

(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2009-528545
(P2009-528545A)

(43) 公表日 平成21年8月6日(2009.8.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/32 (2006.01)	C 1 2 Q 1/32	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 C O 5 6
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-557501 (P2008-557501)
 (86) (22) 出願日 平成19年3月1日(2007.3.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月29日(2008.10.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/063099
 (87) 国際公開番号 W02007/101274
 (87) 国際公開日 平成19年9月7日(2007.9.7)
 (31) 優先権主張番号 60/778, 307
 (32) 優先日 平成18年3月2日(2006.3.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/872, 366
 (32) 優先日 平成18年12月1日(2006.12.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

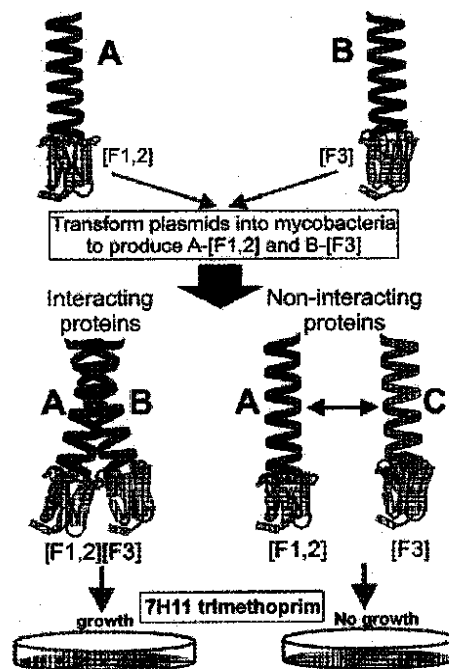
(71) 出願人 506385335
 ザ ユーエービー リサーチ ファウンデーション
 アメリカ合衆国 アラバマ 35294-0117, バーミングハム, 3アール
 ディー アベニュー サウス 1530,
 エービー 770
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイコバクテリウム属の疾患検出、処置、および薬物開発

(57) 【要約】

マイコバクテリウム属関連疾患を検出および処置するための方法であって、マイコバクテリアの病原性を低下させる工程、RV3133c二量体化を減少させる工程、および特定された化合物を用いてマイコバクテリアの感染をともなう被験体を処置する工程を包含する方法が開示される。マイコバクテリウム属関連疾患の処置に有用な化合物の例としては、N-(4-[(アセチルアミノ)スルホニル]フェニル)-3-フェニルプロパンアミド; 1-(3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-2-(2-イミノ-3-メチル-2,3-ジヒドロ-1H-ベンズイミダゾール-1イル)エタノン塩酸塩; および1-(1,3-ベンズオキサゾール-2-イル)-3-({ 4-[(2-ヒドロキシエチル)スルホニル]フェニル } アミノ)アクリルアルデヒドが挙げられる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体において、結核菌感染を検出する方法であって、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうちの一つ以上を、該被験体由来のサンプルにおいて検出する工程を包含し、該ポリペプチドのうちの一つ以上の検出が結核菌感染を示す、方法。

【請求項 2】

被験体において結核菌の存在を検出する方法であって、以下の工程：

被験体から得られた、抗体を含む生物学的なサンプルを、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cもしくはRv3800c、またはそのフラグメントのうちの一つ以上に対して接触させる工程と；

該サンプル中において、一つ以上の該ポリペプチドに結合する抗体の量を検出する工程であって、該サンプルにおける抗体に対する、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうちの一つ以上の結合が、該被験体における結核菌の存在を示す工程と、を包含する、方法。

【請求項 3】

被験体における結核の進行をモニタリングする方法であって、以下の工程：

(a) 被験体から得られた、抗体を含む生物学的なサンプルを以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800c、Cfp-10、Esa-6またはそのフラグメントのうちの一つ以上と接触させる工程と；

(b) 該サンプル中において、該ポリペプチドに結合する抗体の量を検出する工程と；

(c) 1以上の引き続く時点で該被験体から得られた生物学的サンプルを用いて(a)、(b)および(c)の工程を繰り返す工程であって；結合された抗体の量の増大が、該被験体における結核の進行を示す工程と、を包含する、方法。

【請求項 4】

被験体における結核菌感染の重篤度を検出する方法であって：

以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうちの一つ以上の量を検出する工程と；

該ポリペプチドの該量と標準とを比較する工程であって、該結核菌感染の重篤度が、該ポリペプチドの量によって決定され得る工程と、を包含する、方法。

【請求項 5】

前記被験体が哺乳動物である、請求項 1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記被験体がヒトである、請求項 1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cのうちの一つ以上に特異的に結合する少なくとも一つの抗体を含む、キット。

【請求項 8】

以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうちの一つ以上を備えており、該ポリペプチドが固体支持体上に固定されている、キット。

【請求項 9】

以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、およびRv3800cのうちの一つ以上の活性を調節する工程を包含する、細胞中の細菌感染を減少させる方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

被験体が哺乳動物細胞である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

被験体がヒト細胞である、請求項 9 または 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

Cfp-10 と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、
または Rv3800c との間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって：

a) Cfp-10 および、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、
または Rv3800c の存在下において該因子を投与する工程と；

b) Cfp-10 と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、
または Rv3800c との間の相互作用を検出する工程であって、相互作用における
変化が相互作用を調節する化合物を示している工程と、
を包含する、方法。

10

【請求項 13】

Cfp-10 と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、
または Rv3800c との間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって：

Cfp-10 および Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c
、または Rv3800c を発現する細胞と、該因子とを接触させる工程と；

Cfp-10 と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、
または Rv3800c との間の相互作用を検出する工程であって、相互作用における変化
が、相互作用を調節する化合物を示している工程と；
を包含する、方法。

20

【請求項 14】

Esat-6 と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c
または Rv3800c との間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって：

Esat-6 および Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c
、または Rv3800c の存在下において該因子を投与する工程と；

Esat-6 と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、
または Rv3800c との間の相互作用を検出する工程であって、相互作用における変化
が相互作用を調節する化合物を示している工程と；
を包含する、方法。

30

【請求項 15】

Esat-6 と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、
または Rv3800c との間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって：

Esat-6 および Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c
、または Rv3800c を発現する細胞と、該因子とを接触させる工程と；

Esat-6 と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、
または Rv3800c との間の相互作用を検出する工程であって、相互作用の変化が相互
作用を調節する化合物を示している工程と、
を包含する方法。

40

【請求項 16】

細胞における細菌感染を軽減する因子を特定する方法であって：

Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c
または Rv3800c を発現する細胞と、該因子とを接触させる工程と；

Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c
もしくは Rv3800c の発現または活性における変化を検出する工程であって、発現または活性における変化は、
該因子が細菌感染を軽減する因子であることを示す工程と、
を包含する、方法。

【請求項 17】

酵素の別のフラグメントの再アセンブリを含むマイコバクテリウム属における分子相互作用の検出のためのアッセイであって、
該酵素フラグメントの再アセンブリが、各々の酵

50

素フラグメントに融合された分子ドメインの相互作用によって操作され、ここで該酵素フラグメントの再アセンブリが、他の分子プロセスと独立しており、かつ該再アセンブリが、該酵素の活性の再構成によって検出される、アッセイ。

【請求項 18】

前記分子ドメインがマイコバクテリウム属のポリペプチドである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

酵素フラグメントに融合された第一の分子ドメインが、C f p - 10、E s a t - 6、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、R v 3 8 0 0 cまたはそれらのフラグメントである、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 20】

酵素フラグメントに融合された第二の分子ドメインが、C f p - 10、E s a t - 6、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、R v 3 8 0 0 cまたはそれらのフラグメントである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記酵素が D H F R を含む、請求項 17 ~ 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

D H F R の第一のフラグメントがフラグメント F [3] である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

D H F R の第二のフラグメントがフラグメント F [1 , 2] である、請求項 21 に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記酵素の活性がトリメトプリム耐性である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 25】

マイコバクテリウム属における生体分子相互作用を検出するための方法であって：

酵素レポーター分子の第一のフラグメントと第一のポリペプチドとを含む第一の融合タンパク質と、該酵素レポーター分子の第二のフラグメントと第二のポリペプチドとを含む第二の融合タンパク質とを合わせる工程であって、該第一のポリペプチドと該第二のポリペプチドとの会合が、酵素レポーター分子の再アセンブリおよび酵素レポーター活性の再構成を生じる工程と；

30

酵素レポーター活性を検出し、これによって、該第一のポリペプチドと該第二のポリペプチドとの間の生体分子相互作用が示される工程と；
を包含する、方法。

【請求項 26】

マイコバクテリウム属において生体分子相互作用を調節する因子を特定するための方法であって：

酵素レポーター分子の第一のフラグメントと第一のポリペプチドとを含む第一の融合タンパク質と、該酵素レポーター分子の第二のフラグメントと第二のポリペプチドとを含む第二の融合タンパク質であって、該第一のポリペプチドが該第二のポリペプチドと会合して、これが酵素レポーター分子の再アセンブリおよび酵素レポーター活性の再構成を生じる融合タンパク質と；

40

因子と；を合わせる工程と、

該酵素レポーター活性を検出し、該因子の非存在下におけるコントロールに対する、該因子の付加を伴う酵素レポーター活性の減少は、該因子が該第一のポリペプチドと第二のポリペプチドとの間の生体分子相互作用を妨害することを示す工程と、
を包含する、方法。

【請求項 27】

マイコバクテリウム属における生体分子相互作用を検出するための方法であって：

酵素レポーター分子の第一のフラグメントと第一のポリペプチドとを含む第一の融合タ

50

ンパク質と、該酵素レポーター分子の第二のフラグメントと第二のポリペプチドとを含む第二の融合タンパク質と、因子とを合わせる工程であって、該因子と、該第一のポリペプチドおよび該第二のポリペプチドとの会合が、該酵素レポーター分子の再アセンブリおよび該酵素レポーター活性の再構成を生じる工程と、

該酵素レポーター活性を検出し、これによって該因子と該第一のポリペプチドおよび該第二のポリペプチドとの間の生体分子相互作用が示される工程と、
を包含する、方法。

【請求項 28】

前記第一のポリペプチドが、マイコバクテリウム属のポリペプチドである、請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 29】

前記第一のポリペプチドが C f p - 10、E s a t - 6、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、R v 3 8 0 0 c またはそのフラグメントである、請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

前記第二のポリペプチドがマイコバクテリウム属のポリペプチドである請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

前記第二のポリペプチドが C f p - 10、E s a t - 6、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、R v 3 8 0 0 c またはそのフラグメントである、請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 32】

前記酵素レポーター分子の第一のフラグメントが、D H F R フラグメント F [3] を含む、請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

前記酵素レポーター分子の第二のフラグメントが、D H F R フラグメント F [1 , 2] を含む、請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

前記酵素レポーター活性がトリメトプリム耐性である、請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 35】

請求項 25 ~ 27 のいずれかに記載の方法であって、さらに、前記因子に架橋された結合分子を含み、該結合分子が該第一のポリペプチドと会合し、かつ該因子と該第二のポリペプチドとの会合が、酵素レポーター分子の再アセンブリおよび酵素レポーター活性の再構成を生じ、そして酵素レポーター活性の検出が、該因子と該第二のポリペプチドとの間の生体分子相互作用を示す、方法。

【請求項 36】

前記因子が前記結合分子に共有結合される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記因子が架橋剤によって前記結合分子に連結される、請求項 35 に記載の方法。

40

【請求項 38】

前記結合分子がラパマイシンである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

前記因子がラパマイシン分子に共有結合される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 40】

前記因子が、架橋剤によって前記ラパマイシン分子に結合される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 41】

前記第一のポリペプチドが F R B または F K B P である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 42】

50

キットであって：

第一のポリペプチドおよび第一の酵素レポーターフラグメントを含む第一の融合タンパク質；ならびに

第二の酵素レポーターフラグメント、
のうちの1つ以上を備える、キット。

【請求項43】

請求項42に記載のキットであって、さらに結合分子を備え、前記第一の融合タンパク質が該結合分子に親和性を有する、キット。

【請求項44】

架橋剤が前記結合分子に結合される、請求項43に記載のキット。

10

【請求項45】

前記結合分子がラパマイシンである、請求項43に規定されるようなキット。

【請求項46】

被験体においてハンセン病を検出する方法であって、該被験体由来のサンプルにおいて、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうちの1つまたは組み合わせを検出することによって、免疫細胞によって生成される応答を検出する工程を包含し、該ポリペプチドの1つ以上の検出がハンセン病を示す、方法。

【請求項47】

M. tuberculosis 感染によって生成される免疫応答と、被験体においてワクチン接種によって生成される記憶応答との間を区別する方法であって、該被験体由来のサンプルにおいて、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうちの1つまたは組み合わせを検出することによる、免疫細胞によって生成される応答を検出する工程を包含し、免疫細胞によって生成される応答の検出が、ワクチン接種ではなく結核菌感染を示す、方法。

20

【請求項48】

免疫原性組成物であって以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうちの1つ以上、ならびに抗原および適切なキャリアを含む、免疫原性組成物。

30

【請求項49】

結核菌感染を検出するための診断アッセイであって、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cのうちの1つ以上を検出する手段を含む、診断アッセイ。

【請求項50】

Esat-6および/またはCfp-10の改変を検出するための診断アッセイであって、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cのうちの1つ以上を含む、診断アッセイ。

【請求項51】

結核菌感染の重篤度を決定するための診断アッセイであって、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cのうちの1つ以上の量を決定する工程を包含する、診断アッセイ。

40

【請求項52】

Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントに特異的に結合する、単離された抗体、またはその抗原結合フラグメント。

【請求項53】

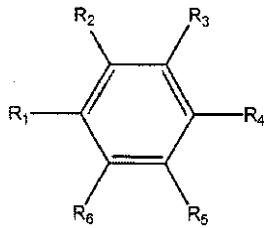
以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cまたはRv3800cのうちの1つ以上をコードする核酸についてのプローブを含むマイクロアレイ。

50

【請求項 5 4】

マイコバクテリアの病原性を軽減する方法であって、マイコバクテリウム属と、以下の構造式の化合物：

【化 1】



10

とを接触させる工程を包含し、ここで：

R₁ が NH - X または C (= O) - X であり、ここで X が、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；

R₄ が OH ; SO₂ - Y であって、ここで Y が置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール；または SO₂ - NH - Z であって、ここで Z が置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；そして

20

R₂、R₃、R₅、および R₆ の各々が独立して、H、OH、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール、ならびにその薬学的に受容可能な塩および誘導体であり、

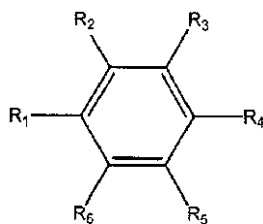
ここで該化合物が、該化合物の非存在下におけるマイコバクテリウム属と比較して病原性を軽減させる、方法。

【請求項 5 5】

マイコバクテリウム属における R v 3 1 3 3 c 二量体化を軽減する方法であって、マイコバクテリウム属と、以下の構造式の化合物：

30

【化 2】



とを接触させる工程を包含し、ここで：

40

R₁ が NH - X または C (= O) - X であり、ここで X が、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；

R₄ が OH ; SO₂ - Y であって、ここで Y が置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール；または SO₂ - NH - Z であって、ここで Z が置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；そして

R₂、R₃、R₅、および R₆ の各々が独立して、H、OH、置換もしくは非置換の C

50

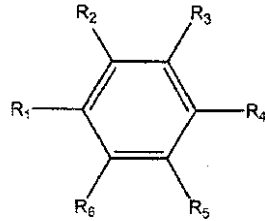
$C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール、ならびにその薬学的に受容可能な塩および誘導体であり、

ここで該化合物が、該化合物の非存在下におけるマイコバクテリウム属の Rv3133c 二量体化と比較して Rv3133c 二量体化を軽減させる、方法。

【請求項 56】

被験体におけるマイコバクテリウム属感染を処置する方法であって、該被験体に対して以下の構造式の化合物：

【化 3】



を薬学的に受容可能な形態で投与する工程を包含し、ここで：

R_1 が $NH - X$ または $C(=O) - X$ であり、ここで X が、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；

R_4 が OH ； $SO_2 - Y$ であって、ここで Y が置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール；または $SO_2 - NH - Z$ であって、ここで Z が置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；そして

R_2 、 R_3 、 R_5 、および R_6 の各々が独立して、 H 、 OH 、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール、ならびにその薬学的に受容可能な塩および誘導体であり、

ここで該化合物が、該化合物の非存在下におけるマイコバクテリウム属感染と比較してマイコバクテリウム属感染を軽減させる、方法。

【請求項 57】

X がベンゾオキサゾール基で置換される、請求項 54 ~ 56 のいずれかに記載の方法。

【請求項 58】

X が、1-メチル-1,3-ジヒドロ-ベンゾイミダゾール-2-イリデンアミン基で置換される、請求項 54 ~ 56 のいずれかに記載の方法。

【請求項 59】

X がフェニル基で置換される、請求項 54 ~ 56 のいずれかに記載の方法。

【請求項 60】

X がカルボキシル基で置換される、請求項 54 ~ 56 のいずれかに記載の方法。

【請求項 61】

Y がヒドロキシル基で置換される、請求項 54 ~ 56 のいずれかに記載の方法。

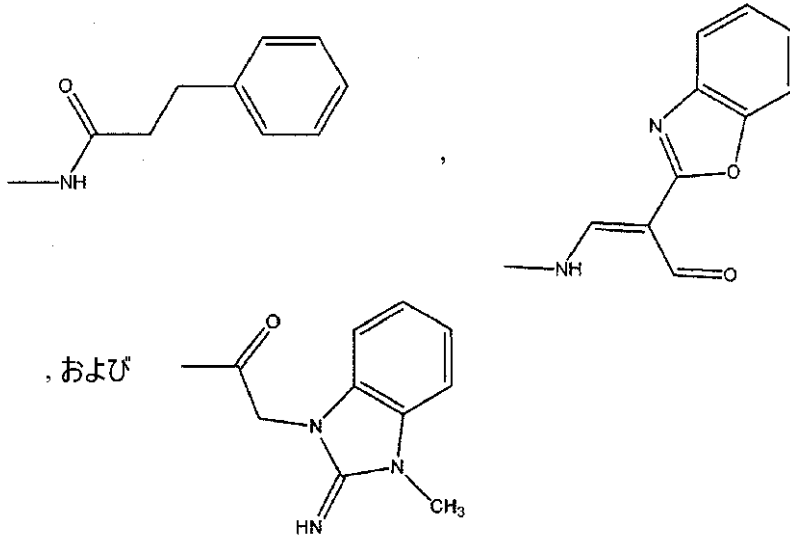
【請求項 62】

Z がカルボニル部分で置換される、請求項 54 ~ 56 のいずれかに記載の方法。

【請求項 63】

R_1 が以下の構造式：

【化 4】



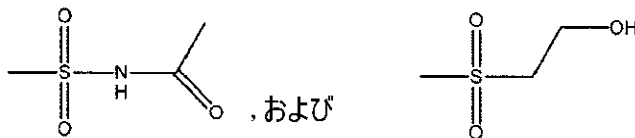
10

から選択される、請求項 5 4 ~ 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 4】

R₄ が以下の構造式：

【化 5】



20

から選択される、請求項 5 4 ~ 5 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 5】

前記化合物が、N - (4 - [(アセチルアミノ) スルホニル] フェニル) - 3 - フェニルプロパンアミド ; 1 - (3 , 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - (2 - イミノ - 3 - メチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンズイミダゾール - 1 イル) エタノン塩酸塩 ; および 1 - (1 , 3 - ベンズオキサゾール - 2 - イル) - 3 - ({ 4 - [(2 - ヒドロキシエチル) スルホニル] フェニル } アミノ) アクリルアルデヒド ; ならびにその薬学的に受容可能な塩および誘導体からなる群より選択される、請求項 5 4 ~ 5 6 のいずれかに記載の方法。

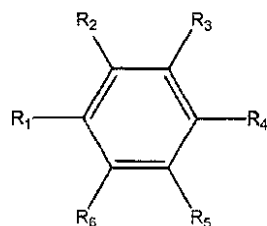
30

【請求項 6 6】

キットであって：

以下の構造式の化合物であり：

【化 6】



40

ここで：

R₁ が NH - X または C (= O) - X であり、ここで X が、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換

50

の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；

R_4 が OH； $SO_2 - Y$ であって、ここで Y が置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール；または $SO_2 - NH - Z$ であって、ここで Z が置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アリールであり；そして

R_2 、 R_3 、 R_5 、および R_6 の各々が独立して、H、OH、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール、ならびにその薬学的に受容可能な塩および誘導体と、

請求項 54 ~ 56 のいずれかに規定される方法を行うための説明書と、
を備える、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本願は、2006年3月2日に出願された米国仮特許出願第60/778,307号；
および2006年12月1日に出願された米国仮特許出願第60/872,366号に対
する優先権を主張する。これらは、その全体が、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

背景

Mtb (*Mycobacterium tuberculosis*) は、毎年2~3百万例の死亡の原因である (WHO, 2004)。ゲノム配列から情報を抽出するのにおける多くの技術的な前進にもかかわらず、遺伝子機能は、MtbのORFの約58%にしか帰せられず、これによって、遺伝子機能、従って病原性をさらによく理解するための新規でかつ創造的なアプローチを開発するという重要性が強調される。ポストゲノム時代の重要な課題は、Mtbの病原性の分子機構をさらによく理解するための機能的なストラテジーを統合するということである。病原性経路は分子コネクシオンのマルチパートネットワークによって媒介されるということ、そしてMtbはそれが他のタンパク質と相互作用する限りその機能を遂行できないということがますます明確になってきている。機能が未知のタンパク質と公知のタンパク質との間の物理的な会合によって、前者がしばしば後者の機能に関連する機能を有することが示されるということも認識されてきている。さらに、遺伝子的に解決しにくい病原体、例えばMtbにおけるタンパク質間会合を研究するインビボの技術の開発は、疾患の機構の理解に有意に影響し得る。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0003】

要旨

被験体において、マイコバクテリウム属関連の感染、例えば、結核菌を検出および処置するための方法、材料およびキット、ならびに *Mycobacterial* (マイコバクテリア、放線菌) のタンパク質、薬物および薬物標的を特定するための方法が、本明細書に開示される。

【0004】

特定されたタンパク質およびタンパク質間の相互作用を利用する、マイコバクテリア (*Mycobacterial*) の感染を検出し、そしてマイコバクテリアの感染を示す因子を特定するための方法が開示される。例えば、マイコバクテリア感染の検出のために有用な特定のタンパク質としては、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800c、Cfp-10 (Rv3874)、および Esat-6 (Rv3875) が挙げられる。

10

20

30

40

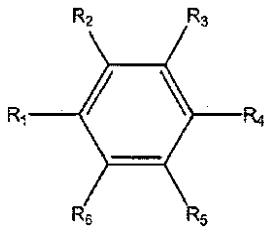
50

【 0 0 0 5 】

以下の一般式を有する化合物：

【 0 0 0 6 】

【 化 7 】



10

であって、ここで：

R_1 が $NH - X$ または $C(=O) - X$ であり、ここで X が、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；

R_4 が OH ； $SO_2 - Y$ であって、ここで Y が置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール；または $SO_2 - NH - Z$ であって、ここで Z が置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；そして

20

R_2 、 R_3 、 R_5 、および R_6 の各々が独立して、 H 、 OH 、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルケニル、置換もしくは非置換の $C_1 - C_{12}$ アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールである、化合物、を用いて、マイコバクテリア (*Mycobacterial*) の病原性を軽減し、RV3133c の二量体化を軽減し、そしてマイコバクテリアの感染を有する被験体を処置するための方法が開示される。

