0089】

反応性ペプチド中にHLA-A2モチーフが認められ、それらを用いて推定工

ピトープのみの9量体ペプチド (P_{48-56} および $P_{242-250}$) を構築した。これらの9量体ペプチドを、各ペプチドに対して強い応答を示したドナー由来のPBMCを用いたエキスビゴ実験に使用して、BCG接種ドナー中にミコバクテリアの分泌抗原を認識しうる循環CD8⁺T細胞が存在することを示した。約1:18000の循環CD8⁺T細胞が各エピトープに特異的であることがわかり、これらのドナーが20年前またはそれ以内にBCG接種されていたという事実にもかかわらず、その数はHLA-A*201制限インフルエンザウイルス蛋白FMP M1₅₈₋₆₆に特異的なPBMC (出現頻度約1:12000) に匹敵するものであった。同定された2つのエピトープのうち、 $P_{242-250}$ はAg85Aに特異的であるように思われ、 P_{48-56} はAg85A、BおよびC間に共通であり、結果として、強力なワクチン候補である。

【0090】

HLA-A2単球細胞系THP-1を慣用的な⁵¹Cr放出アッセイにおいてACP sとして使用して、同定されたエピトープのHLA-制限を確認した。 P_{48-56} および $P_{242-250}$ に特異的なCD8⁺T細胞系は、対応エピトープをパルスされたTHP-1細胞を認識したが、無関係なペプチドを認識せず (すなわち、 P_{48-56} 特異的細胞系は P_{48-56} をパルスされた標的を認識したが、 $P_{242-250}$ をパルスされた標的を認識しなかったし、その逆も成り立った)、あるいはインフルエンザHLA-A2特異的ペプチドFMP M1₅₈₋₆₆を認識しなかった。このことは、CD8T細胞は抗原特異的であり、HLA-A*201制限であることを示す。このことは、IFN 分泌に加えて、ペプチド特異的CD8⁺T細胞が強力なCTLエフェクター細胞であることも示す。

【0091】

これらのペプチド特異的CD8⁺細胞系が内因性のエピトープを認識できたかどうかの問題については、自己由来の単球由来マクロファージを生きた細菌M. bovis BCG/M. Tuberculosis、あるいはAg85A蛋白全体を発現する組み換えワクシニアウイルス (rVV) 感染させることにより解答が得られた。 P_{48-56} および $P_{242-250}$ に特異的なCTL細胞系がAg85Aを発現するrV

V、M. bovis BCGまたはM. tuberculosisのいずれに感染した自己由来のマクロファージであっても認識するという観察結果は、この抗原がMHCクラスI提示経路を経て内因性のプロセッシングを受け、かくしてHLA-A2によるエピトープP₄₈₋₅₆およびP₂₄₂₋₂₅₀の提示が起こるということを示すものである。

【0092】

まとめると、我々は、2種のCD8⁺T細胞のHLA-A*201制限エピトープをM. tuberculosisの主要分泌蛋白であるAg85A中に同定した。健康なBCG接種されたドナー由来の循環PBMCsはこれらのエピトープを認識し、インフルエンザマトリックス蛋白の場合と同様の頻度で防御的サイトカインIFN- γ を産生する。ペプチド特異的細胞系は、ペプチドをパルスされた標的細胞に対して強力なCTL活性を有する。

【0093】

さらにそのうえ、これらのペプチド特異的CD8⁺T細胞は、内因性のプロセッシングを受け、M. bovis BCGおよびM. tuberculosisに感染したマクロファージから提示された抗原を認識することができる。これらの結果は、これらのAg85Aエピトープがワクチン中に使用することに特に適したペプチドであることを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> GLAXO GROUP LIMITED
 5 <120> VACCINE
 <130> N78468A GCW
 <150> GB 0003082.5
 10 <151> 2000-02-10
 <160> 4
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 15 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 20 <400> 1
 Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val
 1 5
 25
 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <400> 2
 Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val
 1 5
 35
 <210> 3
 <211> 1014
 40 <212> DNA
 <213> Mycobacterium tuberculosis
 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (1)..(1014)
 <400> 3
 atg cag ctt gtt gac agg gtt cgt ggc gcc gtc acg ggt atg tcg cgt 48
 Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg
 50 1 5 10 15
 cga ctc gtg gtc ggg gcc gtc ggc gcg gcc cta gtg tcg ggt ctg gtc 96
 Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val
 20 25 30

