

(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2015-515276
(P2015-515276A)

(43) 公表日 平成27年5月28日 (2015.5.28)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)
C12N	1/21	(2006.01)	C12N	1/21	ZNA	4B024
C07K	19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4B064
C07K	14/35	(2006.01)	C07K	14/35		4B065
C12P	21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	4C085
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4H045

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-506943 (P2015-506943)
 (86) (22) 出願日 平成24年4月16日 (2012.4.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月7日 (2014.11.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/033757
 (87) 国際公開番号 WO2013/158061
 (87) 国際公開日 平成25年10月24日 (2013.10.24)

(71) 出願人 507158972
 アエラス グローバル ティービー ワク
 チン ファウンデーション
 アメリカ合衆国 メリーランド州 208
 50 ロックヴィル リサーチ ブールヴ
 アード 1405 스위트 300
 (71) 出願人 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
 サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
 ディカル
 フランス国、エフ-75013 パリ、リ
 ユ・ドゥ・トルビアック 101
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘパリン結合性赤血球凝集素 (HBHA) 融合タンパク質とその用途をコードする組換え型マイ
 コバクテリアム

(57) 【要約】

赤血球凝集素 (HBHA) 融合タンパク質をコードする配列を含む組換え型マイコバクテリアム (rMyC) が供給され、rMyCと融合タンパク質を製作し使用する。融合タンパク質はアミノ末端ミコバクテリアム抗原 Ag85Bリーダーペプチドを含み、融合タンパク質の書換えは Ag85Bプロモーター配列によって動かされる。組換え型融合タンパク質は rMyC によって多量に生産され、翻訳後にメチル化され、高度に抗原的である。

【選択図】 図 2

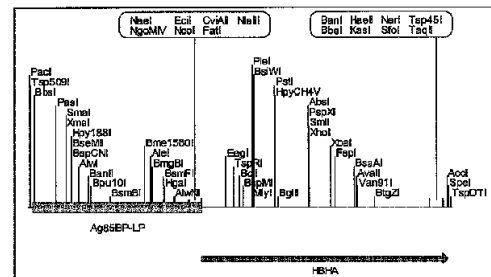


Figure 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着した、A g 8 5 B リーダー配列をコードしている核の酸性融合配列を含み、前記融合配列が、プロモーターに操作可能に結合されるマイコバクテリウム。

【請求項 2】

前記マイコバクテリウムがヒト型結核菌、ウシ型結核菌およびスメグマ菌を含む群から選択される、請求項 1 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 3】

前記マイコバクテリウムが、ウシ型結核菌 (カルメット・ゲラン桿菌) (B C G) である、請求項 1 または請求項 2 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 4】

前記 B C G がデンマーク S t a t e n s S e r u m I n s t i t u t (S S I) 型である、請求項 3 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 5】

前記 B C G S S I 型が p f o 遺伝子である、請求項 4 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 6】

前記 p f o 遺伝子がウェルシュ菌からの p f o 遺伝子である、請求項 5 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 7】

前記マイコバクテリウムが栄養要求体である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 8】

前記マイコバクテリウムがパントテン酸栄養要求体である、請求項 7 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 9】

前記核酸融合配列が、配列番号 1 に少なくとも 9 0 % 相同するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 10】

前記核酸融合配列によってコードされるポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 11】

前記マイコバクテリウム H B H A タンパク質が、ヒト型結核菌 H B H A である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 12】

前記プロモーターがマイコバクテリウム A g 8 5 B プロモーターである、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 13】

配列番号 1 に少なくとも 9 0 % 相同するヌクレオチド配列を含む孤立した核酸分子。

【請求項 14】

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する A g 8 5 B リーダー配列を含む融合タンパク質。

【請求項 15】

前記融合タンパク質が、配列番号 3 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

前記融合タンパク質がメチル化された、請求項 14 または請求項 15 に記載の融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

融合タンパク質をコードする核酸配列をマイコバクテリウム細胞に導入することと、前記マイコバクテリウム細胞が前記融合タンパク質を生産させる状況下で、前記導入されたマイコバクテリウム細胞を成長させることを含み、マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素（HBHA）タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する Ag 85 B リーダー配列を含むタンパク質を生産する、方法。

【請求項 18】

前記融合タンパク質をさらに取得することを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記導入することが電気穿孔法で実行される、請求項 17 または請求項 18 に記載の方法。 10

【請求項 20】

前記患者にマイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素（HBHA）タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する Ag 85 B リーダー配列を含む融合タンパク質への免疫反応性の欠如の存在を検知することであって、すなわちそこで、免疫反応性の存在が、前記被験者が潜在的な結核感染症があることを示す、検知することを含む、被験者が潜在的な結核感染症があるかどうかを決定する方法。

【請求項 21】

前記検知することは、前記被験者から生体サンプルを採取することと、前記生体サンプルの中で、前記免疫反応性を検知することを含む、請求項 20 に記載の方法。 20

【請求項 22】

前記の生体サンプルが、痰サンプルまたは血清サンプルである、請求項 20 または請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記検知することは、前記融合タンパク質で前記被験者を皮下注射することと、皮下注射の場所で前記免疫反応性を検知することを含む、請求項 20 から 22 のうちのいずれかに記載の方法。 30

【請求項 24】

ヒト型結核菌に対して免疫反応を必要とする被験者において、それを誘発する方法であって、

前記被験者に、マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素（HBHA）タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する、Ag 85 B リーダー配列を含む融合タンパク質の前記被験者で免疫反応を誘発するのに十分な量の投与することを含む、方法。

【請求項 25】

前記免疫反応が、1つまたは複数の B 細胞、抗体および T 細胞の生成である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記免疫反応が保護免疫反応である、請求項 24 に記載の方法。 40

【請求項 27】

ヒト型結核菌に対して免疫反応を必要とする被験者において、それを誘発する方法であって、

前記被験者にマイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素（HBHA）タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する、Ag 85 B リーダー配列をコードしている核酸融合配列を含むマイコバクテリウムを投与し、融合配列はプロモーターに操作可能に結合されており、前記マイコバクテリウムが前記被験者で免疫反応を誘発するのに十分な量で投与されることを含む、方法。

【請求項 28】 50

前記免疫反応が抗体の生成である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記免疫反応が保護免疫反応である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (HBHA) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する、Ag 85 B リーダー配列をコードしている核の酸性融合配列を含み、前記融合配列が、プロモーターに操作可能に結合されるマイコバクテリウムの培養菌を育てることを含む、組換え型ヘパリン結合性赤血球凝集素 (rHBHA) タンパク質を生産する方法。

【請求項 31】

前記 rHBHA 融合タンパク質を前記培養菌からさらに取得することを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記 rHBHA タンパク質を取得することの後に、前記 rHBHA タンパク質を精製する前記のことをさらに含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記精製が、細胞破壊とクロマトグラフィーの一方または両方によって実行される、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記 rHBHA タンパク質の識別の証明をさらに含む、請求項 30 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 35】

前記成長が振とうまたは発酵により培養において実行される、請求項 30 ~ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

前記成長が、バッチ培養または連続培養を使用することで実行される、請求項 30 ~ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

組換え型マイコバクテリウムであって、マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (HBHA) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する、Ag 85 B リーダー配列をコードしている核の酸性融合配列を含み、前記融合配列が、プロモーターに操作可能に結合される、組換え型マイコバクテリウムと、

前記シードロットの保管の間、生きた状態で前記組換えマイコバクテリウムを維持することに適切な培養とを含む、組換えマイコバクテリウムのシードロット。

【請求項 38】

ヘパリン結合性赤血球凝集素 (HBHA) タンパク質を含む組成物を調製する方法であって、

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (HBHA) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する、Ag 85 B リーダー配列をコードしている核の酸性融合配列を含み、前記融合配列が、プロモーターに操作可能に結合されるマイコバクテリウムの培養菌を育てることと、

前記 rHBHA 融合タンパク質を前記培養菌からさらに取得することと、

rHBHA 融合タンパク質を精製することと、

前記精製された rHBHA 融合タンパク質を生理学的に許容可能な担体と結合することを含む、方法。

【請求項 39】

前記成長が振とう培養で発酵により実行される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記組成物に対して、HBHA ではない薬品、1 つまたは複数の抗原性補強剤および 1 つまたは複数の免疫原性補強剤からなる群からさらに選択された 1 つ以上の薬剤を加える

10

20

30

40

50

ことを含む、請求項 38 または請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 30 から 50 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内で含まれる、請求項 1 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 42】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたは構成する、請求項 41 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 43】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 30 ~ 50 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内で含まれる、請求項 14 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 44】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 43 に記載の融合タンパク質。

【請求項 45】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 30 ~ 50 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内で含まれる、請求項 20、24、27、30、37 または 38 に記載の方法。

【請求項 46】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 45 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

説明

発明の背景

本発明は一般的にヘパリン結合性赤血球凝集素 (HBHA) 融合タンパク質をコードする配列を含み、明示する組換え型マイコバクテリウムに関するものである。融合タンパク質はアミノ末端マイコバクテリア抗原 Ag 85 B リーダー配列を含んでおり、融合タンパク質の書換えは適切なプロモーター、例えば、Ag 85 B プロモーターによって動かされる。また、本発明は例えば痘苗原として、組換え型マイコバクテリウムおよび組換え型融合タンパク質を製造し、使用方法を提供する。

【背景技術】

30

【0002】

結核 (TB) は毎年 800 万の新しい症例があり 200 万人が死に至る国際的な公衆衛生問題である。結核診療の特に問題の多い側面は、ヒト結核菌 (Mtb) 細菌が潜在的で無症候性の状態に入り、長期間に潜在的に感染した個人に持続する能力である。そのような個人は、例えば HIV などの病気または状態によって引き起こされた免疫抑制、化学療法や副腎皮質ホルモンの使用、老化等に伴う免疫低下に起因する病気の再発に影響されやすい。現在約 20 億人 (世界の人口の 1/3) が潜在的に Mtb に感染しており、潜在的な結核の活性化は、活動性疾患の新しい症例のほとんどを占める。再活性化は、肺の炎症、壊死と空洞化、気管支に病変の排液をもたらすプロセスに関連している。気管支病変を持つ個人が咳をするときに生成されるエアロゾルが、未感染で感染しやすい人々に対する Mtb 有機体の拡散を招き、このように感染サイクルが持続される。

40

【0003】

結核に対する唯一の現在利用可能なワクチンはウシ型結核菌 (カルメット - ゲラン桿菌) (BCG) は、1921 年に最初に導入された。BCG は広く活用されており、そして研究は、いくらかの目的のために BCG が有効であることを (例えば、播種性結核に対する) 示しているが、潜在的な結核の発生、持続および再発を妨げることにに関して効果がないことが知られている。

【0004】

結核に対する改善された、より有効なワクチンを開発する継続的な必要がある。特に、潜伏結核感染の開発、保持、そして / または、再発に対する保護を提供するワクチンを開

50

発する必要がある。

【0005】

T B ワクチンにおける使用が提案されている1つのタンパク質は、ヘパリン結合性赤血球凝集素(H B H A)タンパク質である。H B H Aは、結核菌と宿主との相互作用を媒介する22k D Aのメチル化された表面露出型タンパク質であり、非貪食性細胞への付着因子として作用する。C末端リジン残基のメチル化は、タンパク質の生物化学的および免疫学的特性の両方に影響を及ぼすことが知られており、複数の実験的発見は、H B H AをM t bの肺外播種のプロセスに関連付けている(非特許文献1)。非特許文献2は、H B H Aの共有原子価のメチル化がM t bで忌避されたネズミでの保護的なT細胞応答の誘引に必要であることを示し、Z a n n e t t iらは、浄化されたメチル化H B H Aが、制御と比較して結核患者から得られた血清によって強く認められることを示し、非メチル化H B H Aはそうではないことを示した(非特許文献3)。これらおよび他の研究を踏まえて、H B H Aに基づくワクチンの開発がT Bの予防および/または治療のための効果的な戦略を示し得ることが提示されている。

10

【0006】

特許文献1、ここに参考文献として完全に援用される全内容が、メチル化組換え体H B H Aを含む免疫原組成物を報告する。P e t h eによると、2つの方法の1つでH B H Aを生産できる。1:異種細胞(大腸菌またはスメグマ菌)内の組換え型非メチル化H B H Aタンパク質の生産、そして翻訳後に化学的または酵素的な方法を使用することで、精製された組換え体H B H Aをメチル化すること、または2:H B H Aおよびマイコバクテリウムメチル基転移酵素をコードする同時発現のヌクレオチド配列に組換え型細胞を使用すること。方法1はタンパク質調製のための複数のことを含む。方法2はワクチンとして処理できない異種細胞の使用を含む。さらに、P e t h eによって使用される菌株は、抗生物質抵抗性であり、そして、タンパク質収率を最適化することに関する議論は、提供されない。このように、痘苗原として使用できる組換え型M t bのための、および/または、i n v i t r oとi n v i v oの両方で、臨床的に関連するH B H Aの十分な量を生成し、および/または臨床応用において後の使用のための製造現場で大量のH B H Aを生成する技能の必要性が生じる。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0007】

【特許文献1】米国特許第7,829,103号P e t h e ら

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】P e t h e e t a l . , 2 0 0 1 . N a t u r e 4 1 2 : 1 9 0 - 1 9 4 .