【 0 0 0 7 】

このような化合物の例としては、 $N - (4 - [(アセチルアミノ)スルホニル]フェニル) - 3 - フェニルプロパンアミド$ ； $1 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - (2 - イミノ - 3 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - 1H - ベンズイミダゾール - 1イル)エタノン塩酸塩$ ；および $1 - (1, 3 - ベンズオキサゾール - 2 - イル) - 3 - (\{4 - [(2 - ヒドロキシエチル)スルホニル]フェニル\}アミノ)アクリルアルデヒド$ が挙げられる。

30

【 0 0 0 8 】

さらに開示されるのは、マイコバクテリウム属の細胞においてポリペプチドと相互作用する因子を特定するための方法である。この方法では、酵素レポーター分子の第一のフラグメントと第一のポリペプチドとを含む第一の融合タンパク質と、酵素レポーター分子の第二のフラグメントを含む第二の融合タンパク質とを合わせる。合わせた後、この第一および第二のポリペプチドの会合が、この酵素レポーター分子の再アセンブリおよびこの酵素レポーター活性の再構成を生じる。最終的に、酵素レポーター活性が検出される。レポーター分子の活性の変化によって、この因子が第二のポリペプチドと相互作用していることが示される。このシステムを用いれば、第一と第二のポリペプチドの間の相互作用を促進または阻害する因子が特定され得る。

40

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 0 9 】

発明の詳細な説明

結核菌感染の検出および処置は、特に先進工業国における、この伝染病との戦いにおける重要な手段である。ツベルクリン皮膚試験 (TST) は、潜在性の *M. tuberculosis* 感染を検出する、前世紀の唯一の実用的手段であった。不幸にも、TSTは、

50

多数の十分に証明された能力および理論的な問題を被り、その最も重大なものは非結核性マイコバクテリア (*nontuberculous mycobacteria*) (NTM) での感染によって、またはカルメット・ゲランウシ型結核菌 (*Bacillus Calmette-Guérin*) (BCG) ワクチン接種によって生じる反応性に起因する偽陽性である。結核菌精製タンパク質誘導性 (*purified protein derivative*) (PPD) に対するIFN応答を測定することによってM. tuberculosis感染を検出するインビトロの全血液試験は、米国で承認された。このアッセイは、TSTよりもBCGワクチン接種による影響が少ないかもしれないが、いくつかのBCGワクチン接種個体では偽陽性である。なぜなら多くのPPD抗原がBCGおよびNTMにおいて抗原と類似または同一であるからである。全てのBCG亜系統およびほとんどのNTMのゲノムが存在しないM. tuberculosisゲノムの一部が特定されている。これらのM. tuberculosis特異的な領域は、Cfp-10およびEsat-6を含む多数のタンパク質をコードする。これらの抗原に対する細胞媒介性の応答は、証明されたM. tuberculosis感染および高リスクの感染の両方と相関することが示されている。しかし、全血IFN-アッセイに対するCfp-10およびEsat-6の適用は、M. tuberculosis感染のさらに鋭敏な診断を可能にするが、やはり限界を有している。なぜなら、それでは感染の重篤度を区別できず、やはり偽陰性および偽陽性を生じるからである。さらに、M. tuberculosis感染についての試験の感度および特異性の評価は、ゴールドン・スタンダードを欠くことによって妨げられ；当業者は、潜在性の結核菌 (TB) 感染の有無を証明できない。

【0010】

マイコバクテリアの感染の検出および処置のための方法および組成物が本明細書に開示される。さらに、マイコバクテリア感染の検出および処置に有用な因子を特定するための方法もまた本明細書において開示される。マイコバクテリア疾患および病原性を研究するために、マイコバクテリアにおけるタンパク質間の会合の研究を可能にするマイコバクテリアのシステムが開発されている。このシステムは、マイコバクテリアのタンパク質フラグメントの相補性 (*mycobacterial protein fragment complementation*) (M-PFC) システムと呼ばれ、2つの相互作用するタンパク質に対して独立して融合された2つの小型のマウスジヒドロ葉酸還元酵素 (*mDHFR*) ドメインのモデル生物体である *Mycobacterium smegmatis* (Msm) における機能的な再構成に基づく。M-PFCを用いて、酵母GCN4の二量体化、MtbヒスチジンキナーゼKdpDと応答調節因子KdpEとの間の相互作用、および分泌された抗原Esat-6とCfp-10との間の会合が首尾よく実証されている。膜貫通センサーキナーゼと、DevSと応答調節因子DevRとの間の会合もまた、首尾よく示されており、それによってM-PFCがマイコバクテリアの膜におけるタンパク質会合を明らかにする能力が実証されている。Mtb H37Rvライブラリーを、主要な分泌抗原Cfp-10と会合するタンパク質についてスクリーニングしたところ、Esat-6 (Cfp-10と会合することが公知のタンパク質) が、このスクリーニングにおいて一貫して見出された。

【0011】

Cfp-10はまた、以下のタンパク質と会合することが見出された：(1) Rv0686およびRv2151c (FtsQ)、進化上保存されたシグナル認識経路 (*signal recognition pathway*) (SRP) のそれぞれ成分および基質；(2) Rv3596c (ClpC1)、タンパク質の転座および品質管理に關与するAAA-ATPaseシャペロン；(3) Rv2240c、これは機能が未知；ならびに(4) Rv3800c (pks13)、ミコール酸生合成の最終工程を触媒するポリケチド合成酵素。これらの結果は直接、Mtbシグナルペプチド独立分泌 (*signal peptide independent secretion*) (SPS) 経路と進化的に保存されたSRPおよびSecA/SecYEG経路とを結びつけ、それらが分泌成分を共有し得ることを示している。

【0012】

Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、およびRv3800cと、Cfp-10およびEsat-10との会合のおかげで、これらのタンパク質は、結核菌の検出に関連する種々の方法、キットおよびアッセイで用いられ得る。これらのタンパク質はまた、らい病（ハンセン病）および他のマクィコバクテリア疾患を検出するために用いられ得る。結核、ハンセン病および他のマイコバクテリア属関連の疾患および障害の検出および処置に対するこれらのタンパク質のこのような適用は下に考察される。

【0013】

被験体における結核菌感染を検出する方法は、その被験体由来のサンプルにおいて、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうち1つまたは組み合わせを検出することに關与する。これらのポリペプチドのうち1つ以上の検出は、結核感染を示す。Cfp-10（Rv3874）および/またはEsat-6（Rv3875）の検出はまた、結核菌感染を示す。このような検出は、例えば、全血のIFN-アッセイを用いて、または核酸検出システムを用いて行われてもよい（例えば、ポリペプチドをコードする核酸は、PCR検出システムを用いて検出される）。

10

【0014】

本明細書において用いる場合、被験体は個体である。従って、被験体は、限定はしないが、飼っている動物（例えば、ネコ、イヌなど）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど）、およびトリであってもよい。さらなる例としては、この被験体は、哺乳動物、例えば、霊長類、またはヒトであってもよい。

20

【0015】

本明細書に記載される方法およびアッセイは、潜伏性（LTBI）および活動性の結核（TB）感染の両方を有する個体を診断および処置することに有用である。極めて若齢の小児について以外は、初回感染の直後に結核症状を示すのはわずかな小児である。しかし、潜伏性の感染では、この細菌はマクロファージにかくまわれる。マクロファージでは、この細菌は長年にわたって休眠状態で生残可能であり、小さな瘢痕の内側に囲まれる。90～95%の例では、この細菌は、さらなる問題を全く生じないが、感染した人の約5～10%では、増殖を開始する（活動性疾患）。この活動期には、感染した人は実際に病気になる、そして疾患を伝播し得る。

30

【0016】

活動性感染は、小児、きわめて高齢者、またはコルチコステロイドの使用によって、さらに高頻度にもたらされる。多くの感染性疾患と同様、結核はさらに急速に伝播し、そして免疫系が弱体化しているヒトではさらに危険である。従って、HIV感染を有するヒトは、活動性の結核を発症するリスクが増大している。潜伏性の結核感染（latent tuberculosis infection）（LTBI）の処置はまた、予防的治療または化学的予防とも呼ばれ、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）陰性の集団において活動性疾患への進行を予防することを補助する。

40

【0017】

インビトロ試験を用いて、潜伏性の結核菌感染（LTBI）および結核（TB）症の両方を含む、Mycobacterium tuberculosis感染を診断してもよい。例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（enzyme-linked immunosorbent assay）（ELISA）試験によって、感作されたヒト由来の新鮮なヘパリン処理全血におけるインターフェロン-（IFN-）の放出を、これを合成ペプチドの混合物とともにインキュベートしたとき、検出して、M.tuberculosisに存在するタンパク質、例えば、上記のような、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、およびRv3800c、ならびに早期分泌抗原性標的-6（ESAT-6）および培養濾過タンパク質-10（culture filtrate protein-10）（CFP-10）の存在をシミュレートする。

50

【0018】

本明細書に記載される全ての方法およびアッセイについては、任意の以下のタンパク質 (R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c) を個々に、または任意の組み合わせで検出してもよい。列挙したタンパク質の1つで結核感染の存在を検出するのに十分であるが、それらを同様に種々の組み合わせで用いてもよい。本明細書において用いる場合、組み合わせという用語は、同時または連続を意味する。以下の列挙は、限定はしないが、可能な組み合わせのいくつかの例となる。例えば、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、または R v 3 8 0 0 c の各々のタンパク質は、本明細書に開示される方法およびアッセイを用いて単独で検出され得る。R v 0 6 8 6 はまた、R v 2 1 5 1 c とともに検出され得る。R v 0 6 8 6 はまた、R v 2 2 4 0 c とともに検出され得る。R v 0 6 8 6 はまた、R v 3 5 9 6 c とともに検出され得る。R v 0 6 8 6 はまた、R v 3 8 0 0 c とともに検出され得る。さらに、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、および R v 2 2 4 0 c が、一緒に検出されてもよい。R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、および R v 3 5 9 6 c も、一緒に検出されてもよい。R v 0 6 8 6、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c も、一緒に検出されてもよい。R v 0 6 8 6、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c も一緒に検出されてもよい。R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c も一緒に検出されてもよい。R v 0 6 8 6、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c も一緒に検出されてもよい。R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c も一緒に検出されてもよい。R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c も一緒に検出されてもよい。R v 3 5 9 6 c および R v 3 8 0 0 c も一緒に検出されてもよい。R v 2 1 5 1 c、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c も一緒に検出されてもよい。上記のリストは完全ではなく、そして限定はしないが、可能な組み合わせのいくつかの例となる。

10

20

30

40

50

【0019】

タンパク質の上記の組み合わせの上に、C f p - 1 0 および E s a t - 1 0 も、結核感染を検出するために用いられる方法およびアッセイで用いられ得る。C f p - 1 0 および E s a t - 1 0 は、お互いと組み合わせで、そして可能な他の種々のタンパク質組み合わせで用いられてもよいし、または個々に用いられても、そして可能な種々のタンパク質の組み合わせで用いられてもよく、例えば、R v 0 6 8 6 および C f p - 1 0 が検出されてもよく、または R v 0 6 8 6、C f p - 1 0、および E s a t - 6 が検出されてもよい。これは、可能な多くの組み合わせのうちの1例でしかない。

【0020】

また本明細書には、被験体における結核菌の存在を検出する方法も開示され、この方法は、以下の工程を包含する：a) 被験体から得られる生物学的なサンプルであって、抗体を含む生物学的サンプルを、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c もしくは R v 3 8 0 0 c、またはそのフラグメントのうちの1つ以上に対して接触させる工程と；b) このサンプル中において、1つ以上のポリペプチドに結合する抗体の量を検出する工程であって、このサンプルにおける抗体に対する、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、R v 3 8 0 0 c またはそのフラグメントのうちの1つ以上の結合が、この被験体における結核菌の存在を示す工程と。例えば、R v 3 5 9 6 c は、抗体アッセイによって検出可能であることが示されている。C f p - 1 0 および / または E s a t - 6 も、例えば、検出され得る。

【0021】

これらの R v タンパク質 (R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c) と、E s a t - 6 および / または C f p - 1 0 との相互作用は、I F N - のレベルに影響し得る。リンホカイン I F N - は、主に T 細胞および N K 細胞によって生成され、多数の細胞内病原体を制御するのににおけるマクロファージ活性化の重要なメディエーターであることが示されている。I F N - の m R N A は、結核患者由来の胸膜組織において、そしてハンセン病の自己治癒型の病変において見出され

ている。癩腫癩患者における病変への組み換え I F N - の注入によって、注射部位への多数の T h 細胞および単球の遊走、ならびに抗酸菌の減少が生じた。病原性の M . t u b e r c u l o s i s チャレンジに対する防御を養子性に移動させる T 細胞は、インビトロで刺激された場合に I F N - を生じる。

【 0 0 2 2 】

また本明細書では、被験体において結核の進行をモニタリングする方法も開示され、この方法は、被験体から得られる生物学的なサンプルであって、抗体を含む生物学的サンプルを、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、R v 3 8 0 0 c、C f p - 1 0 E s a - o またはそのフラグメントのうちの 1 つ以上と接触させる工程と；このサンプル中において、このポリペプチドに結合する抗体の量を検出する工程と；1 以上の引き続く時点でこの被験体から得られた生物学的サンプルを用いて、前の工程を繰り返す工程とを包含し；結合された抗体の量の増大が、この被験体における結核菌の進行を示している。I F N - 産生は、本明細書において上記される方法を用いて測定され得る。

10

【 0 0 2 3 】

本明細書において開示されるのは、ある被験体における結核菌感染の重篤度を検出する方法であって、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、R v 3 8 0 0 c またはそのフラグメントのうちの 1 つ以上の量を検出する工程と；このポリペプチドの量と標準とを比較する工程であって、この結核菌感染の重篤度が、このポリペプチドの量によって決定され得る工程と、を包含する。

20

【 0 0 2 4 】

また本明細書で開示されるのは、以下のポリペプチド：R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、および R v 3 8 0 0 c のうちの 1 つ以上の活性を調節する工程を包含する、細胞中の細菌感染を減少させる方法である。この細菌感染は、マイコバクテリウム属によって生じ得る。詳細には、例えば、M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s、M . l e p r a e、M . u l c e r a n s、M . a v i u m、または M . m a r i n u m である。このポリペプチドの活性は、この細胞と、ある組成物であって、化学物質、化合物、低分子または高分子、有機分子、無機分子、ペプチド、薬物、タンパク質、抗体、モルホリン、三重らせん分子、s i R N A、s h R N A s、m i R N A、アンチセンス核酸またはリボザイムを含む組成物とを接触させることによって調節され得る。1 例では、この細菌感染は、このポリペプチドに特異的に結合する抗体によって調節される。このような実施形態は、下にさらに詳細に考察される。さらに、この細胞は、被験体中であっても、またはインビトロであってもよい。

30

【 0 0 2 5 】

開示されるのは、C f p - 1 0 と、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、または R v 3 8 0 0 c との間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって、この方法は、C f p - 1 0 および、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、または R v 3 8 0 0 c の存在下においてこの因子を投与する工程と；C f p - 1 0 と、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、または R v 3 8 0 0 c との間の相互作用を検出する工程とを包含しており、相互作用における変化が相互作用を調節する化合物を示している。

40

【 0 0 2 6 】

また開示されるのは、C f p - 1 0 と、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、または R v 3 8 0 0 c との間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって、この方法は、C f p - 1 0 および R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、または R v 3 8 0 0 c を発現する細胞と、この因子とを接触させる工程と；C f p - 1 0 と、R v 0 6 8 6、R v 2 1 5 1 c、R v 2 2 4 0 c、R v 3 5 9 6 c、または R v 3 8 0 0 c との間の相互作用を検出する工程とを包含しており、相互作用における変化（例えば、結合のレベルにおける変化）が、相互作用を調節する化合物を示している。

50

【0027】

また開示されるのは、Esat-6と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cまたはRv3800cとの間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって、この方法は、Esat-6およびRv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cの存在下においてこの因子を投与する工程と；Esat-6と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cとの間の相互作用を検出する工程とを包含しており、相互作用における変化が相互作用を調節する化合物を示している。

【0028】

また開示されるのは、Esat-6と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cとの間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって、この方法は、Esat-6およびRv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cを発現する細胞と、この因子とを接触させる工程と、Esat-6と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cとの間の相互作用を検出する工程とを包含しており、相互作用の変化が相互作用を調節する化合物を示している。

10

【0029】

本明細書に開示されるのは、細胞における細菌感染を軽減する因子を特定する方法であって、この方法は、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cまたはRv3800cを発現する細胞と、この因子とを接触させる工程と；Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cもしくはRv3800cの発現または活性における変化を検出する工程とを包含しており、発現または活性における変化は、この因子が細菌感染を軽減する因子であることを示している。この細胞は被験体中であっても、またはインビトロであってもよい。

20

【0030】

本明細書に開示されるのは、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cのうちの一つ以上を含む免疫原性組成物、またはその免疫原性フラグメントである。この組成物はさらに、キャリアおよび/またはアジュバントを含んでもよい。

【0031】

また開示されるのは、結核菌感染を検出するための診断アッセイであって、このアッセイは、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cもしくはRv3800cのうちの一つ以上を検出する手段、またはRv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cもしくはRv3800cが、Esat-6および/もしくはCfp-10を改変してIFN-（ELISAによって測定され得る）に影響する方法を検出する手段を包含する。このアッセイでは、Cfp-10および/またはEsat-6も検出され得る。1実施例では、検出の手段はELISAであってもよい。

30

【0032】

また本明細書で開示されるのは、結核菌感染の重篤度を決定するための診断アッセイであって、このアッセイは、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cもしくはRv3800cのうちの一つ以上の量を検出する手段、またはRv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cもしくはRv3800cが、Esat-6および/もしくはCfp-10を改変する方法を検出する手段を包含する。このアッセイでは、Cfp-10および/またはEsat-6も検出され得る。1実施例では、検出の手段はELISAであってもよい。

40

【0033】

また本明細書で開示されるのは、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する、単離された抗体、またはその抗原結合フラグメントである。例えば、この抗体は、中和抗体であってもよい。

50

【0034】

また本明細書で開示されるのは、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cまたはRv3800cのうちの1つ以上をコードする核酸についてのプローブを含むマイクロアレイである。Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596cまたはRv3800cに対する抗体を検出するために用いられ得るマイクロアレイも提供され、これは、列挙されたポリペプチドまたはそのフラグメントのうちの1つ以上を含む。また、本明細書で提供されるのは、列挙されるポリペプチドに対する抗体、またはその列挙されたポリペプチドのうちの1つ以上に結合する抗体フラグメントを含むマイクロアレイである。

【0035】

上記の方法、アッセイおよびキットの全てはまた、ハンセン病(M. leprae)および他のマイコバクテリア疾患で用いられ得る。特に、本明細書で開示されるのは、被験体でハンセン病を検出する方法であって、この方法は、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントの組み合わせのうちの1つ以上を用いて、免疫細胞によって生成される応答を；その被験体由来のサンプル中で検出する工程を包含し、ここで免疫細胞によって生成される応答は、ハンセン病を示す。

【0036】

また本明細書で開示されるのは、M. tuberculosis感染によって生成される免疫応答と、被験体においてワクチン接種によって生成される記憶応答との間を区別する方法であって、この方法は、以下のポリペプチド：Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはそのフラグメントのうちの1つまたは組み合わせを用いて、この被験体由来のサンプルにおいて、免疫細胞によって生成される応答を検出する工程を包含し、ここでこのポリペプチドの1つ以上の検出が、ワクチン接種ではなく結核菌感染を示す。例えば、ワクチン接種は、M. bovisワクチン接種であってもよい。

【0037】

また開示されるのは、開示された組成物を調製するために用いられるべき成分、および本明細書に開示される方法内でそれ自体が用いられるべき組成物である。これらおよび他の材料および方法は、本明細書に開示されており、そしてこれらの材料または方法の工程の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示される場合、これらの化合物または工程の各々の種々の個々のそして総合的な組み合わせおよび順列の特定の言及は明確には開示されえないが、各々が特異的に意図されそして本明細書に記載されることが理解される。例えば、ポリペプチドのリストが開示され、かつ考察され、そしてこのポリペプチドが単独でまたは組み合わせで用いられ得る場合、特に意図されるのは、特に反対に示されない限り、可能なポリペプチドの各々のかつあらゆる組み合わせおよび順列である。従って、あるクラスの分子または工程A、BおよびCが開示され、同様に、あるクラスの分子または工程D、EおよびFならびに組み合わせの例が開示される場合、A-Dが開示され、各々が個々に言及されない場合でさえ、各々が個々にかつ総称的に意図され、これは組み合わせ、A-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-EおよびC-Fが意図され開示されるということの意味する。同様に、これらの任意のサブセットまたは組み合わせも開示される。従って、例えば、A-E、B-FおよびC-Eのサブグループが開示され考慮される。この概念は、この適用の全ての局面にあてはまり、これには限定はしないが、開示される組成物を作成および使用方法の工程が挙げられる。従って、行われ得る種々のさらなる工程が存在する場合、これらのさらなる工程の各々が、開示される方法の任意の特定の実施形態または実施形態の組み合わせで行われてもよいことが理解される。

【0038】

本明細書に開示されるこれらのタンパク質、例えば、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800c、Cfp-10およびEsat-6は

10

20

30

40

50

、 改 変 体、 誘 導 体 を 有 し て も よ く、 そ し て 本 明 細 書 に 記 載 さ れ る 方 法 お よ び ア ッ セ イ で や は り 有 用 で あ る そ の フ ラ グ メ ン ト と し て 用 い ら れ て も よ い。 本 明 細 書 に お い て 開 示 さ れ た 遺 伝 子 お よ び タ ン パ ク 質 の、 任 意 の 公 知 の 改 変 体 お よ び 誘 導 体、 ま た は そ の よ う な 遺 伝 子 お よ び タ ン パ ク 質 を 生 じ 得 る も の を 規 定 す る 1 方 法 は、 特 定 の 公 知 の 配 列 に 対 す る 相 同 性 の 観 点 か ら 改 変 体 お よ び 誘 導 体 を 規 定 す る こ と に よ る。 詳 細 に 開 示 さ れ る の は、 こ れ ら の 改 変 体、 な ら び に 言 及 さ れ る 配 列 に 対 し て 少 な く と も 7 0、 7 1、 7 2、 7 3、 7 4、 7 5、 7 6、 7 7、 7 8、 7 9、 8 0、 8 1、 8 2、 8 3、 8 4、 8 5、 8 6、 8 7、 8 8、 8 9、 9 0、 9 1、 9 2、 9 3、 9 4、 9 5、 9 6、 9 7、 9 8、 ま た は 9 9 パ ー セ ン ト の 相 同 性 を 有 す る、 本 明 細 書 に 開 示 さ れ る 他 の 遺 伝 子 お よ び タ ン パ ク 質 で あ る。 当 業 者 は、 2 つ の タ ン パ ク 質 ま た は 遺 伝 子 の よ う な 核 酸 の 相 同 性 を 決 定 す る 方 法 を 容 易 に 理 解 す る。 例 え ば、 相 同 性 は、 相 同 性 が そ の 最 高 レ ベ ル に な る よ う に 2 つ の 配 列 を 整 列 さ せ た 後 に 計 算 さ れ 得 る。

10

【 0 0 3 9 】

相 同 性 を 計 算 す る 別 の 方 法 は、 公 開 さ れ た ア ル ゴ リ ズ ム に よ っ て 行 わ れ て も よ い。 比 較 の た め の 配 列 の 最 適 の ア ラ イ ン メ ン ト は、 S m i t h お よ び W a t e r m a n A d v . A p p l . M a t h . 2 : 4 8 2 (1 9 8 1) の 相 同 性 ア ラ イ ン メ ン ト ア ル ゴ リ ズ ム に よ っ て、 N e e d l e m a n お よ び W u n s c h , J . M o L B i o l . 4 8 : 4 4 3 (1 9 7 0) の 局 所 相 同 性 ア ル ゴ リ ズ ム に よ っ て、 P e a r s o n お よ び L i p m a n , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 5 : 2 4 4 4 (1 9 8 8) の 類 似 性 検 索 方 法 に よ っ て、 こ れ ら の ア ル ゴ リ ズ ム (G A P、 B E S T F I T、 F A S T A、 お よ び T F A S T A、 W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , 5 7 5 S c i e n c e D r . , M a d i s o n , W I) の コ ン プ ュ ー タ ー 処 理 の 実 行 に よ っ て、 ま た は 検 閲 に よ っ て 行 わ れ て も よ い。