	ggc gcc gtc ggt ggc acg gcg acc gcg ggg gca ttt tcc cgg ccg ggc	144
	Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly	
	35 40 45	
5	ttg ccg gtg gag tac ctg cag gtg ccg tcc ccg tcc atg gcc cgt gac	192
	Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp	
	50 55 60	
10	atc aag gtc caa ttc caa agt ggt ggt gcc aac tcc ccc gcc ctg tac	240
	Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr	
	65 70 75 80	
15	ctg ctg gac gcc ctg cgc gcg cag gac gac ttc agc gcc tgg gac atc	288
	Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile	
	85 90 95	
20	aac acc ccg gcg ttc gag tgg tac gac cag tcc ggc ctg tcc gtg gtc	336
	Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val	
	100 105 110	
25	atg ccg gtg ggt ggc cag tca agc ttc tac tcc gac tgg tac cag ccc	384
	Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro	
	115 120 125	
30	gcc tgc gcc aag gcc ggt tgc cag act tac aag tgg gag acc ttc ctg	432
	Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu	
	130 135 140	
35	acc agc gag ctg ccg ggg tgg ctg cag gcc aac agg cae gtc aag ccc	480
	Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro	
	145 150 155 160	
40	acc gga agc gcc gtc gtc ggt ctt tcc atg gct gct tct tcc gcg ctg	528
	Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu	
	165 170 175	
45	acc ctg gcg atc tat cac ccc cag cag ttc gtc tac ccg gga gcg atg	576
	Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met	
	180 185 190	
50	tcc ggc ctg ttg gac ccc tcc cag gcg atg ggt ccc acc ctg atc gcc	624
	Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly	
	195 200 205	
55	ctg gcg atg ggt gac gct gcc gcc tac aag gcc tcc gac atg tgg gcc	672
	Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly	
	210 215 220	
60	ccg aag gag gac ccg gcg tgg cag cgc aac gac ccg ctg ttg aac gtc	720
	Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val	
	225 230 235 240	
65	ggg aag ctg atc gcc aac aac acc cgc gtc tgg gtg tac tgc gcc aac	768
	Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn	
	245 250 255	

	ggc aag ccg tcg gat ctg ggt ggc aac aac ctg ccg gcc aag ttc ctc	816
	Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu	
	260 265 270	
5	gag ggc ttc gtg cgg acc agc aac atc aag ttc caa gac gcc tac aac	864
	Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn	
	275 280 285	
10	ggc ggt ggc gcc cac aac ggc gtg ttc gac ttc ccg gac agc ggt acg	912
	Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr	
	290 295 300	
15	cac agc tgg gag tac tgg ggc gcc cag ctc aac gct atg aag ccc gac	960
	His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp	
	305 310 315 320	
20	ctg caa cgg gca ctg ggt gcc acg ccc aac acc ggg ccc gcc ccc cag	1008
	Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln	
	325 330 335	
	ggc gcc	1014
	Gly Ala	
25	<210> 4	
	<211> 338	
	<212> PRT	
	<213> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
30	<400> 4	
	Met Gln Leu Val Asp Arg Val Arg Gly Ala Val Thr Gly Met Ser Arg	
	1 5 10 15	
35	Arg Leu Val Val Gly Ala Val Gly Ala Ala Leu Val Ser Gly Leu Val	
	20 25 30	
	Gly Ala Val Gly Gly Thr Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly	
	35 40 45	
40	Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro Ser Met Gly Arg Asp	
	50 55 60	
45	Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn Ser Pro Ala Leu Tyr	
	65 70 75 80	
	Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe Ser Gly Trp Asp Ile	
	85 90 95	
50	Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser Gly Leu Ser Val Val	
	100 105 110	
	Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr Gln Pro	
	115 120 125	

	Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys Trp Glu Thr Phe Leu	
	130	135 140
5	Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn Arg His Val Lys Pro	
	145	150 155 160
	Thr Gly Ser Ala Val Val Gly Leu Ser Met Ala Ala Ser Ser Ala Leu	
		165 170 175
10	Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val Tyr Ala Gly Ala Met	
		180 185 190
	Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly Pro Thr Leu Ile Gly	
		195 200 205
15	Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala Ser Asp Met Trp Gly	
		210 215 220
20	Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp Pro Leu Leu Asn Val	
		225 230 235 240
	Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp Val Tyr Cys Gly Asn	
		245 250 255
25	Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu Pro Ala Lys Phe Leu	
		260 265 270
	Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe Gln Asp Ala Tyr Asn	
		275 280 285
30	Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe Pro Asp Ser Gly Thr	
		290 295 300
35	His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn Ala Met Lys Pro Asp	
		305 310 315 320
	Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr Gly Pro Ala Pro Gln	
		325 330 335
40	Gly Ala	

【図面の簡単な説明】

【図1】 合成20mer Ag85A8ペプチド（完全Ag85A配列におよぶ10aaが重複）での再刺激に反応したエム・ボビスBCG反応性CD8⁺T細胞によるIFN γ の分泌を示す。

【図2】 FMP M₁₅₈₋₆₆、P₄₈₋₅₆、P₂₄₂₋₂₅₀とともに、またはペプチドなしのいずれかで一夜PBMC刺激することによるIFN γ 産生を示す。

【図3】 HLA-A*201ドナーからの短期細胞系(STCL)のAg85AペプチドP₄₈₋₅₆(A)およびP₂₄₂₋₂₅₀(B)特異性細胞溶解活性を示す。

【図4】 Ag85A、エム・ボビスBCGまたはエム・ツベルクローシスを発現する組み換えワクシニアウイルスで感染したオートローガスなマクロファージに対して測定されたペプチド特異性CD8⁺T細胞のCTL活性を示す。