【非特許文献2】T e m m e r m a n ら (N a t u r e M e d i c i n e 1 0 , 9 3 5 - 9 4 1 (2 0 0 4))

【非特許文献3】C l i n D i a g n L a b I m m u n o l S e p t e m b e r 2 0 0 5 v o l . 1 2 n o . 9 1 1 3 5 - 1 1 3 8

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は一般的にヘパリン結合性赤血球凝集素(H B H A)融合タンパク質をコードする核酸配列を含み、発現する組換え型マイコバクテリウム(r M y c)を規定するものである。融合タンパク質はアミノ末端で付着したマイコバクテリア抗原A g 8 5 Bリーダペプチドを含む。融合蛋白質は翻訳後にメチル化されており、ネイティブのH B H Aのものと同じであるか、または近似のメチル化パターンでタンパク質をもたらす。その結果、得られた融合タンパク質はそのように高抗原性であり、多量の抗原性融合タンパク質は、本発明の方法を使用することで生成できる。融合タンパク質の書換えは適切なプロモーター

50

によって動かされ、そのプロモーターは、構成的または誘導的に可能な場合がある。1つの実施形態では、プロモーターはA g 8 5 Bプロモーター配列である。また、本発明はr M y cを（例えば工業規模で）製造する方法、そして/または免疫反応を誘導するために、または融合タンパク質を製造するために、または種培養を製造するために、痘苗原として例えばr M y cを使用する方法、そして例えば、痘苗原として融合タンパク質を製造し使用する方法、または、免疫反応を引き出すか、または例えば、潜伏結核感染力を検出する病気の特徴として誘導する。

【0010】

本発明の目的は、マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素（H B H A）タンパク質、融合配列が、プロモーターに操作可能に結合されるアミノ末端に付着した、A g 8 5 Bリーダー配列をコードしている核酸融合配列を含み、明示するために遺伝子改変された組換え型マイコバクテリウムを生成することである。いくつかの実施形態では、マイコバクテリウムは、例えば、ヒト結核菌、ウシ型結核菌、またはスメグマ菌である。いくつかの実施形態では、マイコバクテリウムは、ウシ型結核菌、例えば、ウシ型結核菌（カルメット-ゲラン桿菌）（B C G）である。いくつかの実施形態では、B C GはB C GデンマークS t a t e n s S e r u m I n s t i t u t（S S I）型であり、例えば、クロストリジウム属ウェルチ菌からのp f oの遺伝子などのp f oの遺伝子を明示する可能性がある。いくつかの実施形態では、マイコバクテリウムは栄養要求変異株、例えば、パントテン酸栄養要求変異株である。

10

【0011】

本発明のいくつかの実施形態では、核酸融合配列は、

20

【化1】

```

atgagacgac tttgcgcccc aatcgacatt tggcctccac acacgggatg ttctggcccc
agcacacgac gacatacagg acaaaggggc acaagtatgg ccacagacgt gagccgaaag
attcgagcctt ggggacgccc attgatgacg ggcacggcag cggctgtagt ccttccgggc
ctgggtggggc ttgcccggcgg agcggcaacc gcgggcgcggt tctccatggc tgaaaactcg
aacattgatg acatcaaggc tcogttgctt gccgcgcttg gagcggccga cctggccttg
gccactgtca acgagttgat cacgaacctg cgtgagcgtg cggaggagac tcgtacggac
acccgcagcc gggtcgagga gagccgtgct cgcctgacca agctgcagga agatctgccc
gagcagctca ccgagctgcg tgagaagtgc accgcccagg agctgcgtaa ggccgcccag
ggctacctcg aggcgcgac tagccggtac aacgagctgg tgcgagcgcgg tgaggccgct
ctagagcggc tgcgcagcca gcagagcttc gaggaagtgt cggcgcgcgc cgaaggctac
gtggaccagg cgggtggagtt gaccacaggag gcggtgggta cggtcgcacg gcagacccgc
gcggtcgggtg agcgtgcccgc caagctggtc ggcacgcagc tgcctaagaa ggctgctccg
gccaagaagg ccgctccggc caagaaggcc gctccggcca agaaggcggc ggccaagaag
gcgccccgca agaaggcggc ggccaagaag gtcacccaga agtag （配列番号1）

```

30

40

である。

【0012】

他の実施例では、核酸融合配列によってコードされたポリペプチドは、アミノ酸配列を持っている：

【化 2】

mrncaridi wpphtvcsgp strrhtgqrg tsmatdvsrk

irawgrlmi gtaaavvlpq lvglaggaat agafsmaens niddikapll aalgaadlal atvnelitnl reracctrtd
 trsrveesra rltklqedlp eqitelrekf taeelrkaae gyleaatsry nelvergeaa lerlrsqqsf ecvsaraogy
 vdqaveltqe algivasqtr avgeraaklv gielpkkaap akkaapakka apakkaaakk apakkaaakk vtqk
 (配列番号 3)。

10

【 0 0 1 3】

いくつかの実施形態では、マイコバクテリウム H B H A タンパク質はヒト結核菌 H B H A である。さらに別の実施形態では、プロモーターはマイコバクテリウム A g 8 5 B プロモーターである。

【 0 0 1 4】

また、本発明は、以下のヌクレオチド配列を有する分離された組換え核酸分子を提供する。

【化 3】

atgagacgac ttgcgccc aatcgacatt tggcctccac acacgggatg ttctggcccg
 agcacacgac gacatacagg acaaaggggc acaagtalgg ccacagacgt gagccgaaag
 attcgagctt ggggacgccg allgatgac ggcacggcag cggctgtagt cctccgggc
 ctggtggggc ttgccggcgg agcggcaacc gcgggcgcgt tctccatggc tgaaaactcg
 aacattgatg acatcaaggc tccgttgctt gccgcgcttg gagcggccga cctggccttg
 gccactgtca acgattgat cacgaacctg cgtgagcgtg cggaggagac tcgtacggac
 accccagacc gggctcagga gagccgtgct cgcctgacca agctgcagga agatctgcc
 gagcagctca ccgagctcgg tgagaagltc accgccgagg agctgcgtaa ggccgcccag
 ggctacctcg aggccgcgac lagccggtac aacgagctgg tcgagcgcgg tgaggccgct
 ctgagcggc tgcgagcca gcagagcttc gaggaagtgt cggcgcgcgc cgaaggctac
 gtggaccagg cggltggagt gaccaggag gcgtgggta cggtcgcatc gcagacccc
 gcggtcggtg agcgtgccgc caagctggtc ggcatcgagc tgcctaagaa ggctgctccg
 gccaaagaagg ccgctccggc caagaaggcc gctccggcca agaaggcggc ggccaagaag
 gcgcccgcga agaaggcggc ggccaagaag gtcaccaga agtag (配列番号 1)。

20

30

【 0 0 1 5】

また、本発明はマイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質のアミノ末端に付着した A g 8 5 B リーダー配列を含む組換え型の融合タンパク質を生成する。1つの実施形態では、全体の融合タンパク質は、1つの m R N A として転写され、単一のポリペプチド (タンパク質) として翻訳される。1つの実施形態では、組換え型の融合タンパク質はアミノ酸配列を持っている :

40

【化 4】

mrrlcaridi

wpphtvcsgp strrhigqrg tsmatdvsrk irawgrrlmi gtaaavvlpg lvglaggaat agafsmaens
niddikapll aalgaadlal atvncilitni rraccturtd trsrveesra ritklqedlp eqltelrckf taecrkaae
gylcaatsry nelvergeaa lerlrsqqsf ecvsaracgy vdqavcltqc algtvasqtr avgeraaklv gielpkkaap

akkaapakka apakkaaakk apakkaaakk vtqk (配列番号3)。

10

いくつかの実施形態では、組換え型の融合タンパク質はメチル化される。

【0016】

また、本発明はマイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質のアミノ末端に付着したAg85Bリーダー配列を含む組換え型の融合タンパク質を生成する方法を提供する。本方法は以下を含む。1)組換え型融合タンパク質をコードしている核酸配列でマイコバクテリウム細胞のような細菌の細胞を導入すること；2)バクテリア細胞を組換え型融合タンパク質を生成させる状況下で導入されたバクテリア(例えばマイコバクテリウム)細胞を成長させること；3)組換え型融合タンパク質を取得すること；いくつかの実施例では、導入は電気穿孔法によって実行される。

【0017】

また、本発明は、被験者が潜伏結核感染を有するかどうかを決定する方法を提供する。本方法は、マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質のアミノ末端に付着するAg85Bリーダー配列を含む組換え型融合タンパク質に患者の免疫反応性の有無を決定することを含む。免疫反応性の存在は、被験者が潜伏結核感染を有することを示す。免疫反応性の有無を決定することは、以下のものを含み得る。例えば、1)被験者から生体サンプルを取得すること、そして2)生体サンプルで免疫反応性の有無を決定すること。典型的な生体サンプルが含まれるが、痰サンプルと血清サンプルに限定されていない。他の実施例では、免疫反応性の有無を決定することは、以下の検知のこを含む。1)被験者に組換え型融合タンパク質を皮内に皮下注射すること。そして、2)皮内注射の場所で免疫反応性の有無を決定すること。

20

30

【0018】

また、本発明は必要に応じて被験者でヒト型結核菌に対して免疫反応を誘導する方法を提供する。この方法は、前記被験者で免疫反応を誘導するのに十分なマイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質のアミノ末端に付着したAg85Bリーダー配列を含む組換え型融合タンパク質を投与することを含み、「治療的な」量と言及される場合がある。1つの実施形態では、誘導された免疫反応は1つまたは複数のB細胞、抗体およびT細胞の生成である。いくつかの実施形態では、免疫反応は保護免疫反応である。

【0019】

また、本発明は必要に応じて被験者でヒト型結核菌に対して免疫反応を誘導する方法を提供する。本方法は、被験者にマイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着した、Ag85Bリーダー配列をコードしている核酸融合配列を含む組換え型融合タンパク質を投与することを含む。本融合配列は、プロモーターに操作可能に結合されており、組換え型マイコバクテリウムは被験者で免疫反応を誘導するのに十分な量で投与される。1つの実施形態では、免疫反応が抗体の生成である。いくつかの実施形態では、免疫反応は保護免疫反応である。

40

【0020】

本発明は、組換え型ヘパリン結合性赤血球凝集素(rHBHA)タンパク質を生産する方法を提供する。本方法は、以下のものを含む。1)マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質アミノ末端に付着した、Ag85Bリーダー配列を

50

コードしている核酸融合配列を含む組換え型マイコバクテリアの培養菌を育てること。rHBHAが生成される条件下で、前記融合配列がプロモーターに操作可能に結合されること。いくつかの実施形態では、本方法はさらに培養菌からrHBHAタンパク質を取得することを含む。また、本方法は例えばrHBHAを取得することの後に、rHBHAタンパク質を精製することを含み得る。精製は、1つまたは複数の物理化学的なテクノロジーを使用して実行される可能性がある。例えばクロマトグラフィー（例えば1つまたは複数の親和力、立体排除、イオン交換または疎水性相互作用クロマトグラフィー）そして/または、細胞破壊技術（例えば1つまたは複数の高圧細胞破壊、ビーズ破砕機、均質化、超音波処理、遠心分離、など）がある。また、本方法はrHBHAタンパク質の識別の証明を含み得る。いくつかの実施形態では、成長することは振とうまたは発酵により培養において実行される。いくつかの実施形態では、成長はバッチ培養または連続培養を使用することで実行される。

10

【0021】

本発明はさらに、組換え型マイコバクテリウムのシードロットを生成する。本方法は、以下のシードロットを含む。1)マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質のアミノ末端に付着した、Ag85Bリーダー配列をコードしている核酸融合配列を含む組換え型マイコバクテリウム、融合配列はプロモーターに操作可能に結合される。そして、2)シードロットの保管の間、生菌状態で、組換え型マイコバクテリアを維持することにふさわしい媒体。

20

【0022】

本発明はさらに、ヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質を含む組成物を調製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法はいかを含む。1)マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質アミノ末端に付着した、Ag85Bリーダー配列をコードしている核酸融合配列を含む組換え型マイコバクテリアの培養菌を育て、融合配列がプロモーターに操作可能に結合されること。2)培養菌からrHBHAタンパク質を取得すること。3)rHBHAタンパク質を精製すること。4)精製されたrHBHAタンパク質を生理学的に許容可能な担体と結合すること。成長は振とう培養で発酵により実行され得る。加えて、本方法はさらに1つまたは複数の治療上有益な薬剤を含み得る。含まれるがこれに限定されない、rHBHAおよび生理学的に許容可能な担体に対しての、HBHAではない薬品、1つまたは複数の抗原性補強剤および1つまたは複数の免疫原性補強剤。これらの組成物は例えばワクチンとして、治療または診断、または他の目的のために使われ得る。

30

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】A:HBHA融合配列をコードする、DNA配列(配列番号1)Ag85Bリーダーペプチドは強調されたヌクレオチドによってコードされる。B:Aの場合のようにHBHA融合タンパク質をコードしているが、また、太字で典型的なAg85Bプロモーター配列を示しているDNA配列(配列番号2)。

【図1B】A:HBHA融合配列をコードする、DNA配列(配列番号1)Ag85Bリーダーペプチドは強調されたヌクレオチドによってコードされる。B:Aの場合のようにHBHA融合タンパク質をコードしているが、また、太字で典型的なAg85Bプロモーター配列を示しているDNA配列(配列番号2)。

40

【図2】コンピュータ上での複製および相補性戦略。

【図3A】A:パントテン酸塩相補プラスミド(pKAMCB)およびB:pKAMCB₂へのHBHA遺伝子の複製を図式的に示す。

【図3B】A:パントテン酸塩相補プラスミド(pKAMCB)およびB:pKAMCB₂へのHBHA遺伝子の複製を図式的に示す。

【図4】カナマイシン耐性のためにpKAMCB₂+HBHA複製をマーク解除することを図式的に示す。

【図5A】Aのアミノ酸配列、Bと比較した組換え型のHBHA(配列番号3)、アミノ

50

末端メチオニンが開裂された自然のHBHA（配列番号4）およびC、N-末端でAg85Bリーダーの場所を図示的に示す。

【図5B】Aのアミノ酸配列，Bと比較した組換え型のHBHA（配列番号3）、アミノ末端メチオニンが開裂された自然のHBHA（配列番号4）およびC、N-末端でAg85Bリーダーの場所を図示的に示す。

【図5C】Aのアミノ酸配列，Bと比較した組換え型のHBHA（配列番号3）、アミノ末端メチオニンが開裂された自然のHBHA（配列番号4）およびC、N-末端でAg85Bリーダーの場所を図示的に示す。

【図6】Aのために検査された組換え型のBCG群体PCR、HBHA遺伝子、B、核外遺伝子骨格の存在およびC、カナマイシン耐性マーカーの欠損。クローンno.5は検査でHBHAの遺伝子の存在、完全な核外遺伝子骨格、およびカナマイシン遺伝子の欠損において陽性と出た。

【図7】AERAS445発育動態、BCGデンマークSSI型式クロストリジウム属ウエルチ菌pf0の遺伝子パントテン酸栄養要求変異株、および本発明のHBHA融合タンパク質をコードするようにさらに改変された。

【図8】AERAS-445でHBHAの式上で4057D2反HBHAMonoclonal抗体を使用し示すウエスタンブロット。矢印1および2は内因性HBHAと組換え型のHBHAタンパク質を示す。

【図9】AERAS-445でHBHAの式上で1G10抗体を使用し示すウエスタンブロット。レーン：1AERAS-401；2AERAS-413；3AERAS445。矢印1および2は天然のHBHAと組換え型のHBHAタンパク質を示す。

【図10】AERAS-445を製造する異なる段階で、1G10抗体を使用するウエスタンブロットHBHA式。矢印1および2は天然のHBHAと組換え型のHBHAタンパク質を示す。レーン：1AERAS413。2段階2製造のサンプル。3継承発酵槽のサンプル。矢印1および2は内因性HBHAと組換え型のHBHAタンパク質を示す。

【図11】サンドイッチELISA法で決定している型における、HBHAタンパク質の収量。A、視覚的に描写される、およびB、および棒グラフとして描写される。

【図12】AERAS445から精製されたrHBHAの質量分析法。

【図13】AERAS445から精製されたrHBHAのC-末端側終端の質量分析法。

【図14】ELISAによるMonoclonal抗体3921E4を使用する抗原性分析（A）および4057D2（B）。

【発明を実施するための形態】

【0024】

1つの実施形態で、本発明は一般的にヘパリン結合性赤血球凝集素（HBHA）融合タンパク質をコードする核酸配列を含み、発現する組換え型マイコバクテリウム（rMyc）を規定するものである。組換え型マイコバクテリウムは、抗生物質抵抗性ではなく、弱毒生であるため、ワクチン製剤を投与できる。本融合タンパク質はアミノ末端で付着したマイコバクテリア抗原Ag85Bリーダー配列を含む。本発明のrMycsは、転写が適切なプロモーターによって駆動される多量の融合タンパク質を生成する。また、本融合タンパク質は工業生産の過程でrMycを回復させて、ワクチン製剤または診断の一部として使用し得る。