20

【 0 0 4 0 】

同 じ タ イ プ の 相 同 性 は、 核 酸 に つ い て、 例 え ば、 核 酸 ア ラ イ ン メ ン ト に 関 す る 少 な く と も 材 料 に つ い て の 参 照 に よ っ て 本 明 細 書 に 援 用 さ れ る、 Z u k e r , M . S c i e n c e 2 4 4 : 4 8 ~ 5 2 , 1 9 8 9 , J a e g e r ẽ , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 7 7 0 6 - 7 7 1 0 , 1 9 8 9 , J a e g e r ẽ , M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 3 : 2 8 1 ~ 3 0 6 , 1 9 8 9 に 開 示 さ れ る ア ル ゴ リ ズ ム に よ っ て 得 ら れ て も よ い。

30

【 0 0 4 1 】

本 明 細 書 に お い て 用 い ら れ る 場 合、 ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン と い う 用 語 は、 少 な く と も 2 つ の 核 酸 分 子、 例 え ば、 プ ラ イ マ ー ま た は プ ロ ー プ お よ び 遺 伝 子 の 間 の 配 列 に 由 来 す る 相 互 作 用 を 意 味 す る。 配 列 に 由 来 す る 相 互 作 用 と は、 2 つ の ニ ュ ク レ オ チ ド ま た は ニ ュ ク レ オ チ ド ア ナ ロ グ、 ま た は ニ ュ ク レ オ チ ド 誘 導 体 の 間 で、 ニ ュ ク レ オ チ ド 特 異 的 な 方 式 で 生 じ る 相 互 作 用 を 意 味 す る。 例 え ば、 C と 相 互 作 用 す る G ま た は T と 相 互 作 用 す る A は、 配 列 に 由 来 す る 相 互 作 用 で あ る。 2 つ の 核 酸 の ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン は、 当 業 者 に 公 知 の 多 数 の 条 件 お よ び パ ラ メ ー タ ー に よ っ て 影 響 さ れ る。 例 え ば、 反 応 の 塩 濃 度、 p H お よ び 温 度 は 全 て、 2 つ の 核 酸 分 子 が ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン す る か 否 か に 影 響 す る。

40

【 0 0 4 2 】

2 つ の 核 酸 分 子 の 間 の 選 択 性 の ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン に つ い て の パ ラ メ ー タ ー は、 当 業 者 に 周 知 で あ る。 例 え ば、 あ る 実 施 形 態 で は、 選 択 性 の ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン 条 件 は、 ス ト リ ン ジ ェ ン ト な ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン 条 件 と し て 規 定 さ れ 得 る。 ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン の ス ト リ ン ジ ェ ン シ ー は、 ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン お よ び 洗 浄 の 工 程 の い ず れ か ま た は 両 方 の、 温 度 お よ び 塩 濃 度 の 両 方 に よ っ て 制 御 さ れ る。 例 え ば、 選 択 性 の ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン を 達 成 す る た め の ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン の 条 件 は、 T m (そ れ ら の ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン パ ー ト ナ ー か ら 分 子 の 半 分 が 解 離 す る 融 解 温 度) よ り 約 1 2 ~ 2 5 低 い 温 度 で 高 い イ オ ン 強 度 の 溶 液 (6 x S S C ま た は 6 x S S P E) で の ハ イ ブ リ ダ イ ゼ ー シ ョ ン、 続 い て 洗 浄 温 度 が T m よ り 約 5 ~ 2 0 低 く な る よ う に 選 択 さ れ た 温 度 お よ

50

び塩濃度の組み合わせでの洗浄を包含し得る。温度および塩の条件は、予備実験において経験的に容易に決定され、フィルター上に固定された参照DNAのサンプルが目的の標識核酸にハイブリダイズされ、次いで異なるストリンジェンシー条件下で洗浄される。ハイブリダイゼーション温度は代表的には、DNA-RNAおよびRNA-RNAのハイブリダイゼーションについては高い。より高い、増大する、上昇する、または上昇という用語は、基礎またはコントロールのレベルを上回る増大をいう。コントロールという用語は、本明細書において用いる場合、変化を測定する標準である。例えば、コントロールは、試験の変数に供されないが、代わりに、規定のセットのパラメーターに供されるか、またはコントロールは、前のまたは後の処置レベルに基づく。条件は、ストリンジェンシーを達成するために上記されたとおり、または当該分野で公知のとおり用いられ得る。(Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Kunkelら、Methods Enzymol. 1987: 154: 367, 1987、これは、その全体が参照によって、そして少なくとも核酸のハイブリダイゼーションに関する材料について、本明細書に援用される)。本明細書において用いる場合、DNA:DNAハイブリダイゼーションに関するストリンジェントなハイブリダイゼーションという用語は、6×SSCまたは6×SSPE中で約68 (水溶液中)、続いて68 での洗浄である。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のストリンジェンシーは、必要に応じて、所望される相補性の程度が減るに応じて低下されてもよく、そしてさらに、変動が検索される任意の領域のG-CまたはA-Tの豊富さに依存する。低下する、低下した、低下、減少、低いまたはより低いという用語は、基本のレベルまたはコントロールのレベルよりも下に下がることをいう。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のストリンジェンシーは、必要に応じて、所望される相補性が増大するに応じて増大されてもよく、そしてさらに、全てが当該分野で公知のように、高い相同性が所望される任意の領域のG-CまたはA-Tの豊富さに依存する。

【0043】

より高い、増大する、上昇する、または上昇という用語は、本明細書において用いる場合、基礎のレベルまたはコントロールのレベルを上回る増大をいう。コントロールという用語は、本明細書において用いる場合、変化が測定される標準である。例えば、コントロールは、試験の変数に供されないが、代わりに、規定のセットのパラメーターに供されるか、またはコントロールは、前のまたは後の処置レベルに基づく。

【0044】

選択性のハイブリダイゼーションを規定するための別の方法は、他の核酸に結合された核酸の1つの量(割合)を見出すことによる。例えば、ある実施形態では、選択性のハイブリダイゼーション条件とは、限定核酸(limiting nucleic acid)の少なくとも約60、65、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100パーセントが非限定核酸に結合されるときである。代表的には、非限定的なプライマーは、例えば、10または100または1000倍過剰である。このタイプのアッセイは、限定および非限定的なプライマーの両方が例えば、それらの k_d よりも10倍または100倍もしくは1000倍低い条件下で、または核酸分子の1つだけが10倍もしくは100倍もしくは1000倍である条件下で、または核酸分子の1つもしくは両方がそれらの k_d を上回る条件下でおこなわれてもよい。

【0045】

選択性のハイブリダイゼーションを規定する別の方法は、所望の酵素操作を促進するためにハイブリダイゼーションが必要とされる条件下で酵素的に操作されたプライマーの割合を見出すことによる。例えば、ある実施形態では、選択性のハイブリダイゼーション条件は、このプライマーの少なくとも約60、65、70、71、72、73、74、75

10

20

30

40

50

、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100パーセントが、酵素的な操作を促進する条件下で酵素的に操作されるときであり、例えば、酵素的な操作がDNA伸長であるならば、選択性のハイブリダイゼーション条件は、プライマー分子の少なくとも約60、65、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100パーセントが伸長されるときである。好ましい条件としてはまた、製造業者によって示唆されるか、またはその操作を行う酵素について適切であると当該分野で示される条件が挙げられる。

【0046】

ある組成物または方法が、ハイブリダイゼーションを決定するためのこれらの基準のいずれか1つを総合的にまたは個々に、満たす場合、これは本明細書で開示される組成物または方法であることを当業者は理解するということが理解される。

【0047】

本発明は、マイコバクテリア抗原に関連するポリペプチドを提供する。本明細書において用いる場合、ポリペプチドという用語は、従来の意味で、すなわちアミノ酸の配列として用いられる。このポリペプチドは、特定の長さの生成物には限定されず；従って、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質は、ポリペプチドの定義内に含まれ、そしてこのような用語は、他に特に示されない限り、本明細書において交換可能に用いられ得る。この用語はまた、天然に存在し、天然には存在しない両方の、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに当該分野で公知の他の修飾を指すこともなく、または除外することもない。ポリペプチドは、タンパク質全体であっても、またはその小配列であってもよい。本発明の文脈における目的の特定のポリペプチドは、エピトープ、すなわち、ポリペプチドの免疫原性特性を実質的に担い、かつ免疫応答を惹起し得る抗原性決定基を含むアミノ酸配列である。

【0048】

従って、細菌のポリペプチドもしくは細菌のタンパク質、またはさらに詳細には、マイコバクテリアのポリペプチドまたはマイコバクテリアのタンパク質とは、本明細書に開示される疾患を有する被験体のかなりの割合から単離されたサンプルに存在する本発明のポリペプチド配列を一般にいう。本発明のポリペプチド配列は、感染された細胞におけるその発現に基づいて、本明細書に開示される疾患を有する個体から単離され、下にさらに記載されるように、診断マーカーとして、そして治療剤としての両方で特定の有用性を有する。薬剤及び標的という用語は、選択されたタンパク質または他の分子と相互作用する能力について試験されるべき化合物または他の分子を指す。標的という用語の使用についての変動の例としては、限定はしないが、標的分子、標的基質、標的核酸分子、標的領域、標的細胞が挙げられ、そして各々の場合に、標的のタイプを指す。本発明の1つの特定の実施形態では、細菌ポリペプチドまたは細菌タンパク質は、Rv3874 (Cfp-10)、Rv3873 (Esat-6)、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cを含む。

【0049】

本明細書に記載されるポリペプチドは、罹患していない個体由来のサンプルに比較した場合、結核または他のマイコバクテリア疾患を有する被験体由来のサンプルと、それらのポリペプチドとの種々の反応性によって特定され得る。例えば、本明細書に記載されるポリペプチドは、罹患していない個体由来のサンプルに対する反応性の欠如と比較した場合、結核または他のマイコバクテリア疾患を有する被験体由来のサンプルと、それらのポリペプチドとの反応性によって特定され得る。本明細書において用いる場合、反応性の欠如という用語は、所定のアッセイ方法についてのバックグラウンドよりも1.5倍低い任意の反応性を意味する。本明細書において用いる場合、反応性またはより高い反応性という用語は、所定のアッセイについてバックグラウンドを少なくとも1.5倍こえた反応性を指す。さらに、本明細書に記載されるポリペプチドは、罹患していない個体由来のサン

10

20

30

40

50

ルに対するそれらの高い反応性に比較した場合、結核または他のマイコバクテリア疾患を有する被験体由来のサンプルとのそれらの反応性によって特定され得る。さらに、本明細書に記載されるポリペプチドは、罹患していない個体由来のサンプルに対するそれらの低い反応性に比較した場合、結核を有する被験体由来のサンプルとのそれらのポリペプチドとの反応性によって特定され得る。本明細書において用いる場合、反応性が低いという用語は、比較ポイントより小さくてもよく、そして反応性の欠如を包含してもよい。

【0050】

必要に応じて、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントは、免疫原性である。免疫原性活性のスクリーニングは、当業者に周知の技術を用いておこなわれ得る。例えば、このようなスクリーニングは、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載される方法などの方法を用いて行われてもよい。1つの例示的な例では、ポリペプチドは、固体支持体上に固定されてもよく、そして被験体血清と接触されて、免疫されたポリペプチドに対するこの血清内の抗体の結合が可能にさせられる。

10

【0051】

固体支持体は、固体状態の基板または支持体であり、ここに分子、例えば、分析物および分析物結合分子が会合され得る。分析物、例えば、石灰化ナノ粒子およびタンパク質が、固体支持体と直接または間接的に会合され得る。例えば、分析物は、固体支持体上に直接固定されてもよい。分析物捕獲剤、例えば、捕獲化合物も、固体支持体上に固定され得る。固体支持体の好ましい形態はアレイまたはチップである。別の形態の固体支持体はアレイ検出器である。アレイ検出器は、固体支持体であり、これに複数の異なる捕獲化合物または検出化合物がアレイ、格子または他の組織化されたパターンで結合されている。

20

【0052】

固体支持体における使用のための固体状態基板は、任意の固体材料を含んでもよく、ここに分子が結合され得る。これには、アクリルアミド、アガロース、セルロース、ニトロセルロース、ガラス、ポリスチレン、ポリエチレン酢酸ビニル、ポリプロピレン、ポリメタクリレート、ポリエチレン、ポリエチレンオキシド、ポリシリケート、ポリカーボネート、テフロン（登録商標）、フルオロカーボン、ナイロン、シリコン・ラバー、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリオルトエステル、ポリプロピルフメレート（polypropylfumerate）、コラーゲン、グリコサミノグリカンおよびポリアミノ酸などの物質を挙げることができる。固体状態の基板は、薄膜、膜、ボトル、ディッシュ、ファイバー、織り線維、成型ポリマー、粒子、ビーズ、マイクロ粒子または組み合わせを含む任意の有用な形態を有し得る。固体状態の基板および固体支持体は、多孔性であっても、非多孔性であってもよい。固体状態基板のための好ましい形態は、マイクロタイターディッシュ、例えば、標準の96ウェル型である。好ましい実施形態では、通常1ウェルあたり1アレイを含むマルチウェルガラススライドが使用され得る。この特徴によって、アッセイ再現性のさらに優れた制御、処理能力の向上、およびサンプル取り扱い、ならびに容易な自動化が可能になる。

30

【0053】

種々の化合物をセットとして一緒に用いてもよい。このセットは、別々の反応で別々に用いられる化合物の全てまたはサブセットの混合物として用いられても、またはアレイに固定されてもよい。別々に用いられるかまたは混合物として用いられる化合物は、例えば、固体支持体との会合またはその上の固定を通じて物理的に分けることが可能であり得る。アレイは、そのアレイ上の特定された位置または予め規定された位置に固定された複数の化合物を含み得る。アレイ上の各々の予め規定された位置は一般に、1つのタイプの成分を有し得る（すなわち、その位置の全ての成分が同じである）。各々の位置は、複数のコピーの成分を有する。アレイ中の異なる成分の空間的分離によって、本明細書に開示されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドの別々の検出および特定が可能になる。

40

【0054】

50

固体状態の基板に対して抗体（および他のタンパク質）を固定するための方法は十分確立されている。固定は、標準的な固定化学を用いて、例えば、アミノ化表面、カルボキシル化表面または水酸化表面に対する結合によって達成され得る。結合剤の例は、臭化シアン、スクシンイミド、アルデヒド、塩化トシル、アビジン-ビオチン、光架橋剤、エポキシドおよびマレイミドである。好ましい結合剤は、異種二機能性（heterobifunctional）架橋剤 N - [- マレイミドブチリルオキシ] スクシンイミドエステル（GMBS）である。これらおよび他の結合剤、および結合でそれらを使用するための方法は、Protein immobilization: fundamentals and applications、Richard F. Taylor、編（M. Dekker、New York、1991）；Johnstone and Thorpe、Immunochemistry In Practice（Blackwell Scientific Publications、Oxford、England、1987）頁209～216および241～242、ならびにImmobilized Affinity Ligands；Craig T. Hermansonら編（Academic Press、New York、1992）に記載されており、これらは、固体状態の基板に対して抗体を結合する方法についてその全体が参照によって援用されている。

【0055】

固体支持体上に固定された各々の成分は好ましくは、固体支持体の異なる所定の領域に位置する。各々の異なる所定の領域は、お互いの異なる領域とは物理的に隔てられ得る。固体支持体の異なる所定の領域の間の距離は、固定であっても可変であってもよい。例えば、アレイでは、各々の成分は、お互いから固定距離に配列され得るが、ビーズと会合された成分は、固定された空間関係ではない。詳細には、複数の固体支持体ユニット（例えば、複数のビーズ）の使用によって、距離は可変になる。

【0056】

成分は、任意の密度で固体支持体に会合されるか、または固定されてもよい。成分は好ましくは、1立方センチメートルあたり400を超える異なる成分という密度で固体支持体に固定される。成分のアレイは、多数の成分を有し得る。例えば、アレイは、固体支持体上に固定された少なくとも1,000個の異なる成分、固体支持体上に固定された少なくとも10,000個の異なる成分、固体支持体上に固定された少なくとも100,000個の異なる成分、または固体支持体上に固定された少なくとも1,000,000個の異なる成分を有し得る。

【0057】

必要に応じて、固体支持体上の少なくとも1つのアドレスを、本明細書に開示されるタンパク質またはそのタンパク質をコードする核酸配列のいずれかに示される配列または配列の一部から選択する。固体支持体はまた、本明細書に開示されるタンパク質またはそのタンパク質をコードする核酸配列のいずれかに示される配列または配列の一部の改変体である少なくとも1つのアドレスを含んでもよい。

【0058】

また開示されるのは、抗体応答の複数の特徴付けのための抗原マイクロアレイである。例えば、開示されるのは、マイクロリットル未満の量の生物学的なサンプルを用いる、構造的に多様な抗原に対する抗体応答の大規模複数特徴づけを行うために、抗原アレイを構築および用いる技術についてその全体が参照によって本明細書に援用される、Robinsonら、Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses、Nat Med、8(3):295-301(2002)に記載されるような、マイクロリットル未満の量の生物学的なサンプルを用いる、本明細書に記載のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体に対する抗体応答の大規模な複数の特徴付けを行うための、抗原アレイおよび小型化抗原アレイである。

【0059】

10

20

30

40

50

Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800c、Cfp-10 (Rv3874)、およびEsat6 (Ru3875)をコードするタンパク質配列およびそれぞれの核酸が本明細書に開示される。M. tuberculosis 遺伝子およびそれらの関連のタンパク質に関する情報は、例えば、ウェブサイト、<http://www.doe-mbi.ucla.edu/TB/PUBLIC/qs/annotsearch.php?annot=>に見出すことが可能で、これは、その全体が参照によって本明細書に援用される。このウェブサイトは、University of California Los Angeles (UCLA) Institute for Proteomics and Genomicsによって運営されており、これは、M. tuberculosisのゲノム全体を含み、そしてM. tuberculosisの遺伝子についての情報、そして公知の場合は、それらの関連タンパク質の機能についての情報を含む。このような情報としては、限定はしないが、ゲノム情報(例えば、核酸配列)、プロテオミクス情報(例えば、タンパク質配列)、機能的情報、相同配列、モチーフおよびドメインが挙げられる。本発明の保存的置換および相同性の説明は、任意の組み合わせ、例えば、特定の配列に対して少なくとも70%の相同性を有し、この改変体が1つ以上の保存的置換を含む実施形態と一緒に合わされてもよい。

10

20

30

40

50

【0060】

さらに、開示された組成物に組み込まれ得る多数のアミノ酸およびペプチドアナログが存在することが理解される。アミノ酸アナログおよびアナログおよびペプチドアナログはしばしば、増強されたまたは所望される特性、例えば、より経済的な生成、より大きい化学的安定性、増強された薬理学的特性(半減期、吸収、力価、有効性など)、特異性の変更(例えば、生物学的な活性の広いスペクトル)、低下または増強された抗原性、などを有する。

【0061】

D-アミノ酸は、より安定なペプチドを生成するために用いられ得る。なぜならDアミノ酸は、ペプチダーゼなどでは認識されないからである。同じタイプのDアミノ酸を有するコンセンサス配列の1つ以上のアミノ酸の体系的な置換(例えば、Lリジンの代わりにDリジン)を用いて、より安定なペプチドを生成してもよい。システイン残基は、2つ以上のペプチドと一緒に環化または結合するために用いられ得る。これは、ペプチドを特定の構成に強制するために有益であり得る(参照によって本明細書に援用される、RizzoおよびGierasch Ann. Rev. Biochem. 61 : 387 (1992))。

【0062】

また開示されるのは、融合ポリペプチドである。ポリペプチドは、本明細書に記載されるような複数のポリペプチドを含むか、または本明細書に記載されるような少なくとも1つのポリペプチドおよび無関係の配列、例えば、公知の細菌タンパク質を含む融合ポリペプチドであってもよい。融合のパートナーは例えば、ヘルパーTエピトープ(免疫学的な融合パートナー)、好ましくはヒトによって認識されるTヘルパーエピトープを提供することを補助してもよいし、またはネイティブな組み換えタンパク質よりも高収率でタンパク質(発現エンハンサー)を発現することを補助してもよい。特定の好ましい融合パートナーは、免疫学的融合パートナーおよび発現増強融合パートナーの両方である。他の融合パートナーは、ポリペプチドの溶解度を増大するように選択されても、またはポリペプチドが所望の細胞内区画に標的されることを可能にするように選択されてもよい。なおさらなる融合パートナーとしては、ポリペプチドの精製を容易にするアフィニータグが挙げられる。

【0063】

本明細書は、種々のポリペプチドおよびポリペプチド配列を考察するので、それらのポリペプチド配列をコードし得る核酸も開示されることが理解される。これは、特定のポリペプチド配列に関連する全ての縮重配列、すなわち、1つの特定のポリペプチド配列をコードする配列を有する全ての核酸、ならびにタンパク質配列の開示された改変体および誘

導体をコードする縮重核酸を含む全ての核酸を包含する。従って、各々の特定の核酸配列は、本明細書に記載されなくてもよいが、各々のそしてあらゆる配列は、実際には開示されており、そしてその開示されたポリペプチドを通じて本明細書に記載されていることが理解される。

【0064】

本明細書に開示されるのは、本明細書に開示されるタンパク質、特にRvタンパク質、例えば、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、およびRv3800cをコードするポリヌクレオチド内で相互作用し得る機能的な核酸である。機能的な核酸は、特定の機能、例えば、標的分子もしくは因子に結合すること、または特定の反応を触媒することを有する核酸分子である。機能的な核酸分子は、限定は意味しないが、以下のカテゴリーに分けられてもよい。例えば、機能的な核酸としては、アンチセンス分子、siRNA、shRNA、アプタマー、リボサーム、三重らせん形成分子、および外部ガイド配列が挙げられる。機能的な核酸分子は、標的分子または因子によって保有される特定の活性のエフェクター、インヒビター、モジュレーター（調節因子）およびステイミュレーター（刺激因子）として作用してもよいし、または機能的な核酸分子は、任意の他の分子と独立した新規な（de novo）活性を保有してもよい。

10

【0065】

本明細書に開示されるのは、制御エレメントに作動可能に連結された本明細書に開示されるタンパク質に相当するポリヌクレオチドを含む発現ベクターである。また、本明細書に開示されるタンパク質に相当するポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換されるかまたはトランスフェクトされた宿主細胞も本明細書に開示される。また、本発明のポリヌクレオチドを細胞内に送達する方法も本明細書に開示される。また、発現ベクターを用いて形質転換されるかまたはトランスフェクトされた宿主細胞も開示される。

20

【0066】

細胞に対して、インピトロまたはインピボのいずれかで核酸を送達するために用いられ得る、多数の組成物および方法が存在する。これらの方法および組成物は大きく2つのクラスに分けられる：ウイルスベースの送達系および非ウイルスベースの送達系。例えば、核酸は、多数の直接送達系、例えば、エレクトロポレーション、リポフェクチン、リン酸カルシウム沈澱、プラスミド、ウイルスベクター、ウイルス核酸、ファージ核酸、ファージ、コスミドを通じて、または陽イオン性リポソームのような細胞もしくはキャリアにおけるゲノム物質の移入を介して送達され得る。トランスフェクションのための適切な手段としては、ウイルスベクター、ケミカル・トランスフェクタント、または物理化学的方法、例えば、エレクトロポレーションおよびDNAの直接拡散が挙げられ、これは、例えば、Wolff, J. A., *Science*, 247, 1465-1468, (1990); および Wolff, J. A. *Nature*, 352, 815-818, (1991) に記載される。このような方法は、当該分野で周知であり、そして本明細書に記載される組成物および方法での使用に容易に適合可能である。特定の場合には、この方法は、大きいDNA分子で特異的に機能するように改変される。さらに、これらの方法は、キャリアの特徴を標的することを用いることによって、特定の疾患および細胞集団を標的するために用いられ得る。