【図1A】

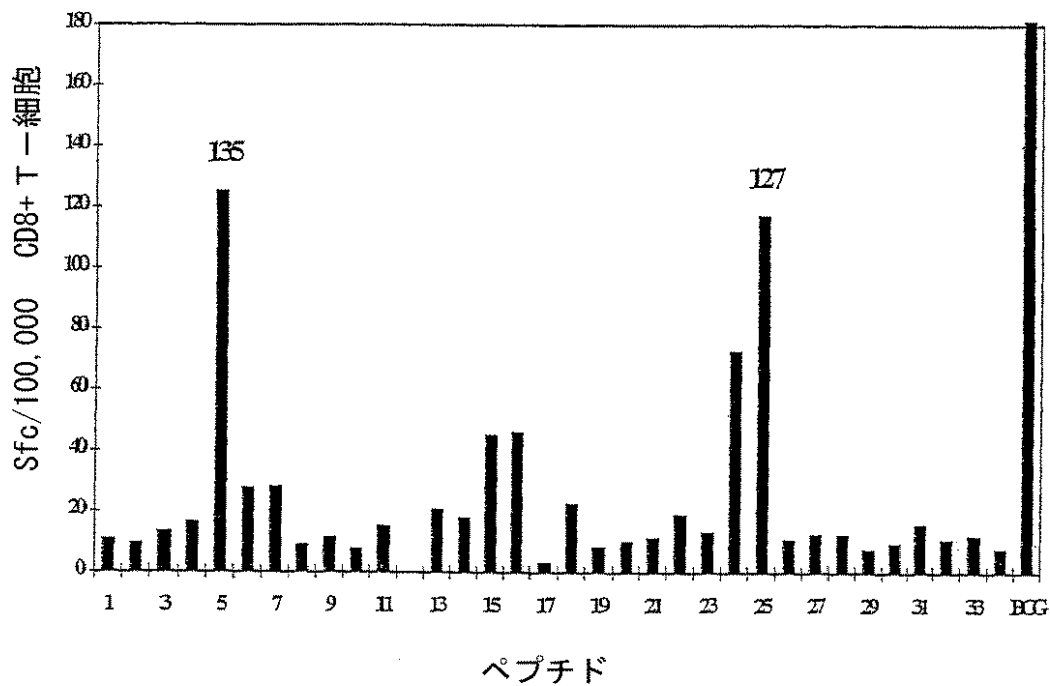


Figure 1A

【図1B】

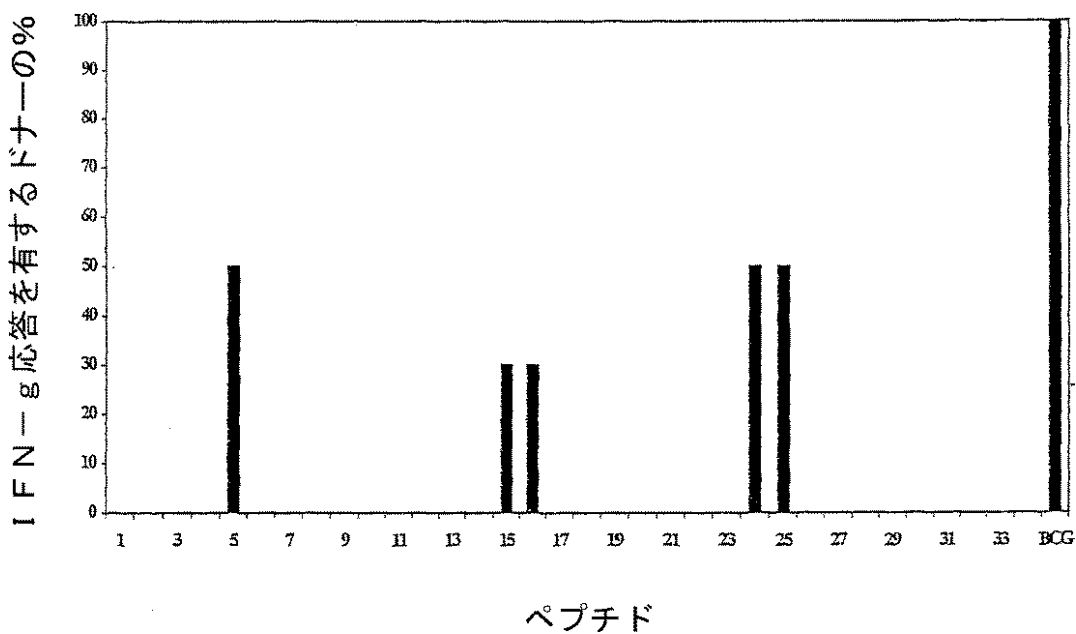


Figure 1b

【図2】

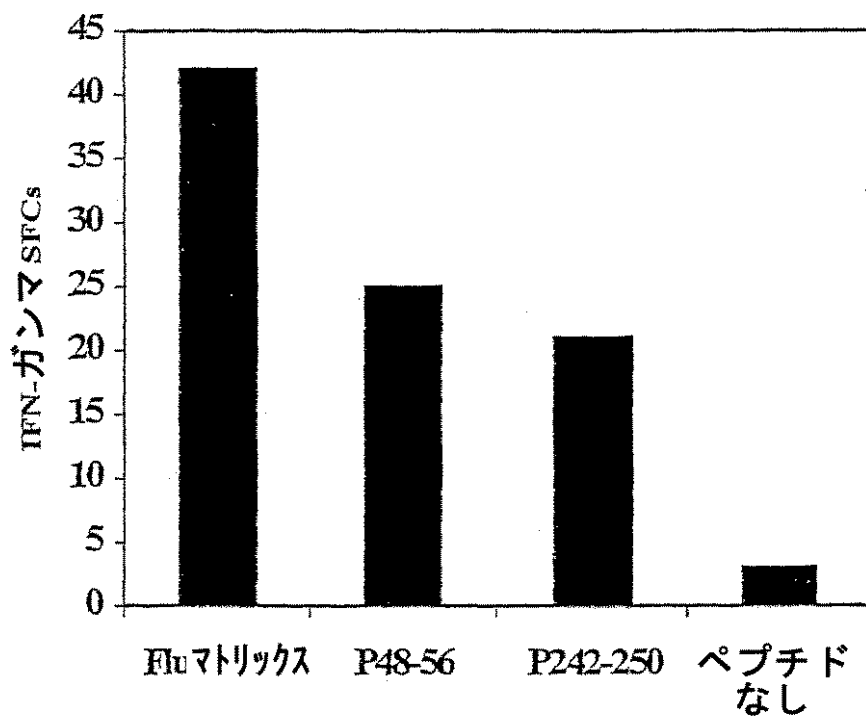


Figure 2

【図3A】

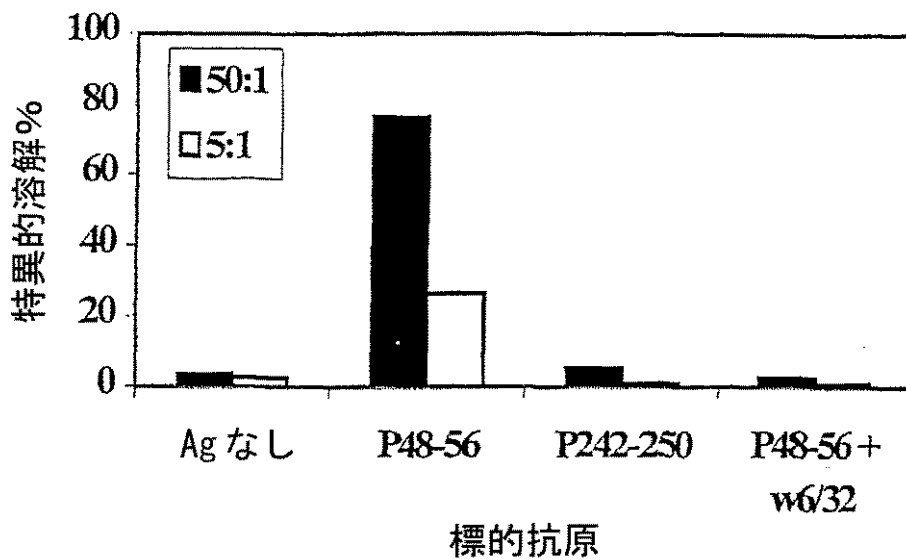


Figure 3A

【図3B】

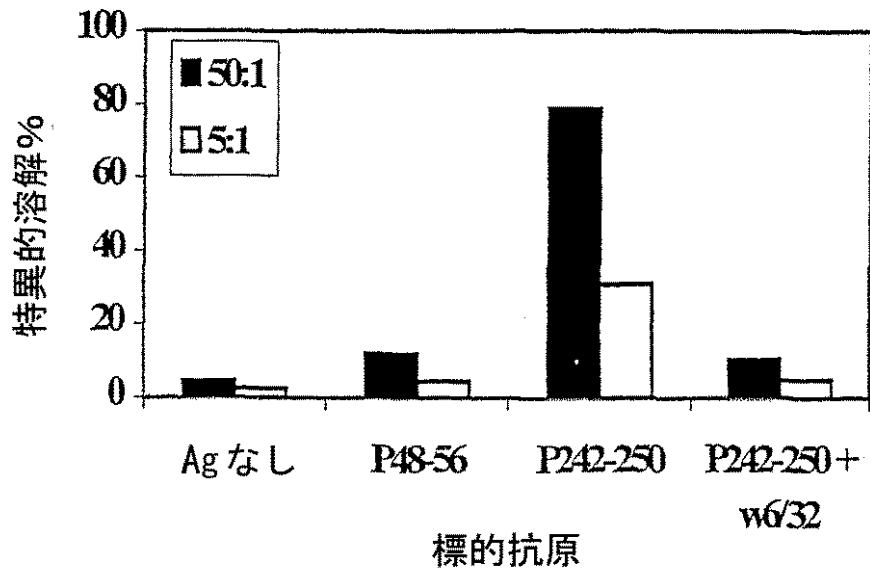


Figure 3B

【図4】

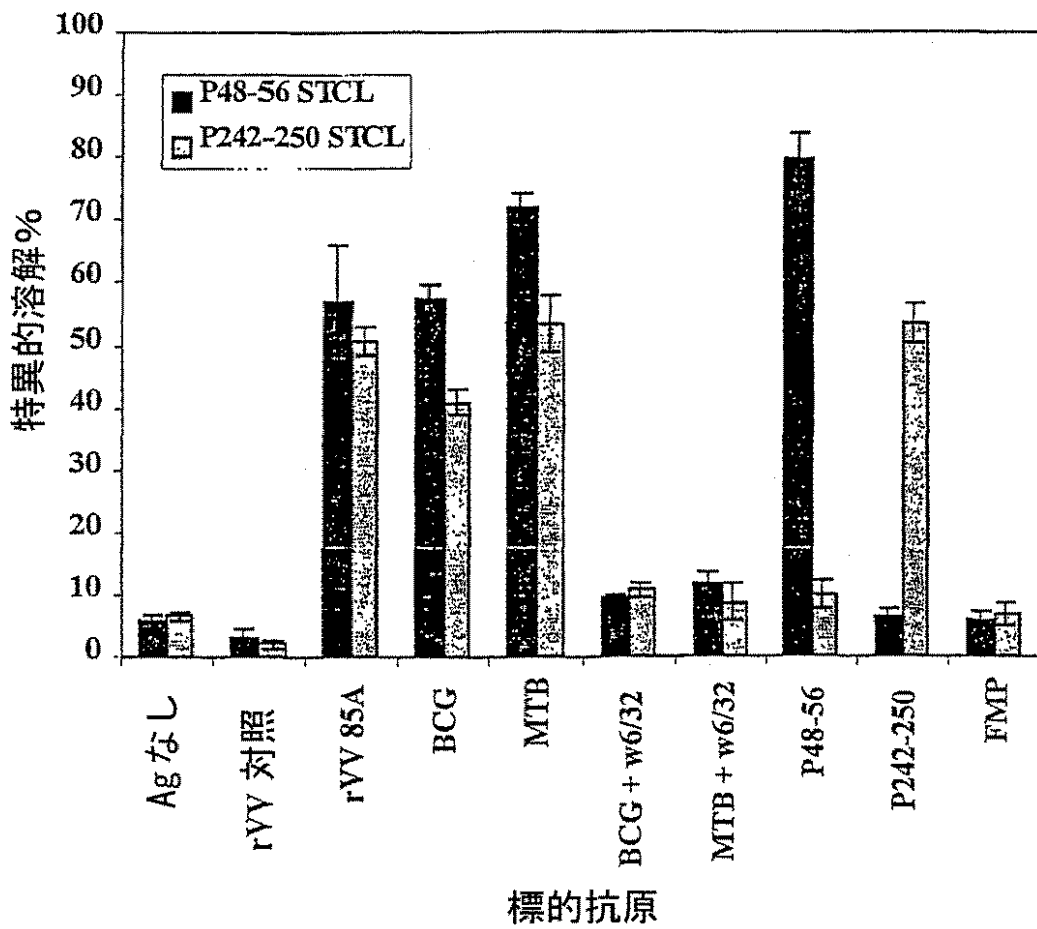


Figure 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		i. national Application No. PCT/GB 01/00561
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K35/14 A61K39/04 G01N33/53 A61P31/06 C12N5/08 A61K31/7088 G01N33/569 C07K14/705 //C07K14/35		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS 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 98 31388 A (HARTH GUENTER ;LEE BAI YU (US); UNIV CALIFORNIA (US); HORWITZ MARC) 23 July 1998 (1998-07-23) page 6, line 13 -page 6, line 15 page 10, line 4 -page 10, line 12 page 13, line 6 -page 13, line 9 page 13, line 31 -page 14, line 2 page 17, line 14 -page 17, line 24 page 34, line 11 -page 34, line 17 page 37, line 18 page 39, line 1 page 39, line 43 claims 1-28; examples 5,23,25-29 page 118 -page 119 page 126 -page 127 page 132 -page 133, line 30 page 167, line 39 page 188, line 7 page 197, line 23 -/--	1-22
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
<ul style="list-style-type: none"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family 		
Date of the actual completion of the international search 28 May 2001		Date of mailing of the international search report 06/07/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Renggli, J

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I. National Application No
PCT/GB 01/00561