【0025】

1つの実施形態では、本発明の抗原性組換え融合タンパク質をコードする核酸配列は、図1A（配列番号1）で描かれたDNA配列である。以上のように、核酸はヌクレオチド1から225（アンダーラインを引かれる）でAg85Bリーダー配列をコードし、ヌクレオチド226から825でHBHAタンパク質をコードする。さらに、5'末端で図1Bに描写された例示的な実施形態では、核酸はヌクレオチド1～184（太字で示す）でAg85Bプロモーター配列を含む。図1Bに示す実施形態では、それ自体は細胞によって生成される翻訳された融合タンパク質は、ヌクレオチド185から1009によってコードされており、すなわち、プロモーター領域は翻訳されない。

10

20

30

40

50

【0026】

1つの実施形態では、本発明は、配列番号1に記載の配列、または配列を含む核酸を包含する(図1Aを参照)。別の実施形態では、本発明は、配列番号2に記載の配列、または配列を含む核酸を包含する(図1Bを参照)。別の実施形態では、本発明は、配列番号3に記載の配列、または配列を含む核酸を包含する(下記参照)。また、本発明は配列番号1および2を補足するDNAを包含する。そしてまた、配列番号1および2から翻訳されるmRNA(または、その補足)またはmRNAに基づくcDNA(ならびにこれらの様々なDNA-RNA混成)単一および二重の両方の鎖核酸を包含する。さらに、当業者は、ここで記載された(すなわち、マイコバクテリウムHBHAタンパク質のアミノ末端に付けられたAg85Bリーダー・シーケンスを含む)抗原性組換え型の融合タンパク質を生成するために配列番号1および2の正確な配列を使用する必要はないと認める。例えば、配列は、翻訳されたポリペプチドをメチル化でき、それが投与される対象における免疫反応を誘導する抗原性である限り、少なくとも配列番号1および2に対して約75、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または約99%の相応関係を使用し得る。また、相応関係のこれらのレベルも対応する上記記述の相補的DNA、RNAなどに対して適応できる。当業者は相応関係レベルを決定するための自動プログラムまたはソフトウェアに詳しい。さらに、当業者は、また、融合タンパク質をコードする核酸配列が、様々な役立つ配列、例えば、配列の遺伝子操作の容易さのための制限部位を含み得ると認める。本明細書に記載された%相互関係は決定できる、例えば、以下の検索パラメータ: 12のギャップオープンペナルティ、および1のギャップ拡張ペナルティを有するアフィンギャップ検索を使用することで、MSPRCHプログラム(オックスフォード分子)で実施されるようにSmith-Waterman相応関係検索アルゴリズムを使用する。

10

20

【0027】

組換え型シーケンスの例示的な変分は含まれるが限定されていない、若干のコードされた残りの保存的なアミノ酸の置換をコードするコドンの代用、例えば、プロモーターおよびリーダー配列間で、例えばリンカーまたはスペーサー配列をコードする配列の挿入、またはリーダー配列と配列をコードするHBHAとの間で: 配列の取扱いまたは操作を容易にする配列への多様な変化、例えば配列に隣接する規制酵素部位での挿入または変化: ベクトルの部分(例えば5フィートまたは3フィートの同じことへの相補的な突出または配列)、下記記述のように様々なタグをコードするシーケンスなど。これは、配列番号3の配列で示される、そこでは、配列の5フィートと3フィートの末端の追加非コード配列がイタリックで示されており、太字でアンダーラインを引かれた配列は前記記載のようにプロモーター領域とリーダーペプチドを表す。

30

【化 5】

ACTGTTAATTAAGTGGTCTTCGTCCGGCTTGCTTCGAGCGAGCCTACGCGGT
 GAACGCAAGTTCGGCCTCCCTGGGGGAGCACAGCCGGTAGCCCCGGGC
 CGCGATTCTGAGAAATCCGCGATAGATCCATACCCGCCATACCGTTTGTGAGC
CCCCTAAGCACACTTGCTCTGTCCGCGGCGGTAACCGATACGGAAATGAGAC
GACTTTGCGCCCGAATCGACATTTGGCCTCCACACACGGTATGTTCTGGCCCG
AGCACACGACGACATACAGGACAAAGGGGCACAAGTATGGCCACAGACGTG
AGCCGAAAGATTTCGAGCTTGGGGACGCCGATTGATGATCGGCACGGCAGCGG
CTGTAGTCCCTCCGGGCCCTGGTGGGGCTTGCCGGCGGAGCGGCAACCGCGGG
CGCGTTCTCCATGGCTGAAAACTCGAACATTGATGACATCAAGGCTCCGTTGC
 TTGCCGCGCTTGGAGCGGCCGACCTGGCCTTGGCCACTGTCAACGAGTTGAT
 CACGAACCTGCGTGAGCGTGCGGAGGAGACTCGTACGGACACCCGCAGCCG
 GGTTCGAGGAGAGCCGTGCTCGCCTGACCAAGCTGCAGGAAGATCTGCCCGAG
 CAGCTCACCGAGCTGCGTGAGAAGTTCACCGCCGAGGAGCTGCGTAAGGCCG
 CCGAGGGCTACCTCGAGGCCGCGACTAGCCGGTACAACGAGCTGGTTCGAGCG
 CGGTGAGGCCGCTCTAGAGCGGCTGCGCAGCCAGCAGAGCTTCGAGGAAGT
 GTCGGCGCGCGCCGAAGGCTACGTGGACCAGGCGGTGGAGTTGACCCAGGA
 GCGTGGGTACGGTTCGCATCGCAGACCCGCGCGGTTCGGTTCGAGCGTGCCGCC
 AAGCTGGTTCGGCATCGAGCTGCCTAAGAAGGCTGCTCCGGCCAAGAAGGCCG
 CTCCGGCCAAGAAGGCCGCTCCGGCCAAGAAGGCGGCGGCCAAGAAGGCCG
 CCGCGAAGAAGGCGGCGGCCAAGAAGGTCACCCAGAAGTAGACTAGTTCAT

10

20

30

(配列番号 1 2)。

【 0 0 2 8】

融合タンパク質の発現は、配列番号 1 に操作可能に結合されるプロモーター配列によっ
 て駆動される。1. 「操作可能に結合され」ることにより、配列番号 1 の発現は、プロモ
 ーターによって駆動されるか、または制御されるように、プロモーター配列および配列番
 号 1 が核酸分子の中に配置されることを意味する。いくつかの実施形態では、プロモーター
 は分子内で直接配列番号 1 に先行し得る。他の実施形態では、いくつかの付加配列が介
 在し得る。またさらに、配列番号 1 の発現で支援される他の制御要素は、様々なエンハン
 サー配列などの核酸分子を含み得る。本発明の実施において使用され得る例示的なプロモ
 ーターは含んでいるが、制限されない、例えば、遺伝子のプロモーター h s p 6 0、h
 s p X、p B 1 a F または m t r A など。1 つの実施形態では、プロモーターは、A g 8
 5 B プロモーターであり、例えば図 1 B (太字の配列) で描写されるように配列番号 1 に
 関して配置され、配列番号 1 は直接上流へ配置される。

40

【 0 0 2 9】

翻訳される本発明の融合タンパク質は、抗原性組換え型の融合またはキメラ蛋白 (ポリ
 ペプチド) であり、以下のものを含む。1) マイコバクテリウム H B H A タンパク質配列
 、またはその機能部分。そして 2) H B H A タンパク質のアミノ末端に付着したか、また
 は関連した、A g 8 5 B リーダーペプチド (または、その機能部分)。マイコバクテリウ
 ム H B H A タンパク質配列またはその機能部分により私たちは、すなわち、図 5 B (配列

50

番号4)で描写される配列で、HBHAタンパク質、または、抗原性であるペプチドまたはそのポリペプチド断片、例えば本発明の融合タンパク質の成分として投与されるとネイティブHBHAに結合する抗体の生成を誘導することを意味する。また、そのような断片も、ヘパリンと結合して、相互作用するのに十分であり得る。例えば、約50のアミノ酸の抗原性ペプチド断片または配列番号4のカルボキシル終点にある最後の30から50のアミノ酸についての範囲内で含まれる、長さのより少ないものは、使用され得る。そのようなペプチド断片を含むペプチドまたはポリペプチドは、長さのおよそ50のアミノ酸より大きい、全長HBHAタンパク質より一般に短いポリペプチドで使用され得る。いくつかの実施形態では、長さ約10~約20のアミノ酸までそのような活性ペプチド断片が存在し得る。他の実施形態では、ペプチド/ポリペプチドは、以下配列番号5に示された39アミノ酸のペプチドであるかまた含み得る。または少なくとも約90%または、より大きい(例えば、91、92、93、94、95、96、97、98%または99%)配列は、配列番号5に対する識別である。本発明の実施に使用され得る、HBHAタンパク質とその断片のさらなる説明は、発行済み米国特許第6,949,345号(Menozziら)により提供される。その完全な内容はここに参照により組み込まれる。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、Ag85Bリーダー配列は、単一のポリペプチドとして翻訳された2つの効力により、核酸分子の範囲内の直列型の核酸配列から直接HBHAタンパク質のアミノ末端に付着している。この場合、付着は共有原子価であり、そして、リーダー配列とHBHA配列との間には、介在するアミノ酸配列が存在しない。しかしながら、いくつかの実施形態では、例えば、スペーサーがグリシン、アラニンなどの比較的小さい荷電されていないアミノ酸を含んで、比較的短い(例えば、約1から約10までの)アミノ酸リンカーまたはスペーサー配列が2つの間に存在し得る。さらに、いくつかの実施例では、本発明の融合タンパク質は他の様々な修正を持ち得る。タグ付け配列の付属のように例えば隔離または発見を容易にする、例えばアフィニティタグのようなHisタグ、Isopetag、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、キチン結合タンパク質(CBP)、麦芽糖結合タンパク質(MBP)など、チオレドキシン、MBP、GSTなどの可溶化タグ、FLAGタグなどのクロマトグラフィータグ、V5-タグ、c-myc-タグ、HAタグなどのエピトプタグ、様々な緑色蛍光タンパク質(GFP)タグやその派生物などの蛍光タグなど。

20

30

【0031】

本発明の免疫原性組換え型の融合タンパク質配列は、例えば、HBHAのヘパリン結合領域でメチル化される、特に、メチル基は前記ヘパリン結合性領域の現在のリジン残留物によって運ばれる。

【0032】

カルボキシ末端の配列は以下のとおりである。

【化6】

KKAAPAKKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK (配列番号5)。

40

【0033】

メチル基はHBHAのC-末端領域の現在のリジン残留物のすべてまたは一部によって運ばれる。有利な点として、単一メチル化されるか、または二重メチル化されるメチル化されたリジン残基で、C-末端領域の15の現在からの少なくともおよそ10(例えば約10、11、12、13、14または15)のリジン残基は、メチル化される。

【0034】

他の代替の実施形態では、本発明の融合タンパク質は化学的に合成され得る。例えば、周知の技術である方法論を使用する。この実施形態では、例えば、上記記述のPetheのように、メチル化が試験管内で実行されるか、または実行され得る。

【0035】

50

本発明の1つの実施形態では、アミノ酸配列の組換え型の融合タンパク質は以下のとおりである。

【化7】

mrrlcaridi wpphtvcsgp sirrhtgqrg tsmatdvsrk irawgrrlmi gtaaavvlpg
lvglaggaat agafismaens niddikapll aalgaadlal atvnciltnl reraeetrd trsrveesra rtklqcdlp
cqltclrcrkf tacclrkaac gylcaatsry nelvergeaa lerlrsqqsf cevsaracgy vdqaveltqe algtvasqtr
avgcraaklv giclpkkaap akkaapakka apakkaaakk apakkaaakk vtqk (配列番号3)。

10

【0036】

他の実施形態では、アミノ酸配列の組換え型の融合タンパク質は、つまり少なくとも75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98および99%配列番号3と同一である。まだ十分な機能を保持している間、例えば、被験者で免疫反応を誘発する抗原性、投与される人、またはまだ検出するために分析において反応できること、例えば患者の潜在的な結核感染の存在。例えば保守的なアミノ酸置換は、配列で作られ得る、それによって、正に荷電する側鎖によるアミノ酸は、正に荷電する側鎖で他のアミノ酸によって代えられる(例えばリジン、ヒスチジン、アルギニン)またはそれによって、負に荷電する側鎖によるアミノ酸は、負に荷電する側鎖で他のアミノ酸によって代えられ(例えば、アスパラギン酸とグルタミン酸)または、それによって、疎水性側鎖によるアミノ酸は、疎水性側鎖で他のアミノ酸によって代えられる(アラニン、ロイシンなど)または、それによって、極地の充電していない側鎖によるアミノ酸は、極地の充電していない側鎖で他のアミノ酸によって代えられる(セリン、トレオニンなど)そして、タンパク質の抗原性に否定的な衝撃を与えない他の代用。さらに単一アミノ酸または配列中のアミノ酸(例えば約2~5)の短い配列の削除または追加に対して、特定の他の突然変異は、融合タンパク質の生成と抗原性を損なうことなく、許容され得る。通常、そのような変化はタンパク質のヘパリン結合領域で実行されない、または、少なくとも、そのような変化はタンパク質の抗原性形を与えるためにメチル化されるリジン残基を阻害しない。

20

【0037】

主要なアミノ酸配列が配列番号3で論述されるHBHAタンパク質は、ヒト型結核菌に由来し識別されて、天然のMtb配列である。しかし、当業者は、他のHBHAタンパク質が本発明の実行において利用され得ることを認める。一般に、HBHAはマイコバクテリウム種または型に特定されるか由来する(すなわち、天然である)、例えば様々な型のウシ型結核菌またはヒト型結核菌、ここで記載されるようにそれが機能する限りどの源からも来るかもしれない。(例えば、少なくとも約10~約300またはそれ以上(例えば、総タンパク量のmgあたりの一般に、約30~約100のμgのHBHAまでの範囲で、約15~約250、または約20~約200または約15~約250、または約10~約100総タンパク量のmgあたりμg)。正確な量に関係なく、タンパク質の抗原性品質は維持される。すなわち、免疫反応を誘発する観点から、配列番号3によって見受けられる融合タンパク質のそれに、タンパク質の抗原性は相当する。

30

40

【0038】

成長する細菌の培養菌の方法はタンパク質を生産するための周知の技術であり、そのことは取得する方法であり、そして、タンパク質を孤立させるかまたは精製することがこのように生み出される。本発明は融合タンパク質を適切なマイコバクテリウム細胞を導入させる(例えば電気穿孔法によって)ことによってここに記述されるようにする方法を含む。そして、生物の成長と生物によるタンパク質の生産にふさわしい培養条件の下で導入する細胞を発達させ、そして、タンパク質を取得し、精製する。例示的な状況と技術は、下記の例項で記述される。

【0039】

いくつかの実施形態では、マイコバクテリウム細胞にもたらされる核酸は、プラスミド

50

のようなベクトルの中に含まれる。しかし、他の導入可能であるか、または移動可能なベクトルが、本発明の実行において使用され得る。例えば様々なウイルス・ベクトル、他のエピソーム要素など。加えて、いくつかの実施形態では、関心の核酸配列は、マイコバクテリウムのゲノムに取り込まれ得る。

