

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4255209号  
(P4255209)

(45) 発行日 平成21年4月15日(2009.4.15)

(24) 登録日 平成21年2月6日(2009.2.6)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 07 K 14/195	(2006.01)	C 07 K 14/195	
C 07 K 14/35	(2006.01)	C 07 K 14/35	
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K 19/00	
C 12 N 1/21	(2006.01)	C 12 N 1/21	

請求項の数 28 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-507804 (P2000-507804)  
 (86) (22) 出願日 平成10年8月12日 (1998.8.12)  
 (65) 公表番号 特表2001-514000 (P2001-514000A)  
 (43) 公表日 平成13年9月11日 (2001.9.11)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP1998/005109  
 (87) 國際公開番号 WO1999/010496  
 (87) 國際公開日 平成11年3月4日 (1999.3.4)  
 審査請求日 平成17年7月11日 (2005.7.11)  
 (31) 優先権主張番号 97114614.7  
 (32) 優先日 平成9年8月22日 (1997.8.22)  
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 596070445  
 マックス-プランク-ゲゼルシャフト ツ  
 ル フォーテルング テル ヴィッセン  
 シャフテン エー. ヴェー.  
 ドイツ連邦共和国 ティー-80539  
 ミュンヘン ホフガルテンシュトラーセ  
 8  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (72) 発明者 カウフマン, ステファン, エイチ. , イー  
 ドイツ連邦共和国 ティー-13465  
 ベルリン, アム ロゼナンケル 57エイ  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】結核ワクチン

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるマイコバクテリウム・ポリペプチド由来の少なくとも1つのドメイン、および(b) ファゴリソソーム脱出ドメイン、を含む融合ポリペプチドをコードする組換え核酸分子。

## 【請求項 2】

ファゴリソソーム脱出ドメインがリストリア属の生物に由来する、請求項1に記載の核酸。

## 【請求項 3】

ファゴリソソーム脱出ドメインが、  
 (a) 配列番号1に示すヌクレオチド211-1722のヌクレオチド配列、  
 (b) (a)からの配列と同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、および、  
 (c) (a)または(b)からの配列の相補鎖配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、

から選択される核酸分子によってコードされる、請求項1または2に記載の核酸。

## 【請求項 4】

免疫応答を誘発する能力があるドメインがMHCクラスI拘束CD8T細胞応答を誘発する能力があるペプチドまたはポリペプチドである、請求項1~3のいずれか1項に記載の核酸。

## 【請求項 5】

10

20

免疫応答を誘発する能力があるドメインがマイコバクテリウム抗原Ag85B (*M. tuberculosis*)、Ag85B (*M. bovis*)、Ag85A (*M. tuberculosis*) およびESAT-6 (*M. tuberculosis*) から選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項6】

免疫応答を誘発する能力があるドメインが抗原 Ag85B である、請求項5に記載の核酸。

【請求項7】

融合ポリペプチドがシグナルペプチド配列によって先行される、請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸。

【請求項8】

免疫応答誘発ドメインとファゴリソーム脱出ドメインの間にペプチドリンクカーが位置する、請求項1～7のいずれか1項に記載の核酸。 10

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の核酸分子の少なくとも1コピーを含む組換えベクター。

【請求項10】

核酸分子が発現制御配列に機能し得る形で連結されている、請求項9に記載のベクター。

【請求項11】

発現制御配列がマイコバクテリア中で活性である、請求項10に記載のベクター。

【請求項12】

染色体外ベクターである、請求項9、10または11に記載のベクター。

【請求項13】

染色体ベクターである、請求項9、10または11に記載のベクター。

【請求項14】

請求項1～8のいずれか1項に記載の組換え核酸分子または請求項9～13のいずれか1項に記載のベクターを含む細胞。

【請求項15】

(a) 哺乳類中で免疫応答を誘発する能力がある少なくとも1つのドメイン、および(b) ファゴリソーム脱出ドメイン、を含む融合ポリペプチドをコードする少なくとも1つの組換え核酸分子を含む、組換えMycobacterium bovis細胞。 30

【請求項16】

ファゴリソーム脱出ペプチドまたはファゴリソーム脱出ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を少なくとも1つ含む、組換えMycobacterium bovis細胞。

【請求項17】

哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるペプチドまたはポリペプチドをコードする別の組換え核酸分子を少なくとも1つ含む、請求項16に記載の細胞。

【請求項18】

免疫応答を誘発する能力があるドメインまたはペプチド若しくはポリペプチドが自己抗原、腫瘍抗原、ウイルス抗原、寄生体抗原、および細菌抗原から選択される、請求項15または17に記載の細胞。 40

【請求項19】

少なくとも1つの前記組換え核酸分子を発現する能力がある、請求項14～18のいずれか1項に記載の細胞。

【請求項20】

少なくとも1つの前記核酸分子によってコードされたポリペプチドを分泌する能力がある、請求項14または19に記載の細胞。

【請求項21】

天然のマイコバクテリウム細胞の細胞内持続性に等しいかまたはそれよりも低い、感染マクロファージ中の細胞内持続性を有する、請求項14～20のいずれか1項に記載の細胞。 50

## 【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸分子によってコードされた組換え融合ポリペプチド。

## 【請求項 2 3】

請求項 1 4 に記載の組換え細菌細胞の調製方法であって、

(i) (a) 哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるマイコバクテリウム・ポリペプチド由来の少なくとも 1 つのドメイン、および(b) ファゴリソーム脱出ドメイン、を含む融合ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を細菌細胞中に挿入し、そして、

(ii) (i) によって取得した細胞を好適な条件下で培養する、

各ステップを含む方法。

10

## 【請求項 2 4】

細胞が *M. bovis* 細胞である、請求項 2 3 に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

請求項 1 5 に記載の組換え細菌細胞の調製方法であって、

(i) (a) 哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるポリペプチド由来の少なくとも 1 つのドメイン、および(b) ファゴリソーム脱出ドメイン、を含む融合ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を *Mycobacterium bovis* 細胞中に挿入し、そして、

(ii) (i) によって取得した細胞を好適な条件下で培養する、

各ステップを含む方法。

## 【請求項 2 6】

20

請求項 1 6 に記載の組換え細菌細胞の調製方法であって、

(i) ファゴリソーム脱出ペプチドまたはファゴリソーム脱出ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を *Mycobacterium bovis* 細胞中に挿入し、そして、

(ii) (i) によって取得した細胞を好適な条件下で培養する、

各ステップを含む方法。

## 【請求項 2 7】

哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるペプチドまたはポリペプチドをコードする別の組換え核酸分子を *Mycobacterium bovis* 細胞に少なくとも 1 つ挿入することを含む、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

## 【請求項 2 8】

30

免疫応答を誘発する能力があるドメインまたはペプチド若しくはポリペプチドが自己抗原、腫瘍抗原、ウイルス抗原、寄生体抗原、および細菌抗原から選択される、請求項 2 5 または 2 7 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0 0 0 1】

本発明は特に結核に対する防御免疫を提供する新規な組換えワクチンに関する。さらに、本発明は新規な組換え核酸分子、この核酸分子を含有するベクター、この核酸分子で形質転換した細胞、およびこの核酸分子によってコードされるポリペプチドに関する。

## 【0 0 0 2】

*Mycobacterium tuberculosis* によって引き起こされる結核 (TB) は重要でグローバルな問題のままである。世界の人口の三分の一が *M. tuberculosis* に感染しているものと推定される (Kochi, 1991)。多くの国で、TBの制御のための唯一の手段は *M. bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) でのワクチン接種であった。しかし、TBに対するBCGの総合的なワクチン効率は約50%であり、各種の実用試験間で0% ~ 80%の範囲の極端な変動がある (Rocherら、1995)。したがって、よりよいTB防御用のワクチンを提供するために、例えば遺伝子工学によってBCGを改良すべきである (Murrayら、1996 ; Hess and Kaufmann, 1993)。多数の薬剤耐性 *M. tuberculosis* 株の広範な出現によって、新規なTBワクチンへの緊急の要請がさらに強調されている (Grange, 1996)。

## 【0 0 0 3】

*M. tuberculosis* は休止マクロファージのファゴソーム液胞内で複製される細胞内細菌の群

50

に属するので、TBに対する防御はT細胞性免疫に依存する (Kaufmann, 1993)。しかし、マウスおよびヒトにおけるいくつかの研究では、マイコバクテリアは抗原特異的な主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)クラスIIまたはクラスI拘束CD4およびCD8 T細胞をそれぞれ刺激することが示された (Kaufmann, 1993)。

#### 【0004】

MHCクラスI拘束CD8 T細胞の重要な役割は、2-ミクログロブリン(2m)欠失マウスが実験的な *M. tuberculosis*の感染を防御することができないことに よって、説得力のある証明がなされた (Flynnら、1993)。これらの突然変異マウスはMHCクラスIを欠損しているので、機能性CD8 T細胞が発生することができない。*M. tuberculosis*の感染とは対照的に、2m-欠失マウスはBCGワクチン株の一定の感染性用量を制御することができる (Flynnら、1993 ; Ladelら、1995)。さらに、BCGで免疫したC57BL/6がTBに耐性であるところから、2m-欠失マウスのBCGワクチン接種によって、その後の *M. tuberculosis*の感染の後の生存が延長された (Flynnら、1993)。*M. tuberculosis*およびBCG間のこの差異のあるCD8 T細胞依存性は以下のように説明することができる：*M. tuberculosis*抗原はBCGからの抗原よりも細胞質へのより良い接近手段を獲得して、より明白なMHCクラスIの提示が導かれる (Hess and Kaufmann, 1993)。その結果、*M. tuberculosis*によってより効果的なCD8 T細胞応答が産生される。この見解は、BCGによるよりも *M. tuberculosis*での抗原提示細胞 (APC) の同時感染によって、無関係な抗原、オボアルブミンのMHCクラスIの提示が増加することから、最近支持された (Mazzaccaroら、1996)。