30

40

【0067】

発現ベクターを用いて、例えば、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、またはRv3800cの発現を調節するために有用な本明細書に開示される組成物を発現してもよい。発現ベクターは真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒトまたは核のある細胞）で用いてもよいし、そしてまた、mRNA発現に影響し得る転写の終止に必要な配列も含んでもよい。これらの領域は、組織因子タンパク質をコードするmRNAの非翻訳部分におけるポリアデニル化セグメントとして転写される。3'非翻訳領域はまた、転写終止部位を含む。転写ユニットはまた、ポリアデニル化領域を含むことが好ましい。この領域の1利点は、転写ユニットがプロセシングされ、そしてmRNAのように輸送される確率を増大させるということである。発現構築物におけるこ

50

の同定およびポリアデニル化シグナルの使用は、十分確立されている。相同なポリアデニル化シグナルが導入遺伝子構築物で用いられることが好ましい。特定の転写ユニットでは、ポリアデニル化領域は、SV40ポリアデニル化シグナル由来であり、そして約400塩基からなる。

【0068】

この開示されたベクターは、実質的な毒性なしに哺乳動物染色体へ組み込み得るDNA分子を提供する。

【0069】

ウイルスおよびレトロウイルスベクターにおいて挿入された核酸は通常、所望の遺伝子産物の発現を制御することを補助するためのプロモーターまたはエンハンサーを含む。プロモーターは一般に、転写開始部位に関して相対的に固定された位置にあるとき機能する配列またはDNAの配列である。プロモーターは、RNAポリメラーゼおよび転写因子の基本的な相互作用に必要なコアエレメントを含み、そして上流エレメントおよび応答エレメントを含んでもよい。

10

【0070】

本明細書において用いる場合、抗体という用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方を包含する。インタクトな免疫グロブリン分子に加えて、また開示されるのは、それらが本明細書に開示されるポリペプチドと相互作用する能力について選択される限り、それらの免疫グロブリン分子の抗体フラグメントまたはポリマー、ならびにその免疫グロブリン分子またはフラグメントのヒトバージョンまたはヒト化バージョンである。

20

【0071】

本明細書において用いる場合、抗体フラグメントという用語は、完全な抗体の一部を意味するものとする。完全な抗体とは、2つの完全な軽鎖および2つの完全な重鎖を有する抗体をいう。抗体フラグメントは、1つ以上の鎖の全てまたは一部を欠く。抗体結合体における使用のための抗体フラグメントは、抗原に結合し得る。好ましくは、この抗体フラグメントは、抗原に特異的である。抗体または抗体フラグメントは、他のエpitepよりもあるエpitepに有意に大きい親和性で結合する場合、その抗原に特異的である。この抗体または抗体フラグメントは、本明細書に記載されるインビトロアッセイを用いて、または類似の方法によって、それらの所望の活性について試験され得、その後、それらのインビボの治療または予防活性を公知の化学的試験方法に従って試験する。

30

【0072】

本明細書において用いる場合、抗体（単数または複数）という用語はまた、ヒト抗体またはヒト化抗体を指してもよい。多くの非ヒト抗体（例えば、マウス、ラット、またはウサギ由来の抗体）はヒトでは当然ながら抗原性であり、従って、ヒトに投与される場合、所望されない免疫応答を惹起し得る。従って、この方法でのヒト抗体またはヒト化抗体の使用は、ヒトに投与される抗体が所望されない免疫応答を惹起する機会を減らすように機能する。

【0073】

開示されたヒト抗体は任意の技術を用いて調製され得る。ヒトモノクローナル抗体生成のための技術の例としては、Coleら（*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985）によって、そしてBoeraerら（*J. Immunol*, 147(1): 86-95, 1991）によって記載される技術が挙げられる。ヒト抗体（およびそのフラグメント）はまた、ファージディスプレイライブラリーを用いて生成されてもよい（Hoogenboomら, *J. Mol. Biol.*, 227: 381, 1991; Marksら, *J. Mol. Biol.*, 222: 581, 1991）。

40

【0074】

開示されたヒト抗体はまた、トランスジェニック動物から得られてもよい。例えば、免疫に应答して、ヒト抗体のフルレパートリーを生成し得る、トランスジェニックの変異マ

50

ウスが記載されている（例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551~255 (1993); Jakobovitsら、Nature, 362: 255~258 (1993); Bruggemannら、Year in Immunol, 7: 33 (1993)を参照のこと）。詳細には、これらのキメラおよび生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖連結領域（J(H)）遺伝子のホモ接合性欠失は、内因性の抗体産生の完全な阻害を生じ、そしてこのような生殖系列変異マウスへのヒト生殖系列抗体遺伝子アレイの首尾よい移入は、抗原チャレンジの際にヒト抗体の産生を生じる。

【0075】

本明細書に開示されるのは、細胞または被験体に対する投与のための薬学的に受容可能なキャリア中に、単独で、または治療の1つ以上の他の様式と組み合わせた、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、T細胞、TCRまたはAPC組成物である。例えば、本明細書で開示されるのは、本明細書に記載されるような薬学的に受容可能なキャリアおよびポリペプチドを含む組成物である。このような組成物はインビボで投与され得る。本明細書において用いる場合、薬学的に受容可能という用語は、生物学的ではないが、そうでなければ所望されない物質を含むことを意味する。すなわち、この物質は、被験体に対して、ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドまたはベクターとともに、含まれる薬学的組成物の任意の他の成分と有害な方式でいかなる所望されない生物学的効果も相互作用も生じることなく、投与されてもよい。このキャリアは通常は、当業者に周知であるとおり、活性成分の任意の分解を最小化するように、そして被験体における任意の有害な副作用を最小化するように選択される。

10

20

【0076】

この組成物は経口的に、非経口的に（例えば、静脈内に）、筋肉内に、腹腔内に、経皮的に、体外で、局所に、または吸入薬によって投与され得る。吸入薬による組成物の投与は、噴霧または滴下機構による送達を介して鼻または口を通じてもよい。

【0077】

必要な組成物の正確な量は、被験体の種、年齢、体重および全身状態、処置されている疾患の重篤度、用いられる特定の核酸またはベクター、その投与方式などに依存して被験体間で変化する。従って、あらゆる組成物についての正確な量を特定することは不可能である。しかし、適切な量は、本明細書における技術を与える慣用的な実験のみを用いて当業者によって決定され得る。

30

【0078】

この組成物の非経口投与が用いられるならば、一般には、注射によって特徴づけられる。注射液は、従来形態で、液体溶液または懸濁液として、注射前の液体における懸濁液の溶液に適切な固体形態で、またはエマルジョンとして調製されてもよい。非経口投与のためのさらに最近修正されたアプローチは、一定の投薬量が維持されるような緩徐な放出または徐放性のシステムの使用に関する。例えば、非経口投与のためのアプローチの教示のためにその全体が参照によって本明細書に援用される、米国特許第3,610,795号を参照のこと。

【0079】

非経口投与のための調製としては、滅菌の水溶液または非水性溶液、懸濁液およびエマルジョンが挙げられる。非水性の溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えば、オリーブ油、および注射用有機エステル、例えば、オレイン酸エチルである。水性キャリアとしては、水、アルコール溶液/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられ、これには生理食塩水および緩衝化媒体を含む。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム水溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル、または固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、液体および栄養補給物、電解質補給物（例えば、リンゲルデキストロースに基づくもの）、などが挙げられる。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどのような防腐剤および他の添加物も存在してもよい。

40

50

【 0 0 8 0 】

局所投与のための処方物としては、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐剤、スプレー、液体および粉末を挙げることができる。従来の薬学的なキャリア、水溶液、粉末または油状基剤、増粘剤などが必要であるかまたは所望され得る。

【 0 0 8 1 】

経口投与のための組成物は、粉末または顆粒、懸濁液または溶液を、水または非水性の媒体、カプセル、子袋 (s a c h e t s) または錠剤に含む。増粘剤、香味料、希釈剤、乳化剤、分散補助剤または結合剤が所望され得る。

【 0 0 8 2 】

マイコバクテリア属関連疾患を処置、阻害または予防するための、抗体のような開示された組成物の投与後に、治療抗体の有効性は、当業者に周知の種々の方法で評価され得る。例えば、本明細書に開示される抗体のような組成物は、この組成物が疾患の症状またはマーカーを減らすことを観察することによって被験体でのマイコバクテリア関連疾患を処置または阻害するのに有効であることを、当業者は理解する。

10

【 0 0 8 3 】

本明細書に開示されるマイコバクテリア属関連疾患を阻害する組成物は、マイコバクテリア属関連疾患のリスクがある被験体に予防的に投与され得る。

【 0 0 8 4 】

この開示された組成物および方法はまた、例えば、種々のマイコバクテリア属関連疾患の新規な薬物候補物を単離および試験するためのツールとして用いられ得る。

20

【 0 0 8 5 】

さらに、本明細書に記載されるタンパク質は、マイコバクテリア属感染の進行についてマーカーとして用いられ得る。マイコバクテリア属関連疾患の診断のための上記のアッセイは、経時的に行われてもよく、そして相対的なポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルの変化が評価され得る。例えば、このアッセイは、6 ヶ月 ~ 1 年の期間にわたって 2 4 ~ 7 2 時間ごとに行われてもよく、その後に必要なに応じて行われてもよい。一般には、結核は、例えば、検出されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルが経時的に増大する被験体では進行している。さらに、本明細書に記載される組成物は、例えば、結核菌に特異的な抗体のレベルをモニターするために用いられ得る。

30

【 0 0 8 6 】

本明細書において注記されるとおり、感度を改善するためには、複数の細菌タンパク質を所定のサンプル内でアッセイしてもよい。本明細書において提供される種々のポリペプチドまたは抗体に特異的な結合因子は、単一のアッセイ内で組み合わせられてもよい。さらに、複数のプライマーまたはプローブを同時に用いてもよい。細菌ポリペプチドの選択は、最適の感度を生じる組み合わせを決定するための慣用的な実験に基づいてもよい。さらに、あるいは、本明細書に提供される細菌のポリペプチドまたは抗体のアッセイは、他の公知の細菌抗原、例えば、C f p - 1 0 または E s a t - 6 についてのアッセイと組み合わせられてもよい。

【 0 0 8 7 】

また本明細書に開示されるのは、固体支持体に必要に応じて結合された R v 0 6 8 6 、 R v 2 1 5 1 c 、 R v 2 2 4 0 c 、 R v 3 5 9 6 c 、 および R v 3 8 0 0 c からなる群に対する少なくとも 1 つの抗体、またはそれらの群から選択される少なくとも 1 つのポリペプチドを備える、またはさらに固体支持体への結合のための手段を備えるキットである。このキットは必要に応じて、抗体のフラグメントまたはポリペプチドを含んでもよい。このキットは必要に応じて、C f p - 1 0 を特異的に認識する抗体、もしくは E s a t - 6 を特異的に認識する抗体を備えてもよく、またはポリペプチド (C f p - 1 0 および / または E s a t - 6) もしくはそのフラグメントを備えてもよい。また、C f p - 1 0 および / または E s a t - 6 ならびに本明細書に開示される R v タンパク質によるその任意の改変の存在に回答して I F N - (または任意の他のサイトカイン) を測定するキットも開示される。

40

50

【0088】

Rvタンパク質は、潜伏性の *Mycobacterium tuberculosis* 感染を検出するために用いられ得る、QuantIFERON (登録商標) - TB 試験 (QFT) または QuantIFERON - TB Gold 試験 (QFT - G) (Cell testis Limited; Carnegie, Victoria, Australia) などの市販のキットと組み合わせて用いられてもよい。これらの試験は、*M. tuberculosis* に対する細胞媒介性の免疫反応の構成要素を測定するインビトロの診断補助である。この試験は、*M. tuberculosis* およびコントロールの抗原由来の精製タンパク質誘導体 (purified protein derivative) (PPD) とともに一晩インキュベートされた全血中で感作されたリンパ球から放出されるインターフェロン (IFN -) の定量に基づく。

10

【0089】

本明細書に開示されるタンパク質はまた、活動性および潜伏性の両方の結核感染を診断するのにおける補助として長年用いられており、かつ PPD の皮内注射の 48 ~ 72 時間後の遅延型過敏症反応の測定を包含するツベルクリン皮膚試験 (tuberculin skin testing) (TST) と組み合わせて用いられてもよい。

【0090】

このキットは、本明細書に開示されるか、または開示された方法の実施において必要であるかもしくは有益であると理解される任意の試薬もしくは試薬の組み合わせ、および容器またはアッセイのプラットフォームを備えてもよい。例えば、本明細書に開示されるのは、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c または Rv3800c のうちの1つ以上に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含むキットである。また本明細書で開示されるのは、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800c、またはその改変体もしくはフラグメントのうちの1つ以上を備えるキットであって、ここでこのポリペプチドは、固体支持体に結合されるか、またはこのキットは固体支持体に対する結合のための手段を備える。このキットは、Cfp - 10 または Esat - 6 に関連するポリペプチドまたは抗体を備えてもよい。

20

【0091】

また、化合物、試薬、容器または装置を備えるキットも開示される。試薬としてはアッセイで用いられるべき緩衝液が挙げられ得る。このようなキットはまた、あるいは、直接または間接的な検出に適切なレポーター基を含む検出試薬を備えてもよい。必要に応じて、キットは、生物学的サンプル中で細菌ポリペプチドをコードする mRNA のレベルを検出するように設計されてもよい。このようなキットは一般には、細菌ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする、上記のような、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのプロブまたはプライマーを備える。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、PCR または ハイブリダイゼーションアッセイ内で用いられてもよい。このようなキット内に存在し得るさらなる構成要素としては、細菌タンパク質をコードするポリヌクレオチドの検出を容易にするための第二のオリゴヌクレオチドまたは診断の試薬もしくは容器が挙げられる。

30

【0092】

必要に応じて、キットは、生物学的サンプルにおける細菌タンパク質に特異的な抗体のレベルを検出するように設計されてもよい。

40

【0093】

また、マイコバクテリアにおいてタンパク質間会合を研究するためのシステムである、M - PFC システムも本明細書において開示される。このシステムは、Mtb の病原性機構およびタンパク質間の会合を通じた他の機能的経路の研究を可能にするように開発されている。このアプローチでは、2つのマイコバクテリア相互作用タンパク質との、mDHF R 相補性フラグメント ([F1, 2] および [F3]) などの酵素レポーターの独立した遺伝的カップリングによって、内因性のマイコバクテリア DHF R 活性が阻害される濃度で、インビボで、酵素レポーター活性、この例では、mDHF R 活性の再構成がもたら

50

される。この相補性事象の読み出しは、T R I Mに抵抗性のマイコバクテリアクローンの選択を可能にするm D H F Rフラグメント[F 1 , 2]および[F 3]のインビボ再構成である。重要なことに、F [1 , 2]およびF [3]を2つの相互作用タンパク質と融合するときだけ、ヘテロ二量体化がm D H F Rの再構成を生じる。酵母およびE . c o l iなどの代用宿主ではなくマイコバクテリアでタンパク質会合を研究することの重要な利点は、適切な修飾(例えば、リン酸化)、補因子および天然の宿主に固有の排他的な細胞内環境が、相互作用の結果を調節し得るということである。

【 0 0 9 4 】

m D H F Rは、2つのドメイン; アデニン結合ドメイン(F [2])および不連続ドメイン(F [1] および F [3])を含む3つの構造的なフラグメント(F [1]、F [2] および F [3])を含む小さい21 k D aのモノマータンパク質である。この特性は、M - P F Cシステムを形成するように開発されてもよい。このM - P F Cシステムは、宿主としてモデル生物体M y c o b a c t e r i u m s m e g m a t i s (M s m)を用いてインビボでタンパク質間会合を精査する。この戦略は、2つのマイコバクテリア相互作用タンパク質AおよびBが、それぞれm D H F R相補性フラグメントF [1 , 2]およびF [3]に独立して融合され、そしてマイコバクテリア中に同時形質転換される場合、A F [1 , 2]およびB F [3]のインビボ会合によって、活性なm D H F R酵素へのこのフラグメントの機能的な再アセンブリが容易になるという事実に基づく。相互作用タンパク質に対する小さいタグ(F [1 , 2]、105 a aおよびF [3]、80 a a)の付加は、タンパク質間会合にごく最小限に影響するだけである。原核生物および真核生物のD H F Rが抗葉酸薬物T R I Mの標的であるという事実にかかわらず、哺乳動物のD H F Rは、細菌のD H F Rが有するよりもT R I Mに12,000倍低い親和性を有する。T R I MによるマイコバクテリアD H F Rのこの選択的な標的化は、M - P F Cシステムの基礎であり、これによって内因性M s m D H F Rを阻害するT R I M濃度の存在下でm D H F Rを発現する組み換えマイコバクテリアの増殖をスクリーニングできる(図1に図示されるとおり)。相互作用タンパク質に融合されたm D H F Rの相補性フラグメントを発現するマイコバクテリア細胞は、T R I Mを含む媒体中で生存し得る。M s mを、M - P F C実験のための宿主として選択した。なぜなら、この系統は、T R I M(7H11では約40 μ g / m l)に感受性であり、かつ非病原性の急速な増殖であり、M t b遺伝子調節および分泌を研究するための優れた代用宿主であることが示されたからである。

【 0 0 9 5 】

図1に示されるとおり、相互作用タンパク質AおよびBは、相補的なm D H F RフラグメントF [1 , 2]およびF [3]に融合される。M s m中でのA - F [1 , 2]およびB - F [3]の融合の同時形質転換によって、T R I Mプレート上でのm D H F R活性の機能的な再構成および引き続き増殖が生じるが、相互作用しないタンパク質(AおよびC)はF [1 , 2]およびF [3]を再構成せず、そして、T R I Mプレート上で形質転換体が生存することを可能にしない。

【 0 0 9 6 】

毒性の経路は、分子相互作用の複雑な経路によって媒介され、この破壊の際には、タンパク質間の会合が変化する。従って、タンパク質間相互作用によって直接のリンクまたは役割が示されるが、一方遺伝子破壊実験は間接的な指標である。

【 0 0 9 7 】

M - P F Cによって、M t bにおけるタンパク質分泌の機構に対する知識が生じ得、そしてC f p - 10分泌経路のいくつかの新規な成分が特定された。M - P F Cは、マイコバクテリアでのタンパク質間会合を研究するように首尾よく実行されている。M s mでのいくつかの公知のタンパク質間相互作用が研究されており、そして相互作用の強度を可視化かつ定量するためにアッセイが開発された(実施例1)。M - P F Cは、C f p - 10と会合するタンパク質のM t bライブラリーをスクリーニングすることによって試験されかつ確認されている。M - P F Cシステムは、M t bの持続性および病原性に関与する新

10

20

30

40

50

規な毒性の経路を特定かつ特徴づけする能力を有する。

【0098】

さらに開示されるのは、酵素の別々のフラグメントの再アセンブリを含むマイコバクテリウム属での分子相互作用の検出のためのアッセイであって、この酵素フラグメントの再アセンブリは、各々の酵素フラグメントに融合された分子ドメインの相互作用によって作動され、この酵素フラグメントの再アセンブリは、他の分子プロセスとは独立しており、そしてこの再アセンブリは、この酵素の活性の再構成の方法によって検出される。マイコバクテリウム属は、例えば、*M. smegmatis* であっても、*M. tuberculosis* であっても、または *M. avium* であってもよい。

【0099】

また、マイコバクテリウム属で生体分子相互作用を検出するための方法であって、この方法は、酵素のレポーター分子の第一のフラグメントと第一のポリペプチドとを含む第一の融合タンパク質と、この酵素レポーター分子の異なるフラグメントと第二のポリペプチドとを含む第二の融合タンパク質との間の会合をマイコバクテリウム属の細胞において検出する工程を包含し、この融合タンパク質の会合が、酵素レポーター分子の再アセンブリおよび酵素レポーター活性の再構成を生じ、そしてこの第一のポリペプチドと第二のポリペプチドとの間の生体分子相互作用が、この酵素レポーター分子の活性を検出することによって測定される、方法も開示される。

【0100】

また、第一の酵素分子のフラグメントが、第二の分子に融合され、そしてフラグメントの会合が第一の酵素分子の活性の再構成によって検出される、マイコバクテリウム属におけるアッセイを含む方法も開示される。

【0101】

また、マイコバクテリウム属のポリペプチドと相互作用するペプチドについてマイコバクテリア属ペプチドのDNAライブラリーをスクリーニングする方法も開示され、この方法はDNAライブラリー由来のペプチドとマイコバクテリウム属のポリペプチドとの間の相互作用が、酵素活性の再構成によって検出される酵素相補性アッセイを行う工程を包含する。

【0102】

本明細書に開示されるのは、Cfp-10と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはその改変体もしくはフラグメントとの間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって、この方法は、Cfp-10に融合された酵素レポーター分子のフラグメントを含む第一の融合タンパク質およびRv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはその改変体もしくはフラグメントのうちの1つに融合された酵素レポーター分子の第二のフラグメントを含む第二の融合タンパク質を発現するマイコバクテリウム属の細胞と、この因子とを、この因子の非存在下において酵素レポーター分子活性を再構成するようにこの第一および第二の融合タンパク質が正常に会合する条件下で接触させる工程と；この酵素レポーター分子の活性における変化を検出する工程と、を包含する。この酵素レポーター分子の活性における変化は、この因子が、Cfp-10と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはその改変体もしくはフラグメントとの間の相互作用を調節する因子であるということを示す。

【0103】

開示されるのは、Esat-6と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはその改変体もしくはフラグメントとの間の相互作用を調節する因子を特定する方法であって、この方法は、Esat-6に融合された酵素レポーター分子のフラグメントを含む第一の融合タンパク質およびRv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはその改変体もしくはフラグメントのうちの1つに融合された酵素レポーター分子の第二のフラグメントを含む第二の融合タンパク質を発現するマイコバクテリウム属の細胞と、この因子とを、この因

10

20

30

40

50

子の非存在下において酵素レポーター分子活性を再構成するようにこの第一および第二の融合タンパク質が正常に会合する条件下で接触させる工程と；この酵素レポーター分子の活性における変化を検出する工程と、を包含し、この酵素レポーター分子の活性における変化は、この因子が、Esat-6と、Rv0686、Rv2151c、Rv2240c、Rv3596c、Rv3800cまたはその改変体もしくはフラグメントとの間の相互作用を調節する因子であるということを示す。

【0104】

上記の例では、この酵素は、マウスのジヒドロ葉酸還元酵素 (mDHFR) であってもよい。非限定的な例の目的で、マイコバクテリウム属は、M. smegmatis、M. tuberculosis、M. bovis、M. bovis BCG、M. marinumまたはM. aviumであってもよい。

10

【0105】

従って、本明細書に開示されるのは、他のタンパク質、核酸、炭水化物を含む他の分子とのマイコバクテリウム属における相互作用を検出するため、または潜在的な治療価値の化合物について低分子ライブラリーをスクリーニングするためのストラテジーである。好ましい実施形態では、本発明は、モノマー酵素のフラグメントのオリゴマー形成補助相補性 (oligomerization-assisted complementation) であって、それらの活性の検出のために他のタンパク質を必要としない相補性を得ようとする。1つのこのような実施形態では、E. coliにおける酵素の規定のフラグメントの相補性によるジヒドロ葉酸還元酵素活性の再構成に基づくタンパク質-フラグメント相補性アッセイ (protein-fragment complementation assay) (PCA) がこれによって提供される。このアッセイは、特定のタンパク質間相互作用 (すなわち、ロイシンジッパー相互作用) を検出するためのさらなる内因性の要素を必要とせず、かつ分子相互作用についてのcDNA、核酸、低分子またはタンパク質の設計ライブラリーをスクリーニングするように都合よく拡張され得る。さらに、このアッセイはまた、任意の細胞状況または区画におけるタンパク質相互作用の検出のために適合され得、そして誘導性タンパク質相互作用と構成的なタンパク質相互作用との間を識別するために用いられ得る。