【0040】

現在の本発明の実施で生成され、使用される融合タンパク質は、いくつかの実施形態では、実質的に精製され、例えば、タンパク質の調製は一般に、（例えば、少なくとも80、90、95、または99%またはそれ以上さえ）他のタンパク質を含まない。同様に、例えば核酸、脂質、および他の高分子のような他の細胞成分を含まない。本発明のrHBHAは、rHBHA生成のためのバイオソースとして使用し得る。そしてそのrHBHA生成は、他の目的でも使用し得る。1つの実施形態では、目的は、隔離され、実質的に精製された融合タンパク質の製剤を刺激している治療用免疫応答を生成することである。以下で議論する。

【0041】

本発明の実施に使用される細菌性細胞は、ワクチン製剤における使用に適することの評価基準を満たすいずれかであり得る。例えば、それらは弱毒性である（すなわち、容量を引き起こす有毒または病気を縮小するか、または無毒または兆候を引き起こすことができないようにされるか、または当技術分野で理解されるような病気の軽度の症状だけを引き起こし、）抗生物質耐性を示さないものさえあり、抗原性である。いくつかの実施形態では、細胞はマイコバクテリウムの多様な種または異形である。（例えば、変異体または組換え型の）ヒト結核菌、ウシ型結核菌、スメグマ菌、または他のマイコバクテリアなどである。いくつかの実施形態では、細菌性細胞は、ウシ型結核菌BCG、そして/または、その様々な型であり、例えば、特定の特性のため選択された変異体BCGs、または遺伝子操作される組換え型のBCGsである。例えば、例示の組換え型BCGsは米国特許で記載される：第7,625,572号；第7,666,656号；第7,829,104号；および第8,043,857号（すべてSun et al.）。それぞれの完全な内容はこの参照により開示に含まれる。例えば、BCGは、中性pHで活性化されたエンドモリティックタンパク質を含み、発現するために遺伝子操作され得る。（例えば、クロストリジウム属ウェルチ菌からのペルフルンゴリシンO）また栄養要求性であって抗生物質耐性でない可能性がある。例えばロイシン、パントテン酸などの生成のための栄養要求株、またはロイシンパントテン酸栄養要求変異株などの二重栄養要求変異株がある。いくつかの実施形態では、マイコバクテリウム細胞は、pfo遺伝子を発現する。例示的なpfo遺伝子は、クロストリジウム属ウェルチ菌などの細菌のものに含んでいるが、限定されていない。しかしながら、当業者はまた、本発明の実施で使用できる他の機能上同様のタンパク質が存在しており、それらの野生型形態か、またはそれらを適切にするために遺伝子を組換えられた後のどちらかであることを認める。そのようなエンドモリティックタンパク質の例は以下のものに含まれるが限定されない。リステリオリシン（リステリア・モノサイトゲネスによって生成される、Llo）、ニューモリシン（肺炎レンサ球菌によって生成される）、連鎖球菌溶血素O（化膿レンサ球菌によって生成される）、セレオリジン（セレウス菌によって生成される）、溶血毒（黄色ブドウ球菌によって生成される）など。1つの実施形態では、使用される細胞は、本明細書に“AERAS-413”として参照される、クロストリジウム属ウェルチ菌pfoの遺伝子を発現するBCGデンマークSSI型パントテン酸栄養要求変異株である。しかしながら、当業者は、例えばそのすべての開示内容が参照によって援用される、米国特許第7,666,656号に記載され得る他のマイコバクテリア型、例えば、他のBCG型、例えばpfoの遺伝子のないBCG SSI、Tice、Tokyoなどが使用され得ると認める。

【0042】

本発明の融合タンパク質の抗原的活性型はメチル化される。一般に、メチル化はrMyc細胞の近くと、内部で実行される。いくつかの実施形態では、細胞は活性メチル基転移酵素を生成するための天然の、および本質的な能力を持っている。しかしながら、いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態では、細胞が追加メチル基転移酵素を発現しながら核酸配列を含むようにさらに修正し、または天然のメチル基転移酵素のより高レベルを生成するようさらに修正できる。

【0043】

また、本発明はヒト型結核に対して免疫反応を誘導する、そして/または、結核に対して個人に予防接種することにおける使用のための組成物を提供する。1つの実施形態では、組成物は1つの作用剤として、1つまたは複数の r M y c 種また型および薬理的に適切な媒体を含む。1つの実施形態では、組成物は1つの作用剤として、本明細書に記載される1つまたは複数の実質上精製された融合タンパク質および薬理的に適切な媒体を含む。ワクチンとしての用途であるこれら組成物の調製は、当業者にとって既知の技術である。10
一般にそのような組成物は、液体溶液または懸濁液として調製されるが、タブレット、錠剤、粉やおよび同様のものなどの固形物もまた考慮される。投与の前に溶液として適切な固形物または懸濁液、液体も調製され得る。本調製はまた乳化され得る。有効成分は、有効成分が薬学的に許容でき互換性がある医薬品添加物に混ぜられ得る。適切な医薬品添加物は、例えば、水、生理的食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールおよびそれらと同様のもの、またはそれらの組み合わせである。さらに、組成物は少量の補助物質、例えば、薬剤を濡らすか、乳状にすること、pHバッファ薬剤および同様のものを含み得る。さらに、組成物は様々な薬剤（抗原または免疫抗原に対する液性のおよび/または細胞免疫反応を引き起こすか、または増加させることができる化合物）を含み得る。経口剤型の組成物の投与を望むならば、様々な増粘剤、調味料、希釈剤、乳化剤、分散補助剤または結合剤および同種のもを追加し得る。20
現在の本発明の組成物は、投与に適切な形態に組成物を生成するために、そのようなどんな追加成分をも含み得る。該処方での作用剤の最終的な分量は変化し得る。しかし一般に、該処方での分量は約1~99%である。有利な点として、本発明の免疫原組成物は以下のものを含む。投与ごとに、融合タンパク質の約0.1~50μg、および一般的に約1~50μg、例えば、精製されたH B H A融合タンパク質の15μg。生成物の組成物生きたままの細菌（例えば弱毒化された細菌）を含む場合、投与ことの最近の分量は一般的に約 1×10^5 から 1×10^7 の範囲であり、通常 1×10^6 である。

【0044】

本発明の組成物（調製、製剤）は、当業者にとって既知の技術である、多くの適切な方法のいずれでも投与され得る。それらの方法は注射で、皮内、吸入、口腔、膈内、鼻腔内、点眼液、スプレー等として作用剤を含む食物またはプロバイオティクス製品の摂取を含むが限定されない。いくつかの実施形態では、投与の様式は注射または皮下によるものである。さらに、免疫システムを高める物質や、様々な化学療法薬や、他の抗原剤や、様々な補助剤や、および同様のものなど他の治療法に関連して組成物を投与し得る。30

【0045】

また、本発明は必要に応じて被験者で免疫反応を誘導する方法を提供する。本方法は、1つの実施形態で、本発明の融合タンパク質を含む組成物の投与、および他の実施形態では、本発明の r M y c の投与を含む。誘発される免疫反応は、先天的および適応型の1つまたは両方であり得、細胞媒介および液性応答の両方を含み得る、例えば抗体の生成、および/またはB細胞、および/または、T細胞応答など。ワクチンの受容者は、M t b のその後の攻撃に対して保護されるので、応答は保護的であり得る。その結果、活発であるか潜在している、結核感染の進行を防ぐ。さらに、結核感染症が起こった後、本発明の組成物が投与される場合、免疫反応は潜伏感染が起こらない可能性があり、または、潜伏感染がすでに存在する場合、進行中の病気への潜伏感染の再開は妨げられるか、または、感染の範囲または深刻さが減少する可能性がある。40

【0046】

本発明はまた、本発明の融合タンパク質を活用する診断検査を提供する。特に、検査は潜在的結核感染を有す個人を識別するのに有効である。検査は一般に含む潜在性結核（例えば、病気の露見、またはその他の理由）を有する可能性があるものとして、免疫細胞の50

露見または識別する被験者の免疫細胞の生成、タンパク質および免疫細胞または生成物が融合タンパク質をそれについて反応するか、または認識するかどうか決定することを含む。1つの実施形態では、露出が、対象から生体試料を入手することによって実行される。(例えば、唾液、痰、血液、プラズマなど)そして例えば、サンプルでの反HBHA抗体の存在を検出するためにサンプルを融合タンパク質に露出する。別の実施形態では、融合タンパク質は皮下注射され、(マントーや他の類似の検査方法で)タンパク質に対する皮膚の反応が観察される。両方の実施形態で、検査の陽性反応は、対象が潜伏結核感染の可能性があるか、またはそうであるらしいということを示しまたは確認する。

【0047】

いくつかの実施形態では、本発明はシードロットとしての使用のために本発明のrMy cの培養を生成するための方法を提供する。特に、rMy cの定量生成、精製および検査を含む方法が包含される。一般に、そのような方法は、最初のクローンの分離株の生産を進めること、血清と動物性起源タンパク質を含まない媒体の適度の規模で分離株を育てること、そして、望ましいより大きな量(十分な量が達成されるまで、必要に応じてこのことを繰り返す)の培養に接種をすること、そしてrMy cが成長し、細胞分裂を経ることができる条件下でrMy c培養が成長することを含む。一般に、rMy cは約4~約6、例えば、約5の密度(A_{600})まで育てられる。一定分量の培養は、例えば、商業目的で、培養から直接、またはrMy cを濃縮し(例えば、遠心分離)、適当な媒体でペレットを再懸濁させるために調製される。最終の培養シードロットの細菌の量は、一般に、約 4×10^7 ~約 6×10^7 の幅である。当業者は例えば、冷凍保存、凍結乾燥などの培養の長期保守に詳しい。最終的な調製とrMy c培養組織の保管の前に、rMy c識別と純度は、当業者にとって既知の方法、例えば、培養のサンプリング、融合タンパク質をコードする核酸の存在のために、または、融合タンパク質自体の存在のために、それを分析することによって検査/確認され得る。

【0048】

別の実施形態では、本発明は組換え型ヘパリン結合性赤血球凝集素(rHBHA)タンパク質生成の方法を提供する。本方法は、以下のことを含む。a)マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質アミノ末端に付着した、Ag85Bリーダー配列をコードしている核酸融合配列を含む組換え型マイコバクテリアの培養菌を育てること。融合配列がプロモーターに操作可能に結合されており、培養からrHBHAタンパク質を取得すること。マイコバクテリアは、核酸融合配列を含み発現するために遺伝子組換えされてきた。培養の成長はどんな適切な方法でも実行され得る、例えば振とう培養、発酵によって、など、そして培養は例えば、バッチまたは連続培養であり得る。

【0049】

本生成方法は、一般にrHBHAタンパク質を精製することも含む。タンパク質の精製は、当業者にとって既知の多くの適切な技術によって実行され得る。一般的に、本技術は、1つまたは複数の物理化学的な精製技術の使用を含む。例示的な技術が含まれるが限定されない。イオン交換クロマトグラフィー、親近感クロマトグラフィー、サイズ除外クロマトグラフィー、疎水的相互作用クロマトグラフィーなどのようなクロマトグラフィー技術、ならびに高圧細胞破壊のようないろいろな細胞破壊技術、ピーズ破砕機、均質化、超音波処理、遠心分離、などがある。これらのおよび他の技術の併用がまた使用され得る。

【0050】

また、本方法はrHBHAタンパク質の識別の証明をすることを含み得る。当業者は、タンパク質およびポリペプチドの識別および/または純度を実証するための適切な技術に詳しい。例示的な技術が含まれるが限定されない。電気泳動、クロマトグラフィー、質量分析、アミノ酸配列などである。

【0051】

本方法はまた精製されたrHBHA融合タンパク質を生理学的に許容可能な担体と結合する方法を含み得る。適切な生理的に許容可能な、または互換性を持つ担体は、本明細書の別の場所で記述される。いくつかの実施形態では、製剤化されたHBHAタンパク質生

10

20

30

40

50

成はさらに1つまたは複数の作用剤を含む。例えば、1つまたは複数の、HBHAではない抗原（例えば、非HBHA抗原）が含まれるが限定されない。例えば、ジフテリア、百日咳、破傷風、ポリオ、インフルエンザ、肝炎、ロタウイルス、肺炎、はしか、おたふく風邪、風疹、水痘、髄膜炎、乳頭腫ウイルスなどのように病気に対する免疫応答を誘発するものである。rHBHAタンパク質生成は、1つまたは複数の抗原性補強剤および1つまたは複数の免疫原性補強剤を含み得る。それらの例は含むが限定されない。ミネラル塩、例えば、水酸化アルミニウム（ミョウバン）、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、油乳剤、例えば、MF59、洗剤安定する水中油型乳剤、粒子状アジュバント、例えば、ピロソーム、イスコム（サポニンと脂質の体系化された複合体）、微生物派生体、例えば、MPL（TM）（一リン酸化脂質A）、CpGのモチーフ、変更された毒素、その他、いろいろな植物派生体、例えば、サポニン（QS-21）ならびに内在性免疫賦活性アジュバント、例えば、サイトカイン、熱ショックタンパク質（HSP）とその断片などがある。

10

【0052】

前述の例はさらに本発明の特定の実施形態を例示するのに役立つが、どんな形であれ本発明を制限することと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0053】

複製、過剰発現およびBCGのヘパリン結合性赤血球凝集素（HBHA）の検査

これらの研究の目的は、組換え型ウシ型結核菌型過剰発現HBHAを開発するためである。以前Aeras（AERAS-413）で構築された組換え型BCG型が使用された。なぜならそれがpanCD栄養要求体であり、HBHA遺伝子によるプラスミド上のpanCDの存在が遺伝子が抗生抵抗がない場合相補性とコロニー選択のために使用されたためである。

20

【0054】

BCG型

カナマイシン（40 μg/ml）で補充されたLBで生育されたエシュリキア属大腸菌stb13細胞で初期の複製は獲得された。HBHAの過剰発現では、エンドソーム逃避機制を通して抗原提示を容易にするクロストリジウム属ウェルチ菌（AERAS-413）からpfoの遺伝子を発現するBCGデンマークSSI型のパントテン酸栄養要求変異株は利用された。（1）BCG型はミドルブロック7H9プロスで育てられて、グリセロール、OADC、およびD-パントテン酸（25 μg/ml）を補充された。親および組換え型BCGはパントテン酸補足の有無にかかわらず7H10-OADCプレートでそれぞれ蒔かれた。

30

【0055】

設計および複製方策

HBHA遺伝子のためのMtb配列は、結核研究者のウェブサイトから取られて、Ag85Bプロモーターとリーダーペプチドと伴って開始HBHAコドン（図1および2）の正面で合成された（DNA2.0）。

【0056】

合成断片は、カナマイシン耐性マーカー（aph）およびpanCO遺伝子がhsp60プロモーター（図3）を通して操作した補足となる、大腸菌マイコバクテリアルシャトルベクターであるpKAMCB2ベクトルのPacIとSpeIとの間の場所で、複製された。この核外遺伝子はAERAS-413でpanCD栄養要求性の補足となり、また、AERAS-413で核外遺伝子の安定性を維持できるように使用された。一度複製されると、抗生物質のマーカーはHpAI酵素で外へ消化され、構造は、それを「抗生物質抵抗性マーカーがない」状態に自己連結された（図4）。自己連結された構造物はAERAS-413に電気穿孔された、回復しているコロニーはパントテン酸補足や抗生物質なしで7H10-プレートに蒔かれた。コロニーは抗原の存在、核外遺伝子骨格、およびカナマイシン抗生物質耐性マーカーの欠如のため検査された。