#### 【0005】

*M. tuberculosis*の分泌タンパク質はMHCクラスI提示にとって有効な抗原の起源を含んでいる。最近、この分泌された抗原 Ag85AをコードするDNAワクチンがマウスにおいてMHCクラスI拘束CD8 T細胞応答を誘発したので、これがTBに対する防御に寄与するのかも知れない (Huygenら、1996)。一般的に、分泌された*M. tuberculosis*のタンパク質抗原による免疫化がモルモットおよびマウスにおいてTBに対するなんらかの防御を誘導するという証拠が蓄積されてきている (Horwitzら、1995 ; Andersen, 1994)。したがって、BCGに基づく改良されたTBワクチンの開発の重要な目標は、分泌されたBCG特異的抗原の感染したAPCの細胞質への接近能力を増強することである。これらの分泌されたタンパク質から誘導されるペプチドのその後のMHCクラスI提示経路中への送達は、TB防御のためにすでに存在するBCG特異的免疫応答を増強すると考えられる。

#### 【0006】

*L. monocytogenes*のファゴリソーム脱出(escape)はリストリア抗原のMHCクラスI抗原提示を助長するための独特的な機構を説明するものである (Bercheら、1987 ; Portnoyら、1988)。細孔形成性のスルフヒドリルで活性化される細胞溶解素であるリストリオリン(Hly steriolysin) (Hly) は宿主細胞のファゴリソーム液胞から細胞質ゾルへの *L. monocytogenes*微生物体の放出に必須である (Gaillardら、1987 ; Portnoyら、1988)。最近、この脱出機能が *Bacillus subtilis* および弱毒化 *Salmonella* ssp. 株に移された (Bieleckiら、1991 ; Gentschevら、1995 ; Hess and Kaufmann, 1997)。無胞子性 *B. subtilis*突然変異株によるかまたは *Salmonella* ssp. 中でのHlyの発現の結果、J774マクロファージ様細胞のファゴリソームから細胞質ゾル中に細菌が脱出する (Bieleckiら、1991 ; Gentschevら、1995 ; Hess and Kaufmann, 1997)。

#### 【0007】

このように、リソソーム脱出機能の異種微生物への転移は生成する組換え微生物の毒性の上昇の原因となることがある。この理由によって、組換え生ワクチンの調製のためのこれらのリソソーム脱出機能の使用はすぐには考慮に入れられなかった。

#### 【0008】

本発明において、溶血活性があるHlyを分泌する組換えBCG株を構築した。これは改良されたMHCクラスI拘束免疫応答を示し、そして驚くべきことに、改変しない天然のBCG株に比較して等しいかむしろ低い細胞傷害性を示す。すなわち、これらの組換え生物はTBに対するワクチンの確実な候補である。

10

20

30

40

50

## 【0009】

本発明の第1の態様は、哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるマイコバクテリウム・ポリペプチド由来の少なくとも1つのドメイン、および(b) ファゴリソーム脱出ドメイン1種、を含む融合ポリペプチドをコードする組換え核酸分子である。

## 【0010】

この第1の態様の特定の1実施形態は配列番号1中の核酸分子である。この核酸分子はシグナルペプチド1種をコードする配列(ヌクレオチド1-120)、免疫原性ドメインをコードする配列(ヌクレオチド121-153)、ペプチドリンカーをコードする配列(ヌクレオチド154-210)、ファゴリソームドメインをコードする配列(ヌクレオチド211-1722)、別のペプチドリンカーをコードする配列(ヌクレオチド1723-1800)およびランダムペプチドをコードする配列(ヌクレオチド1801-1870)を含む。対応するアミノ酸配列を配列番号2に示す。

10

## 【0011】

本発明の核酸はマイコバクテリウム属の生物、好ましくは *Mycobacterium tuberculosis* または *Mycobacterium bovis* 由来のポリペプチド由来の少なくとも1つの免疫原性ドメインを含有する。このドメインは長さ6以上、好ましくは8以上のアミノ酸を有する。この免疫原性ドメインは好ましくは天然のマイコバクテリウム・ポリペプチドの一部分である。しかし、天然の免疫原性ドメインから1または数個のアミノ酸の置換、欠失および/または添加によって誘導される、修飾された免疫原性ドメインもまた本発明の範囲内である。

20

## 【0012】

この免疫原性ドメインは哺乳類中に免疫応答を誘発することができる。この免疫応答はB細胞性免疫応答も可能である。しかし、好ましくはこの免疫原性ドメインはT細胞性免疫応答、より好ましくはMHCクラスI拘束CD8T細胞応答を誘発する能力があるものである。

## 【0013】

免疫応答を誘発することができるドメインは好ましくは *M. bovis* もしくは *M. tuberculosis* からの免疫原性ペプチドもしくはポリペプチド、またはこれらの免疫原性フラグメントから選択される。好適な抗原の特定の例は、*M. tuberculosis* 由来の Ag85B (p30) (Harthら、1996)、*M. bovis* BCG由来の Ag85B (抗原) (Matsuoら、1988)、*M. tuberculosis* 由来の Ag85A (Huygenら、1996) および *M. tuberculosis* 由来の ESAT-6 (Sorensenら、1996、Harboeら、1996 および Andersenら、1995) である。さらに好ましくは、免疫原性ドメインは抗原 Ag85B から誘導される。最も好ましくは免疫原性ドメインは配列番号2中のaa.41からaa.51の配列を含む。

30

## 【0014】

本発明に従う組換え核酸分子はさらに、ファゴリソーム脱出ドメイン、すなわち融合ポリペプチドを哺乳類細胞のファゴリソームから細胞質ゾル中へ脱出させる手段を与えるポリペプチドドメインを含む。好ましくはこのファゴリソーム脱出ドメインはリステリア属生物由来である。さらに好ましくは、ファゴリソーム脱出ドメインは *L. monocytogenes* 生物由来である。最も好ましくは、ファゴリソーム脱出ドメインは、(a) 配列番号1中に示されるヌクレオチド211-1722からのヌクレオチド配列、(b) (a)からの配列と同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、および(c) (a)または(b)からの配列とストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、から選択される核酸分子によってコードされる。

40

## 【0015】

配列番号1に図示するヌクレオチド配列とは別に、本発明はこれらとハイブリダイズする核酸配列をも含む。本発明において、用語「ハイブリダイゼーション」は *Sambrook*ら (*Molecular Cloning. A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104) の定義にしたがって使用する。本発明において、用語「ハイブリダイゼーション」は、55、好ましくは62、さらに好ましくは68で1時間、1×SSCおよび0.1%SDSで、特に55、好ましくは62、さらに好ましくは68で1時間、0.2×SSCおよび

50

0.1% SDS での洗浄後もなお陽性ハイブリダイゼーションシグナルを観察することができる場合に、使用する。こうした洗浄条件下で配列番号 1 によるヌクレオチド配列とハイブリダイズする配列は、本発明にとって好ましい、ファゴリソーム脱出ドメインをコードするヌクレオチド配列である。

【 0 0 1 6 】

好ましくは、融合ポリペプチドをコードする組換え核酸分子はシグナルペプチドをコードする配列を含んでいる。さらに好ましくは、このシグナル配列はマイコバクテリア、好ましくは *M. bovis* 中で活性なシグナル配列であり、例えば天然の *M. bovis* シグナル配列である。好適なシグナル配列の好ましい一例は、配列番号 1 中のヌクレオチド 1-120 で示される、Ag85B シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列である。

10

【 0 0 1 7 】

さらに、免疫原性ドメインとファゴリソーム脱出ドメインとの間にペプチドリンカーを配置するのが好ましい。好ましくは、このペプチドリンカーは長さ 5 から 50 のアミノ酸である。さらに好ましくは、配列番号 1 中のヌクレオチド 154-210 に示すリンカーをコードする配列、または遺伝コードの縮重性に関してこの配列に相当する配列である。

【 0 0 1 8 】

本発明の別の主題は、上に定義した核酸分子の少なくとも 1 つのコピーを含む組換えベクターに関する。好ましくは、この組換えベクターは原核ベクター、すなわち原核細胞中の複製または / およびゲノムへの組み込みのためのエレメントを含有するベクターである。好ましくは、この組換えベクターは発現制御配列に機能し得るように連結した本発明の核酸分子を保有する。この発現制御配列は好ましくはマイコバクテリア、特に *M. bovis* 中で活性な発現制御配列である。このベクターは染色体外ベクターまたは染色体中に組み込むのに好適なベクターとすることができます。こうしたベクターの例は当分野の技術者に知られており、例えば Sambrook ら、上記、に記載されている。

20

【 0 0 1 9 】

本発明のさらに別の主題は、上に定義した組換え核酸またはベクターを含む細胞である。好ましくは、この細胞は原核細胞、特にマイコバクテリウムの細胞である。さらに、この細胞が本発明の核酸分子を発現することができることが好ましい。