20

【0106】

タンパク質相補性アッセイ (protein complementation assay) (PCA) を設計するための1つの特定のストラテジーは、以下の特徴を用いることに基づく：1) 比較的小さくかつモノマー性であるタンパク質または酵素、2) それについて構造的または機能的な情報の多数の文献が存在する、3) それについて、インビボおよびインビトロの両方で、酵素のタンパク質または活性の再構成について簡易なアッセイが存在する、そして4) それについて、真核生物細胞および原核生物細胞における過剰発現が実証されている。これらの基準を満たせば、酵素の構造を用いて、以下の基準に基づいて、2つの中で遺伝子を分けるポリペプチド鎖の最適の位置を決定する：1) このフラグメントは、連続的なポリペプチドのサブドメインを生じなければならない；すなわち、得られたフラグメントは、タンパク質のサブドメイン構造を破壊しない、2) 酵素的および補因子結合部位は全てが、1フラグメントに含まなければならない、そして3) 長いペプチドリンカーの必要性を回避して、かつタンパク質結合の方向依存性の研究を可能にするために、新規なN末端およびC末端を得るのはタンパク質の同じ表面上でなければならない。

30

40

【0107】

上述の基準は全てが、適切な作業アッセイ方法について満たされる必要はない。酵素は小さく、好ましくは10~40kDaであることが有利である。単量体の酵素が好ましいが、多量体の酵素も、本発明の範囲内であると予想され得る。二量体タンパク質チロシナーゼは、即時的なアッセイで用いられ得る。酵素の構造についての情報は、PCAを設計するのにさらなる利点を提供するが、必須ではない。実際、エキソヌクレアーゼ消化生成したタンパク質フラグメント、続いて酵素アミノグリコシドキナーゼに対する適用におけ

50

る指向性のタンパク質進化の組み合わせに基づいて、PCAを開発するさらなる戦略が存在する。原核生物細胞における過剰発現は好ましいが、それは必須ではない。(選択された酵素の)酵素触媒部位は、絶対に同じ分子上であるという必要はない。

【0108】

本出願は、PCAにおいて特定の酵素を用いるための論拠および基準を説明する。タンパク質または酵素の遺伝子は、2つ以上のフラグメントへ合理的に分析される。分子生物学的技術を用いて、選択したフラグメントをサブクローニングして、各々の5'末端(または3'末端)に対して、相互作用することが公知であるかまたは相互作用すると考えられるタンパク質を融合する。次いで、細胞へのこれらのDNA構築物の同時トランスフェクトまたは形質転換を行う。プローブのタンパク質またはそのフラグメント由来の酵素の再アセンブリは、お互いに対する試験タンパク質の結合によって触媒され、そして再構成は、いくつかのアッセイで観察される。これらのアッセイは融合する場合に機能して、相互作用するタンパク質がこの酵素の再アセンブリを触媒する。すなわち、再構成された酵素活性の観察は、融合されたタンパク質の相互作用の指標である。

10

【0109】

本明細書で開示される方法は、酵素ジヒドロ葉酸還元酵素に基づくPCAに集中する。優性または劣性の薬物選択または代謝のサルベージ経路として機能し得る、酵素に基づくアッセイを含むさらなるアッセイが開示される。さらに、着色されるかまたは蛍光の生成物を生じる酵素に基づくPCAも開示される。本明細書において開示されるとおり、PCA戦略は、新規な遺伝子の機能的な試験について一般化されかつ自動化され得、DNA、RNAまたは炭水化物と相互作用する新規な遺伝子産物の生理学的活性および特定の目的のための新規な生成物または化合物のライブラリーのスクリーニングが開示される。PCA戦略はまた、このような分子相互作用を阻害するか活性化し得る潜在的な治療価値の化合物ライブラリーから天然の生成物または低分子を特定すること、そして酵素基質および酵素の低分子インヒビターが特定され得る方法に適用され得る。結局、PCA戦略を用いて、タンパク質操作実験を行うことが可能で、これによって、工業的な適用を有する意図的な酵素または生物学的な活性を有するペプチドがもたらされ得る。

20

【0110】

本明細書に開示される方法は、提示されるDHFRまたは他のPCAに限定されないものとし、そうではなく、タンパク質マイコバクテリウム属相補性アッセイの非限定的な実施形態のわずかな例しかない。さらに、PCAは、それらが用いられ得る文脈には限定されないものとする。シグナル伝達ペプチド配列の付加によって細胞における特異的な区画に対するPCA融合物を標的するために、かなりの構築物が設計され得る。さらに、誘導性のタンパク質間相互作用と構成的なタンパク質間相互作用とは、生化学的な事象によって標的化される相互作用の場合には、PCAの真核生物バージョンによって識別され得る。また、このシステムは、標的タンパク質と発現ライブラリーとの間の新規な誘導性のタンパク質-分子会合についてスクリーニングするのに適した使用に適合され得る。

30

【0111】

さらに本明細書に記載されるのは、活性について薬物候補(因子)をスクリーニングするために用いられ得るM-PFCシステムを用いるマイコバクテリウム属における生体分子相互作用を検出するためのシステムおよび方法であって、ポリペプチドと相互作用するマイコバクテリア属細胞における因子(標的)を特定するための方法は、酵素レポーター分子の第一のフラグメントおよび第一のポリペプチドを含む第一の融合タンパク質、酵素レポーター分子の第二のフラグメントおよび第二のポリペプチドを含む第二の融合タンパク質、および標的分子に架橋された結合分子を合わせる工程であって、この結合分子が、第一のポリペプチドと会合し、そして標的分子と第二のポリペプチドとの会合が、酵素レポーター分子の再アセンブリおよび酵素レポーター活性の再構成をもたらす工程と;酵素レポーター活性を検出する工程とを包含する。レポーター分子の活性の変化によって、この標的が、第二のポリペプチドと相互作用していることが示される。この標的分子は、2つの間の共有結合によって結合分子に直接連結されてもよいし、または結合分子に対して

40

50

標的分子を連結するために連鎖分子が用いられてもよい。

【0112】

図2Aおよび2Bは、この方法の1実施形態を模式的に図示する。第一の融合タンパク質は図2AにFRB-DFHR[3]組み合わせとして示され、ここでFRBはラパマイシンに対して公知の親和性を有するペプチドであり、そしてDFHR[3]は酵素レポーター分子の第一のフラグメントである。この第二の融合タンパク質は、図2Aにおいて、Library-DFHR[1,2]の組み合わせとして示され、ここでLibraryはポリペプチドであって、DFHR[1,2]は、酵素レポーター分子の第二のフラグメントである。標的分子に架橋されたこの結合分子は、図2Aにおいて[(候補薬物)Drug Candidate]-架橋剤(crosslinker)-[Rap]として示され、ここで「候補薬物(Drug Candidate)」は、標的分子であり、そして「Rap」はラパマイシンである。図2に示されるシステムでは、FRBはラパマイシンに親和性を有するので、標的(「候補薬物(Drug Candidate)」)は、融合タンパク質を含むFRBと会合される。標的(「候補薬物(Drug Candidate)」)に親和性を有するポリペプチドを含む融合タンパク質が存在する場合、この融合タンパク質は、FRB含有融合タンパク質との複合体を形成する。標的分子に架橋された結合分子によって媒介されるこの融合タンパク質：融合タンパク質の複合体(図2Bに示されるとおり)は、再構成されたレポーター分子活性を有する。この再構成されたDFHRレポーター活性によって、選択された標的分子を含む細胞がトリメトプリムの存在下で増殖することが可能になる。

10

20

【0113】

レポーター酵素活性は、限定はしないが、分光光度法、蛍光、酵素活性、分光測定または視覚的方法などの当業者に公知である複数のシステムによって検出され得る。

【0114】

選ばれた結合分子に対する親和性を有するポリペプチドの選択は、検討されているシステムに、そして当業者に容易に明白となる他の要因に依存して変化し得る。例えば、ラパマイシンが結合分子として用いられる場合、ラパマイシンに親和性を有するFRBおよびFKBP 12などのポリペプチド(実施例3を参照のこと)を用いてもよい。融合タンパク質のポリペプチドはまた、マイコバクテリアのポリペプチドであってもよい。

【0115】

広範な種々の架橋剤が利用可能であり、架橋剤の選択は、行われるスクリーニングに依存し得る。この架橋は、当該分野で公知の任意の方法によって行われてもよい(March, J., *Advanced Organic Chemistry* (1985) pub. John Wiley & Sons Inc.; House, H.H., *Modern Synthetic Reactions* (1972) pub. Benjamin Cummings)。連結化学の説明はまた、米国特許第7,083,918号、米国特許出願公開第2004/0106154号、米国特許出願公開第2002/0168685号、WO 94/18317、WO 95/02684、WO 96/13613、WO 96/06097、およびWO 01/53355(本明細書に教示される、化合物および方法について少なくとも、その全体が参照によって本明細書に援用される)によって提供される。連鎖、連結(「リンカー(linkers)」)として機能し得る分子は、市販されているか、または容易に調製され得る。疎水性、長さおよび可塑性において変化するリンカーが利用可能であり、または調製されてもよい。

30

40

【0116】

酵素活性に応答するリンカーが利用可能である(かまたは設計され得る)。例えば、リンカーは、グリコシダーゼ酵素によって切断され得、そしてグリコシルトランスフェラーゼ酵素によって形成され得るグリコシダーゼ結合を含んでもよい。酵素活性を有するリンカー成分の他の例としては、プロテアーゼによって切断されて、ペプチダーゼまたはトランスペプチダーゼによって形成され得る、アミド結合；レトロ-アルドラーゼによって切断されてアルドラーゼによって形成されるアルドール生成物結合；エステル結合；および

50

ホスホジエステル結合が挙げられる。これらのタイプのリンカーは、細菌ベースのスクリーニング（W O 0 1 / 5 3 3 5 5 に記載される酵母ベースのスクリーニングにおけるそれらの使用と同様）において用いられてもよい。他の酵素的に活性なリンカー成分およびそれらのそれぞれの酵素は、本開示の範囲内であるものとする。

【 0 1 1 7 】

スクリーニングのための化合物ライブラリーは、コンパイルされても合成されてもよく、そしてこのようなライブラリーは、商業的な供給源から生成されても、または購入されてもよい。このようなライブラリーは、コンパイルされた（または完全に特徴づけられた）ライブラリーの場合は公知の分子のセットを含んでもよく、またはコンビナトリアルに生成されたライブラリーなどに由来する未知の分子セットを含んでもよい。

10

【 0 1 1 8 】

また本明細書に開示されるのは、結合分子に親和性を有するポリペプチドを含む第一の融合タンパク質を含むキットである。このようなキットはさらに、1つ以上の第一の酵素レポーターフラグメント、結合された架橋との結合分子、および第二の酵素レポーターフラグメントを含んでもよい。このようなキットはさらに、化合物、試薬または試薬の組み合わせ、開示された方法の実施に必要であるかまたは有益であることが理解される容器または装置、および容器またはアッセイプラットフォームを備えてもよい。試薬は、アッセイで用いられるべき緩衝液を含んでもよい。これらのキットはまた、マルチウェルプレートなどの固体支持体、またはビーズなどの可動性の支持体を備えてもよい。このキットはさらに説明書を備えてもよい。

20

【 0 1 1 9 】

さらに本明細書に記載されるのは、M - P F C システムを用いて特定された化合物を用いて、マイコバクテリアの病原性を軽減すること、マイコバクテリアにおける R v 3 1 3 3 c の二量体化を減少させること、およびマイコバクテリウム属感染を有する被験体を処置することの方法である。

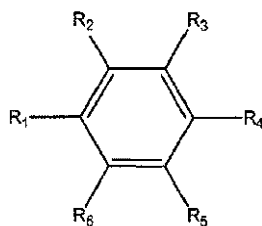
【 0 1 2 0 】

M - P F C システムを用いて、マイコバクテリウム属における R v 3 1 3 3 c (D o s R および D e v R としても公知) 二量体化相互作用を軽減および / または阻害する、上記のような化合物を特定している。これらの化合物としては、以下の一般式：

【 0 1 2 1 】

30

【 化 8 】



を有する化合物が挙げられ、

40

ここで：

R₁ は N H - X または C (= O) - X であり、ここで X は、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；

R₄ は O H ; S O₂ - Y であって、ここで Y が置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリール；または S O₂ - N H - Z であって、ここで Z が置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルケニル、置換もしくは非置換の C₁ - C_{1 2} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールであり；そして

50

R_2 、 R_3 、 R_5 、および R_6 の各々は独立して、H、OH、置換もしくは非置換の C_{1-12} アルキル、置換もしくは非置換の C_{1-12} アルケニル、置換もしくは非置換の C_{1-12} アルキニル、または置換もしくは非置換のアリールである。

【0122】

本明細書に記載される化合物において有用なアルキル基は、1～約12個の炭素原子、1～約8個の炭素原子、1～約6個の炭素原子、または1、2、3もしくは4個の炭素原子を有する。メチル、エチル、プロピルおよびイソプロピル基は、この化合物で用いられ得るアルキル基の例である。このアルキルという用語は、他に改変しない限り、環状、非環式およびハイブリッドの環状/非環式基をいう。非環式基としては直鎖および分枝基が挙げられる。環状基としては、1つ以上の置換基を有する基が挙げられる。ハイブリッドの環状/非環式基としては環状部分および非環状部分、例えば、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサンおよびプロピルシクロヘキサンが挙げられる。

10

【0123】

本明細書に記載される化合物で有用なアルケニルおよびアルキニル基は、1つ以上の不飽和結合および2～約12個の炭素原子、2～約8個の炭素原子、2～約6個の炭素原子、または2、3もしくは4個の炭素原子を有する。アルケニルおよびアルキニルという用語は、他に改変しない限り、環状、非環式およびハイブリッドの環状/非環式基の両方をいう。非環式基としては直鎖および分枝基が挙げられる。環状基としては、1つ以上の置換基を有する基が挙げられる。ハイブリッドの環状/非環状基としては環状部分および非環状部分が挙げられる。

20

【0124】

本明細書に記載される化合物で有用なアルコキシ基は、1つ以上の酸素結合、および1～約12個の炭素原子、1～約8個の炭素原子、1～約6個の炭素原子、または1、2、3もしくは4個の炭素原子を有する基を含む。

【0125】

本明細書に記載される化合物で有用なアミノアルキル基としては、1つ以上の一級、二級および/または三級のアミン基、および約1～約12個の炭素原子、1～約8個の炭素原子、1～約6個の炭素原子、または1、2、3もしくは4個の炭素原子を有する基が挙げられる。

【0126】

本明細書に記載される化合物で有用なアルキルチオ基は、1つ以上のチオエステル結合および1～約12個の炭素原子、1～約8個の炭素原子、1～約6個の炭素原子、または2、3もしくは4個の炭素原子を有する。

30

【0127】

本明細書に記載される化合物で有用なアルキルスルホニル基としては、1つ以上のスルホニル(SO_2)基、および1～約12個の炭素原子、1～約8個の炭素原子、1～約6個の炭素原子、または1、2、3もしくは4個の炭素原子を有する基が挙げられる。

【0128】

本明細書に記載される化合物において有用な複素芳香族基は、N、OまたはS原子から選択される1、2または3つのヘテロ原子を含み、そして、例えば、8-クマリニルを含むクマリニル、8-キノリニルを含むキノリニル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジル、フリル、ピロリル、チエニル、チアゾリル、オキサゾリル、イミダゾリル、インドリル、ベンゾフラニルおよびベンゾチアゾリルを含む。適切な複素脂肪環式基は、N、OまたはS原子から選択される1、2または3つのヘテロ原子を含み、そして、例えば、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ピペリジニル、モルホリノおよびピロリニジニル基を含む。

40

【0129】

本明細書に記載される化合物で有用な適切な炭素環式アリール基としては、単一および複数の環の化合物、ならびに別々のおよび/または縮合されたアリール基を含む複数の環の化合物が挙げられる。有用な炭素環式アリール基は、例えば、1～3個の別々のまたは

50

縮合された環、そして6～約18個の炭素環原子を含む。炭素環式アリール基の例としては、フェニル基、ナフチル基（1-ナフチルおよび2-ナフチルを含む）、ビフェニル基、フェナントリル基およびアントラシル基が挙げられる。フェニル基の例としては、置換フェニル、例えば、2-置換フェニル、3-置換フェニル、2,3-置換フェニル、2,5-置換フェニル、2,3,5-置換および2,4,5-置換フェニルが挙げられ、これは、フェニル置換基の1つ以上が電子求引性基、例えば、ハロゲン、シアノ、ニトロ、アルカノイル、スルフィニル、スルホニルなどである。

【0130】

本明細書に記載される化合物での置換基についての言及は、置換された基の1つ以上の利用可能な位置に結合される1つ以上のさらなる基を有する基をいう。ある基に付加され得るこのようなさらなる基の例としては、ハロゲン、例えば、フルオロ、クロロ、プロモおよびヨード；シアノ；ヒドロキシル；ニトロ；アジド；アルカノイル、例えば、C₁₋₆アルカノイル基、例えば、アシルなど；カルボキサミド；アルキル基であって、1～約12個の炭素原子、1～約6個の炭素原子、または1～約3個の炭素原子を含むもの；アルケニルおよびアルキニル基であって、1つ以上の不飽和結合、および2～約12個の炭素原子、2～約6個の炭素原子、または2～約4個の炭素原子を有する基を含むもの；酸素、例えば、置換基上のカルボニルの形成またはヒドロキシル基の付加；1つ以上の酸素結合および1～約12個の炭素原子、または1～約6個の炭素原子を有するアルコキシ基；アリールオキシ、例えば、フェノキシ；アルキルチオ基であって、1つ以上のチオエーテル結合および1～約12個の炭素原子、または1～約6個の炭素原子を有する基を含むもの；アルキルスルフィニル基であって、1つ以上のスルフィニル結合および1～約12個の炭素原子、または1～約6個の炭素原子を有する基を含むもの；アルキルスルホニル基であって、1つ以上のスルホニル結合および1～約12個の炭素原子、または1～約6個の炭素原子を有する基を含むもの；アミノアルキル基、例えば、1つ以上の窒素原子および1～約12個の炭素原子、または1～約6個の炭素原子を有する基；6個以上の炭素を有する炭素環式アリール、例えば、フェニルまたはビフェニル；アラキル基、例えば、ベンジル；ならびにニトリル基が挙げられる。さらに、置換基は、バリンまたはBocバリンなどで、トリフルオロメチルシンナモイル基またはアミノ酸アシル基においてのように、それ自体置換されてもよい。さらに、複数の置換基が、単一の基に存在してもよく、例えば、シクロアルキル基は、1つ以上の酸素結合および1つ以上のチオエーテル結合を有してもよい。

10

20

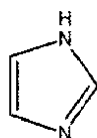
30

【0131】

置換基の置換に利用可能なさらなる部分としては、改変および未改変のイミダゾールおよびイミダゾールアナログ基が挙げられる。イミダゾールは、以下の式：

【0132】

【化9】



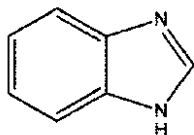
40

を有する複素環芳香族有機化合物である。

イミダゾール基の環は、イミダゾールアナログ基を作製するために置換されてもよい。イミダゾールアナログ基の例としては、ベンズイミダゾールおよび修飾されたベンズイミダゾール基が挙げられる。ベンズイミダゾールは以下の一般的な構造：

【0133】

【化 1 0】

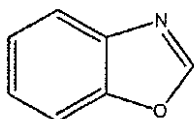


を有する。ベンズイミダゾールは、上記で考察されるように置換されてもよい。ベンズイミダゾールはまた、例えば、酸素でイミダゾールの環窒素の1つを置換することによって改変され得る。修飾されたベンズイミダゾールの例としては、ベンズオキサゾールが挙げられる。ベンズオキサゾールは以下の構造：

10

【 0 1 3 4】

【化 1 1】

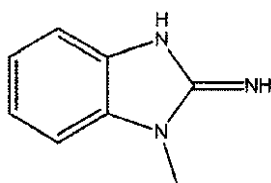


を有する。置換されたベンズイミダゾールの例としては、1 - メチル - 1 , 3 - ジヒドロ - ベンズイミダゾール - 2 - イリデンアミンが挙げられる。1 - メチル - 1 , 3 - ジヒドロ - ベンズイミダゾール - 2 - イリデンアミンは以下の構造：

20

【 0 1 3 5】

【化 1 2】



を有する。置換基として用いられる場合、ベンズイミダゾールおよびベンズイミダゾールアナログは、例えば、イミダゾール環上の開放炭素を通じて、またはイミダゾール環窒素の1つを通じて、この置換された基に連結され得る。

30

【 0 1 3 6】

マイコバクテリウム属における R v 3 1 3 3 c 二量体化相互作用を軽減および/または阻害する化合物のさらなる例としては、N - (4 - [(アセチルアミノ) スルホニル] フェニル) - 3 - フェニルプロパンアミド ; 1 - (3 , 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - (2 - イミノ - 3 - メチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンズイミダゾール - 1 イル) エタノン塩酸塩 ; および 1 - (1 , 3 - ベンズオキサゾール - 2 - イル) - 3 - ({ 4 - [(2 - ヒドロキシエチル) スルホニル] フェニル } アミノ) アクリルアルデヒドが挙げられる。

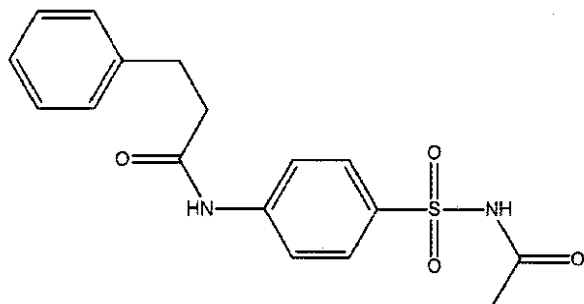
【 0 1 3 7】

N - (4 - [(アセチルアミノ) スルホニル] フェニル) - 3 - フェニルプロパンアミドは以下の構造：

40

【 0 1 3 8】

【化 1 3】



10

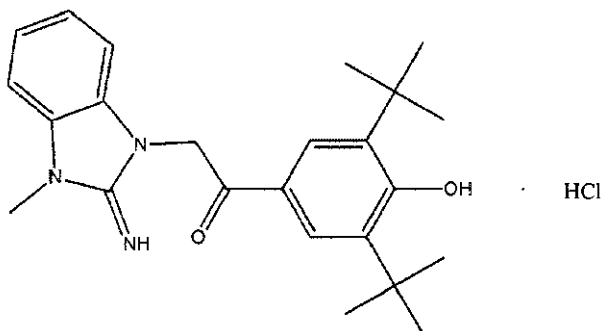
を有する。

【0 1 3 9】

1 - (3 , 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - (2 - イミノ - 3 - メチル - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンズイミダゾール - 1 イル) エタノン塩酸塩は、以下の構造を有する：

【0 1 4 0】

【化 1 4】



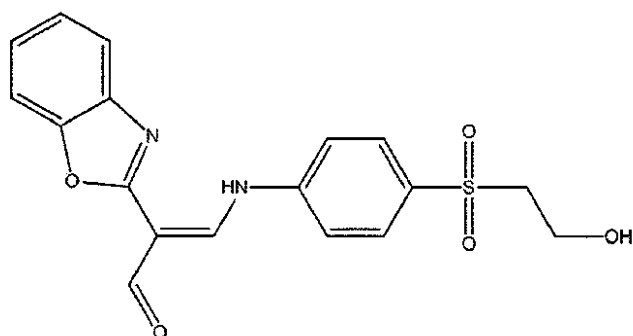
20

2 - (1 , 3 - ベンズオキサゾール - 2 - イル) - 3 - ({ 4 - [(2 - ヒドロキシエチル) スルホニル] フェニル } アミノ) アクリルアルデヒドは以下の構造：