40

50

【0057】

天然および組換えHBHAのアミノ酸比較

天然のHBHAはBCGとMtbの両方で100%配列識別を持つ。組換え型のHBHAは、タンパク質のN-末端と融合したAg85BプロモーターおよびAg85Bリーダーペプチドを使用することで発現される(図5)。

【0058】

AERAS-413からのコロニーの遺伝子型分析

HBHAの遺伝子を含み、pKAMCB2派生体で形質転換されたAERAS-413プレートからのコロニーは、核外遺伝子での完全な長さのAg85B-HBHA構造物の存在のために検査された。このPCRに使用される開始剤は、Ag-HBHA.for: GGTCCTTCGTCGGCTTGCTTC(配列番号6)およびAg-HBHA.rev: GCTCTGCCAGTGTACAAACC(配列番号7)であって、コロニー5番(図6)で見られる2.6kbの生成サイズは予想された。同じコロニーは、oriMからpanCDまで補完遺伝子にわたる核外遺伝子骨格の存在、および抗生物質耐性マーカの欠如のため検査された。核外遺伝子骨格のために使用される開始剤はoriM7932.for GTCTACGAGGCCACACTCAG(配列番号8)およびpan9969.rev TATCGCGCAGCTCCAGGTAG(配列番号9)であった。核外遺伝子でカナマイシン抗生物質マーカをチェックするために使用される開始剤は、kan__intrnl.for GCTCGAGGCCGCGATTAAATTC(配列番号10)およびkan__intrnl.rev GGATGGCAAGATCCTGGTATCG(配列番号11)であった。コロニー5番は核外遺伝子骨格の存在、および抗生物質マーカをより少なくする骨格からのカナマイシン遺伝子の欠如を示す。HBHAを過剰発現する組換え型のAERAS-413型は、AERAS-445と命名されて、さらなる表現型分析および拡大製造に使用された。(図6)

【0059】

AERAS-445の発育動態

上記記述の条件下で生育されたAERAS-445は、AERAS-401と同様に親株AERAS-413のものと同様の成長パターンを持っていることが認められた。種培養は0.2のOD₆₀₀に希釈され、吸収は、成長パターンを観測するために9日間以上測定された。AERAS-445のための成長パターンは、過剰発現されたHBHAタンパク質が成長機構(図7)に少しの有害な影響も持っていなかったことを示す親株のものと非常に近似していた。

【0060】

AERAS-413からのコロニーの表現型分析

培養は無タンパク質の7H9メディアでOD₆₀₀ = 1.0に生育された。培養は上澄とペレットを分離するために10分間3,000rpmで回転された。細胞可溶化物のためのペレットを処理するため、ペレットはプロテアーゼ阻害剤カクテルバッファで再懸濁され、次に、細胞を破壊するためにビーズ破砕で処置された。可溶化物は、破片を取り除くために4度で3,000xgに遠心分離された。細胞可溶化物蛋白濃度はBCA(ピシニコニン酸)タンパク質分析で測定された。サンプルの正常化は、等しい量のタンパク質、30マイクログラムの負荷によって、実施された。サンプルは、15分間70度で還元剤と積載染料で熱することによって、調製された。次に、サンプルはポリアクリルアミドゲルに勾配に(4~12%ビス・トリス)搭載され、MOPSバッファで動作する。移動は6分間のiBlot(登録商標)ドライプロッティングシステムを使用し実行された。ウエスタンブロット解析はSnap i.d.システム(ミリポア)を使用し実行された。使用される主要な抗体は、反HBHAモノクローナル4057D2(2)(1:2000)が、またはヤギ反マウスHRP二次抗体(KPL)の使用が後に続いた1G10(1:1000)反HBHA抗体のどちらかであった。発見は、HRP化学発光(Immuno-Star、バイオ・ラッド)によって実行される。

【0061】

10

20

30

40

50

図8では、矢印1はAERAS-445の組換え型のHBHAおよび制御親株AERAS-413の欠如を示し、矢印2は制御AERAS-413および組換え型のAERAS-445の両方の現在の天然のHBHAを示す。4057D2モノクローナル抗体は、HBHAタンパク質のメチル化された部分を認識し、AERAS-445で生成された組換え型HBHAが、メチル化されることを示した。ウエスタンブロット手順は、リールバスター研究所、フランスで開発されたモノクローナル抗体1G10で反復された。AERAS-401およびAERAS-413は、このブロットの制御として使用された。矢印1はAERAS-445の組換え型のHBHAの存在、および制御親株AERAS-401およびAERAS-413の欠如を示し、矢印2は天然のHBHAが、制御および組換え型の両方に存在していることを示す。4057D2抗体とは異なり、1G10はHBHAタンパク質(図9)の非メチル化された領域の中で特定のエピトープを認識する。

10

【0062】

AERAS-445型からのHBHAのcGMP製造

動物性タンパク質濃縮の段階的な縮小で、組換え型のBCG(rBCG)は、血清と動物起源タンパク質を持っていないメディアで成長するように適合させられた。最終生成物は、接種、例えば、cGMPマスター・セル・バンク生成に使用できる液体室素の気相で保存されたバイアルあたり4.5±0.4mlの濃縮化された継承細胞バンクである。

【0063】

血清および動物起源のタンパク質が含まれていない媒体で成長するためrBCGを適合させるために、ACB確立の間の培養基におけるオレイン酸アルブミンブドウ糖カタラーゼ(OADC)補給物の使用は禁止された。表1は血清の動物起源のタンパク質が含まれていない媒体に変換する過程を要約する。ACB構造に使用される媒体は、OADCまたはいかなる他の血清または動物派生補給物のない、変更されたミドルブルック7H9媒体(MM7H9)であった。最初の段階の培養は、バッフルなしで500mlのガス抜きキャップフラスコで生育された。最初の段階の後のすべての培養はバッフル付振とうフラスコで生育された。

20

【表1】

表1 継承細胞バンクのためのAERAS-445成長指標

パス/ 段階	フラス コのサ イズ (mL)	OADC 濃度 (%)	容量 MM7H9 (mL)	容量 OADC (ML)	接種量 容量 (mL)	全容量 (mL)	対象 A ₆₀₀	仕様ごとの 遠心機 (はい/ いいえ)
1	500	0	95	0	5.0	100	4±1.5	いいえ
2	2000	0	900	0	100	1000	4±1.5	いいえ
3	2000	0	850	0	150	125	4±1.5	はい

30

【0064】

培養物が最終的な継代培養に達した後に、それは、回収/回復された。培養物は6±4で30分間1200×gで遠心分離され、10%で再懸濁しているGST溶液は、室温で1/4の原体積を保存した(表1)。そして、培養は4.0±0.5mlの一定分量で5mlの無菌クライオバイアルに分配された。バイアルは、液体室素の上に気相に保存されました。

40

【0065】

冷凍後のAERAS-445の2個のバイアルが無菌状態かどうか検査された。どんな成長汚染物質に対しても、結果は陰性であった。4倍濃縮AERAS-445rBCGを入れてあるバイアルは、気相液体室素で凍っていた。図10に示されるように、反HBHAMONOクローナル抗体1G10を有するウエスタンブロットはAERAS-445の凍っている培養の細胞可溶化物から目標抗原(HBHA)の生成を示している。

50

【 0 0 6 6 】

A E R A S 4 4 5 の継承細胞バンク開発のための手順

1 . 成長媒体および冷凍媒体を調製する。

a . 1 . 培養基および冷凍媒体を用意する。

4 . 7 g / L	ミドルブロック 7 H 9 パウダー
0 . 2 4 % (v / v)	グリセロール
0 . 0 5 % (w / v)	チロキサポール
1 0 % (v / v)	O A D C 補給物

b . 変更されたミドルブロック 7 H 9

4 . 7 g / L	ミドルブロック 7 H 9 パウダー	10
2 . 0 g / L	グルタミン酸ナトリウム	
2 % (v / v)	グリセロール	
3 m g / L	硫酸亜鉛七水和物	
0 . 2 g / L	硫酸マグネシウム七水和物	
0 . 0 5 % (v / v)	チロキサポール	
1 . 0 % (w / v)	ブドウ糖	
0 %	O A D C 補給物	

c . 1 0 % G S T 溶液

1 0 % (v / v)	グリセロール	
0 . 8 5 % (w / v)	塩化ナトリウム	20
0 . 0 5 % (v / v)	チロキサポール	

【 0 0 6 7 】

2 . K a m a l V e l m u r u g a n (V a c c i n e D i s c o v e r y) から
の 5 m l の生きた A E R A S - 4 4 5 培養物を、O A D C なしで変更されたミドルブ
ック 7 H 9 媒体を含む 9 5 m l の予熱された培養物を含む 5 0 0 m l の振とうフラスコに接
種した。

【 0 0 6 8 】

3 . 残りのプロセスには、変更されたミドルブロック 7 H 9 媒体が使用された。

【 0 0 6 9 】

4 . 培養物を振とう機 / 細菌培養器 (A e r a s # 1 2 3 0) 中で、3 7 および 1 2 3 0
5 r p m でインキュベートした。 30

【 0 0 7 0 】

5 . 吸光度を、培養物が濁度における可視変化を有したときに、6 0 0 n m で測定した
。

【 0 0 7 1 】

6 . 培養物が一旦 $A_{600} = 4.0 \pm 1.5$ A u に達すると、全体の段階 1 培養物 (約
9 0 m l) とともに、第 2 段階 (ガス抜きキャップを備える振とうフラスコ 2 L 中、9 0
0 m l の作業容量) に接種した。

【 0 0 7 2 】

7 . 培養物を振とう機 / 細菌培養器 (A e r a s # 1 2 3 0) 中で、3 7 および 1 2 3 0
5 r p m でインキュベートした。 40

【 0 0 7 3 】

8 . 吸光度を、培養物が濁度における可視変化を有したときに、6 0 0 n m で測定した
。

【 0 0 7 4 】

9 . 培養物が一旦 $A_{600} = 3.0 \pm 1.5$ A u に達すると、1 5 0 m l の段階 2 培養
物とともに、段階 3 (O A D C なしの 8 5 0 m l の M M 7 H 9 媒体) に接種した。合計 3
個 x 2 L の振とうフラスコ (作業容量 1 L / フラスコ) が接種された。

【 0 0 7 5 】

1 0 . 培養物を振とう機 / 細菌培養器で、3 7 および 1 2 5 r p m でインキュベート 50

した。

【0076】

11. 吸光度を、培養物が濁度における可視変化を有したときに、600nmで測定した。

【0077】

12. 培養物(段階3)が一旦 $600 = 4 \pm 1.5 \text{ Au}$ に達すると、平均 A_{600} の読み取り値を有するフラスコを選択して、回収プロセスを開始した。

【0078】

13. 選択された段階3培養物を、事前に加圧滅菌された1L遠心分離機チューブ内で、30分間 $1200 \times g$ および4 で遠心分離した。

【0079】

14. 上澄は廃棄し、ペレットを10% GSTの1/4容量(約250mL)中に再懸濁させた。

【0080】

15. 混合を維持しながら、5mLのクライオバイアルは $4.0 \pm 0.5 \text{ mL}$ の再懸濁細胞で充填した。

【0081】

充填されたバイアルを、液体窒素の気相中で直ちに凍結させた。

【0082】

例2 AERAS-445からのrHBHA精製および機能分析

AERAS-445のHBHAタンパク質の収量に関する推定

AERAS-445に生成されたHBHAの分量は、リールパスツール研究所、フランスで開発されたサンドイッチELISA法により推定された。主要な反HBHA抗体は1G10であり、二次モノクローナル抗体は、ビオチン化された5F2であり、リールパスツール研究所、フランス(EZ-リンク スルホン基-NHS-LC-ビオチン、Pierce)で開発された。要するに、コーティングバッファで希釈された $5 \mu\text{g/mL}$ の mAb 1G10の保護管あたりの $100 \mu\text{l}$ は高親和性結合のELISAプレートに種を蒔かれて、一晚、4 で培養された。プレートは二度洗浄され、1時間PBS-Tween20(+1%BSA)で遮断された。組換え型および天然のHBHAが1X PBS(8つの希釈)に希釈されて、 $100 \mu\text{l}$ は各保護管に加えられて、2時間培養された。1X PBS-Tween20で3回洗浄後に、 $0.2 \mu\text{g/ミリリットル}$ の濃縮で、mAb 5F2の $100 \mu\text{l}$ は加えられて、1時間培養された。保護管は3回洗浄され、 $100 \mu\text{l}$ ストレプトアビジン-HRP(BDバイオサイエンス)結合体はPBSで1/1000の濃縮で加えられ、30分間室温で培養された。タンパク質は、TMB下層(ELISA過酸化物下層)の $100 \mu\text{l}$ で検出され、室温で5分から15分間展開された。反応は3M H_3PO_4 の $50 \mu\text{l}$ で停止され、光学密度は450nmで読み込まれた。この結果から、AERAS-445は親型(図11)と比較して、HBHAよりもほとんど8倍以上で発現した。

【0083】

また、ウシ型結核菌BCGパスツール1173P2からのHBHAの収量はAERAS445と比較された。600nmで読む光学密度が約1.5に達するまで、BCG型は10日間の1リットルのフラスコに入った200mLの攪拌されたソートン培地で生育された。BCG細胞は $8,500 \text{ rpm}$ (Beckmann J2MC遠心分離機、ローターJA10)で遠心分離機によって回収された。BCGペレットは、次に、20mLのPBS+0.05%のTween80(Tw80:Sigma Ultra, ref. P8074)で懸濁し、20分間、4 で $6,500 \text{ rpm}$ (Beckman Coulter Allegra 64R, rotor F0650)で遠心分離された。ペレットは下記記述のように20mLのPBS+0.05% Tween80で懸濁前に荷重され、熱失活され、そして超音波処理された。次に、上記記述のように、超音波処理物の上澄部はタンパク質含有量、およびモノクローナル抗体1G10および5F2でサンドイッチE

10

20

30

40

50

L I S A法を使用することによってH B H A濃縮のために分析された。平均3 ~ 4つの独立測定値は、B C Gパスツール1 1 7 3 2が総タンパク量の約1 0 μ gのH B H A / m gを生成するが、A E R A S 4 4 5が総タンパク量の平均約1 9 μ gのH B H A / m gを生成することを示した。このA E R A S 4 4 5はおよそB C Gパスツール1 1 7 3 P 2の2倍のH B H Aを生成する。

【0084】

A E R A S 4 4 5からのr H B H Aの精製

A E R A S 4 4 5のペレットは、2 0 m lのP B S + 0 . 0 5 %のT w e e n 8 0 (T w 8 0 : S i g m a U l t r a , r e f . P 8 0 7 4)で再懸濁され、2 0分間、4 で6 , 5 0 0 r p m (B e c k m a n C o u l t e r A l l e g r a 6 4 R , r o t o r F 0 6 5 0)で遠心分離された。ペレットは2 0 m lのP B S + 0 . 0 5 % T w e e n 8 0で荷重および再懸濁され、2 0分間、4 で1 2 , 0 0 0 r p m (B e c k m a n C o u l t e r A l l e g r a 6 4 R , r o t o r F 0 6 5 0)で遠心分離された。