【 0 0 2 0 】

本発明の第 2 の態様において、(a) 哺乳類中で免疫応答を誘発する能力がある少なくとも 1 つのドメイン、および (b) ファゴリソーム脱出ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの組換え核酸分子を含む、組換え *Mycobacterium bovis* 細胞が提供される。この態様によれば、免疫原性ドメインはマイコバクテリウムの抗原に限定されるものではなく、自己抗原、腫瘍抗原、および一般的なウイルス抗原、寄生体抗原、細菌抗原などの病原体抗原、ならびにそれらの免疫原性フラグメントから選択することができる。好適な腫瘍抗原の特定の例は、p53 腫瘍サプレッサー遺伝子産物などのヒト腫瘍抗原 (Houbiers ら、1993) およびメラノサイト分化抗原、例えば Melan-A/MART-1 および gp100 である (van Elsas ら、1996)。好適なウイルス抗原の特定の例は、ヒト乳頭腫ウイルス抗原、例えば抗原 E6 および E7 などのヒト腫瘍ウイルス抗原 (Bosch ら、1991)、インフルエンザウイルス抗原、例えばインフルエンザウイルス核タンパク質 (Matsui ら、1995; Fu ら、1997) または HIV 抗原、例えば HIV-1 抗原 p17、p24、RT および Env などのレトロウイルス抗原 (Harrer ら、1996; Haas ら、1996) である。好適な寄生体抗原の特定の例は、肝期 (liver stage) 抗原 (LSA-1) などのマラリア原虫 (*Plasmodium*) 抗原、サーカムスポロゾイト (circumsporozoite) タンパク質 (CS または対立変異体 cp26 若しくは cp29)、トロンボスボンジン (thrombospondin) 関連アモニマス (anonymous) タンパク質 (TRAP)、*Plasmodium falciparum* からのスボロゾイトトレオニンおよびアスパラギンに富むタンパク質 (STAR P) (Aidoo ら、1995) ならびに *Toxoplasma gondii* からの p30 などの *Toxoplasma* 抗原 (Khan ら、1991; Bulow and Boothroyd, 1991) である。好適な細菌抗原の特定の例は *Legionella pneumophila* からの主要分泌タンパク質 (Blander and Horwitz, 1991) などのレジオネラの抗原である。

30

40

50

50

## 【0021】

本発明に従う細胞は好ましくは本発明の核酸分子によってコードされる融合タンパク質を分泌することができ、そしてMHCクラスI拘束抗原認識に好適な形態でそれを提供することができる。

本発明の第3の態様においては、ファゴリソーム脱出ペプチドまたはポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含む、組換えMycobacterium bovis細胞が提供される。ファゴリソーム脱出ペプチドまたはポリペプチドが抗原と融合しなくても、免疫原特性の驚くべき改善が見られる。

## 【0022】

本発明にしたがって提供される組換えMycobacterium bovis細胞は、哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるペプチドまたはポリペプチドをコードする少なくとも1つのさらに別の組換え体、例えば異種核酸分子を含んでいてもよい。このさらに別の免疫原性ペプチドまたはポリペプチドはマイコバクテリウムの抗原から、またはさらに広い意味で、自己抗原、腫瘍抗原、病原体抗原、およびそれらの免疫原性フラグメントから選択することができる。このさらに別のペプチドまたはポリペプチドをコードする核酸分子は融合遺伝子と同じベクター上に位置させてもよい。しかし、例えば融合遺伝子とは無関係に、別のプラスミド上に位置させてもよく、または染色体として統合してもよい。

10

## 【0023】

驚くべきことに、本発明に従うマイコバクテリウムの細胞は感染した細胞、例えばマクロファージ中で細胞内持続性を有し、これは組換え核酸分子を含有しない、対応する天然のマイコバクテリウムの細胞の細胞内持続性に等しいかまたはこれより低いことがわかった。

20

## 【0024】

本発明のさらに別の主題は、上の定義の核酸分子によってコードされた組換え融合ポリペプチドである。本発明に従うこの融合ポリペプチドは細胞に改善されたMHCクラスI拘束抗原認識の能力を与える。

## 【0025】

本発明は活性成分として上の定義の細胞または融合ポリペプチドを、任意に薬学的に許容される希釈剤、担体およびアジュvantとともに含む医薬組成物にも関する。好ましくは、この組成物は哺乳類、好ましくはヒトに投与するのに好適な生ワクチンである。実際に選択されるワクチン接種経路はワクチン投与するベクターの選択に依存する。投与は一回の用量でまたは間隔をとって反復して実施してもよい。適切な投与量はワクチン用ベクター自体または投与経路などの各種のパラメーターに依存する。粘膜表面（例えば眼球、鼻腔内、経口、胃、腸、肛門、腔若しくは尿管）または非経口（例えば皮下、皮内、筋内、静脈内または腹腔内）投与を選択することができる。

30

## 【0026】

さらに、本発明は上記定義の組換え細菌細胞の調製方法に関する。第1の態様によれば、この方法は、(i) (a) 哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるマイコバクテリウム・ポリペプチド由来の少なくとも1つのドメイン、および(b) ファゴリソーム脱出ドメインを含む融合ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を細菌細胞中に挿入し、そして(ii) ステップ(i)によって取得した細胞を好適な条件下で培養する、ステップを含む。好ましくはこの核酸分子を発現することができる細胞を取得する。好ましくは、その細胞はM.b bovis細胞である。

40

## 【0027】

第2の態様によれば、この方法は、(i) (a) 哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるポリペプチド由来の少なくとも1つのドメイン、および(b) ファゴリソーム脱出ドメイン、を含む融合ポリペプチドをコードする組換え核酸分子をMycobacterium bovis細胞中に挿入し、そして(ii) (i)によって取得した細胞を好適な条件下で培養する、ステップを含む。

## 【0028】

50

第3の態様によれば、この方法は、(i) ファゴリソーム脱出ペプチドまたはポリペプチドをコードする組換え核酸分子を *Mycobacterium bovis* 細胞中に挿入し、そして(ii) (i)によって取得した細胞を好適な条件下で 培養する、ステップを含む。

【0029】

所望ならば、本発明の方法に、哺乳類中で免疫応答を誘発する能力があるペプチドまたはポリペプチドをコードする、少なくとも1つの別の組換え核酸分子をさらに挿入することを含ませる。

【0030】

最後に、本発明は、薬学的に有効な量の医薬として許容される希釈剤、担体および/またはアジュバント中の上記組換え細胞を製剤することを含む、生ワクチンの調製方法に関する。

10

【0031】

本発明を以下の図面および配列表によってさらに説明する。

配列番号1： 本発明に従う核酸分子のヌクレオチド配列を示す。

配列番号2： 配列番号1の核酸分子に対応するアミノ酸配列を示す。

【0032】

(実施例)

1. 実験操作

1.1 細菌株およびプラスミド

Dubos培地用アルブミン (Difco) を補充したDubosプロスペース (Difco) 中、37 で、*M. bovis* BCG株 Chicago (ATCC 27289) を培養した。中期対数期の培養物を分注し、使用時まで-70 で保存した。G.B.Mackanessから最初に入手した *L.monocytogenes* EGD Sv 1/2a (Domann and Chakraborty, 1989) を、脳心臓浸出物 (BHI) プロス (Difco) 中、37 でエアレーションしながら増殖させた。プラスミド pILH-1は Dr.I.Gentschew および Dr.W.Goebel (Wurzburg大学、ドイツ) の寛大な寄贈によった。マイコバクテリア-大腸菌シャトルベクター、pAT261 およびpMV306は MedImmune (Gaithersburg, U.S.A.) から入手した。

20

【0033】

1.2 酵素および一般的な遺伝子技法

制限酵素 (Boehringer Mannheim) およびT4 DNAリガーゼ (Pharmacia) を製造者の指示にしたがって使用した。分子クローニングおよび組換えDNA技法を標準プロトコル (Sambrookら、1989) にしたがって実施した。

30

【0034】

1.3 DNA操作およびシークエンシング

染色体外 pAT261 (親ベクター pAB261 ; Stoverら、1993) および組み込み用 (integrative) pMV306 (親ベクター pMV361 ; Stoverら、1991) 発現プラスミドをHly分泌のために使用した。プラスミド pAT261 および pMV306は発現カセット1個、選択マーカーとしてカナマycin耐性を与えるTn903由来の aph遺伝子、およびpUC19由来の大腸菌複製起源を含む、共通のエレメントを共有している。これらはマイコバクテリアプラスミドの複製起源 (pAT261) かまたはマイコバクテリオファージL5の attPおよび int遺伝子 (pMV306) の挿入について異なっている。プラスミド構築物 pAT261中に挿入された *M. bovis* BCG特異的Ag 85B遺伝子のDNA断片はBCG hsp60プロモーターの制御下にある。成熟Ag85Bタンパク質のためのコード配列の下流の Pst I制限部位 (位置4404、MedImmune) を使用して、*L.monocytogenes* EGDからの天然のHlyの溶血活性が維持され、N-末端 Ag85B特異的シグナルペプチドによって移送される、Hly由来の融合物を構築した。pAT261:Hly の構築のために、プラスミド pILH-1 (Gentschewら、1995 ; Hessら、1996) によってコードされた当初の遺伝子融合物 hly-hlyAの 1.7 kb Pst-I断片 (当初の位置 1357および4277 ; Hessら、1986) を使用した。コードされている Ag85B-Hly ハイブリッドタンパク質のためのプラスミド pAT261:Hly 中の hsp60プロモーターを含む完全 Xba I-Sal I DNA発現カセットをプラスミド pMV306中に導入した。この結果生成した構築物を pMV306:Hlyと命名した。以下のオ

40

50

リゴヌクレオチド、BCG-H1y5-GCTTTGTCCTGCTGおよびBCG-H1y3-GGAAGTCAGGGTGA (Sequise, Vaterstetten, Germany) を使用して、これらのプラスミドの断片挿入部位の正しいDNA配列を決定した。DNA配列分析から、hly-hlyA遺伝子融合物の3'末端に11 aaをコードする短い Pst I-DNA断片のランダム挿入がわかった。