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WD 96 37219 A (HARTH GUENTER ;UNIV CALIFORNIA (US); HORWITZ MARCUS A (US)) 28 November 1996 (1996-11-28) page 9, line 18 -page 9, line 26 page 16, line 14 -page 17, line 9 page 34, line 12,22,29 page 35, line 34 page 37, line 6 page 37, line 48 examples 1-5,17,23-25 page 105 -page 106 page 112 -page 113 page 117 -page 118 claims 1,39,40,59,60,79,82,83,91</p>	1-22
X	<p>EP 0 419 355 A (INNOGENETICS NV) 27 March 1991 (1991-03-27) page 2, line 43 -page 2, line 54 page 3, line 31 -page 3, line 42 page 10, line 52 -page 10, line 54 page 26, line 22 -page 26, line 26 page 51, line 57 -page 52, line 2 claims 1-10,26,28,29,33,40,41 figures 3-5</p>	1-22
X	<p>LEE B-Y. ET AL.: "T-cell epitope mapping of the three most abundant extracellular proteins of Mycobacterium tuberculosis in outbred guinea pigs" 1999 ; INFECTION AND IMMUNITY, VOL. 67 NO. 5, PAGES 2665-2670 XP002168051 page 2668, left-hand column -page 2669; figure 2 page 2670, left-hand column, paragraph 2</p>	1,2, 9-13, 17-22
X	<p>HORWITZ M A ET AL: "Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of mycobacterium tuberculosis" 1995 ; PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON,US, VOL. 92, PAGE(S) 1530-1534 XP002126618 ISSN: 0027-8424 abstract page 1534, left-hand column, line 22 -page 1534, left-hand column, line 27</p>	1-4, 6-13, 19-22
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/GB 01/00561

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	K HUYGEN ET AL: "Immunogenecity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine" 1996 , NATURE MEDICINE,US,NATURE PUBLISHING, CO, VOL. 2, NR. 8, PAGE(S) 893-898 XP002116692 ISSN: 1078-8956 page 893, right-hand column, paragraphs 2,3 page 894, right-hand column -page 895, left-hand column, paragraph 1 page 897, left-hand column, paragraph 2	1-4, 6-13,19, 20
P,X	WO 00 39301 A (CORIXA CORP) 6 July 2000 (2000-07-06) page 3, line 5 -page 3, line 34 page 4, line 10 -page 4, line 12 page 6 -page 16 page 19, line 37 -page 19, line 38 claims 1-6	1-4, 6-13, 19-22
P,X	GELUK A. ET AL.: "Identification of major epitopes of Mycobacterium tuberculosis Ag85B that are recognized by HLA-A*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans" 1 December 2000 (2000-12-01) , JOURNAL OF IMMUNOLOGY, VOL. 165, NO. 11, PAGES 6463-6471 XP000999159 the whole document	1,2,6-22

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 14, 15 and 17 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 10 and 22 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Present claim 1, and consequently claims 2-22 which all relate to claim 1, relate to an extremely large number of possible (i) epitope analogues or (ii) expression vectors comprising a polynucleotide encoding said epitope analogues.

Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is not to be found for items (i)-(ii) listed above, since the present application does not directly and unambiguously disclose an epitope analogue or an expression vector encoding it.

In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the specific sequences ID:1-4 and/or relating to the polypeptide sequences of claim 1 of formula (I).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 01/00561

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9831388	A	23-07-1998	AU 6029898	07-08-1998
			EP 1005365	07-06-2000
WO 9637219	A	28-11-1996	AU 6024596	11-12-1996
			BR 9608894	07-12-1999
			CA 2222000	28-11-1996
			EP 0828510	18-03-1998
			JP 11506320	08-06-1999
EP 0419355	A	27-03-1991	GR 3033328	29-09-2000
			AT 189684	15-02-2000
			AU 6414390	18-04-1991
			CA 2042016	20-03-1991
			DD 295869	14-11-1991
			DE 69033453	16-03-2000
			DE 69033453	21-09-2000
			ES 2144394	16-06-2000
			JP 2872172	17-03-1999
			JP 9234096	09-09-1997
			JP 2756368	25-05-1998
			JP 4501811	02-04-1992
			US 5916558	29-06-1999
WO 0039301	A	06-07-2000	AU 2594500	31-07-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
C 0 7 K	14/35	C 0 7 K	4 C 0 8 7
	14/47		4 H 0 4 5
	14/705		
C 1 2 N	5/06	C 1 2 Q	
	5/10	G 0 1 N	D
	15/09		Y
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 N	A
G 0 1 N	33/53		B
			E