10

【0085】

1 . 5 gの熱失活されたA E R A S 4 4 5は1 5 m lのP B S + 0 . 0 5 % T w e e n 8 0で懸濁され、フラットディスラプターホーンを使用し(1 3 m m、V W R r e f . 1 4 2 - 3 7 5 1)、2 0分間、アナログソニファイアユニットモデルS - 4 5 0 A (ブランソン社、米国)で、氷の上で超音波処理された。超音波処理物は2 0分間1 万 3 5 0 0 x gで遠心分離され、そして、表面に浮かぶのはD P B Sで平衡化されたヘパリン・セファロースC L Bカラム(1 x 5 c m)に適用された。次に、カラムは1 0 0 m lのD P B Sと共に洗浄され、結合物質は1 0 0 m l D P B Sで0 ~ 5 0 0 m MのN a C l 勾配によって溶出させられた。溶出している1 m lの断片は、S D S - ページによって1 2 %のゲルを使用することで識別され、クマシーブリリアントブルーR - 2 5 0 染色が後に続いた。

20

【0086】

H B H Aを含む断片は、0 , 0 5 %のトリフルオロ酢酸で平衡化された逆相H P L C N u c l e o s i l C 8カラム(T S K g e l s u p e r O D S ; I n t e r c h i m)に、貯蔵され、適用された。0 ~ 8 0 %の直線的なアセトニトリル勾配に従って、結合物質は溶出した。H B H Aを含む断片は貯蔵された、そして、溶媒は蒸発で除去された。1 m lの最終的断片のp Hは、1 M - T r i s H C l (p H 9)を使用することによって、p H 8に調整された。最終生成物は- 8 0 で保存された。H B H Aを含む断片は、上記記述のように、S D S - ページ、質量分析、およびサンドイッチE L I S Aによって、1 G 1 0および5 F 2モノクローナル抗体を使用することで分析された。

30

【0087】

図1 2はA E R A S 4 4 5から精製されたr H B H Aの質量分析を示している。質量分析のために、タンパク質(0 . 1 ~ 1 0 p m o l)はd r y d r o p l e t法で調製された。蛋白溶液(0 . 5 μ l)は1 0 m g / m lで5 0 % C H 3 C Nおよび0 . 1 %のトリフルオロ酢酸で新たに溶解している - シアノ - 4 - ヒドロキシケイ皮酸に混ぜられた。スポットティングと乾燥の後、質量分析は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型(V o y a g e r - D E - S T R , A p p l i e d B i o s y s t e m s)を使用することによって、実行された。以下の設定パラメータが使用された: ポジティブで直線モード、2 5 k Vの加速電圧、9 2 %の格子電圧、7 5 0 n sの遅れた抽出時間、1 , 0 0 0 D aの低いマス・ゲート。スペクトルは、大腸菌チオレドキシンの平均質量とホース・アポミオグロビン(A p p l i e d B i o s y s t e m s)に異なったペプチドの[M + H +]アイソトピックイオンを使用することによって、外部的に較正された。

40

【0088】

r H B H Aメチル化パターンの質量分析法

精製されたr H B H Aは一晩で5 %のエンドプロテイナーゼ・グルコース(R o c h e)で消化され、そして、得られたペプチドは、B e c k m a n U l t r a s p h e r

50

e ODSカラム(2×200mm)および0.1%のトリフルオロ酢酸で調製されて質量分析によって直接分析された0~60%の直線的なアセトニトリル溶離法勾配を使用することで逆相HPLCによって分離された。

【0089】

質量分析法では、ペプチド溶液は10mg/mlで50%CH₃CNおよび0.1%のトリフルオロ酢酸で新たに溶解している -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸に混ぜられた。スポットティングと乾燥の後、質量分析は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型(Voyager-DE-STR, Applied Biosystems)を使用することによって、実行された。3,000Daから1,000Daの間のペプチドのために、以下の設定パラメータが使用された: ポジティブで直線モード、25kVの加速電圧、92%の格子電圧、750nsの遅れた抽出時間、1,000Daの低いマス・ゲート。スペクトルは、大腸菌チオレドキシンの平均質量とホース・アポミオグロビン(Applied Biosystems)に異なったペプチドの[M+H]⁺アイソピックイオンを使用することによって、外部的に較正された。

10

【0090】

AERAS445から精製されたrHBHAの質量分析の結果は、図13に表されており、タンパク質のC-末端側終端が異種性を示しており、HBHAのために予想される複雑なメチル化プロファイルと一致している。

【0091】

モノクローナル抗体4057D2および3921E4とのHBHAの異なった形式の反応
AERAS445から精製されたrHBHAの濃縮は、一晩でELISAプレートの保護管あたり41μgをコーティングするように測定されて、調整された。そして、プレートはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)/Tween(PBST)で洗浄された。その後3%のBSAを含んでいるPBSTで室温で2時間のブロッキングが続いた。再びPBSTで3回洗浄した後に、プレートは室温で1時間30分間PBST+BSAでモノクローナル抗体3921E4または4057D2の連続の4倍の希釈で培養された。後者の2つは優先的にメチル化されたフォームのHBHA(3)を認識する。プレートは、次に、PBSTで10回洗浄して、室温で反マウス抗体がペルオキシダーゼ類にリンクされる状態で1時間、培養された。PBSTで10回の洗浄後に、ペルオキシダーゼ基質TMBの100μlは各保護管に加えられた、そして、色の反応は50μl H₃PO₄の添加で停止された。最終的に450nmの吸収性は、各井戸で標準の酵素結合免疫吸着検定法プレートリーダーを使用することで読み込まれた。図14は、それが適切にメチル化されると確認して、AERAS445からのrHBHAが4057D2および4Eの3921モノクローナル抗体の両方によって認識されるのを示している。

20

30

【0092】

潜伏感染したヒトのAERAS445からのrHBHAの抗原性

AERAS445から精製されたrHBHAを、3人の潜伏感染ヒト被験者、3人の進行中の結核患者、および3人の陰性の対照被験者から分離された10⁶の末梢血単核細胞(PBMC)とともに、2μg/mlでインキュベートした。96時間後、上澄に遊離したIFN-濃度をELISAによって測定し、非刺激PBMCからのIFN-分泌を、抗原によって誘発されたIFN-分泌から引いた。IFN-ELISAの感度は10pg/mlであった。非感染対照とLTBI被験者との間の最適識別のためのカットオフ値は、以前に、HBHA(4)について100pg/mlであることを決定されていた。表2に示されるように、AERAS445から精製されたrHBHAは、潜伏感染した個人からのPBMCによって良好に認識され、肺結核患者からのPBMCによって不十分に認識され、健康な対照からのPBMCによっては認識されなかった。

40

表2 HBHAのヒトTセル抗原性。9人のヒト被験者(3人の潜伏感染被験者番号1、8、および9、3人の進行中の結核患者番号2、3、および4、ならびに3人の陰性の対照番号5、6、および7)からのPBMCを、ウシ型結核菌BCGパスツール1173P3(IPL)またはAERAS445(Aeras)からの2μg/mlのHBHAと

50

もにインキュベートし、得られたIFN-g濃度を培養上澄中で測定し、ng/mlとして表した。

【0093】

【表2】

患者番号	HBHA IPL (BCG パスツール)	HBHA Aeras* (AERAS-445)
1	5. 21	13. 53
2	0. 09	0. 02
3	0. 02	0. 11
4	0. 24	0. 27
5	0. 07	0. 12
6	<0. 01	<0. 01
7	<0. 01	<0. 01
8	1. 43	. 73
9	1. 62	1. 28

10

20

【0094】

参考文献

1. Sun R, Skeiky YA, Izzo A, Dheenadayalan V, Imam Z, Penn E, Stagliano K, Haddock S, Mueller S, Fulkerson J, Scanga C, Grover A, Derrick SC, Morris S, Hone DM, Horwitz MA, Kaufmann SH, Sadoff JC. Novel recombinant BCG expressing perforin O and the over-expression of key immunodominant antigens; pre-clinical characterization, safety and protection against challenge with Mycobacterium tuberculosis. Vaccine. 2009 Jul 16;27(33):4412-23.

30

2. Rouse DA, Morris SL, Karpas AB, Mackall JC, Probst PG, Chaparas SD. Immunological characterization of recombinant antigens isolated from a Mycobacterium avium lambda gt11 expression library by using monoclonal antibody probes. Infect Immun. 1991 Aug;59(8):2595-600

40

3. Pethe et al. 2002. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10759-10764

4. Hougardy J-M, Schepers K, Place S, et al. Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN-gamma release as a diagnostic too

50

l for latent tuberculosis. PLoS ONE 2007; 2: e926.

5. Temmerman S, Pethe K, Parra M, Alonso S, Rouanet C, Pickett T, Drowart A, Debrie AS, Delogu G, Menozzi FD, Sergheraert C, Brennan MJ, Mascart F, Locht C. Methylation-dependent T cell immunity to Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin. Nat Med. 2004 Sep; 10(9): 935-41

6. Zanetti S, Bua A, Delogu G, Pusceddu C, Mura M, Saba F, Pinna P, Garzelli C, Vertuccio C, Sechi LA, Fadda G. Patient s with pulmonary tuberculosis develop a strong humoral response against methylated heparin-binding hemagglutinin. Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Sep; 12(9): 1135-8

10

【0095】
好適実施形態で本発明について説明したが、当業者は、追加された請求の趣旨と範囲の中に修正がある状態で本発明を実施できると認める。従って、本発明は、上で説明したように、実施形態に制限するべきでないが、本明細書に提供された説明の趣旨と範囲の中にさらにすべての修正とそれの同等物を含んでいるはずである。

20

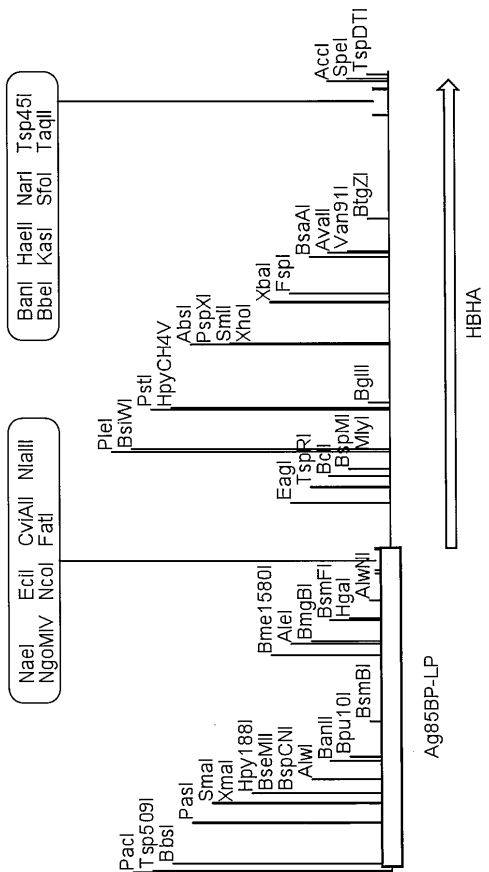
【 図 1 A 】

60 atgagacac tttagcccg aatcgacatt tggcctccac acacggtatg ttctggcccg
 120 agcaacacac gacatacag acaaggggc acaagtatgg ccacagacgt gagccgaag
 180 attcgagctt ggggacgccc attgatgac ggcacggcag cggcttagt ccttccggc
 240 ctggtggggc ttgcccggcg agcgcaacc gggggcgggt tctccatggc tgaanaactc
 300 aacattyatg acatcaagg tccgttgcct gccgcgttg gagcgccga cctggccttg
 360 gccactqca acgattgat cacgaacctg cgtgagcgtg cggagagac tegtacggac
 420 acccgagcc gggtcgagga gagcgtgct cyoctgacca agctgcagga agatctgcc
 480 ggcagctca ccgagctgcg tgaagttc accgcccagg agctgcgtaa ggcgcggcgt
 540 ggtacctc agggccgac tagcggctac accgagctgg tcgagcggc ggagggcctg
 600 ctagagggc tggcgacca gacagcttc gaggagttg cggcgcgc cgaaggctac
 660 gtagaccagg cgttggagtt gaccagagg gcgttgggta cggtcgcat gcagaccgc
 720 ggggtgggt agctgcgc caagtggc ggcctcagc tgcctaagaa ggcctgcctc
 780 gcccaagg cgcctccgg caagaaggc gtcccggcca agaaggcggc ggcacaaga
 825 ggcgccgga agaaggcggc ggcacaaga gtcaccaga agtag
 (配列番号1)

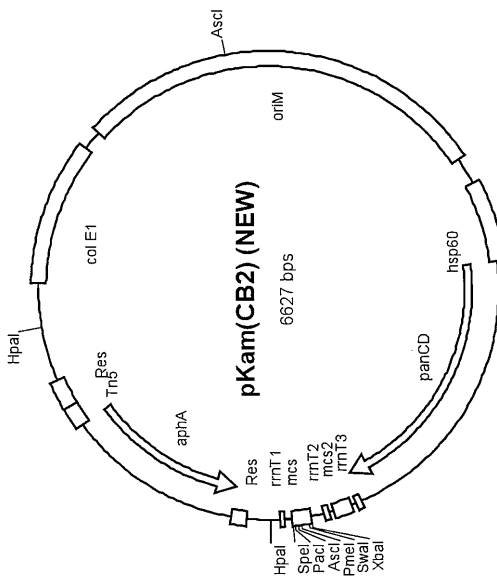
【 図 1 B 】

60 gtggtcttcg tcggttgcg tcgagcagc ctaccgggag aacgcaagtt cggcctccct
 120 gggggagcac agccggtagc cccggccgc gattctgaga aatccggat agatacatc
 180 cgcataccg ttgtgagc ccttaagcac acttgcctg tccggggcgg taaccgatac
 240 ggaatgata gactttgcg cccgaatcga catttggcct ccacacacgg tatgtcttg
 300 ccgagacca cagcagacata caggacaag ggcacaagt atggccacag acgtgagccg
 360 aaagattcga gcttggggac gccgattgat gacggcacg gcagcggctg tagtcttcc
 420 gggcctggtg gggcttgcg gcggagcggc aaccggggc gcgttctcc atggctgaaa
 480 ctgcaacatt gatgacatca aggtccqtt gcttgcgcq ctggagcgg ccgacctggc
 540 ctgtggccact gtcacagagt tgatcacgaa cctgctgag cgtggcgagg agactcgtac
 600 ggcacaccgc agccgggtcg aggagacccg tqctgcctt accaagctgc aggaagatc
 660 cccgagcag ctcaccgagc tgcgtgagaa gttcacgcc gaggagctgc gtaaggccg
 720 caggggtac ctcgagggcc cyactagccg gtacaacag ctggctcagc gcgctgagc
 780 cgtctagag cggctgcgca gccagcagag cttcgaggaa gtfctggcgc gcgccgaa
 840 ctactggac cagcgggtcg agttgaccca gagggtttg gttacgctc cctcgcagac
 900 ccgcggctc ggtgagcgtg ccgccaagct ggtcggcctc gactgccta aqaaggctc
 960 tccggccaag aagcggctc cggccaaga ggcctctcc gccaagaag cggcggccaa
 1009 gaaggccccc gcgaagaagq cggcggcccaa gaaggtcacc cagaagtag
 (配列番号2)