## 【0035】

## 1.4 組換えM.bovis BCG株の特性決定

標準的なエレクトロポレーションプロトコル (Langermannら、1994) によって、プラスミド pAT261:H1y または pMV306:H1y を M.bovis BCG 株 Chicago 中に導入し、次にカナマイシン (15 µg/ml) を補充した Middlebrook 7H10アガー上で組換え体コロニーを選択した。10 0% Dubos培地用アルブミン (Difco) および15 µg/mlカナマイシンを含有する Dubos液体培地 (Difco) 中で3週間、カナマイシン耐性コロニーを中期対数期まで増殖させた。Tween 80を含むリン酸塩緩衝化生理食塩水 (PBS) 中で細胞を洗浄した後、RIPAバッファー (1% NP-40、0.5% デオキシコール酸、0.1% SDS、50 mM Tris、pH 8.0) 中で細胞懸濁液を20倍に濃縮して、細胞を溶解した。これらの培養物の細菌を含まない上清 (1 ml) を0.2 µm 膜フィルターでろ過した。この上清中のH1y融合タンパク質を、回転装置中、室温で30分、ブチルセファロース (Pharmacia) 100 µlとともにインキュベートすることによって、富化した (Schoelら、1994)。遠心分離 (3000 rpm) 後、ペレットを Laemmliバッファー (Laemmli, 1970) 中に溶解した。次に、前記 (Laemmli, 1970) にしたがい、10% SDS / ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、タンパク質を分離し、Hybond-PVDF膜 (Amersham Life Science) に移した。抗H1y mAbH14-3 (Natoら、1991) およびペルオキシダーゼと複合体化した2次抗体 (Boehringer Mannheim) によって免疫染色を実施した。製造者 [BM Western Blotting Kit(Mouse/Rabbit) (Boehringer Mannheim)] の記載にしたがって、洗浄操作およびケミルミネセンス免疫検出を実施した。X線フィルム (Kodak, XOMAT-AR) 上でのシグナルの現像を1分間実施した。 20

## 【0036】

0.1%ウシ血清アルブミンを含有するリン酸塩緩衝化生理食塩水 (PBS) でサンプルを連続希釈することによって、BCG pAT261:H1y、BCG pMV306:H1y、BCG および L.monocytogenes の上清および全細菌懸濁液の溶血活性を判定した。次に、希釈したサンプル (100 µl) をシスティン (最終濃度 20 mM) の添加によって活性化し、96ウェルプレート中、37 °C で45分間、ヒツジ赤血球 (PBS中  $6 \times 10^8$  細胞 / ml、pH6.0) 50 µlとともにインキュベートした。溶血活性は、完全溶血を検出することができた最高希釈率の逆数と定義される、完全CHUである (Gentschevら、1995)。 30

## 【0037】

## 1.5 マイコバクテリアの増殖のin vitro分析

それぞれヒトおよびマウスのマクロファージ様細胞である THP-1 (ATCC TIB-202) および J774A.1 (ATCC TIB-67) を24ウェルプレートに付着させた (1 ウェルについて  $10^6$ )。THP-1の場合、感染の48時間前に 10 nM PMA (Sigma) で刺激することによって、付着を成功させた。1細胞につき10マイコバクテリア (BCG、BCG pAT261:H1y または BCG pMV306:H1y) の感染多重度 (moi) で3時間、細胞に感染させた。感染直後に、Bacto Middlebrook OADC (Difco) および適切な 15 µg/mlカナマイシンで富化した7H10アガー上に、上清および細胞溶解物の連続希釈物をプレーティングすることによって、CFUを測定した。マクロファージによるマイコバクテリアの取り込みは同程度だった。感染したマクロファージの残ったサンプルをPBSで洗浄し、200 µg/mlゲンタマイシンの存在下でさらに14日間インキュベートした。感染後 (p.i.) 1、8 または15日目に、CFU分析によって、組換えBCG株の細胞内増殖を判定した。 40

## 【0038】

## 1.6 LDH放出

感染したJ774A.1マクロファージによるLDH放出を測定することによって、組換えBCG株および陽性対照としての L.Monocytogenes EGDの細胞傷害性を判定した。Promegaより入手した定量用キットを使用して、BCG、BCG pAT261:H1y、BCG pMV306:H1y または L.monocyto 50

genes EGDを感染させた J774A.1マクロファージの培養上清および細胞溶解物のLDH活性をアッセイした。J774A.1細胞(1ウェルについて $10^4$ )を96ウェルプレートに播種し、10mCiで感染させた。感染後1時間目に、サンプルにゲンタマイシン(最終濃度 200 μg/ml)を添加した。製造者の指示にしたがって、p.i. 3、4、5または24時間目にLDH活性を定量分析した。細胞傷害性のパーセンテージを以下のようにして算出した：細胞傷害性% = (感染J774A.1 - 自発的J774A.1) / (最大J774A.1 - 自発的J774A.1 × 100)。

#### 【0039】

##### 2. 結果

###### 2.1 マイコバクテリア-大腸菌シャトル発現ベクター pAT261:HlyおよびpMV306:Hlyの構築

[*L.monocytogenes* EGD Sv 1/2a(Domann and Chakraborty, 1989)のHlyによって仲介される]ファゴリソーム脱出機能をBCG Chicagoに転移させるため、2つの別の大腸菌-マイコバクテリアシャトルベクター、pAT261およびpMV306を使用した。pMV261の誘導体である第2世代ベクター pAT261 (Stoverら、1991)は1つのBCGゲノムについて約5プラスミドコピーの染色体外Hly発現を指令し、pMV361の誘導体である組み込み用(integrative)プラスミド pMV306はHlyの安定な染色体内発現を可能にする(図1) (Stoverら、1991)。

。

#### 【0040】

hly-hlyA(大腸菌 pHly152特異的溶血素A)オープンリーディングフレーム(ORF)をコードする pILH-1由来の 1.7 kb Pst I-DNA断片をプラスミド pAT261の Pst I部位に挿入した(Gentschевら、1995; Stoverら、1993)。これによって生成する遺伝子融合物は BCG特異的Ag85Bシグナルペプチド(Matsuoら、1990)によって上清に分泌するように指令されるタンパク質の発現をコードする。この構築物を pAT261:Hlyと命名し、次に hsp60マイコバクテリアプロモーターの転写制御下にあるそのXba I-Sal I DNA発現力セットを使用して、親pMV306ベクター中に挿入し、構築物 pMV306:Hlyを生成させた(図1)。BCG特異的Ag85Bシグナルペプチド(Matsuoら、1990)のためのコード配列を含む、両マイコバクテリア発現プラスミド中の hly特異的挿入部位のDNA配列を分析した。誘導された完全Hly融合タンパク質のアミノ酸配列を図2に示す。成熟Hly融合タンパク質は、融合体のN-末端に30アミノ酸(aa)、およびC-末端部分に52 aaの、元来大腸菌のHlyAに属するアミノ酸で構成される(Gentschевら、1995)。

#### 【0041】

続いて、各プラスミド構築物 pAT261:Hlyまたは pMV306:Hlyを BCG Chicago株中にエレクトロポレートし、それぞれプラスミドまたは染色体 Hly発現をする BCG pAT261:Hlyまたは BCG pMV306:Hlyを生成させた。

#### 【0042】

##### 2.2 BCG pAT261:HlyおよびBCG pMV306:Hly中のHly発現の分析

BCG pAT261:HlyまたはBCG pMV306:Hly株による Hly分泌を特性付けるため、Stoverら(1993)にしたがって、中期対数期の増殖培養物の適切な上清およびマイコバクテリア溶菌液を調製した。免疫染色のために利用可能な抗Hlyモノクローナル抗体(mAb)に観察される交差反応性を克服するために、Hly融合体を疎水性相互作用クロマトグラフィーによって富化した(Schoelら、1994; Natoら、1991)。両マイコバクテリア株、BCG pAT261:HlyおよびBCG pMV306:Hlyの溶菌液および上清において、Hly融合タンパク質が検出可能である(図3)。Hly由来のポリペプチドの推定サイズ、62 kDaは元来の *L.monocytogenes*の 58 kDa Hlyタンパク質よりもわずかに大きい。

#### 【0043】

BCG pAT261:HlyおよびBCG pMV306:Hlyによって分泌されるHly融合タンパク質の細孔形成能力を特性付けるため、全細菌懸濁液および上清の溶血活性を判定した。BCG pAT261:HlyおよびBCG pMV306:Hlyのサンプルはヒツジ赤血球に対して溶血活性を表し(表1)、これはマイコバクテリア種への細胞溶解性のHlyの機能の転移が成功したことを明白に証明するものである。

10

20

30

40

50

【0044】

【表1】

組換えBCG株およびL.monocytogenes EGDの上清および全細菌懸濁液の溶血活性

株	溶血活性 (CHU) <sup>a</sup>	
	上清	全細菌懸濁液 <sup>b</sup>
L.monocytogenes EGD	8	16
BCG pAT261:Hly	2	4
BCG pMV306:Hly	2	4
BCG	ND <sup>c</sup>	ND

a 溶血活性は完全溶血の最高希釈の逆数として定義される、完全単位(CHU)で与えられる。

b 細胞外および膜結合溶血活性。

c ND、検出されない。

【0045】

## 2.3 組換えBCG株のマクロファージ中の増殖

感染後(p.i.)1、8および15日目に、感染させたマクロファージのマイコバクテリアCFUによって、宿主細胞中のBCG pAT261:HlyまたはBCG pMV306:Hly微生物の生存をモニターした。マイコバクテリアの標的細胞として、ヒト単球細胞系THP-1(ATCC TIB-202)およびマウスマクロファージ様細胞系J774A.1(ATCC TIB-67)を使用した。ホルボールミリステートアセテート(PMA)で刺激したTHP-1細胞は天然のヒト単球由来のマクロファージに類似している(Tsuchiyaら、1982)。THP-1またはJ774A.1細胞の感染後3時間目に、マイコバクテリアの食作用の効力を判定した。続いて200μg/mlゲンタマイシンの存在下で長期間の培養を実施して、上清中の放出されたかまたは食作用を受けなかったマイコバクテリアを死滅させた。図4に示すように、各BCG株、BCG pAT261:HlyおよびBCG pMV306:Hlyはいずれの宿主細胞中でも増殖することができなかった。さらに、BCG pMV306:Hly細菌は親BCG株に比較して、THP-1およびJ774A.1宿主細胞中での細胞内持続性の減退を示した。THP-1マクロファージ中のBCG pMV306:Hly細菌の細胞内生存率はBCGまたはBCG pAT261:Hly感染サンプルの数値に関してp.i.1日目にすでに低下したことは注目に値する。