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

(72)発明者 ヘーゼル・マーガリート・ドックレル
イギリス、ダブリューシー1イー・1エイチティ、ロンドン、ケッペル・ストリート、ロンドン・スクール・オブ・ハイジーン・アンド・トロピカル・メディスン

(72)発明者 スティーブン・マーク・スミス
イギリス、ビーエス8・1ジェイエル、ブリストル、クリフトン、メリディアン・プレイス30番、2フロアー・フラット

(72)発明者 ロジャー・ブルックス
イギリス、オーエックス3・9ディユー、オックスフォード、ジョン・ラドクリフ・ホスピタル、ユニバーシティ・オブ・オックスフォード

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA02 DA02 DA20
EA02 FA01 GA11 HA17
4B063 QA01 QA06 QA18 QA19 QQ06
QQ08 QQ43 QQ79 QR48 QR77
QS36 QX07 QX10
4B065 AA36Y AA90X AA91X AA94X
AA95X AB01 AC14 AC20
BA01 BA02 BA30 CA24 CA45
CA46
4C084 AA13 ZB092 ZB352
4C085 AA03 BA09 BB11 CC07 DD62
EE01 EE06 FF13
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 ZB35
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA40
BA42 CA11 CA40 DA86 EA20
EA31 EA50 EA52 FA74

专利名称(译)	分枝杆菌AG 85复合特异性T细胞肽及其在诊断和治疗应用中的用途		
公开(公告)号	JP2003522150A	公开(公告)日	2003-07-22
申请号	JP2001557571	申请日	2001-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素集团有限公司		
[标]发明人	ヘーゼルマーガリートドックレル ステイーブンマークスミス ロジャーブルックス		
发明人	ヘーゼル・マーガリート・ドックレル ステイーブン・マーク・スミス ロジャー・ブルックス		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/14 A61K39/00 A61K39/04 A61K39/39 A61K48/00 A61P31/06 C07K14/35 C07K14/47 C07K14/705 C12N5/06 C12N5/08 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02		
CPC分类号	C07K14/35 A61K39/00 A61K2039/5154 A61K2039/53		
FI分类号	A61K39/04.ZNA A61K35/14.Z A61K39/39 A61K48/00 A61P31/06 C07K14/35 C07K14/47 C07K14/705 C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/53.Y C12N15/00.A C12N5/00.B C12N5/00.E		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/DA20 4B024/EA02 4B024/FA01 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX07 4B063/QX10 4B065/AA36Y 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA94X 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BA02 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/ZB092 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/BA09 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF13 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB37 4C087/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/BA42 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	2000003082 2000-02-10 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(a) 公式 (I) : X₁L/I/MX₂X₃X₄X₅X₆X₇V/L/I [其中X₁是G, X₂是P, X₃是V, X₄是E, X₅是Y, X₆是L, X₇是Q, 或者X₁是K或R, X₂是I或V, X₃是A, X₄是N, X₅是N, X₆是T, 而X₇是R], 或一个表位序列, 它是 (I) 的类似物, 并且可以被识别 (I) 的CD8 T细胞识别。一种多肽, 包含; 或 (b) 表达载体的CD8 T细胞应答, 该表达载体包含编码所述多肽的多核苷酸 (a), 该多核苷酸可操作地连接至能够提供所述多肽表达的调节序列 (a) 用于预防或治疗针对分枝杆菌感染的疫苗 用于制造药物。还提供了可用于治疗分枝杆菌感染的多肽, 表达载体和细胞; 以及检测可识别上述表位的T细胞的方法。

脂肪性	非極性	GAP
		ILV
	極性-非荷電	CSTM
		NQ
極性-荷電	DE	
	KR	
芳香性		HFVY