【0 1 4 1】

30

【化 1 5】



40

を有する。

【0 1 4 2】

本明細書に記載される化合物は、薬学的に受容可能な塩およびその誘導体を含む薬学的に受容可能な形態で提供され得る。これらの組成物は、薬学的に受容可能なキャリアまたは安定化剤を含んでもよい。薬学的に受容可能な酸塩およびその誘導体という用語は、記載される化合物の生物学的有効性および特性を保持し、かつ生物学的にもそうでなくても望ましくないことがない、本明細書に記載される化合物の塩および誘導体をいう。薬学的に受容可能な塩は、例えば、無機の酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など、および有機酸、例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ

50

酸、マレイン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸などと形成され得る。

【0143】

本明細書に記載される化合物を用いる方法としては、Mycobacterialの病原性を軽減する方法、RV3133c二量体化を軽減する方法、およびMycobacterialの感染を有する被験体を処置する方法が挙げられる。

【0144】

Mycobacterialの病原性を軽減する方法は、マイコバクテリウム属と、本明細書に記載される化合物であって、この化合物の非存在下でのマイコバクテリウム属の病原性に比較して病原性を軽減する化合物とを接触させる工程を包含する。

10

【0145】

RV3133c二量体化を軽減する方法は、マイコバクテリウム属と、本明細書に記載の化合物であって、この化合物の非存在下でのマイコバクテリウム属におけるRV3133c二量体化に比較してRV3133cの二量体化を軽減する化合物とを接触させる工程を包含する。

【0146】

Mycobacterialの感染を有する被験体を処置する方法は、薬学的に受容可能な形態で本明細書に記載の化合物であって、この化合物の非存在下に比較してマイコバクテリウム属感染の1つ以上の症状を軽減する化合物をこの被験体に投与する工程を包含する。症状としては、例えば、咳、疲労、息切れ、体重減少、熱、および胸痛を挙げることができる。

20

【0147】

本明細書に開示されるのはまた、Mycobacterialの病原性を軽減し、RV3133c二量体化を軽減し、そしてMycobacterial感染を有する被験体を処置するためのキットである。これらのキットは、本明細書に記載される1つ以上の化合物を、必要に応じて固体支持体、例えば、ビーズなどの可動性の支持体のマルチウェルプレートとともに含む。このようなキットはさらに、開示された方法の実施において必要であるかもしくは有益であると理解される、化合物、試薬または試薬の組み合わせ、容器または装備、ならびに容器またはアッセイのプラットフォームを備えてもよい。試薬とは、アッセイに用いられる緩衝液を含んでもよい。このキットはさらに装置を備えてもよい。

30

【0148】

以下の実施例は、本発明の特定の実施形態をさらに図示することを意図しており、特許請求の範囲を限定する意図ではない。

【実施例】

【0149】

実施例1：タンパク質間の会合を通じたMycobacterium tuberculosisの病原性の経路を分析する

M-PFCシステムを用いて、マイコバクテリアでのタンパク質会合を研究した。E.coli-マイコバクテリアのシャトルベクターpUAB100およびpUAB200(図2)を構築して、M-PFC融合タンパク質を生成した。以前には、mDHF Rフラグメントは、その相互作用するタンパク質の対ならびにF[1,2]およびF[3]が10アミノ酸の可塑性のグリシンリンカーペプチドによって分けられ(Pelletier, J.N., Campbell-Valois, F.X. & Michnick, S.W. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 12141-6)、それによってほぼ全てのタンパク質の流体力学半径にまたがるように設計された80の距離にまたがる相互作用の研究を可能にするように(Cody, V., Luft, J.R., Ciszak, E., Kalman, T.I. & Freisheim, J.H. (1992) Anticancer Drug Des 7, 483-91)操作された。Msmにおける多様な範囲のタンパク質間の会合を検出するためのM-PFCの実現可

40

50

能性を実証するために、いくつかの十分特徴付けられた相互作用パートナーすなわち、*Saccharomyces cerevisiae* GCN4 (Pelletierら、(1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 12141~6)、Mtb2成分のタンパク質KdpD (Rv1028c) / KdpE (Rv1027c) (Steynら(2003) Mol. Microbiol 47, 1075~89)およびMtb分泌抗原Esat-6 (Rv3875) / Cfp-10 (Rv3874) (Renshawら(2002) J Biol Chem 277, 21598-603)を選択した。これらの餌(bait)および獲物(pre y)プラスミドをmDHF Rの相補的なフラグメントとのC末端融合物として生成して、相互作用するタンパク質対GCN4 [F1, 2] / GCN4 [F3]、KdpD [F1, 2] / KdpE [F3]およびEsat-6 [F1, 2] / Cfp-10 [F3]を生成した。完全なオープンリーディングフレーム(ORF)を、材料および方法に記載されたような構成的なマイコバクテリアプロモーター(hsp60)の制御下でpUAB100およびpUAB200の中にクローニングした。mDHF RフラグメントF[1, 2]およびF[3]に独立して融合された相互作用するタンパク質対をコードするプラスミドをMsmに同時形質転換して、7H11 / KAN / HYG上で選択した。形質転換体を50 μg / mlのTRIM (7H11 KAN / HYG / TRIM)を含有する7H11 KAN / HYGプレートでサブクローニングして、37 °Cで3~6日間インキュベートした(図4)。増殖を全ての場合に観察したところ、これはMsm中でGCN4 [F1, 2] / GCN4 [F3]、KdpD [F1, 2] / KdpE [F3]およびEsat-6 [F1, 2] / Cfp-10 [F3]が会合することを示している。重要なことに、F[1, 2]およびF[3]のみを生成する空のプラスミドに融合された1つのタンパク質(GCN4 [F1, 2]、またはKdpD [F1, 2]、またはEsat-6 [F1, 2])のみをコードするコントロールクローンは、TRIMプレート上で増殖を示さなかった。さらに、関連のないタンパク質(例えば、Esat6およびKdpD)またはスワッピングF[1, 2]またはF[3]を有する対合クローンは、[F1, 2]および[F3]の会合が自然に生じないこと、そして両方のmDHF Rフラグメントに独立して融合された相互作用ドメインのみが[F1, 2]およびF[3]を再構成するというを示す。従って、M-PFCシステムは、Msm中のタンパク質間会合を特異的に検出できる。増殖は比較的短期間(3~4日)で検出されるので、M-PFCは、広範な範囲の相互作用を検出するのに十分堅調である。

【0150】

タンパク質会合および折り畳みが、原核生物の細胞質および膜で示差的に調節されるということは周知である。M-PFCがMtbの細胞質タンパク質と膜シグナル伝達タンパク質との間の相互作用を検出し得るか否かを評価するために、Mtb膜貫通センサーヒスチジンキナーゼと、DevS (Rv3132c)と、その対応する応答調節因子DevR (Rv3133c)との間の相互作用、(Fig. 5A)を研究した。MtbのDevR / DevSタンパク質は、インピボでの潜伏性に寄与し得る2つの環境信号である低酸素および一酸化窒素に対するMtbの遺伝的応答の再プログラミングに必要であることが示されている2成分のシグナル伝達システムを含む(Robertsら、(2004) J Biol Chem 279, 23082~7; Parkら(2003) Mol. Microbiol 48, 833~43)。MtbのdevRおよびdevSのORFを、pUAB100およびpUAB200中にクローニングして、それぞれF[3]およびF[1, 2]とのC末端融合を生成し、DevR_{F[3]}およびDevS_{F[1, 2]}を生成する。MsmへのDevR_{F[3]}およびDevS_{F[1, 2]}をコードするプラスミドの同時形質転換、ならびに7H11 / KAN / HYG / TRIMでの形質転換体の引き続き増殖によって、DevR_{F[1, 2]}とDevS_{F[3]}との間の会合がF[1, 2]およびF[3]を機能的に再構成し、それによってTRIM (図5A)に対するMsm耐性が生じることが実証された。対照的に、空のコントロールのプラスミド、または無関係のタンパク質(例えば、KdpE)を含むクローンは、7H11 / KAN / HYG / TRIMプレートでは増殖を示さず、このことは、この相互作用が特異的であることを示して

いる。DevRF_[3] および DevSF_[1,2] を産生するクローンは、KdpD_[3] / KdpE_[1,2] および Esat-6_[3] / Cfp-10_[1,2] を産生するクローンに比較して、7H11 / KAN / HYG / TRIM上でわずかに緩徐に増殖したので、このデータは、DevRF_[3] / DevSF_[1,2] 相互作用が、KdpD_[3] / KdpE_[1,2]、および Esat-6_[3] / Cfp-10_[1,2] 相互作用に比較して弱いことを示す(下に示す)。従って、M-PFCは、膜貫通タンパク質と、対応する細胞質応答調節因子との間の会合を検出するのに有効である。

【0151】

M-PFCが、小型のF_[1,2] またはF_[3] 融合物のN末端またはC末端方向によって影響されるか否かを決定するために、Esat-6 および Cfp-10 を pUAB100、pUAB300 および pUAB200、pUAB400 中にクローニングして、それぞれ、Esat-6_[1,2]、F_[1,2] Esat-6 および Cfp-10_[3]、F_[3] Cfp-10 融合物を生成した。図5Bに示されるとおり、Esat-6_[1,2] / Cfp-10_[3] および F_[1,2] Esat-6 / F_[3] Cfp-10 を生成するプラスミドで同時形質転換されたクローンは、堅調な増殖を示したが、コントロールは、7H11 / KAN / HYG / TRIMでは増殖を示さなかった。従って、M-PFCは、少なくとも Esat-6 および Cfp-10 について、DHFRペプチドの方向によってごくわずかに影響される可塑性でかつ堅調なシステムである。

【0152】

この結果によって、Msmでのタンパク質間会合に起因するmDHFRの再構成は、7H11 / KAN / HYG / TRIMプレート上での生存ベースのアッセイによって容易にモニターされ得ることが示された。しかし、タンパク質間会合またはドメインマッピング実験を行うことに対する、単一のaa置換または修飾(例えば、リン酸化)の影響を研究するためには、より鋭敏かつ定量的なアッセイを必要とする。結果として、比色定量及び蛍光のプレートベースのアッセイを開発して最適化した。このアッセイは、抗菌化合物に対するマイコバクテリアの感度を評価するための定量的および定性的なアッセイで広範に用いられている酸化/還元指示薬Alamar Blue (AB)に基づく(McNerneyら(2000) Int J Tuberc Lung Dis 4, 69-75)。このABアッセイはヒトおよび動物の細胞株、細菌および真菌の増殖を定量的に測定し(Backら(1999) J Neurosci Methods 91, 47-54; Collinsら(1997) Antimicrob Agents Chemother 41, 1004-9)、そして96ウェルの形式で容易におこなわれ得る。相互作用クローンGCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、KdpD_[F1,2] / KdpE_[F3]、Esat-6_[F1,2] / Cfp-10_[F3] および DevRF_[3] / DevSF_[1,2] を保有するMsmを7H9 / HYG / KANで培養して、7H9 / KAN / HYG / TRIMを含有する96ウェルマイクロタイタープレート中に新鮮に接種した。非蛍光の青(暗い方の影付き)から蛍光のピンク色(明るい方の影つき)への変化は、ABの減少を示し、そしてピンク色の強度は細菌増殖の程度と直接関連し、これが次に、相互作用タンパク質によって駆動されるF_[1,2] およびF_[3] の再構成の程度に依存する(図6)。相互作用するパートナーを含むMsmクローンは、ABの減少に起因してピンク色の発色(明るい方の影付き)によって証明されたとおり、7H9 / KAN / HYG / TRIM培地で増殖した(図6)。さらに重要なことに、ベクターコントロールで観察された色の変化はなく、このアッセイの特異性が確認された。さらに、相互作用の強度を正確に測定するために、蛍光を530nmの励起波長および580nmの放射波長で定量した。図6に示されるとおり、GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3] が最強に相互作用し、続いてEsat-6_[F1,2] / Cfp-10_[F3] およびKdpD_[F1,2] / KdpE_[F3]、そして最後がDevRF_[3] / DevSF_[1,2] であることが見出された。M-PFCシステムは、マイコバクテリアにおいて広範な範囲のタンパク質間の会合を検出するために利用され得る。

10

20

30

40

50

【0153】

タンパク質相互作用技術は、特定の病原性経路またはシグナル伝達カスケードに関与する遺伝子と、それらが必須であるか否かにかかわらず、直接関連する。標準的なマイコバクテリアの方法に以前には受け入れられない毒性機構を研究するための、M-PFCの適用性を確認および試験するために、Mtb Cfp-10/Esat-6分泌経路を分析した。Esat-6およびCfp-10は両方とも、シグナルペプチド独立分泌 (signal peptide independent secretion) (SPS) システムとして公知の未定義のMtb分泌機構を通じて分泌される。Cfp-10は、RD1領域に存在するesxB (Rv3874) によってコードされる主要なT細胞抗原であり、そしてMtbの完全な病原性に必要である。M-PFCが、Esat-6およびCfp-10の分泌に関与するさらなる必須の遺伝子産物を特定し得、かつMtbにおけるSPSの機構の理解に対して寄与し得るといふ仮説を試験した。引き続き、全長のcfp-10を、安定な、組み込みのM-PFC餌 (bait) ベクター中でF[3]とインフレームでクローニングして、pUAB400-Cfp10を生成した。5 × 10⁵ 個の独立したクローンからなるMtb H37RvゲノムDNAライブラリーを、pUAB300中で作成し、pUAB400-Cfp10を含むMsm細胞中に形質転換して、7H11/KAN/HYG/TRIM上にプレートした。7H11/KAN/HYG/TRIMプレート上で増殖を示したクローンを溶解して、プラスミドDNAを単離して、E.coli中で増殖して、pUAB400-Cfp10を含むMsm中に再度形質転換した。クローンを再度、7H11/KAN/HYG/TRIMプレート上にストリークして、増殖について評価した。TRIMプレート上で増殖を示すクローン由来のライブラリープラスミドを配列決定した。予想どおり、Mtb dfrA (Rv2763c) を含有するTRIM耐性クローンが、ライブラリー中で観察された。好都合にも、これらのTRIM耐性クローンは、ライブラリーの複雑性および形質転換効率についての内部クローンとして機能し、そしてコロニー-PCRを用いてこれらのクローンを排除した。さらに、Cfp-10の公知のパートナーであるEsat-6を、このライブラリーのスクリーニングにおいて6回特定した。これらの結果によって、M-PFCがMtbライブラリー由来の相互作用クローンを特定するために効率的に活かされることが実証される。また、これらの相互作用の特異性は、(i) 個々のCfp-10 [F_{1,2}] 相互作用タンパク質が無関係のタンパク質 (例えば、Kdpe) と会合する能力を決定すること、および(ii) 対応する空のベクターとのCfp-10 [F_{1,2}] 相互作用クローンとの同時形質転換によって確認した。全ての場合に、7H11/TRIMプレートでは増殖は観察されず、それによって、相互作用の特異性が確認された。Cfp-10と会合するタンパク質を表1に列挙する。このスクリーニングでは、同じ遺伝子の複数の重複するクローンを特定し、それによって、会合が実際に真実であるという支持が得られた。snm2 (Rv3871) の引き続くクローニングおよびM-PFC分析によって、Snm2は、Cfp-10 (Fig. 7) と強力に会合することが実証された (図7)。Esat-6およびCfp-10は、緊密な複合体を形成するので、Cfp-10相互作用タンパク質はまた、Esat-6と会合し得ると仮説された。実際、6つのCfp-10相互作用クローンのうち、Pks13、ClpC1、FtsQ (およびCfp-10) はEsat-6 (表2) と特異的に会合する。興味深いことに、このデータによってEsat-6がオリゴマー化することが示される (図7)。ClpC1の役割をさらに検討するために、ClpC1が、タンパク質分解性成分ClpP2とは会合するが、ClpP1とは会合しないことを実証した (図7)。まとめると、推定の相互作用クローンの56%が、Mtb dhfrを含み、24%のクローンが、アンチセンスおよびフレーム外のクローンであり、そしてクローンの約20%がインフレームのクローンを含んだ。

10

20

30

40

【0154】

【表 1 - 1】

表1. M-PFCスクリーニングで特定されたCfp-10相互作用Mtbタンパク質

Rv番号	遺伝子	アノテーションおよび推定の機能
Rv3875 ^a	<i>esat-6</i>	分泌された抗原、公知のCfp-10相互作用クローン
Rv0686 ^b		SRP-GTPaseファミリーのメンバーを含むCOG0541に属する。このファミリーは、SRPおよびそのレセプターを含み、これが挿入について細菌または真核生物の膜に対して膜タンパク質を標的する；必要なIMP/GMPリダクターゼドメインおよび疎水性N末端を含む。
Rv2151c ^c	<i>ftsQ</i>	細胞質の膜タンパク質；細胞分裂に役割を果たし、SRP経路を介して膜に送達され、そして膜への挿入の間にSecYEG転位酵素と相互作用する。

10

【 0 1 5 5 】

【表 1 - 2】

Rv3596 ^d	<i>clpC1</i>	二重の機能を有するAAA-ATPaseシャペロン: (i) 外部および内部のクロロプラストに存在するタンパク質転位複合体の成分のオルソログ、そしてClpC依存性ATP加水分解を介して膜を横切る前駆体タンパク質の転移を容易にし得るか、または(ii)タンパク質分解性サブユニット、ClpPの分解チャンパへ誤って折り畳まれたタンパク質をレトロ転位することによってタンパク質の品質管理に関与する。
Rv3800c ^e	<i>pk13</i>	ミコール酸生合成の最終工程を触媒するポリケチド合成酵素。アシルトランスフェラーゼドメインを含む。
Rv2240c ^f		機能が未知の膜タンパク質。

20

^a 重複するクローンの2つのクラスを特定した；E s a t - 6の a a 9および a a 1 3での融合接合部。 30

^b 重複するクローンの2つのクラスを特定した；R v 0 6 8 6の a a 2 0 1および a a 3 3 4での融合接合部。

^c 相互作用するクローンの1つのクラスを特定した；F t s Qの a a 2 2 0での融合接合部。

^d 重複するクローンの4つのクラスを特定した；A T Gの 2 9、3 8、5 9および 1 1 7 b p上流の融合接合部は、C l p C 1とのインフレーム融合を生成した。

^e 相互作用するクローンの1つのクラスを特定した；P k s 1 3の a a 1 3 4 0での融合接合部。

^f 相互作用するクローンの1つのクラスを特定した；R v 2 2 4 0 cの a a 1 2 7での融合接合部。 40

【 0 1 5 6 】

本明細書に開示されるようなM-PFCシステムによって、Mtb病原性機構の研究およびタンパク質間会合を通じた他の機能的経路の研究が可能になる。このアプローチでは、mDHF R相補性フラグメント([F 1, 2]および[F 3])と2つのマイコバクテリア相互作用タンパク質の独立した遺伝子カップリングによって、インビボにおいて、内因性のマイコバクテリアDHF R活性が阻害される濃度で、mDHF R活性の再構成がもたらされる。この相補性事象の読み出しは、TRIMに対して耐性のマイコバクテリアクローンの選択を可能にするmDHF RフラグメントF [1, 2]およびF [3]のインビボでの再構成である。重要な事に、F [1, 2]およびF [3]が2つの相互作用タンバ 50

ク質と融合される場合のみ、ヘテロ二量体はmDHF Rの再構成を生じる。真核生物のGCN4などの十分証明されかつ公知のタンパク質間相互作用、ならびにMtb KdpD / KdpE、およびDevR / DevS、および分泌性抗原Esat-6およびCfp-10のタンパク質相互作用を用いて、M-PFCシステムを徹底的に試験した。無関係のタンパク質および空のベクターを含む多数のコントロールを用いて、これらのタンパク質がマイコバクテリアにおいて特異的に会合することを確認した。このシステムは、それぞれ、膜に位置するセンサーキナーゼ (KdpDおよびDevS) とそれらの対応する応答調節因子 (KdpEおよびDevR) との間の推定の一過性の会合を研究するために十分に鋭敏かつ堅調であることが証明されている。さらに、融合の方向は、少なくともEsat-6 / Cfp-10について、F [1 , 2] およびF [3] の再折り畳みにほとんど影響がないかまたは全くないと思われる。しかし、いくつかのタンパク質は個々に試験されなければならない相互作用のために遊離のN末端またはC末端を必要とし得ると予想される。酵母およびE. coliのような代用の宿主ではなくマイコバクテリアでのタンパク質会合を研究するという重要な利点は、天然の宿主に固有である適切な修飾 (例えば、リン酸化)、補因子および排他的な細胞内環境が、相互作用の転帰を調節し得るということである。

【 0 1 5 7 】

病原性の経路は、破壊の際にタンパク質間の会合を変化させる分子相互作用の複雑なネットワークによって媒介される。従って、タンパク質間の相互作用は代表的には、直接のリンクまたは役割を示唆するが、遺伝子破壊実験は、間接的な方法である。結果として、この研究の中心的な目的の1つは、M-PFCが未定義のMtb病原性機構を研究するための能力を試験することであった。いくつかの研究 (Fortuneら (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102, 10676-81; Brodinら (2006) Infect Immun 74, 88~98; Pymら (2002) Mol. Microbiol 46, 709~17) によって、MtbのRD1領域の内側および外側のタンパク質が、免疫原性抗原であるEsat-6およびCfp-10の分泌に関与しているということが示されている。SPSシステムの重要な特徴は、これらの小さいタンパク質がシグナルペプチドを含まないということである。引き続き、MtbのSPS経路は、Cfp-10相互作用クローンについてゲノムワイドなスクリーニングを行うことによって特徴付けられる。Esat-6は、以前の研究 (Renshawら (2002) J Biol Chem 277, 21598-603; Stanleyら (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100, 13001-6; Okkelsら (2004) Proteomics 4, 2954~60) と一致して、その相互作用パートナーの1つとして繰り返し特定されており、そしてM-PFCは、相互作用タンパク質についてMtbのゲノムをスクリーニングするための有効なツールとして確認される。さらに重要なことに、Mtb分泌経路のいくつかの成分が特定された。例えば、SRP-GTPaseファミリーのメンバーであるRv0686は、Cfp-10と特異的に相互作用することが示された。このファミリーのメンバーとしては、SRPおよびそのレセプターが挙げられ、SRは、分泌または膜の挿入のための細菌の原形質膜および真核生物ER膜におけるタンパク質の同時転位的な標的化に関与する (Keenanら (2001) Annu Rev Biochem 70, 755~75)。グラム陽性の細菌であるBacillus subtilisでは、SRPおよびSRの両方とも、Sec転位酵素に対して分泌タンパク質のほとんどを標的化することに関与する (Yamaneraら (2004) Biosci Biotechnol Biochem 68, 2007~23)。このデータによって、SRP-GTPaseオルソログ (Rv0686) は、SRP経路を介して膜に対してCfp-10を標的化することを容易にし得るということが示される。上記の結果を支持するように、SRP経路の第二の基質である細胞分裂タンパク質FtsQ (Rv2921c) が特定されており、これは、一体型の膜タンパク質のSRP依存性の転位を分析するためのモデルタンパク質として広範に用いられている (Urbanusら (2001) EMBO Rep 2, 524~9)。重要なことに、膜