【0046】

対照的に、BCG pMV306:Hlyの細胞内持続性は、THP-1中でのBCGに匹敵した(図4)。興味深いことに、p.i.15日目に可視BCG pAT261:Hly細菌は感染したJ774A.1細胞中で検出されず、少なくともゲンタマイシン存在下でのこれらのマイコバクテリア構築物の完全増殖阻害が示唆された。

【0047】

BCG pAT261:HlyおよびBCG pMV306:Hly株の減退した細胞内持続性の本質を究明するため、短期培養におけるこれらの組換えBCG株のJ774A.1マクロファージに対する細胞傷害性を判定した。BCG; BCG pAT261:Hly; BCG pMV306:Hly; またはL.monocytogenes EGDで感染させた宿主細胞のp.i.3、4、5および24時間目の上清中のラクテートデヒドロゲナーゼ(LDH)活性を測定することによって、細胞傷害性を分析した。p.i.24時間目、上清中に放出されたLDHの量は、親BCG、BCG pAT261:Hly若しくはBCG pMV306:Hlyで感染させ

10

20

30

40

50

るかまたは感染させない宿主細胞間で有意な差異はなかった(図4)。対照的に、増殖が早い溶血性 *L.monocytogenes* EGD株はp.i.24時間以内に上清中に顕著なLDH放出を引き起こした。これらのデータは、組換えBCG株による溶血性H1yの分泌は親BCG株の細胞傷害性を変性させなかつことを示唆している。むしろ、BCG pAT261:H1yおよびBCG pMV306:H1y株の両者ともに非組換えBCG保有体に比較して、マウスマクロファージ中で減退した持続性を示した。

## 【0048】

(引用文献)

Aidoo,M.,Lalvani,A.,Allsopp,C.E.M.ら(1995)、マラリアに対する細胞傷害性Tリンパ球を誘導するワクチンのための保存された抗原性成分の同定、The Lancet 345:1003。 10

## 【0049】

Andersen,P.(1994)、分泌されたマイコバクテリアタンパク質の可溶性混合物による、*Mycobacterium tuberculosis*感染に対するマウスの有効なワクチン接種、Infect.Immun.62:2536-2544。

## 【0050】

Andersen,P.,Andersen,A.B.,Sorensen,A.L.and Nagai,S.(1995)、マウスにおける *Mycobacterium tuberculosis*感染に対する長期存続免疫のリコール(recall)、J.Immunol.154:3359。

## 【0051】

Berche,P.,Gaillard,J.L.,and Sansonetti,P.J.(1987)、T細胞性免疫のin vivo誘発のための必須要件としての *L.monocytogenes*の細胞内増殖、J.Immunol.138:2266-2276。 20

## 【0052】

Bielecki,J.Youngman,P.,Connelly,P.,and Portnoy,D.A.(1990)、*Listeria monocytogenes*からの溶血素遺伝子を発現する *Bacillus subtilis*は哺乳類細胞中で増殖することができる、Nature 354:175-176。

## 【0053】

Blander,S.J.and Horwitz,M.A.(1991)、レジオネラの主要分泌タンパク質によるワクチン接種は、*Legionella pneumophila*の別種のセログループ(serogroup)および別種のレジオネラ間にまたがる体液性および細胞性免疫応答ならびに防御免疫を誘発する、J.Immunol.147:285。 30

## 【0054】

Bosch,F.X.,Durst,M.,Schwarz,E.,Boukamp,P.,Fusenig,N.E.and zur Hausen,H.(1991)、腫瘍抑制のターゲットとしての癌関連ヒト乳頭腫ウイルスの初期遺伝子E6およびE7?、Behring Inst.Mitt.108。

## 【0055】

Bulow,R.and Boothroyd,J.C.(1991)、リポソーム中のp30抗原での免疫化による致死性 *Toxoplasma gondii*感染からのマウスの防御、J.Immunol.147:3496。

## 【0056】

Clemens,D.L.,と Horwitz,M.A.(1996)、*Mycobacterium tuberculosis*ファゴソームは初期エンドソームと相互作用し、外部から投与したトランスフェリンに接近することができる、J.Exp.Med.184:1349-1355。 40

## 【0057】

Darji,A.,Chakraborty,T.,Weiland,J.,and Weiss,S.(1996)、リステリオリシンは主要組織適合性遺伝子複合体クラスIによる外来抗原の提示のための経路を作成する、Eur.J.Immunol.25:2967-2971。

## 【0058】

Domann,E.,and Chakraborty,T.(1989)、*Listeria monocytogenes*セロタイプ1/2a株からのリステリオリシン遺伝子のヌクレオチド配列、Nucleic Acids Res.17:6406。

## 【0059】

Flesch,I.,Hess,J.H.,Oswald,I.P.,and Kaufmann,S.H.E.(1994)、IFN- $\gamma$ で刺激されたマ 50

クロファージによる *Mycobacterium bovis* の増殖阻害：内在性腫瘍壞死因子 および IL-10 による調節、 *Int. Immunol.* 6:693-700。

【 0 0 6 0 】

Flynn, J.L., Goldstein, M.M., Triebold, K.J., Koller, B., and Bloom, B.R. (1992)、 *Mycobacterium tuberculosis* 感染に対する耐性のためには、主要組織適合性遺伝子複合体クラス I 拘束 T 細胞が必要とされる、 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:12013-12017。

【 0 0 6 1 】

Fu, T.M., Friedman, A., Ulmer, J.B., Liu, M.A. and Donnelly, J.J. (1997)、 防御性細胞免疫：細胞傷害性 T リンパ球はインフルエンザウイルス核タンパク質の優性および劣性エピトープを誘発する DNA での免疫に対して応答する、 *J. Virol.* 71:2715。

10

【 0 0 6 2 】

Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., and Sansonetti, P.J. (1987)、ヒトエンテロサイト(enterocyte)様細胞系 Caco-2 中の *Listeria monocytogenes* の侵入および細胞内増殖の *in vitro* モデル、 *Infect. Immun.* 55:2822-2829。

【 0 0 6 3 】

Gentsch, I., Sokolovic, Z., Mollenkopf, H.-J., Hess, J., Kaufmann, S.H.E., Kuhn, M., Krohne, G.F., and Goebel, W. (1995)、サルモネラが分泌する活性なリストリオリシンはその細胞内局在位置を変更する、 *Infect. Immun.* 63:4202-4205。

【 0 0 6 4 】

Grange, J.M. (1996)、マイコバクテリアおよびヒト疾病における薬剤耐性の疫学的様相、 *Arnold, London*, pp. 124-125。

20

【 0 0 6 5 】

Haas, G., Plikat, U., Debre, P., Lucchiari, M., Katlama, C., Dudoit, Y., Bonduelle, O., Bauer, M., Ihlenfeldt, H.G., Jung, G., Maier, B., Meyerhans, A. and Autran, B. (1996)、HIV-1 Nef および特異的細胞毒性 T リンパ球中のウイルス変異体の *in vivo* 動態、 *J. Immunol.* 157:4212。

【 0 0 6 6 】

Harboe, M., Oettinger, T., Wiker, H.G. ら (1996)、 *Mycobacterium tuberculosis* および毒性 *Mycobacterium bovis* 中の ESAT-6 タンパク質の出現、ならびに *Mycobacterium bovis* BCG 中のその不在の証拠、 *Infect. Immun.* 64:16。

30

【 0 0 6 7 】

Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S.A., Barbosa, P., Trocha, A., Johnson, R.P., Elbeik, T., Feinberg, M.B., Buchbinder, S.P. and Walker, B.D. (1996)、無症候性長期非進行性 HIV-1 感染症中の細胞毒性 T リンパ球。長期感染および低ウイルス負荷患者における応答の範囲および特異性ならびに *in vivo* ウイルス準種との関連、 *J. Immunol.* 156:2616。

【 0 0 6 8 】

Harth, G., Lee, B.-Y., Wang, J., Clemens, D.L., and Horwitz, M.A. (1996)、 *Mycobacterium tuberculosis* の 30 キロダルトンの主要細胞外タンパク質の遺伝学、生化学および免疫細胞化学に対する新規な洞察、 *Infect. Immun.* 64:3038-3047。

40

【 0 0 6 9 】

Hess, J., Wels, W., Vogel, M., and Goebel, W. (1986)、プラスミドにコードされた溶血素決定基のヌクレオチド配列および対応する染色体溶血素配列との比較、 *FEMS Lett.* 34:1-11。

【 0 0 7 0 】

Hess, J. and Kaufmann, S.H.E. (1993)、細胞内微生物に対するワクチン接種戦略、 *FEMS Microbiol. Immunol.* 7:95-103。

【 0 0 7 1 】

Hess, J., Gentsch, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W. and Kaufmann, S.H.E. (1996)、組換えサルモネラワクチンが誘発するリストリア症に対する防御における、体性 p60 またはリストリオリシン抗原表示に対する分泌の優れた効力、 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1458-1463。

50

## 【 0 0 7 2 】

Hess,J. and Kaufmann,S.H.E.(1997)、細胞内病原体に対する宿主応答における、細胞内病原体に対するワクチン接種戦略の基礎となる細胞性免疫の原理、S.H.E.Kaufmann(ed),R.G.Landes Co.,Austin,pp.75-90。