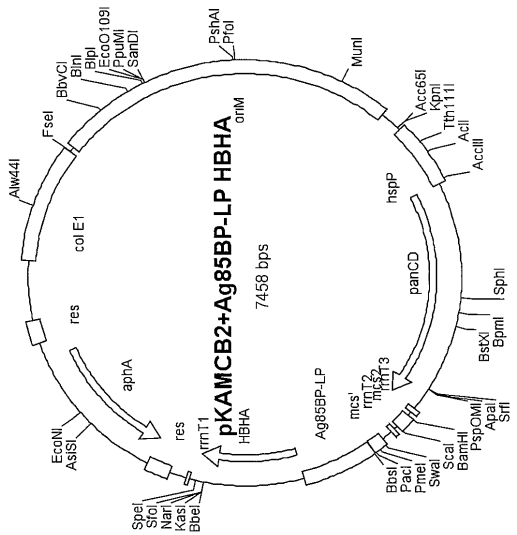
【 2 】



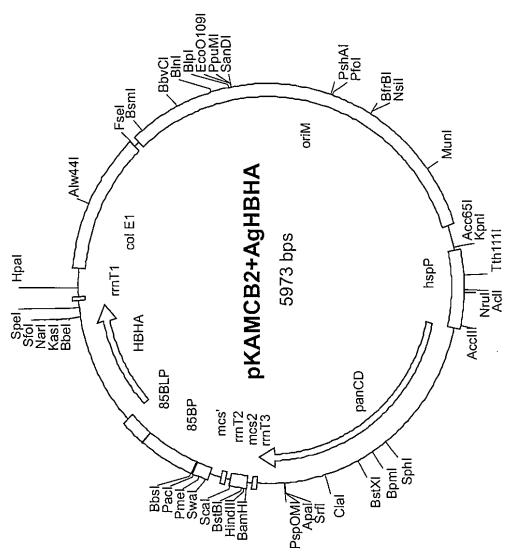
【 3 A 】



【 3 B 】



【 4 】



【 5 A 】

AERAS-445 HBHA aa
 1 mrrlcaridi wpphtvcsgp strrhtgggrg tsmatdvsrk irawgrrlmi
 51 gtaaaavllpg lvglaggaat agafismaens niddikapll aalgaadlal
 101 atvnelitnl reraeetrd trsrveesra rltklgedlp eqlteirekf
 151 taeelrkaae gyleaatsry nelvergeaa lerlrsqgsf eevsaraegy
 201 vdqaveitqe algtvasqtr avgeraaklv gielpkkaap akkaapakka
 251 apakkaaakk apakkaaakk (配列番号3)

【 5 B 】

BCG HBHA aa
 1 aensniddik apllaalgaa dlatatvnel itnlreraee trtdtrsrve
 51 esrarltklq edlpeglteel rekftaeelr kaaegyieaa tsrynelver
 101 geaalerlrs qgsfeevsar aegyvdqave ltqealgtva sqtravgera
 151 aklvgielpk kaapakkaap akkaapakka aakkapakka aakvtqk (配列番号4)

【 5 C 】

異体同形ブロック:76~274

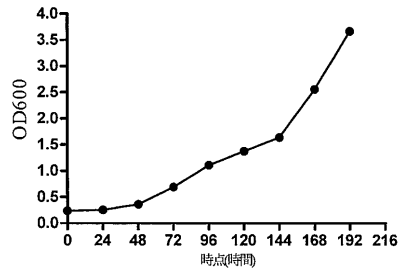
445-HBHAAA (1~274)

N: _____ : C
 N: _____ : C

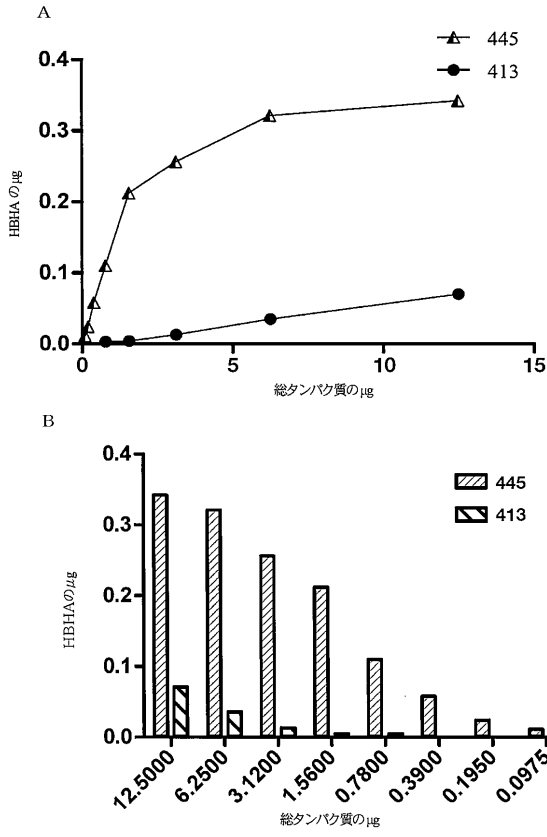
異体同形ブロック:1~199

BCG-HBHAAA (1~199)

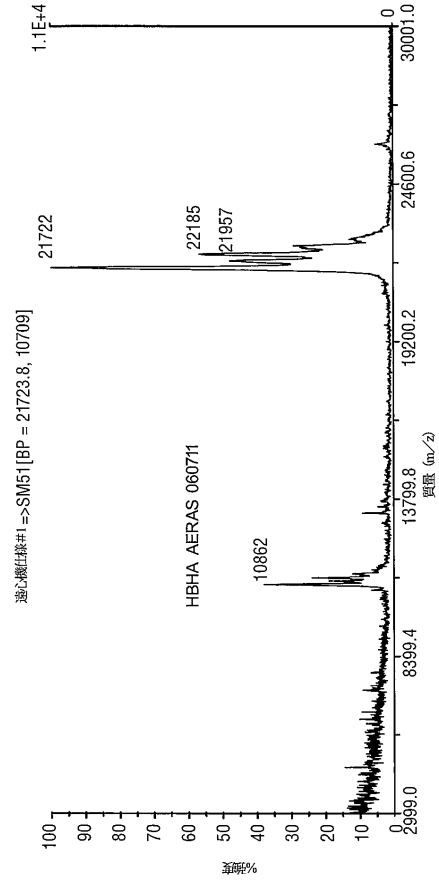
【 7 】



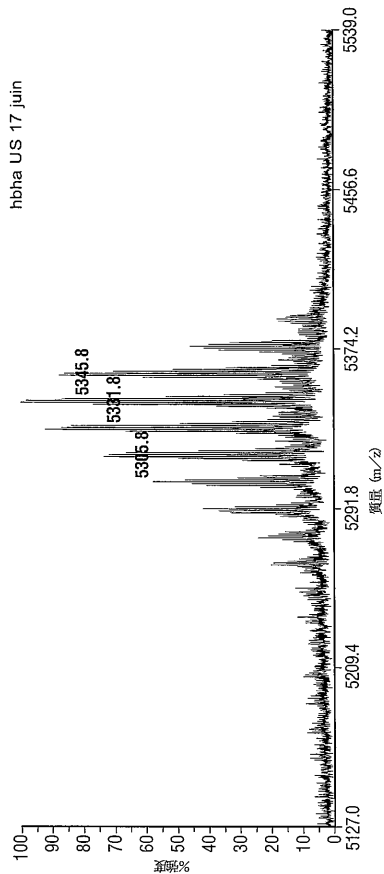
【 図 1 1 】



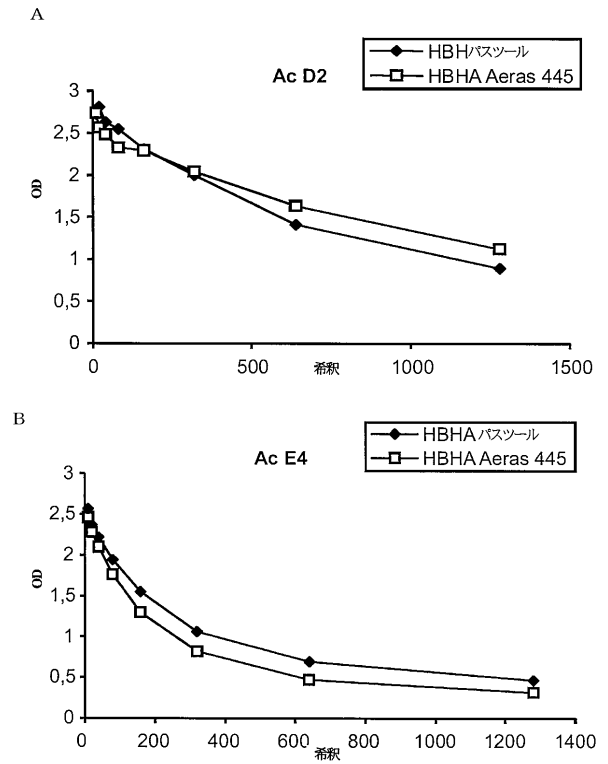
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

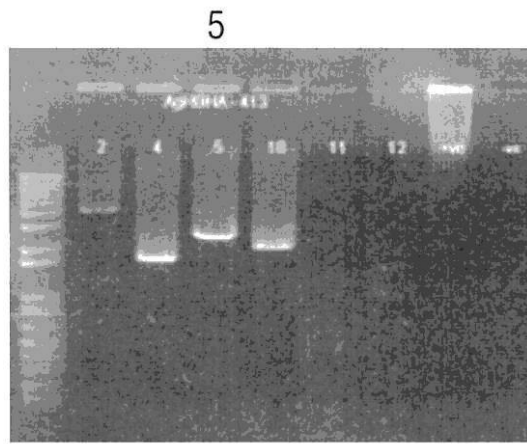


【 図 1 4 】

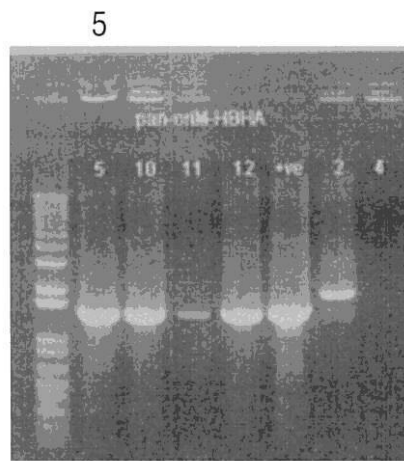


【図6】

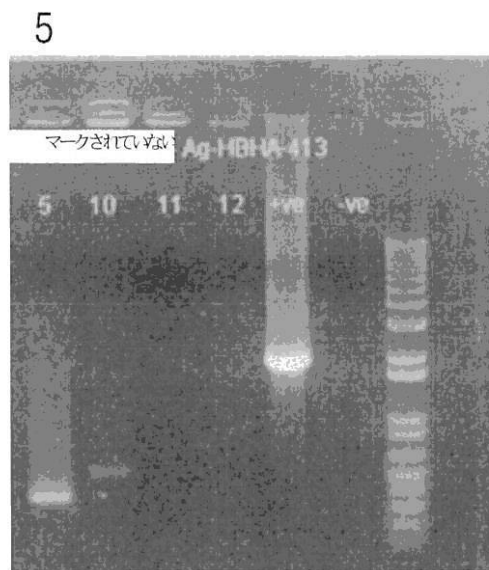
A



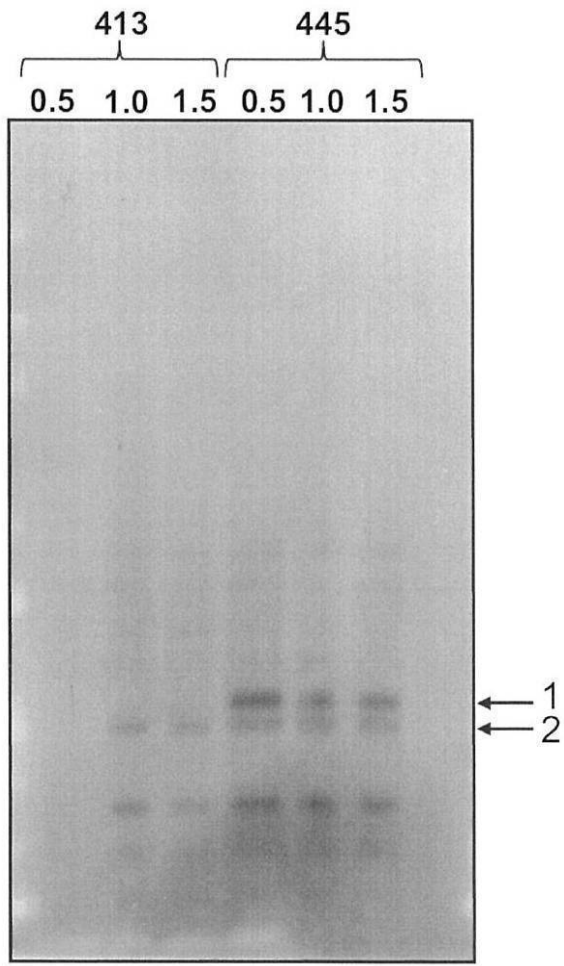
B



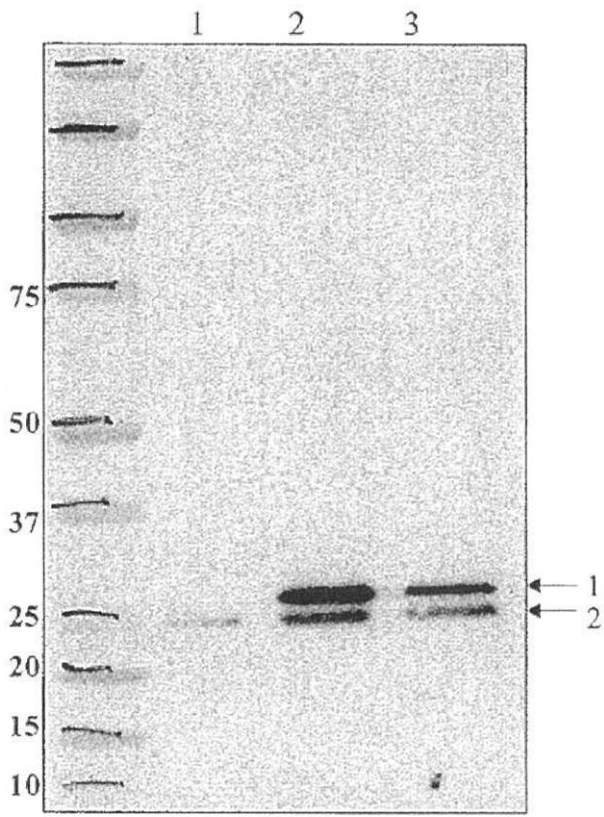
C



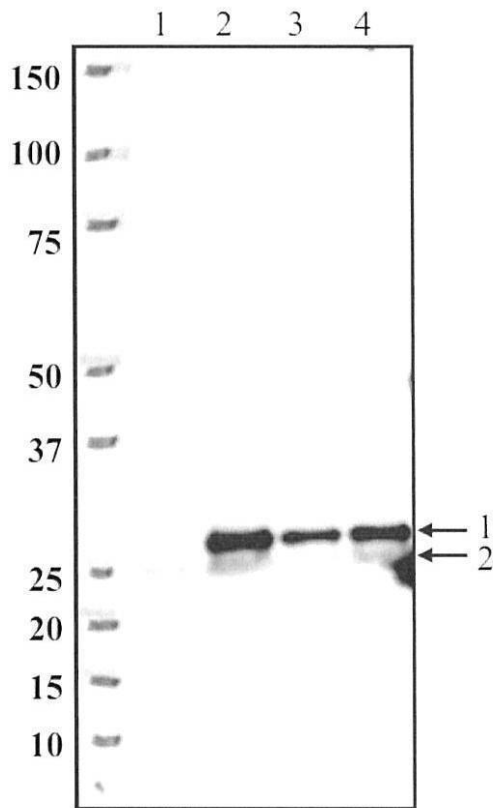
【 図 8 】



【 図 9 】



【図 10】



【配列表】

[2015515276000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成27年4月8日(2015.4.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素(HBHA)タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着したAg85Bリーダー配列をコードしている核酸融合配列を含み、前記融合配列がプロモーターに操作可能に結合される、マイコバクテリウム。