10

20

30

40

50

挿入プロセスの間、FtsQはSecYEGトランスロコン(translocon)の成分と相互作用することが公知である。従って、FtsQはSecYEGトランスロコン(translocon)に対するCfp-10の送達に關与する可能性がある。さらに、Clp/Hsp100ファミリーのタンパク質に屬するCfp-10とAAA-ATPaseシャペロンClpC1との間の正の相互作用も検出された。Clpファミリーのメンバーは、分泌、遺伝子調節、タンパク質折り畳み、および分解を含む多様な機能に關与する(Bolhuisら、(1999) J Biol Chem 274, 24585-92; Porankiewiczら、(1999) Mol Microbiol 32, 449~58)。興味深い事に、ClpCホモログは、クロロプラスト膜において転位機構と会合することによって、植物中のタンパク質輸送経路において重要な役割を果たすことが示されている(Nielsenら、(1997) Embo J 16, 935~46)。MtbのClpC1は、膜において転位複合体と会合することによってCfp-10分泌を促進し得る。さらに、ClpCはまた、タンパク質分解性のサブユニット、分解のためのClpPのチャンバ中に誤って折り畳まれたタンパク質を標的することによって、翻訳されたタンパク質の品質管理に重要な役割を果たし得る(Pan, Q. & Losick, R. (2003) J Bacteriol 185, 5275~8)。ClpC1が選択的にClpP2(Rv2460c)プロテアーゼサブユニットと会合する(図6)が、他のタンパク質分解性サブユニット(例えば、ClpP1)または無関係のコントロールのタンパク質とは会合しないという事実によって、この会合が特異的であることが示される。

10

20

【0158】

Pks13とのEsat-6およびCfp-10の会合によって、この相互作用が生理学的に特に關連することが特に示される。なぜなら、アセチル化はCfp-10とEsat-6との相互作用に影響することが以前に実証されているからである。Pks13におけるアセチルトランスフェラーゼ(AT)ドメインは、アシル化によってCfp-10を改変し得ると仮説された。興味深い事に、真核生物タンパク質のN末端アシル化は、頻繁に生じて、認識可能な分泌シグナル配列を欠くタンパク質の適切な転位に必要である。Cfp-10は、N末端においてMetの後にAlaを含むが、Cfp-10の公知のパートナーであるEsat-6は、N末端Thr残基でアセチル化される。真核生物では、これらのアミノ酸は、N末端アセチル化残基の約95%を占める。

30

【0159】

まとめると、M-PFCによって、Mtbにおけるタンパク質分泌の機構に対する認識が生じ得、そしてCfp-10分泌経路のいくつかの新規な成分が特定された。この結果は、Mtb SPS経路と進化的に保存されたSRPおよびSecA/SecYEG経路とを直接關連させ、そしてこれらの経路の間の重複の強力な証拠を提供し、これによってそれらは分泌成分を共有し得ることが示されている。また、M-PFCがFtsQ、ClpC1およびSecYEG複合体のような必須の遺伝子産物とMtb SPS経路において關係し得るという事実によって、遺伝子破壊ストラテジーによって受け入れられない病原性の機構をM-PFCが分析する能力が実証される。

40

【0160】

(方法)

株および培地。Mtb H37RvおよびMsm mc²155の培養および形質転換は、前に記載されたとおりに行った(Wards, B. J. & Collins, D. M. (1996) FEMS Microbiol Lett 145, 101~5)。必要な場合、Middlebrook media (Middlebrook培地)(MB)に、カナマイシン(25 μg/ml)、ハイグロマイシン(50 μg/ml)、またはトリメトプリム(40~50 μg/ml)を補充した。E. coliのDH10Bは、カナマイシン(25 μg/ml)またはハイグロマイシン(150 μg/ml)を補充したLB中で増殖した。

【0161】

50

M - P F C についてのプラスミド構築物。プラスミド p K S F R (1 , 2) および p K S F R (3) は、それぞれ、10アミノ酸の可塑性 G l y リンカー (G l y ₁₀) および G C N 4 ロイシンジッパーコード配列とインフレームで融合された、m D H F R F (1 , 2) (F [1 , 2]) および m D H F R F (3) (F [3]) を含み、M - P F C プラスミドを生成するためのテンプレートとして用いた。制限酵素部位 B a m H I および A c c I を含む相補性のオリゴヌクレオチドを用いて、可塑性の G l y リンカーおよびロイシンジッパー (G C N 4) 配列とともに F [1 , 2] を P C R 増幅した (G C N 4 - [G l y] ₁₀ - F [1 , 2]) 。その P C R フラグメントを消化して、B a m H I / C l a I 消化した p M V 2 6 1 に連結して、エピソームベクター p U A B 1 0 0 を生成した。同様に、可塑性のグリシンリンカーおよび G C N 4 配列とともに F [3] を含む P C R アンプリコン (G C N 4 - [G l y] ₁₀ - F [3]) を消化して、M f e I / H p a I 消化した p M V 3 6 1 に連結して、組み込みベクター p U A B 2 0 0 を生成した。これらの構築物は、m D H F R フラグメントの N 末端に融合された G C N 4 ホモ二量体化ドメインを含む。必要に応じて、p U A B 1 0 0 および p U A B 2 0 0 由来の G C N 4 ドメインを、餌 (ベイト) (b a i t) D N A および獲物 (プレイ) (p r e y) D N A 配列で置換した。ライブラリースクリーニングのために、M - P F C ベクターを、E . c o l i - マイコバクテリアシャトルベクター p M V 7 6 1 中へ F [3] - [G l y] ₁₀ 配列をクローニングすることによって改変して、組み込みベクター p U A B 4 0 0 を生成した。同様に、m D H F R の相補性フラグメント、すなわち、F [1 , 2] を、可塑性のグリシンリンカー (F [1 , 2] - [G l y] ₁₀) とともに、P C R 増幅して、p M V 7 6 2 にクローニングして、エピソームプラスミド p U A B 3 0 0 を作成した。

【 0 1 6 2 】

p U A B 1 0 0 および p U A B 3 0 0 は、エピソームのマイコバクテリア - E . c o l i シャトルプラスミドであるが、p U A B 2 0 0 および p U A B 4 0 0 は、マイコバクテリア - E . c o l i シャトルプラスミドを組み込んでいる。D N A ライブラリーを作成するための好ましいプラスミド選択は、p U A B 3 0 0 である。F [1 , 2] および F [3] は、m D H F R の相補性フラグメントであり、G C N 4 は、S . c e r e v i s i a e のロイシンジッパー配列であり、(G L Y) ₁₀ は、可塑性の10アミノ酸 G l y リンカーであり、a p h は、カナマイシンに対する耐性を付与し、h y g は、ハイグロマイシンに対する耐性を付与し、h s p 6 0 p は、h s p 6 0 プロモーターであり、o r i M は、マイコバクテリアにおける増殖の複製起点であり、o r i E は、E . c o l i における増殖の複製の起点であり、そして i n t および a t t P は、マイコバクテリオファージ L 5 由来である。

【 0 1 6 3 】

M - P F C のライブラリースクリーニング。5 × 10⁵ 個の独立したクローンを含む M t b のゲノム D N A ライブラリーを調製して、p U A B 3 0 0 の固有の C l a I 部位にクローニングした。餌 (ベイト) プラスミドを、c f p - 1 0 を P C R 増幅することおよび引き続く M u n I / C l a I 直線化 p U A B 4 0 0 への連結によって構築して、p U A B 3 0 0 - c f p 1 0 を作成した。餌 (b a i t) プラスミドを M s m 中に形質転換して、M t b ライブラリー D N A とともにエレクトロポレーションした。組み込みクローンを、K A N、H Y G および T R I M (5 0 μ g / m l) を含む 7 H 1 1 培地上に形質転換体をプレートすることによって選択した。

【 0 1 6 4 】

アラマーブルーアッセイ (a l a m a r b l u e a s s a y) 。相互作用プラスミドを含む M s m クローンを、H Y G および K A N を含む M B 7 H 9 培地中において、0 . 8 の O D _{600nm} まで培養した。細胞を、新鮮な 7 H 9 培地中で希釈して、約 10⁶ 個の細胞を、透明な底の 96 ウェルマイクロタイタープレートに添加した。アウター・ペリメータ (o u t e r p e r i m e t e r) ウェルを、滅菌水で満たして、脱水を防いだ。T R I M をジメチルスルホキシドに溶解して、薬物の 2 倍階段希釈を、マイクロタイタープレート中で 0 . 1 m l の 7 H 9 中に行った。薬物のみを含み M s m 細胞を含まない

ウェルが自己蛍光コントロールであった。さらなるコントロールは、細胞および培地のみを含むウェルから構成した。プレートを12時間インキュベートして、その後30 μ lのAlamar Blue (Biosource International; Camarillo, CA) 溶液 (MB 7H9 - ツーン培地中で1:1希釈) を、細胞のみを含むウェルに添加して、インキュベートし、ピンク色の出現について観察した。アラマー・ブルー (Alamar Blue) を、細胞にピンク色の出現後のウェルにのみ、各々のウェルに添加した。プレートをさらに、37 $^{\circ}$ でインキュベートして、その結果を6時間後に記録した。蛍光強度を、Cytofluor II マイクロプレート蛍光光度計 (PerSeptive Biosystems; Framingham, MA) 中で、ボトム・リーディングモード (bottom reading mode) で、530nmの励起および590nmの発光で測定した。空のベクター hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3] を含む Msm 形質転換体は、低レベルのバックグラウンド蛍光を示す。

【0165】

Yed グラフ・エディター (graph editor)。Cfp-10 と会合するタンパク質のネットワークを、Yed グラフ・エディター・ソフトウェア (www.yworks.com; Tübingen, Germany) を用いて生成した。

【0166】

Y2H 分析。相互作用が生物学的に有意であることを強力に示す知見である、複数の重複クローンが Cfp-10 スクリーニングで特定されたという事実にもかかわらず、Y2H システムを用いて、Cfp-10 / ClpC1、Cfp-10 / Pks13、Cfp-10 / FtsQ、Cfp-10 / Rv2240c および Cfp-10 / Rv0686 の相互作用を独立して確認する (図8)。Y2H データによって、Cfp-10 / ClpC1、Cfp-10 / FtsQ、Cfp-10 / Rv2240c、および Cfp-10 / Rv0686 は実際に会合するということが確認された。M-PFC スクリーニングで特定されたクローンも、Cfp-10 も、Y2H システムで自己会合できなかったことに注意のこと。

【0167】

Saccharomyces cerevisiae の株 (PJ69-4A および PJ69-4) を、前に記載のとおり培養した。餌 (bait) および獲物 (prey) のプラスミド pGBKT7 および pGADT7 (Clontech, CA) を用いて、2つのハイブリッド融合構築物を生成した。制限酵素部位 NcoI および BamHI を含む相補性オリゴヌクレオチドを用いて、全長 cfp-10 (餌) および獲物を PCR 増幅した。餌および獲物の融合構築物を配列決定によって確認して、S. cerevisiae PJ69-4 中に同時形質転換した。S. cerevisiae の PJ69-4 では、GAL4 は、ADE2、HIS3 および ガラクトシダーゼをコードする MEL1 を調節し、これによって、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド (X-Gal) (20 μ g/ml) を含有し、Ade および His を欠く合成完全 (synthetic complete) (SC) プレート上の青色形成についてスクリーニングすることによって、相互作用の特異性の確認が可能になる。酵母形質転換体を、SC-Leu-Trp 上で30 $^{\circ}$ で選択した。S. cerevisiae 細胞を、SC-Leu-Trp-Ade プレートを含有する X-Gal プレート上にプレートした (図8)。

【0168】

(実施例2: M-PFC を用いて低分子化合物ライブラリーをスクリーニングする)

本明細書に記載される M-PFC スクリーニングシステムを用いて、上記される Alamar blue アッセイを用い、DevR (DosR または Rv3133c と呼ばれる) 二量体化の低分子インヒビターについて検索した。このアッセイは、コントロールと比較した場合の490nmで放射された蛍光での有意な低下 (3 \times 標準偏差) に基づく生存度および/またはタンパク質間相互作用に対するインヒビターの影響を反映した。生存

10

20

30

40

50

度をもたらす化合物を、スクリーニングのために化合物から分離した。

【0169】

Chembridge (San Diego, CA) の DIVERSet (商標) ライブラリーから分離した 1000 の化合物のライブラリーを、Rv3133c 二量体化相互作用に対して $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で最初にスクリーニングした。このスクリーニングによって、細胞の生存度に影響しなかった 17 の候補物を得た。図 9 A および 9 B は、このスクリーニングについてのデータを示す。図 9 A では、スクリーニングで得られたデータを、コントロールのスクリーニングで得たデータで正規化した。図 9 B は、スキャンしたコントロールプレートおよび発見プレートのセグメントを示す。図 9 B では、白丸は、図 9 A における丸印のデータポイントに相当するヒットを示している (この図で交差斜線によって示される陽性ヒットを有するプレートにおいてそれぞれのウェルの蛍光強度における相違によって特定されるとおり)。図 9 B における白の矢印は、DevR 二量体化を標的しないが、コントロールプレートおよび発見プレートの両方において細胞を殺傷する化合物を示す。

10

【0170】

広範なカウンター・スクリーニングを、公知の相互作用対である Esat6 - Cfp10 (Rv3875 - Rv3874) を用いて行って、レポーター酵素 (DFHR) を標的した候補物を排除した。図 10 は、M-PFC Alamar Blue TRIM カウンタースクリーニングアッセイについての設定の図を示す。図 10 では、破線は、タンパク質間の会合のインヒビターの仮説の例を示す。図 10 では、DevR : DevR スクリーニングは、Esat6 - Cfp10 スクリーニングについてのカウンター・スクリーニングとして作用する (そして逆も真)。図 10 の固体の青色カラム (レーン 1 および 12 ; 濃い方の陰影付) は、混入物およびエッジ効果についての AB 単独コントロールである。図 10 のレーン 11 は、TRIM を含むが化合物のない相互作用クローンである。図 10 のピンク色 (薄い方の影付き) は、生存している細胞を示すが、青 (濃い方の影付き) は、死んだ細胞を示す。

20

【0171】

3 つの化合物をこのスクリーニングによって特定した : N - (4 - [(アセチルアミノ)スルホニル]フェニル) - 3 - フェニルプロパンアミド ; 1 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - (2 - イミノ - 3 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンズイミダゾール - 1 イル) エタノン塩酸塩 ; および 1 - (1, 3 - ベンズオキサゾール - 2 - イル) - 3 - ({ 4 - [(2 - ヒドロキシエチル)スルホニル]フェニル } アミノ) アクリルアルデヒド (これらの化合物についての構造は上記に示す)。これらの化合物の各々は、低濃度で DevR 二量体化に対する疎外性の影響を示した。図 11 は、これらの化合物についての滴定曲線を示す。3 つ全ての化合物は、 $12.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ で DevR 二量体化に最も劇的な影響を有する。1 - (3, 5 - ジ - tert - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル) - 2 - (2 - イミノ - 3 - メチル - 2, 3 - ジヒドロ - 1 H - ベンズイミダゾール - 1 イル) エタノン塩酸塩および 1 - (1, 3 - ベンズオキサゾール - 2 - イル) - 3 - ({ 4 - [(2 - ヒドロキシエチル)スルホニル]フェニル } アミノ) アクリルアルデヒドは、高濃度で細胞生存度に影響することが見出された。

30

40

【0172】

さらに、DevR 二量体化の阻害が、マイコバクテリウム属休眠状態経路に關与する対応するセンサーヒスチジンキナーゼである、DevR および DevS (Rv3132c) との上流の相互作用に影響するか否かを検討した。N - (4 - [(アセチルアミノ)スルホニル]フェニル) - 3 - フェニルプロパンアミドは、図 12 に示されるとおり、DevS (HKD) - DevR 相互作用を破壊し得ることが見出された。図 12 では、N - (4 - [(アセチルアミノ)スルホニル]フェニル) - 3 - フェニルプロパンアミドは、 10 および $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で DevS (HKD) - DevR 相互作用を破壊することが示され、一方、Esat6 - Cfp10 相互作用は、発効されないままである。図 12 はまた、TRIM の非存在下で DevS (HKD) - DevR および Esat6 - Cfp10

50

0の両方の株が増殖することを示す(右側のプレート)。

【0173】

(実施例3:マイコバクテリア細胞におけるラバマイシン誘導性タンパク質相互作用)
M-PFC実験は、M-PFC融合タンパク質のポリペプチド成分としてFRBおよびFKBP12フラグメントを用いて行った。FRBおよびFKBPは、ラバマイシンと相互作用して、三元複合体を形成することが公知である。Laura A. Banaszynski、Corey W. Liu、およびThomas J. Wandless, 「Characterization of the FKBP-Rapamycin-FRB Ternary Complex,」 J. Am. Chem. Soc., 127(13), 4715-4721, 2005を参照のこと。FRBおよびFKBP12に対するラバマイシンの結合領域を示すラバマイシンの化学構造は図13Aに示される。このシステムでは、図13Bに図示されるとおり、FKBP12およびFRB融合タンパク質は、ラバマイシンが存在する場合複合体を形成し、一緒になってDHFRフラグメントをもたらし、それによってトリメトプリム耐性が付与される。

10

【0174】

この実験では、FRBおよびFKBP12フラグメントは、6.25 ng/mL程度の少ないラバマイシンの付加の際に会合するが、これは20 µg/mLのトリメトプリムを用いてM-PFC Alamar Blue TRIMアッセイにおいて測定され得る。M-PFC Alamar Blue TRIMアッセイ実験データを図14に示す。図14Bは、種々のラバマイシン濃度で(TRIM、20 µg/mLで)の実験およびコントロールのプレートを示す(薄い方の影付きは、細胞生存を示している)。図14Aは、図14Bで示されるプレートからのラバマイシン滴定曲線データのプロットを示す。図14Aでの滴定曲線に示されるとおり、ラバマイシンは、6.25 ng/mL程度の小さい相互作用を誘導する。マイコバクテリア細胞の生存は、200 µg/mL程度の高さのラバマイシン濃度では発効されなかった。従って、この実験によって、FRBおよびFKBP12についてのラバマイシン親和性が、Mycobacterial細胞で保持されること、そして、トリメトプリム耐性が、FRB:ラバマイシン:FKBP12三元複合体を含むM-PFCシステムで付与され得ることが実証される。

20

【0175】

ラバマイシンがFRBおよびFKBP12との三元複合体を形成することを考慮すれば、図8および上記に示されるシステムによって、有用な薬物候補スクリーニングアッセイを提供する。このアッセイは、この実験と同様であり、ここではFRBまたはFRBP12が別のポリペプチドで置換され(図2Aおよび図2Bにおける「ライブラリー(Library)」または「X」)、そして薬物候補物は、ラバマイシンに関連付けられる。このアッセイでは、ラバマイシンは、FRB(またはFKBP12)ポリペプチドとの複合体を形成し、そして「ライブラリー(Library)」または「X」ポリペプチドが、薬物候補物に親和性を有する場合、DHFRフラグメントを再構成する複合体を形成し、これによってトリメトプリム耐性が付与される。

30

【0176】

本明細書に言及される任意の特許または刊行物は、本発明が属する当業者のレベルの指標である。これらの特許および刊行物は、あたかも各々の個々の刊行物が参照によって援用されることが詳細にかつ個々に示されるのと同じ程度まで参照によって本明細書に援用される。

40

【0177】

本発明は、本発明の2~3の局面の例示として意図される実施例に開示される実施形態、および本発明の範囲内である機能的に等価である任意の実施形態による範囲には限定されない。本明細書に示されかつ記載されるものに加えて本発明の種々の改変が当業者に明確になるものであり、そして添付された特許請求の範囲内におさまるものとする。さらに、本明細書に開示される組成物のわずかな特定の代表的な組み合わせが、上記の実施形態に詳細に考察されるが、この組成物の他の組み合わせは、当業者に明白になり、そしてま

50

た添付の特許請求の範囲内におさまるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0178】

【図1】マイコバクテリアのタンパク質フラグメント相補性 (mycobacterial-protein fragmentation complementation) (M-PFC) 技術を示す図である。

【図2】図2Aおよび図2Bは概して、ポリペプチド：因子の相互作用を特定するための方法における工程を図示する。

【図3】図3は、M-PFCにおいて用いられるプラスミドの概略図を示す。

【図4】図4Aは、M-PFCが、GCN4タンパク質の間のタンパク質間会合を示すために用いられ得るということを実証している細胞培養結果を示す：(1) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、(2) GCN4_[F1,2] / hsp60_[F3]、(3) GCN4_[F3] / hsp60_[F1,2] (4) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3]。図4Bは、M-PFCが、LdpDとKdpEタンパク質の間のタンパク質間

会合を示すために用いられ得るということを実証している細胞培養結果を示す：(1) KdpD_[F1,2] / KdpE_[F3]、(2) KdpD_[F1,2] / hsp60_[F3]、(3) KdpE_[F3] / hsp60_[F1,2] (4) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3]。図4Cは、M-PFCが、Esat6とCfp-10タンパク質

の間のタンパク質間会合を示すために用いられ得るということを実証している細胞培養結果を示す：(1) Esat-6_[F1,2] / Cfp-10_[F3]、(2) Esat-6_[F1,2] / hsp60_[F3]、(3) Cfp-10_[F3] / hsp60_[F1,2]、(4) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3]。

【図5】図5Aは、脂質二重層(左)および7H11/HYG/KAN/TRIM細胞培養物(右)におけるDosS/DosR(これはDevS/DevRとも呼ばれる)相互作用の図を示しており、これは、DevR_{F[3]}およびDevS_{F[1,2]}が会合するが、その他の融合タンパク質の組み合わせは会合しないことを示す：(1) DevR_{F[3]} および DevS_{F[1,2]}、(2) DevR_{F[3]} および hsp60_{F[1,2]} (3) hsp60_{F[3]} および DevS_{F[1,2]}、ならびに(4) hsp60_{F[1,2]} / hsp60_{F[3]}。図5Bは、[F1,2]および[F3](左)なら

びに7H11/HYG/KAN/TRIM細胞培養物(右)でのEsat-6およびCfp-10のC末端よびN末端融合タンパク質の両方の図を示しており、これはEsat-6_{F[1,2]} / Cfp-10_{F[3]}、および_{F[1,2]} Esat-6 / _{F[3]} Cfp-10が堅調な増殖を示したことを示している：(1) Esat-6_{F[1,2]} / Cfp-10_{F[3]}、(2) _{F[1,2]} Esat-6 / _{F[3]} Cfp-10、(3) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、および(4) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3]。

【図6】図6Aは、タンパク質パートナーを生成するプラスミドで同時形質転換されたMsm細胞について96ウェルマイクロタイタープレートにおける適合したAlamar Blue蛍光アッセイを示す(1) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3] (2) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、(3) DevS_[F1,2] / DevR_[F3]、(4) Esat-6_[F1,2] / Cfp-10_[F3] および(5) KdpD_[F1,2] / KdpE_[F3] (ここで非蛍光のブルー(濃い方の影付き)から蛍光のピンク(薄い方の影付き)への変化は、Alamar Blueの減少を示し、そしてタン

パク質間相互作用の指標である)。図6Bは、図5Aで示されるマイクロタイタープレートにおける色強度の変化を示す(530nmの励起波長を用いて580nmで測定した場合)。

【図7】図7は、グラフ(Yedグラフ・エディター・ソフトウェアを用いて作成した)を示しており、これはM-PFC技術によって特定および/または確認されたタンパク質会合を示している。破線の矢印は、自己会合を示す。外側の節は、Y2H研究を指すが、内側の節は本明細書で見いだされた新規な相互作用を指す。

【図8】図8Aは、脂質二重層(左)および7H11/HYG/KAN/TRIM細胞培養物(右)におけるDosS/DosR(これはDevS/DevRとも呼ばれる)相互作用の図を示しており、これは、DevR_{F[3]}およびDevS_{F[1,2]}が会合するが、その他の融合タンパク質の組み合わせは会合しないことを示す：(1) DevR_{F[3]} および DevS_{F[1,2]}、(2) DevR_{F[3]} および hsp60_{F[1,2]} (3) hsp60_{F[3]} および DevS_{F[1,2]}、ならびに(4) hsp60_{F[1,2]} / hsp60_{F[3]}。図8Bは、[F1,2]および[F3](左)なら

びに7H11/HYG/KAN/TRIM細胞培養物(右)でのEsat-6およびCfp-10のC末端よびN末端融合タンパク質の両方の図を示しており、これはEsat-6_{F[1,2]} / Cfp-10_{F[3]}、および_{F[1,2]} Esat-6 / _{F[3]} Cfp-10が堅調な増殖を示したことを示している：(1) Esat-6_{F[1,2]} / Cfp-10_{F[3]}、(2) _{F[1,2]} Esat-6 / _{F[3]} Cfp-10、(3) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、および(4) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3]。

【図9】図9Aは、タンパク質パートナーを生成するプラスミドで同時形質転換されたMsm細胞について96ウェルマイクロタイタープレートにおける適合したAlamar Blue蛍光アッセイを示す(1) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3] (2) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、(3) DevS_[F1,2] / DevR_[F3]、(4) Esat-6_[F1,2] / Cfp-10_[F3] および(5) KdpD_[F1,2] / KdpE_[F3] (ここで非蛍光のブルー(濃い方の影付き)から蛍光のピンク(薄い方の影付き)への変化は、Alamar Blueの減少を示し、そしてタン

パク質間相互作用の指標である)。図9Bは、図9Aで示されるマイクロタイタープレートにおける色強度の変化を示す(530nmの励起波長を用いて580nmで測定した場合)。

【図10】図10は、グラフ(Yedグラフ・エディター・ソフトウェアを用いて作成した)を示しており、これはM-PFC技術によって特定および/または確認されたタンパク質会合を示している。破線の矢印は、自己会合を示す。外側の節は、Y2H研究を指すが、内側の節は本明細書で見いだされた新規な相互作用を指す。

【図11】図11Aは、脂質二重層(左)および7H11/HYG/KAN/TRIM細胞培養物(右)におけるDosS/DosR(これはDevS/DevRとも呼ばれる)相互作用の図を示しており、これは、DevR_{F[3]}およびDevS_{F[1,2]}が会合するが、その他の融合タンパク質の組み合わせは会合しないことを示す：(1) DevR_{F[3]} および DevS_{F[1,2]}、(2) DevR_{F[3]} および hsp60_{F[1,2]} (3) hsp60_{F[3]} および DevS_{F[1,2]}、ならびに(4) hsp60_{F[1,2]} / hsp60_{F[3]}。図11Bは、[F1,2]および[F3](左)なら

びに7H11/HYG/KAN/TRIM細胞培養物(右)でのEsat-6およびCfp-10のC末端よびN末端融合タンパク質の両方の図を示しており、これはEsat-6_{F[1,2]} / Cfp-10_{F[3]}、および_{F[1,2]} Esat-6 / _{F[3]} Cfp-10が堅調な増殖を示したことを示している：(1) Esat-6_{F[1,2]} / Cfp-10_{F[3]}、(2) _{F[1,2]} Esat-6 / _{F[3]} Cfp-10、(3) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、および(4) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3]。

【図12】図12Aは、タンパク質パートナーを生成するプラスミドで同時形質転換されたMsm細胞について96ウェルマイクロタイタープレートにおける適合したAlamar Blue蛍光アッセイを示す(1) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3] (2) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、(3) DevS_[F1,2] / DevR_[F3]、(4) Esat-6_[F1,2] / Cfp-10_[F3] および(5) KdpD_[F1,2] / KdpE_[F3] (ここで非蛍光のブルー(濃い方の影付き)から蛍光のピンク(薄い方の影付き)への変化は、Alamar Blueの減少を示し、そしてタン

パク質間相互作用の指標である)。図12Bは、図12Aで示されるマイクロタイタープレートにおける色強度の変化を示す(530nmの励起波長を用いて580nmで測定した場合)。

【図13】図13は、グラフ(Yedグラフ・エディター・ソフトウェアを用いて作成した)を示しており、これはM-PFC技術によって特定および/または確認されたタンパク質会合を示している。破線の矢印は、自己会合を示す。外側の節は、Y2H研究を指すが、内側の節は本明細書で見いだされた新規な相互作用を指す。

【図14】図14Aは、脂質二重層(左)および7H11/HYG/KAN/TRIM細胞培養物(右)におけるDosS/DosR(これはDevS/DevRとも呼ばれる)相互作用の図を示しており、これは、DevR_{F[3]}およびDevS_{F[1,2]}が会合するが、その他の融合タンパク質の組み合わせは会合しないことを示す：(1) DevR_{F[3]} および DevS_{F[1,2]}、(2) DevR_{F[3]} および hsp60_{F[1,2]} (3) hsp60_{F[3]} および DevS_{F[1,2]}、ならびに(4) hsp60_{F[1,2]} / hsp60_{F[3]}。図14Bは、[F1,2]および[F3](左)なら

びに7H11/HYG/KAN/TRIM細胞培養物(右)でのEsat-6およびCfp-10のC末端よびN末端融合タンパク質の両方の図を示しており、これはEsat-6_{F[1,2]} / Cfp-10_{F[3]}、および_{F[1,2]} Esat-6 / _{F[3]} Cfp-10が堅調な増殖を示したことを示している：(1) Esat-6_{F[1,2]} / Cfp-10_{F[3]}、(2) _{F[1,2]} Esat-6 / _{F[3]} Cfp-10、(3) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、および(4) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3]。

【図15】図15Aは、タンパク質パートナーを生成するプラスミドで同時形質転換されたMsm細胞について96ウェルマイクロタイタープレートにおける適合したAlamar Blue蛍光アッセイを示す(1) hsp60_[F1,2] / hsp60_[F3] (2) GCN4_[F1,2] / GCN4_[F3]、(3) DevS_[F1,2] / DevR_[F3]、(4) Esat-6_[F1,2] / Cfp-10_[F3] および(5) KdpD_[F1,2] / KdpE_[F3] (ここで非蛍光のブルー(濃い方の影付き)から蛍光のピンク(薄い方の影付き)への変化は、Alamar Blueの減少を示し、そしてタン

パク質間相互作用の指標である)。図15Bは、図15Aで示されるマイクロタイタープレートにおける色強度の変化を示す(530nmの励起波長を用いて580nmで測定した場合)。

10

20

30

40

50

【図8】図8Aは、Ade、LeuおよびTrpを欠くが、x - · - Galを補充されたSC培地で増殖された*S. cerevisiae*のクローンにおいてM - PFCスクリーニングで特定されたタンパク質とのMtb Cfp - 10の相互作用を実証するY2Hのデータを示す。組み合わせは以下であった：1) *S. cerevisiae* [Cfp - 10 / ClpC1]、2) *S. cerevisiae* [Cfp - 10 / Rv0686]、3) *S. cerevisiae* [pGBKT7 / ClpC1]、4) *S. cerevisiae* [pGBKT7 / Rv0686]。図8Bは、Ade、LeuおよびTrpを欠くが、x - · - Galを補充されたSC培地で増殖された*S. cerevisiae*のクローンにおいてM - PFCスクリーニングで特定されたタンパク質とのMtb Cfp - 10の相互作用を実証するY2Hのデータを示す。組み合わせは以下であった：1) *S. cerevisiae* [Cfp - 10 / FtsQ]、2) *S. cerevisiae* [Cfp - 10 / Rv3800c]、3) *S. cerevisiae* [pGBKT7 / Rv3800c]、4) *S. cerevisiae* [Cfp - 10 / pGADT7]。図8Cは、Ade、LeuおよびTrpを欠くが、x - · - Galを補充されたSC培地で増殖された*S. cerevisiae*のクローンにおいてM - PFCスクリーニングで特定されたタンパク質とのMtb Cfp - 10の相互作用を実証するY2Hのデータを示す。組み合わせは以下であった：1) *S. cerevisiae* [Cfp - 10 / Rv2240c]、2) *S. cerevisiae* [Cfp - 10 / FtsQ]、3) *S. cerevisiae* [pGBKT7 / FtsQ]、4) *S. cerevisiae* [pGBKT7 / Rv2240c]。

10

20

【図9】図9Aは、DevR二量体化を阻害する低分子を特定するためのライブラリースクリーニング実験からのデータを示しており、そして図9Bは、例のコントロール/発見プレート設定を示しており、ここで矢印は発見プレート上の擬陽性を示し、そして白丸が発見プレート上の陽性のヒットを示す（ここで陽性のヒットは図9Bで斜影線として示される）。

【図10】図10は、M - PFC Alamar Blue TRIMカウンタースクリーニングアッセイについて設定された2つのプレートの例を示す。

【図11】図11は、DevR二量体化を阻害する低分子を特定するためのスクリーニング実験で特定された分子の滴定曲線を示す。

【図12】図12は、実験プレートを示しており、これはN - (4 - [(アセチルアミノ)スルホニル]フェニル) - 3 - フェニルプロパンアミドが、DevS (HKD) - DevR相互作用を破壊し得るということを示している。

30

【図13】図13Aは、ラパマイシンの化学構造を示しており、そして図13Bは、M - PFCシステム内で形成されたラパマイシン媒介性FRP : ラパマイシン : FKBP12複合体を示す。

【図14】図14Aは、FRPとFKBP12との間のラパマイシン誘発性の相互作用の滴定プロットを示す。その実験データは、図14Bに示される。

【 図 1 】

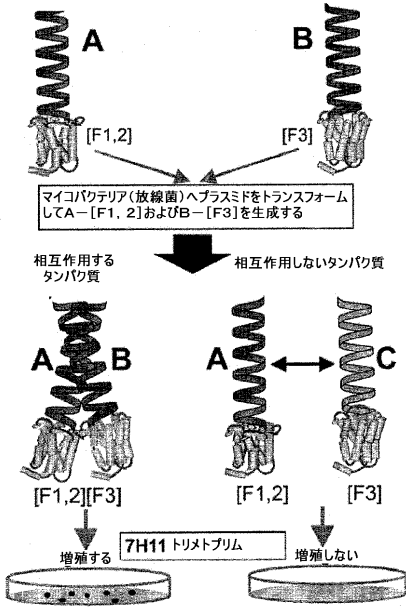


Fig. 1

【 図 2 】

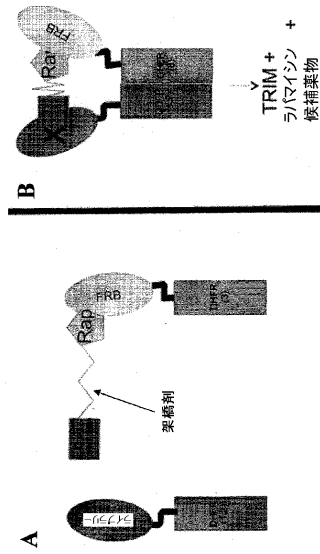


Fig. 2

【 図 3 】

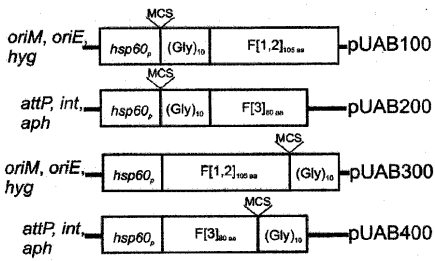


Fig. 3

【 図 4 】

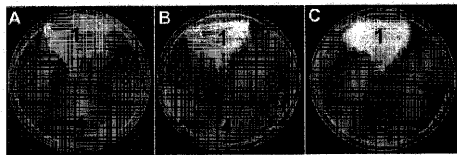


Fig. 4

【 図 5 】

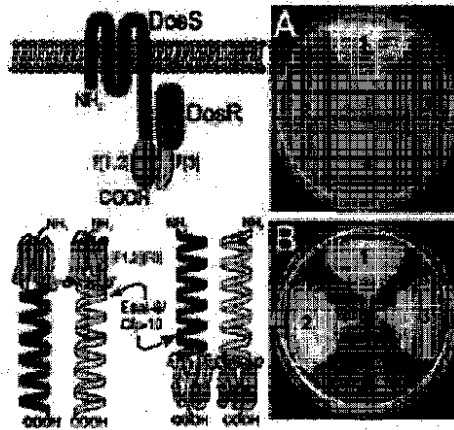


Fig. 5

【 図 6 】

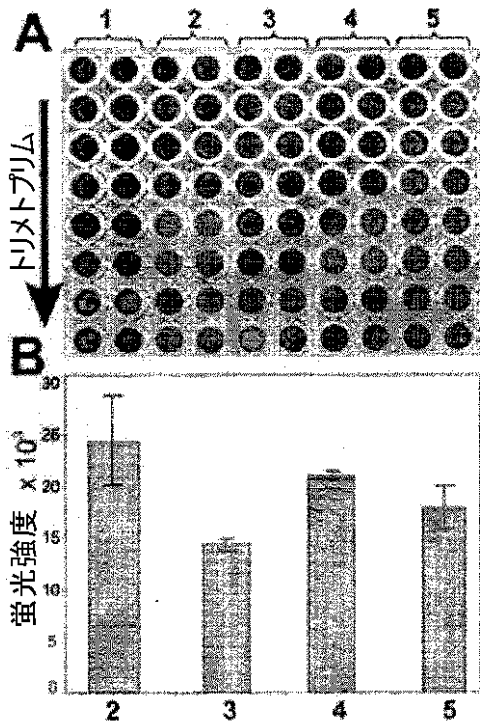


Fig. 6

【 図 7 】

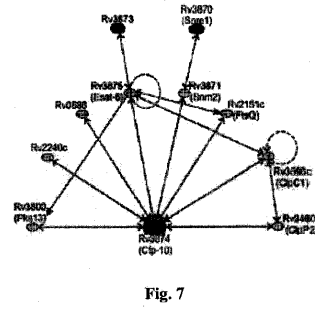


Fig. 7

【 図 8 】

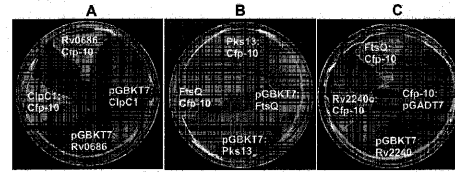


Fig. 8

【 図 9 】

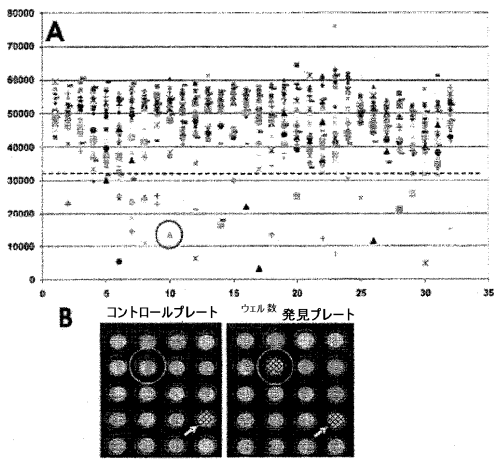


Fig. 9

【 図 10 】

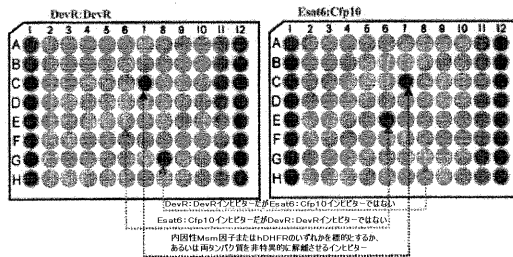


Fig. 10

【 図 1 1 】

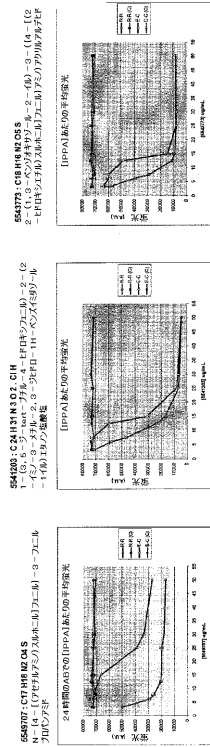


Fig. 11

【 図 1 2 】

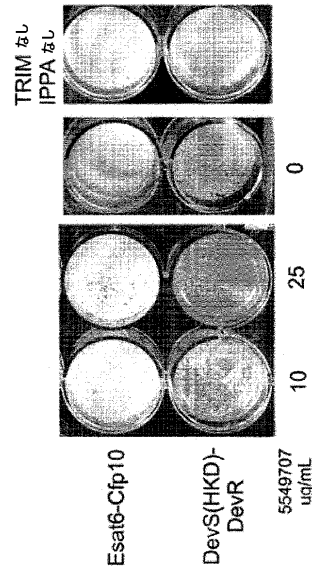


Fig. 12

【 図 1 3 】

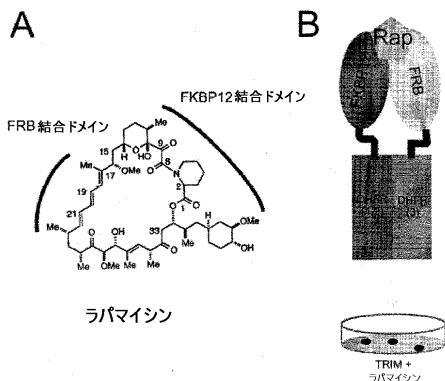


Fig. 13

【 図 1 4 】

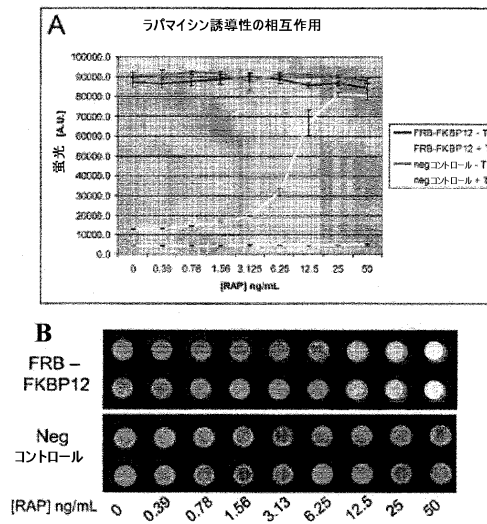




Fig. 14

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2007/063099
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/68(2006.01); C07K 14/00(2006.01); C07K 14/195(2006.01);</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) IPC 8: C12Q, C12N, G01N, A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS(KIPO internal), Delphion, Pubmed {protein, interaction, fusion, mycobacterial, mycobaterium, tuberculosis, CFP-10, ESAT-6, and similar terms}		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P ₂ X / P ₂ A	"Dissecting virulence pathways of Mycobacterium tuberculosis through protein-protein association" (2006) PNAS Vol.103(30) pages 11346-11351, 25 JULY 2006 See the entire document	17, 18, 25-28, 30, 42, 43 / 32-41, 44, 45, 54, 56
X / A	US20020106698A1 (MANFREDI, J.) 08 AUGUST 2002 See claim 18, figure 3 & 5, paragraphs 8-14, 52, 53, 74, 75, 80, 81.	17, 18, 25-28, 30, 32-45 / 54, 56
X / A	WO 0507822A1 (SENTIGEN BIOSCIENCES, INC.) 27 JAN. 2005 See abstract and claims 1-76.	17, 18, 25-28, 30, 32-45 / 54, 56
X / A	US 5985935A (KHARAZIMI, A. ET AL.) 16 NOV. 1999 See abstract.	54, 56 / 17, 18, 25-28, 30, 32-45
A	US 5444094A (STEPAN COMPANY) 22 AUG. 1995 See claims 1-10.	17, 18, 25-28, 30, 32-45, 54, 56
<input 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 23 OCTOBER 2007 (23.10.2007)		Date of mailing of the international search report 23 OCTOBER 2007 (23.10.2007)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer JEONG, JAE CHEOL  Telephone No. 82-42-481-8385

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/063099**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

2. Claims Nos.: 1-16, 19-24, 29, 31, 46-53, 55, 57-62
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:

The polypeptides, "Rv0686, Rv2151c, Rv2240, Rv3596c, or Rv3800c, (or a fragments thereof)" in claims 1-16, 19-24, 29, 31, 46-53 are vague and unclear, rendering said claims unsearchable. Rv3133c in claims 55, 57-62 is vague and unclear, rendering said claims unsearchable.

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

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

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

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/US2007/063099

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US20020106698A1	08.08.2002	W00264834A1	22.08.2002
		US20020106693A1	08.08.2002
		US20020106632A1	08.08.2002
		US20020105809AA	08.08.2002
		US6562576BB	13.05.2003
W00507822A1	27.01.2005	AU2004257228AA	27.01.2005
		CA2531698A1	27.01.2005
		CN1894581A	10.01.2007
		EP1644734A2	12.04.2006
		EP1644734A4	25.04.2007
		US20050100934A1	12.05.2005
		US20060073123A1	06.04.2006
		US20060196120A1	07.09.2006
		US20060147975AA	06.07.2006
		US2007224615AA	27.09.2007
		US7049076BB	23.05.2006
		US7178292BB	20.02.2007
		W005007822A2	27.01.2005
US5985935A	16.11.1999	W09317671A1	16.09.1993
		US6603046B1	05.08.2003
		EP0634927B1	04.07.2001
US5444094A	22.08.1995	none	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
A 6 1 K 31/63 (2006.01)	A 6 1 K 31/63	
A 6 1 K 31/4184 (2006.01)	A 6 1 K 31/4184	
A 6 1 K 31/423 (2006.01)	A 6 1 K 31/423	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
C 0 7 D 235/30 (2006.01)	C 0 7 D 235/30	B
C 0 7 D 263/56 (2006.01)	C 0 7 D 263/56	

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

(72) 発明者 ステイン, アンドリース ジェイ. シー.
 アメリカ合衆国 アラバマ 3 5 2 4 4, フーバー, エデン リッジ ドライブ 1 4 0 8

(72) 発明者 マイ, デボラ
 アメリカ合衆国 アラバマ 3 5 4 0 6, タスカルーサ, グレイモント レーン 1 4 0 0

(72) 発明者 シン, アミット
 アメリカ合衆国 アラバマ 3 5 2 1 6, フーバー, センテナリアル ドライブ, ライム ビ
 レッジ, アpartment ナンバー 1 1 1 2

F ターム(参考) 2G045 AA40

4B024 AA13 BA08 BA80 CA01 DA06 EA04 GA11 HA08 HA12
 4B063 QA18 QA19 QQ06 QQ08 QQ24 QR04 QR41 QR42 QR57 QR75
 QR80 QS28 QS36 QS38 QX01
 4C056 AA01 AB01 AC02 AD03 AE03 CA06 CA09 CC01 CD01
 4C086 AA01 AA02 BC39 BC70 DA19 MA01 MA03 NA14 ZB35

专利名称(译)	分枝杆菌的疾病检测，治疗和药物开发		
公开(公告)号	JP2009528545A	公开(公告)日	2009-08-06
申请号	JP2008557501	申请日	2007-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	UAB研究基金会		
申请(专利权)人(译)	该Yuebi研究基金会		
[标]发明人	ステインアンドリースジェイシー マイデボラ シンアミット		
发明人	ステイン, アンドリース ジェイ. シー. マイ, デボラ シン, アミット		
IPC分类号	G01N33/569 C12N15/09 C12Q1/32 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/50 G01N33/15 A61K31/63 A61K31/4184 A61K31/423 A61P31/10 C07D235/30 C07D263/56		
CPC分类号	C12N15/1037 A61K31/18 A61K31/4184 A61K31/423 A61K39/00 C12Q1/18 G01N33/5695 G01N2333 /35 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/569.F C12N15/00.F C12Q1/32 G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K31/63 A61K31/4184 A61K31/423 A61P31/10 C07D235/30.B C07D263/56		
F-TERM分类号	2G045/AA40 4B024/AA13 4B024/BA08 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ24 4B063/QR04 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR57 4B063/QR75 4B063/QR80 4B063/QS28 4B063 /QS36 4B063/QS38 4B063/QX01 4C056/AA01 4C056/AB01 4C056/AC02 4C056/AD03 4C056/AE03 4C056/CA06 4C056/CA09 4C056/CC01 4C056/CD01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC39 4C086 /BC70 4C086/DA19 4C086/MA01 4C086/MA03 4C086/NA14 4C086/ZB35		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/778307 2006-03-02 US 60/872366 2006-12-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种检测受试者中结核感染的方法，包括检测一种或多种多肽。