## 【 0 0 7 3 】

Horwitz,M.A.,Lee,B.-W.E.,Dillon,B.J.,and Harth,G.(1995)、*Mycobacterium tuberculosis*の主要細胞外タンパク質でのワクチン接種によって誘発される、結核に対する防御免疫、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:1530-1534。

## 【 0 0 7 4 】

Houbiers,J.G.A.,Nijman,H.W.,van der Burg,S.H.,Drijfhout,J.W.,Kenemans,P.,van de Velde,C.J.H.,Brand,A.,Momburg,F.,Kast,W.M.and Melief,C.J.M.(1993)、変異型および野生型 p53のペプチドに対するヒト細胞傷害性Tリンパ球応答の *in vitro*誘発、*Eur.J.Immunol.* 23:2072。

10

## 【 0 0 7 5 】

Huygen,K.,Content,J.,Denis,O.,Montgomery,D.L.,Yawman,A.M.,Deck,R.R.,DeWitt,C.M.,Orme,I.M.,Baldwin,S.,D'Souza,C.,Drowart,A.,Lozes,E.,Vandenbussche,P.,Van Vooren,J.-P.,Liu,M.A.,and Ulmer,J.B.(1996)、結核DNAワクチンの免疫原性および防御効力、*Nat.Med.* 2:893-898。

## 【 0 0 7 6 】

Kaufmann,S.H.E.(1993)、細胞内細菌に対する免疫、*Annu.Rev.Immunol.* 11:129-163。

20

## 【 0 0 7 7 】

Khan,I.A.,Ely,K.H.and Kasper,L.H.(1991)、精製された寄生体抗原(p30)がマウスにおける致死性 *Toxoplasma gondii* 感染に対する CD8 T 細胞免疫を仲介する、*J.Immunol.* 147:3501。

## 【 0 0 7 8 】

King,C.H.,Mundayoor,S.,Crawford,J.T.and Schinnik,T.M.(1993)、*Mycobacterium tuberculosis*による接触依存性細胞傷害活性の発現およびその活性をコードするゲノム遺伝子座の単離、*Infect.Immun.* 61:2708-2712。

## 【 0 0 7 9 】

Kochi,A.(1991)、世界の結核の現況および世界保健機構の新しい制御戦略、*Tubercle* 72:1-6。

30

## 【 0 0 8 0 】

Ladel,C.H.,Daugelat,S.,and Kaufmann,S.H.E.(1995)、主要組織適合性遺伝子複合体クラス I-および II-欠失ノックアウトマウスにおける *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin 感染に対する免疫応答：獲得される耐性に対する CD4 および CD8 T 細胞の寄与、*Eur.J.Immunol.* 25:377-384。

## 【 0 0 8 1 】

Laemmli,U.K.(1970)、バクテリオファージ T4 の頭部の組み立て中の構造タンパク質の開裂、*Nature* 227:680-685。

## 【 0 0 8 2 】

40

Langermann,S.,Palaszynski,S.R.,Burlein,J.E.,Koenig,S.,Hanson,M.S.,Briles,D.E.,and Stover,C.K.(1994)、肺炎球菌表面タンパク質 A を発現する組換え Bacille Calmette Guerin ワクチンによって誘発されるマウスの肺炎球菌感染に対する防御性体液応答、*J.Exp.Med.* 180:2277-2286。

## 【 0 0 8 3 】

Matsui,M.,Moots,R.J.,Warburton,R.J.,Peace-Brewer,A.,Tussey,L.G.,Quinn,D.G.,McMichael,A.J.and J.A.Frelinger(1995)、インフルエンザ A マトリックスペプチドに特異的な CTL 認識の細胞内ペプチド間の差異に関する遺伝子的証拠、*J.Immunol.* 154:1088。

## 【 0 0 8 4 】

Matsuo,K.,Yamaguchi,R.,Yamazaki,A.,Tasaka,H.,Terasaka,K.,and Yamada,T.(1990)、細

50

胞外アルファ抗原のための *Mycobacterium bovis* BCG遺伝子のクローニングおよび発現、  
*J.Bacteriol.* 170:3847-3854。

## 【 0 0 8 5 】

Mazzaccaro, R.Z., Gedde, M., Jensen, E.R., Van Santen, H.M., Ploegh, H.L., Rock, K.L., and Bloom, B.R. (1996)、*Mycobacterium tuberculosis*感染によって助長される可溶性抗原の主要組織適合性クラス I の提示、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:11786-11791。

## 【 0 0 8 6 】

McDonough, K.A., Kress, Y., and Bloom, B.R. (1993)、結核の病因論：*Mycobacterium tuberculosis*とマクロファージの相互作用、*Infect. Immun.* 61:2763-2773。

## 【 0 0 8 7 】

Murray, P.J., Aldovini, A., and Young, R.A. (1996)、サイトカインを分泌する組換え *Bacille Calmette-Guérin* 株を使用する抗マイコバクテリア免疫の操作および有力化、*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:934-939。

## 【 0 0 8 8 】

Nato, F., Reich, K., Lhopital, S., Rouye, S., Geoffroy, C., Mazie, J.C., and Cossart, P. (1991)、リステリオリシン O に対する無力化および非無力化モノクローナル抗体の製造および特性決定、*Infect. Immun.* 59:4641-4646。

## 【 0 0 8 9 】

Portnoy, D.A., Jacks, P.S., and Hinrichs, D.J. (1988)、*Listeria monocytogenes* の細胞内増殖のための溶血素の役割、*J.Exp.Med.* 167:1459-1471。

10

## 【 0 0 9 0 】

Roche, P.W., Triccas, J.A., and Winter, N. (1995)、結核に対する BCG 接種：過去の失望および将来の希望、*Trends Microbiol.* 3:397-401。

## 【 0 0 9 1 】

Russell, D.G. (1995)、*Mycobacterium* および *Leishmania*：エンドソームネットワーク内の隠れ場所、*Trends in Cell Biology* 5:125-128。

## 【 0 0 9 2 】

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989)、*Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York。

20

## 【 0 0 9 3 】

Schoel, B., Welzel, M., and Kaufmann, S.H.E. (1994)、細胞溶解性細菌毒素の精製のための疎水性相互作用クロマトグラフィー、*J.Chromatography A* 667:131-139。

## 【 0 0 9 4 】

Sorensen, A.L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P. and Andersen, A.B. (1995)、*Mycobacterium tuberculosis* によって分泌される低分子量 T 細胞抗原の精製および特性決定、*Infect. Immun.* 63:1710。

## 【 0 0 9 5 】

Stover, C.K., Bansal, G.P., Hanson, M.S., Burlein, J.E., Palaszynski, S.R., Young, J.F., Koenig, S., Young, D.B., Sadziene, A., Barbour, A.G. (1993)、組換え *Bacille Calmette Guérin* (BCG) が発現する外表面タンパク質 A (OspA) リポタンパク質によって誘発される防御免疫：ライム (Lyme) 病ワクチンの候補、*J.Exp.Med.* 178:197-209。

30

## 【 0 0 9 6 】

Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Snapper, S.B., Barletta, R.G., Jacobs, W.R., Jr., and Bloom, B.R. (1991)、組換えワクチンのための BCG の新規な利用、*Nature* 351:456-460。

## 【 0 0 9 7 】

Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakrasborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J. and Russell, D.G. (1994)、小胞状プロトン ATP アーゼの排除によって產生される *Mycobacterium* ファゴソームの酸化作用の欠如、*Sci*

40

50

nce 263:678-681。

【0098】

Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J.(1979)、ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロースシートへのタンパク質の電気泳動転移：操作法および適用例、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:4350-4354。

【0099】

Tsuchiya,S., Kobayashi,Y., Goto,Y., Okumura,H., Nakae,S., Konno,T., and Tada,K.(1982)、ホルボールジエステルによる培養ヒト単球性白血病細胞の成熟の誘導、Cancer Res.42:1530-1536。

【0100】

Tweten,R.K.(1995)、グラム陽性細菌の細孔形成性毒素、細菌性病原体の毒性機構、J.A.Rothら(ed), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp.207-228。

【0101】

van Elsas,A., van der Burg,S.H., Van der Minne,C.E., Borghi,M., Mourer,J.S., Melief,C.J.M. and Schrier,P.I.(1996)、ペプチドパルス(pulse)した樹状細胞は健康なドナーから、Melan-A/MART-1自己抗原からの安定な HLA-A'0201-結合性ペプチドに対する腫瘍撲滅性(tumoricidal)細胞傷害性Tリンパ球を誘発する、Eur.J.Immunol.26:1683。

【図面の簡単な説明】

【図1】組換えBCG株によるHly分泌のためのプラスミドマップを示す。

A. 大腸菌-マイコバクテリアシャトルプラスミド pAT261:Hlyによる染色体外Hly発現。  
成熟Hlyタンパク質のDNA配列をコードするpILH-1由来の1.7 kb Pst I 断片の挿入。省略語：Mrep、マイコバクテリアレプリコン；Erep、大腸菌複製起源；kan、カナマイシン耐性遺伝子；hsp、熱ショックタンパク質プロモーター。 B. マイコバクテリアによるHly発現のための染色体組み込み用シャトルベクター pMV306:Hly。挿入されるhsp60プロモーターを含むDNA制限断片(Xba I-Sal I)はプラスミド pAT261:Hly由来である。省略語：attP、マイコバクテリオファージL5の付着部位；MCS、多重クローニング部位；int、マイコバクテリオファージL5のインテグラー。