【請求項2】

前記マイコバクテリウムがヒト型結核菌、ウシ型結核菌およびスメグマ菌を含む群から選択される、請求項1に記載のマイコバクテリウム。

【請求項3】

前記マイコバクテリウムがウシ型結核菌(カルメット・ゲラン桿菌)(BCG)である、請求項1または2に記載のマイコバクテリウム。

【請求項4】

前記BCGがBCGデンマークStatens Serum Institut(SSEI)型である、請求項3に記載のマイコバクテリウム。

【請求項5】

前記 B C G S S I 型が p f o 遺伝子を発現する、請求項 4 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 6】

前記 p f o 遺伝子がウェルシュ菌からの p f o 遺伝子である、請求項 5 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 7】

前記核酸融合配列が配列番号 1 と少なくとも 90% 相同するヌクレオチド配列を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 8】

前記核酸融合配列によってコードされるポリペプチドが、配列番号 3 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 9】

前記マイコバクテリウム H B H A タンパク質がヒト型結核菌 H B H A である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 10】

前記プロモーターがマイコバクテリウム A g 8 5 B プロモーターである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 11】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後から 30 ~ 50 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内に含まれる、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 12】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 11 に記載のマイコバクテリウム。

【請求項 13】

配列番号 1 と少なくとも 90% 相同するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 14】

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する A g 8 5 B リーダー配列を含む、融合タンパク質。

【請求項 15】

前記融合タンパク質が配列番号 3 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

前記融合タンパク質がメチル化される、請求項 14 または 15 に記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 30 ~ 50 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内に含まれる、請求項 14 ~ 16 のいずれかの 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 17 に記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する A g 8 5 B リーダー配列を含む融合タンパク質を生産する方法であって：

前記融合タンパク質をコードしている核酸配列をマイコバクテリウム細胞に導入すること；および

前記マイコバクテリウム細胞が前記融合タンパク質の生産を可能にする条件下で、前記導入されたマイコバクテリウム細胞を成長させること；

を含む、方法。

【請求項 20】

組換え型ヘパリン結合性赤血球凝集素 (r H B H A) タンパク質を生産する方法であって：

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する A g 8 5 B リーダー配列をコードする核酸融合配列を含み、前記融合配列がプロモーターに操作可能に結合される、マイコバクテリウムの培養菌を育てること；

を含む、方法。

【請求項 21】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 30 ~ 50 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内に含まれる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

ヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質を含む組成物を調製する方法であって：

マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する A g 8 5 B リーダー配列をコードしている核酸融合配列を含み、前記融合配列がプロモーターに操作可能に結合されている、マイコバクテリウムの培養菌を育てること；

前記 r H B H A 融合タンパク質を前記培養菌から取得すること；

前記 r H B H A 融合タンパク質を精製すること；および

前記精製された r H B H A 融合タンパク質と生理学的に許容可能な担体と組み合わせること；

を含む、方法。

【請求項 24】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 30 ~ 50 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内に含まれる、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

被験者が潜在的な結核感染症を有するかどうかを決定するために使用する、マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する A g 8 5 B リーダー配列を含む融合タンパク質を含む、キットであって、前記融合タンパク質に免疫反応性の有無を検知することを含み、免疫反応性の存在が前記被験者に潜在的な結核感染症があることを示す、キット。

【請求項 27】

前記検知が、前記融合タンパク質で前記被験者を皮下注射すること、および皮下注射の場所で免疫反応性を検知することを含む、請求項 26 に記載のキット。

【請求項 28】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 30 ~ 50 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内に含まれる、請求項 26 または 27 に記載のキット。

【請求項 29】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 28 に記載のキット。

【請求項 30】

ヒト型結核菌に対して免疫反応を必要とする被験者において免疫反応を誘発するために使用する、マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する A g 8 5 B リーダー配列を含む融合タンパク質を含む、医薬。

【請求項 3 1】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 3 0 ~ 5 0 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内に含まれる、請求項 3 0 に記載の医薬。

【請求項 3 2】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 3 1 に記載の医薬。

【請求項 3 3】

ヒト型結核菌に対して免疫反応を必要とする被験者において免疫反応を誘発するために使用する、マイコバクテリウムヘパリン結合性赤血球凝集素 (H B H A) タンパク質またはその抗原性断片のアミノ末端に付着する A g 8 5 B リーダー配列をコードしている核酸融合配列を含み前記融合配列がプロモーターに操作可能に結合されるマイコバクテリウムを含む、医薬。



【請求項 3 4】

前記抗原性断片が配列番号 4 の最後の 3 0 ~ 5 0 のカルボキシ末端アミノ酸の範囲内に含まれる、請求項 3 3 に記載の医薬。

【請求項 3 5】

前記抗原性断片が配列番号 5 であるかまたはそれを含む、請求項 3 4 に記載の医薬。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/033757
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 1/21(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, C12P 21/00(2006.01)i</i>		
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) C12N 1/21; C12N 15/63; A61K 39/04; A61P 31/04; A61K 39/02; A61K 39/275; /; A61K 39/00; C12N 9/10; G01N 33/58; G01N 33/53; C07K 16/12; G01N 33/569; C12Q 1/68; C12N 15/31		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Ag85B, leader sequence, heparin-binding hemagglutinin, HBHA, fusion protein, Mycobacterium, pfo gene, etc.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011-013097 A2 (BERND HELMUT ADAM REHM et al.) 03 February 2011 See the whole document.	1-6, 13-19, 30-34 , 37-44
A	US 8012467 B2 (MENZO J. E. HAVENGA et al.) 06 September 2011 See the whole document.	1-6, 13-19, 30-34 , 37-44
A	US 2006-0292168 A1 (KEVIN PETHE et al.) 28 December 2006 See the whole document.	1-6, 13-19, 30-34 , 37-44
A	WO 98-44119 A1 (STATENS SERUM INSTITUT) 08 October 1998 See the whole document.	1-6, 13-19, 30-34 , 37-44
A	EP 2437061 A1 (JOHN IKONOMOPOULOS) 04 April 2012 See the whole document.	1-6, 13-19, 30-34 , 37-44
A	WO 2011-144951 A1 (HEALTH PROTECTION AGENCY) 24 November 2011 See the whole document.	1-6, 13-19, 30-34 , 37-44
A	US 7745141 B2 (SUMAN LAAL et al.) 29 June 2010 See the whole document.	1-6, 13-19, 30-34 , 37-44
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of 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 21 DECEMBER 2012 (21.12.2012)		Date of mailing of the international search report 26 DECEMBER 2012 (26.12.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Heo, Joo-Hyung Telephone No. 82-42-481-8150 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/033757

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0226678 A1 (HELEN MCSHANE et al.) 18 September 2008 See the whole document.	1-6, 13-19, 30-34 , 37-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/033757

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.: 20-29,45,46
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 20-29, 45, and 46 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.: 8
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:
Claim 8 is unclear, because it refers to multiple dependent claim which is not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a).
3. Claims Nos.: 7,9-12,23,35,36
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:

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

- 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 SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/033757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011-013097 A2	03.02.2011	CA 2769645 A1	03.02.2011
		CN 102573891 A	11.07.2012
		WO 2011-013097 A3	07.04.2011
US 8012467 B2	06.09.2011	AU 2005-305869 A1	26.05.2006
		AU 2005-305869 B2	09.12.2010
		AU 2011-200749 A1	10.03.2011
		BR P10518933 A2	16.12.2008
		CA 2586620 A1	26.05.2006
		CN 101090974 B	11.05.2011
		CN 102220357 A	19.10.2011
		EA 012037 B1	30.06.2009
		EA 200701084 A1	26.10.2007
		EP 1812580 A2	01.08.2007
		JP 2008-520198 A	19.06.2008
		JP 4838259 B2	14.12.2011
		KR 10-2007-0091620 A	11.09.2007
		MX 2007005256 A	11.03.2008
		NZ 555907 A	24.12.2009
		SG 159555 A1	30.03.2010
		US 2009-0123438 A1	14.05.2009
		US 2011-0256166 A1	20.10.2011
		US 2011-0281347 A1	17.11.2011
		US 8202723 B2	19.06.2012
		WO 2006-053871 A2	26.05.2006
WO 2006-053871 A3	21.12.2006		
US 2006-0292168 A1	28.12.2006	AT 522542 T	15.09.2011
		AU 2002-360178 A1	10.06.2003
		AU 2002-360178 B2	17.04.2008
		CA 2466937 A1	30.05.2003
		DK 1446422 T3	14.11.2011
		EP 1446422 A2	18.08.2004
		EP 1446422 B1	31.08.2011
		EP 2354154 A1	10.08.2011
		ES 2371597 T3	05.01.2012
		FR 2832410 A1	23.05.2003
		FR 2832410 B1	02.04.2004
		JP 2005-526006 A	02.09.2005
		JP 2010-043087 A	25.02.2010
		PT 1446422 E	15.11.2011
		US 2012-0034257 A1	09.02.2012
		US 7829103 B2	09.11.2010
US 8303963 B2	06.11.2012		
WO 03-044048 A2	30.05.2003		
WO 98-44119 A1	08.10.1998	AT 370236 T	15.09.2007
		AU 1998-68204 B2	08.11.2001
		AU 1998-94338 A1	31.05.1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/033757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		AU 1998-94338 B2	11.07.2002
		AU 1999-60784 A1	01.05.2000
		AU 1999-60784 B2	09.10.2003
		AU 2000-59664 A1	30.01.2001
		AU 2000-59664 B2	27.01.2005
		AU 6820498 A	22.10.1998
		CA 2165949 A1	12.01.1995
		CA 2165949 C	07.06.2011
		CA 2285625 A1	08.10.1998
		CA 2319380 A1	20.05.1999
		CA 2346218 A1	20.04.2000
		CA 2378763 A1	18.01.2001
		DE 69838268 D1	27.09.2007
		DE 69838268 T2	08.05.2008
		DK 1449922 T3	03.12.2007
		EP 0706571 A1	04.09.2002
		EP 0706571 B1	22.09.2004
		EP 0972045 A1	19.01.2000
		EP 1029053 A1	23.08.2000
		EP 1117683 A2	25.07.2001
		EP 1200466 A2	02.05.2002
		EP 1449922 A2	25.08.2004
		EP 1449922 A3	17.11.2004
		EP 1449922 B1	15.08.2007
		EP 1484405 A1	08.12.2004
		EP 1508339 A1	23.02.2005
		EP 1787994 A1	23.05.2007
		ES 2291810 T3	01.03.2008
		JP 2001-515359 A	18.09.2001
		JP 2003-510018 A	18.03.2003
		JP 2008-142079 A	26.06.2008
		JP 2008-301817 A	18.12.2008
		JP 2010-154856 A	15.07.2010
		JP 2011-102299 A	26.05.2011
		JP 4406024 B2	27.01.2010
		JP 4544434 B2	15.09.2010
		PT 1449922 E	09.11.2007
		US 05955077 A	21.09.1999
		US 2002-0094336 A1	18.07.2002
		US 2002-0176867 A1	28.11.2002
		US 2003-0147897 A1	07.08.2003
		US 2003-0165525 A1	04.09.2003
		US 2004-0013685 A1	22.01.2004
		US 2004-0115211 A1	17.06.2004
		US 2007-0184073 A1	09.08.2007
		US 2008-0267990 A1	30.10.2008
		US 6641814 B1	04.11.2003
		US 6982085 B2	03.01.2006
		US 6991797 B2	31.01.2006
		US 7037510 B2	02.05.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/033757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 7867502 B1	11.01.2011
		US 8076469 B2	13.12.2011
		WO 00-21983 A2	20.04.2000
		WO 01-04151 A2	18.01.2001
		WO 95-01441 A1	12.01.1995
		WO 99-24577 A1	20.05.1999
EP 2437061 A1	04.04.2012	None	
WO 2011-144951 A1	24.11.2011	GB 201008512 D0	07.07.2010
US 7745141 B2	29.06.2010	AU 2001-271554 A1	09.09.2003
		AU 2001-271554 B2	12.03.2009
		CA 2451045 A1	04.09.2003
		US 2005-0084904 A1	21.04.2005
		WO 03-073101 A2	04.09.2003
US 2008-0226678 A1	18.09.2008	AT 501727 T	15.04.2011
		AU 2006-204382 A1	13.07.2006
		AU 2006-204382 B2	12.05.2011
		CA 2592756 A1	13.07.2006
		CN 101115500 A	30.01.2008
		CN 102580070 A	18.07.2012
		DE 602006020679 D1	28.04.2011
		DK 1833507 T3	11.07.2011
		EP 1833507 A1	19.09.2007
		EP 1833507 B1	16.03.2011
		ES 2364698 T3	12.09.2011
		GB 0500102 D0	09.02.2005
		JP 2008-526823 A	24.07.2008
		KR 10-2007-0108518 A	12.11.2007
		PT 1833507 E	27.06.2011
		RS 51815 B	31.12.2011
		SI 1833507 T1	29.07.2011
		US 7850979 B2	14.12.2010
		WO 2006-072787 A1	13.07.2006

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04	
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/06	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74) 代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72) 発明者 ジョン・フルカーソン

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 9 0 1 . シルバースプリング . レキシントドライブ 2 0 7

(72) 発明者 マイケル・ブレナン

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 0 . ロックビル . リサーチプールバード 1 4 0 5 . サード
フロアー . アエラス・グローバル・ティービー・ワクチン・ファウンデーション

(72) 発明者 カマラカナン・ヴェレムルガン

アメリカ合衆国メリーランド州 2 0 8 5 0 . ロックビル . リサーチプールバード 1 4 0 5 . サード
フロアー . アエラス・グローバル・ティービー・ワクチン・ファウンデーション

(72) 発明者 カミーユ・ロクト

ベルギー国ビー 1 1 8 0 ブリュッセル . アヴニュジャックパステュール 1 6 0

F ターム (参考) 4B024 AA01 BA31 CA01 DA05 EA04 FA02 GA11 HA03 HA08

4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 CE10 CE12 DA01

4B065 AA01X AA01Y AB01 BA03 BC26 CA24 CA45

4C085 AA03 BA09 CC07 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 BA41 CA11 DA86 EA22 FA74 GA01

GA15 GA25 GA26