【図2】BCG pAT261:HlyまたはBCG pMV306:Hlyによって発現されるHly融合体のアミノ酸配列を示す。hly遺伝子特異的オープンリーディングフレームに対応するアミノ酸配列はマイコバクテリア発現プラスミド pAT261:Hlyまたは pMV306:HlyのDNA配列由来である。Hly融合タンパク質は以下の異なるポリペプチド配列で構成される：シグナルペプチドを含むBCG特異的 Ag85B、下線を付けた1文字コードのアミノ酸配列(以前は抗原と称された；Matsuoら、1988)；大腸菌 pHly152特異的HlyA、イタリック文字、(Hessら、1986)；成熟Hly、太字、(Domann and Chakraborty, 1989)；ランダムアミノ酸配列、通常文字。対応する遺伝子融合体について使用する制限部位(Pst IおよびNsi I)をそのアミノ酸配列の下に示す。

【図3】組換えBCGによるHly発現の分析を示す。BCG、BCG pAT261:HlyまたはBCG pMV306:Hly株の溶菌液(L)または上清(S)中のHly融合タンパク質の免疫染色による検出。各種マイコバクテリア株の培養物溶菌液および富化した上清を SDS/10 %ポリアクリルアミドゲル上で分離し、Hybond-PVDF膜に移した。62 kDa Hlyハイブリッドタンパク質のケミルミネンス免疫染色のために使用した一次抗体は抗Hly mAb H14-3 (Natoら、1991)である。

【図4】組換えBCG株の細胞内増殖および細胞傷害性を示す。

A. ヒトマクロファージ様細胞 THP-1中の野生型BCG( )、BCG pAT261:Hly( )およびBCG pMV306:Hly( )株の生存。

B. マウス J774A.1マクロファージ様細胞中の野生型BCG( )、BCG pAT261:Hly( )およびBCG pMV306:Hly( )株の生存。感染3時間後に感染細胞溶解液からrBCG特異的CFUを判定し、0日から15日目までモニターした。データを平均±SD (n=3)で示す。

C. BCGまたはrBCG感染後のLDH活性について、J774A.1の上清および細胞溶解液をアッセイした。J774A.1( )、BCG( )、BCG pMV306:Hly( )、BCG pAT261:Hly( )また

10

20

30

40

50

は *L.monocytogenes* EGD ( )。上清中で検出した総LDH活性の累積パーセンテージで示す(平均±SD)。これは3つの実験の代表例である。上清中に放出されたLDHのパーセンテージを測定して細胞死の尺度とした。

【配列表】

配列番号1:

(i)配列の特色:

(A)配列の長さ: 1881塩基対

(B)配列の型: 核酸

(C)鎖の数: 両形態

(D)トポロジー: 直鎖状

10

(ix)配列の特徴:

(A)特徴を表す記号: C D S

(B)存在位置: 1..1 8 7 8

(xi)配列:

ATG ACA GAC GTG AGC CGA AAG ATT CGA GCT TGG GGA CGC CGA TTG ATG  
Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met  
1 5 10 15

48

ATC GGC ACG GCA GCG GCT GTA GTC CTT CCG GGC CTG GTG GGG CTT GCC  
Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala  
20 25 30

96

GGC GGA GCG GCA ACC GCG GGC GCG TTC TCC CGG CCG GGG CTG CCG GTC  
Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val  
35 40 45

144

20

GAG TAC CTG CAG TCT GCA AAG CAA TCC GCT GCA AAT AAA TTG CAC TCA  
Glu Tyr Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ser Ala Ala Asn Lys Leu His Ser  
50 55 60

192

GCA GGA CAA AGC ACG AAA GAT GCA TCT GCA TTC AAT AAA GAA AAT TCA  
Ala Gly Gln Ser Thr Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn Ser  
65 70 75 80

240

ATT TCA TCC ATG GCA CCA CCA GCA TCT CCG CCT GCA AGT CCT AAG ACG  
Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Pro Lys Thr  
85 90 95

288

30

CCA ATC GAA AAG AAA CAC GCG GAT GAA ATC GAT AAG TAT ATA CAA GGA Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly 100 105 110	336
TTG GAT TAC AAT AAA AAC AAT GTA TTA GTA TAC CAC GGA GAT GCA GTG Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val 115 120 125	384
ACA AAT GTG CCG CCA AGA AAA GGT TAC AAA GAT GGA AAT GAA TAT ATT Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile 130 135 140	432
GTT GTG GAG AAA AAG AAG AAA TCC ATC AAT CAA AAT AAT GCA GAC ATT Val Val Glu Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile 145 150 155 160	480
CAA GTT GTG AAT GCA ATT TCG AGC CTA ACC TAT CCA GGT GCT CTC GTA Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val 165 170 175	528
AAA GCG AAT TCG GAA TTA GTA GAA AAT CAA CCA GAT GTT CTC CCT GTA Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val 180 185 190	576
AAA CGT GAT TCA TTA ACA CTC AGC ATT GAT TTG CCA GGT ATG ACT AAT Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn 195 200 205	624
CAA GAC AAT AAA ATC GTT GTA AAA AAT GCC ACT AAA TCA AAC GTT AAC Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn Val Asn 210 215 220	672
AAC GCA GTA AAT ACA TTA GTG GAA AGA TGG AAT GAA AAA TAT GCT CAA Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln 225 230 235 240	720
GCT TAT CCA AAT GTA AGT GCA AAA ATT GAT TAT GAT GAC GAA ATG GCT Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala 245 250 255	768
TAC AGT GAA TCA CAA TTA ATT GCG AAA TTT GGT ACA GCA TTT AAA GCT Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala 260 265 270	816
GTA AAT AAT AGC TTG AAT GTA AAC TTC GGC GCA ATC AGT GAA GGG AAA Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys 275 280 285	864
ATG CAA GAA GAA GTC ATT AGT TTT AAA CAA ATT TAC TAT AAC GTG AAT Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Asn Val Asn 290 295 300	912
GTT AAT GAA CCT ACA AGA CCT TCC AGA TTT TTC GGC AAA GCT GTT ACT Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys Ala Val Thr 305 310 315 320	960
AAA GAG CAG TTG CAA GCG CTT GGA GTG AAT GCA GAA AAT CCT CCT GCA Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro Pro Ala 325 330 335	1008
TAT ATC TCA AGT GTG GCG TAT GGC CGT CAA GTT TAT TTG AAA TTA TCA Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser 340 345 350	1056
ACT AAT TCC CAT AGT ACT AAA GTA AAA GCT GCT TTT GAT GCT GCC GTA Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val 355 360 365	1104
AGC GGA AAA TCT GTC TCA GGT GAT GTA GAA CTA ACA AAT ATC ATC AAA Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn Ile Ile Lys 370 375 380	1152

AAT TCT TCC TTC AAA GCC GTA ATT TAC GGA GGT TCC GCA AAA GAT GAA Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu 385 390 395 400	1200
GTT CAA ATC ATC GAC GGC AAC CTC GGA GAC TTA CGC GAT ATT TTG AAA Val Gin Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys 405 410 415	1248
AAA GGC GCT ACT TTT AAT CGA GAA ACA CCA GGA GTT CCC ATT GCT TAT Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr 420 425 430	1296
ACA ACA AAC TTC CTA AAA GAC AAT GAA TTA GCT GTT ATT AAA AAC AAC Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn 435 440 445	1344
TCA GAA TAT ATT GAA ACA ACT TCA AAA GCT TAT ACA GAT GGA AAA ATT Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile 450 455 460	1392
AAC ATC GAT CAC TCT GGA GGA TAC GTT GCT CAA TTC AAC ATT TCT TGG Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp 465 470 475 480	1440
GAT GAA GTA AAT TAT GAT CCT GAA GGT AAC GAA ATT GTT CAA CAT AAA Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys 485 490 495	1488
AAC TGG AGC GAA AAC AAT AAA AGC AAG CTA GCT CAT TTC ACA TCG TCC Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser 500 505 510	1536
ATC TAT TTG CCA GGT AAC GCG AGA AAT ATT AAT GTT TAC GCT AAA GAA Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu 515 520 525	1584
TGC ACT GGT TTA GCT TGG GAA TGG TGG AGA ACG GTA ATT GAT GAC CGG Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg 530 535 540	1632
AAC TTA CCA CTT GTG AAA AAT AGA AAT ATC TCC ATC TGG GGC ACC ACG Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr 545 550 555 560	1680
CTT TAT CCG AAA TAT AGT AAT AAA GTA GAT AAT CCA ATC GAA TAT GCA Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala 565 570 575	1728
TTA GCC TAT GGA AGT CAG GGT GAT CTT AAT CCA TTA ATT AAT GAA ATC Leu Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile 580 585 590	1776
AGC AAA ATC ATT TCA GCT GCA GTT CTT TCC TCT TTA ACA TCG AAG CTA Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu Thr Ser Lys Leu 595 600 605	1824
CCT GCA GAG TTC GTT AGG CGC GGA TCC GGA ATT CGA AGC TTA TCG ATG Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met 610 615 620	1872
TCG ACG TAG Ser Thr 625	1881
40	

(2)配列番号2:

(i)配列の特色:

- (A)配列の長さ: 626 アミノ酸
- (B)配列の型: アミノ酸
- (D)トポロジー: 直鎖状
- (ii)配列の種類: タンパク質
- (xi)配列:

Met Thr Asp Val Ser Arg Lys Ile Arg Ala Trp Gly Arg Arg Leu Met  
 1 5 10 15

Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu Val Gly Leu Ala  
 20 25 30

Gly Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val  
 35 40 45

Glu Tyr Leu Gln Ser Ala Lys Gln Ser Ala Ala Asn Lys Leu His Ser  
 50 55 60

Ala Gly Gln Ser Thr Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys Glu Asn Ser  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Pro Lys Thr  
 85 90 95

Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr Ile Gln Gly  
 100 105 110

Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly Asp Ala Val  
 115 120 125

Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn Glu Tyr Ile  
 130 135 140

Val Val Glu Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn Ala Asp Ile  
 145 150 155 160

Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly Ala Leu Val  
 165 170 175

Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val Leu Pro Val  
 180 185 190

Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly Met Thr Asn  
 195 200 205

Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser Asn Val Asn  
 210 215 220

Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys Tyr Ala Gln  
 225 230 235 240

Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp Glu Met Ala  
 245 250 255

Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala Phe Lys Ala  
 260 265 270

Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser Glu Gly Lys  
 275 280 285

Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr Asn Val Asn  
 290 295 300

Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys Ala Val Thr  
 305 310 315 320

Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn Pro Pro Ala  
 325 330 335  
 Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu Lys Leu Ser  
 340 345 350  
 Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp Ala Ala Val  
 355 360 365  
 Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn Ile Ile Lys  
 370 375 380  
 Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala Lys Asp Glu  
 385 390 395 400  
 Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp Ile Leu Lys  
 405 410 415  
 Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro Ile Ala Tyr  
 420 425 430  
 Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile Lys Asn Asn  
 435 440 445  
 Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Lys Ile  
 450 455 460  
 Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn Ile Ser Trp  
 465 470 475 480  
 Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val Gln His Lys  
 485 490 495  
 Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe Thr Ser Ser  
 500 505 510  
 Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr Ala Lys Glu  
 515 520 525  
 Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile Asp Asp Arg  
 530 535 540  
 Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr  
 545 550 555 560  
 Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile Glu Tyr Ala  
 565 570 575  
 Leu Ala Tyr Gly Ser Gln Gly Asp Leu Asn Pro Leu Ile Asn Glu Ile  
 580 585 590  
 Ser Lys Ile Ile Ser Ala Ala Val Leu Ser Ser Leu Thr Ser Lys Leu  
 595 600 605  
 Pro Ala Glu Phe Val Arg Arg Gly Ser Gly Ile Arg Ser Leu Ser Met  
 610 615 620  
 Ser Thr  
 625

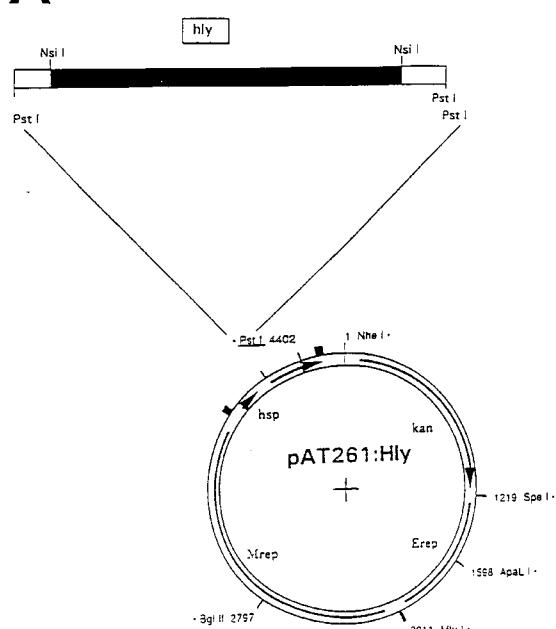
10

20

30

【図1】

A



B

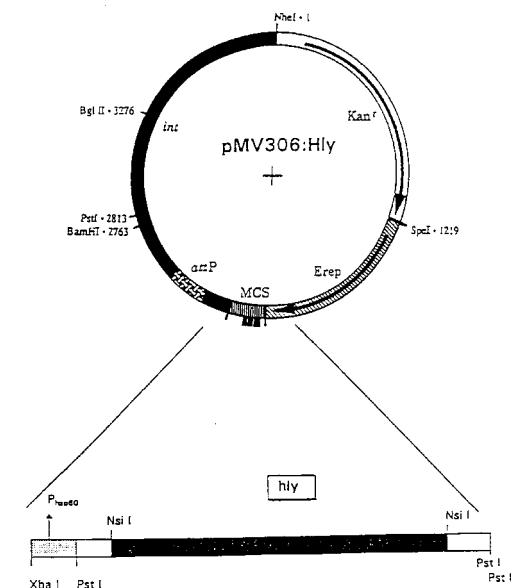


FIG.1

FIG.1

【図2】

FIG.2

Ag85B シグナルペプチド 成熟 Ag85B 配列

1 MTDVSRKIRA WGRRLMIGTA AAVVLPGLVG LAGGAATAGA FSRPGLPVEY

HlyA ペプチド ドリンカー 成熟 Hly 配列

51 LOS4KQSLAN KHSAGQSTK DASAFNKEN S ISSMAPPASP PASPKTPIEK  
(Pst I) (Nsi I)

101 KHADEIDKYI QGLDYNKNV L VYHGDAVTN VPPRKGYKDG NEYTVVKEKKK

151 KSENQNNADI QVVNAISSLT YPGALVKANS ELVENQPDVL PVKRDSDLTLS

201 IDLPGMTNQD NKIVV KNATK SNVNNNAVNTL VERWNEKYAQ AYPNV SAKID

251 YDDEMAYSES QLIAKFGTAF KAVNNSLNVN FGAIS EGKMQ EEVISFKQIY

301 YNVNVNNEPTR PSRFFGKAVT KEQLQALGVN AENPPAYISS VAYGRQVYLK

351 LSTNSHSTKV KAAFDAAVSG KSVSG DVELT NIIKNSSFKA VTYGGSAKDE

401 VQIIDGNLGD LRDILKKGAT FNRETPGVPI AYTTN FLKDN ELAVIKNNSE

451 YIETTSKAYT DGKIN IDHSG GYVAQFNISW DEVNYDPEGN EIVQHKNWSE

501 NNKSKLAHFT SSIYLPGNAR NINVYAKECT GLAWE WWRTV DDDRNLPLVK

HlyA ペプチド ドリンカー

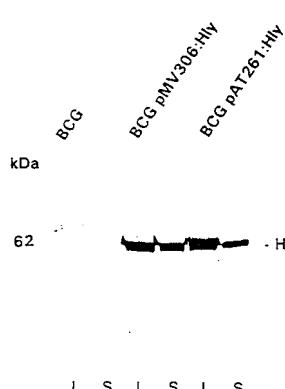
551 NRNISIWGTT LYPKYSNKVD NPDE YALIYG SQGDLNPLIN EISKI ISLIV  
(Nsi I) (Pst I)

ランダムペプチド配列

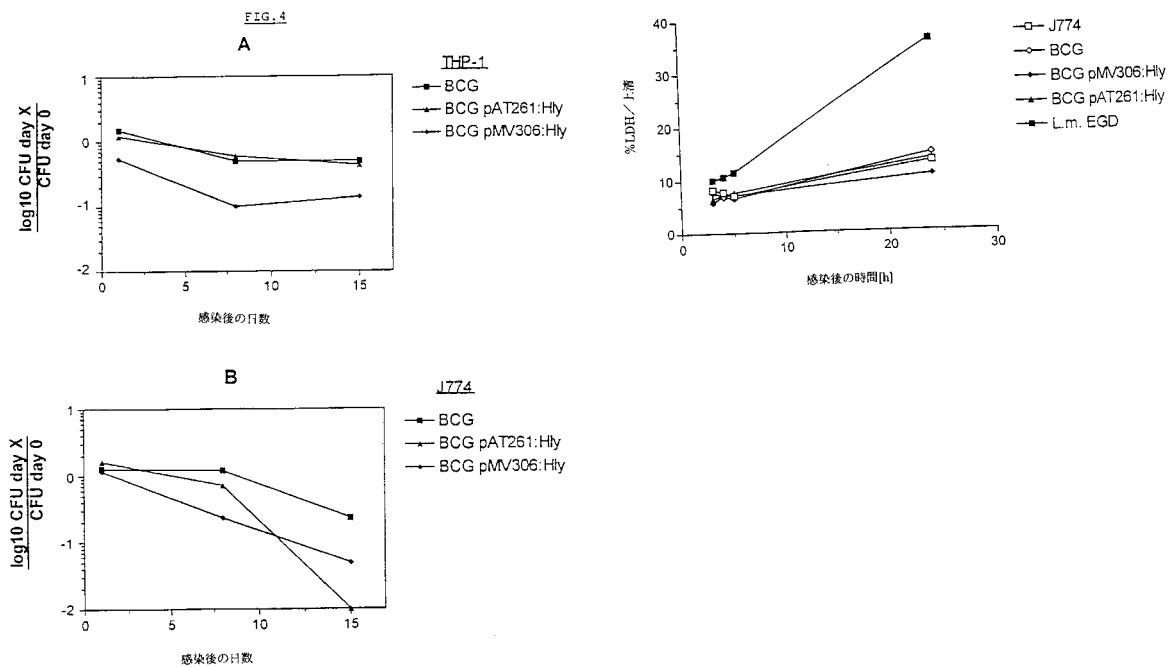
601 LSSLTSLPA EFVRRGSGIR SLSMST  
(Pst I)

【図3】

FIG.3



【図4】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02
A 6 1 K 39/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/04
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04

(72)発明者 ヘス,ヨルゲン  
ドイツ連邦共和国 ディー 10318 ベルリン,ライプニッツシュトラーセ 31

審査官 三原 健治

(56)参考文献 Host Response to Intracellular Pathogens, edited by Stefan H.E.Kaufmann(1997,Jan.)p.75-94  
Biologicals, Vol.25(1997,Jun.)p.169-173  
PNAS, Vol.93(1996)p.11786-11791  
PNAS, Vol.93(1996)p.1458-1463  
HESS J. AND KAUFMANN S.H.E., VACCINATION STRATEGIES AGAINST INTRACELLULAR MICROBES, FE  
MS MICROBIOL. IMMUNOL., 1993年, V7N2, P95-103  
Infect. Immun., Vol.64, No.8(1996)p.3038-3047

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus/EMBASE(STN)  
JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamII)