

(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2005-518203

(P2005-518203A)

(43) 公表日 平成17年6月23日(2005.6.23)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/04		4 B O 6 3
A 6 1 K 39/04	A 6 1 K 39/39		4 B O 6 4
A 6 1 K 39/39	A 6 1 P 31/06		4 B O 6 5
A 6 1 P 31/06	C O 7 K 14/35		4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 50 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-569872 (P2003-569872)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月25日 (2003. 2. 25)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月20日 (2004. 10. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2003/000986
 (87) 国際公開番号 W02003/070981
 (87) 国際公開日 平成15年8月28日 (2003. 8. 28)
 (31) 優先権主張番号 02290458.5
 (32) 優先日 平成14年2月25日 (2002. 2. 25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 501173391
 アンスティテュ・パストゥール
 INSTITUT PASTEUR
 フランス国パリ、リュ、デュ、ドクトール
 、ルー、25-28
 (71) 出願人 504323711
 ベテリナリー、ラボラトリーズ、エイジェ
 ンシー
 VETERINARY LABORATO
 RIES AGENCY
 イギリス国サリー、アデルストーン、ニュー
 ー、ハム
 (74) 代理人 100075812
 弁理士 吉武 賢次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 M. TUBERCULOSIS の欠失配列、これらの配列を用いるマイコバクテリアの検出方法、およびワクチン

(57) 【要約】

本発明は、特に、Mycobacterium africanum、Mycobacterium canetti、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCGに起因する感染症からMycobacterium tuberculosis株の大部分に起因する感染症を識別することができるヌクレオチド配列の同定である。本発明の主題はまた、これらの配列の発現産物によって問題の配列を検出する方法、およびこれらの方法を実施するためのキットである。さらに、本発明の主題は、新規なワクチンである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記からなる群より選択される、単離または精製した核酸：

- a . 配列番号 1、
- b . 配列番号 1 に完全に相補的な配列を有する核酸、
- c . 最適アライメント後に、a) または b) に記載の配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸、
- d . ストリンジェント条件下で、a) または b) に記載の核酸とハイブリダイズする核酸。

【請求項 2】

10

請求項 1 に記載の少なくとも 1 個の核酸で構成される少なくとも 8 ~ 2000 の連続的ヌクレオチドを含んでなる、核酸断片。

【請求項 3】

配列番号 1 に特異的なプローブまたはプライマーとして用いることが可能な、請求項 2 に記載の核酸断片。

【請求項 4】

配列番号 17、配列番号 18 からなる群より選択される、請求項 2 に記載の核酸断片。

【請求項 5】

プライマーである配列番号 17 および配列番号 18 の対を用いる、配列番号 1 の特異的増幅によって得られる、請求項 2 に記載の核酸断片。

20

【請求項 6】

核酸断片が、

遺伝子 *katG* のコドン 463 に配列 CTG を有し且つゲノムには IS6110 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* のゲノムから特異的に欠失し、かつ

Mycobacterium africanum、*Mycobacterium canetti*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis BCG* のゲノムに含まれているものである、

請求項 2 に記載の核酸断片。

【請求項 7】

- a) 配列番号 4、
- b) 配列番号 4 に完全に相補的な配列を有する核酸、
- c) 最適アライメント後に、a) または b) に記載の配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する核酸、
- d) ストリンジェント条件下で a) または b) に記載の核酸とハイブリダイズする核酸

30

からなる群より選択される、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項に記載の核酸断片。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の少なくとも 1 個の核酸の少なくとも 8 ~ 2000 の連続的ヌクレオチドを含んでなる、核酸断片。

【請求項 9】

40

配列番号 1 および配列番号 4 に特異的なプローブまたはプライマーとして用いることが可能な、請求項 2 または 8 に記載の核酸断片。

【請求項 10】

配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 からなる群より選択される、請求項 9 に記載の核酸断片。

【請求項 11】

配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16 からなる群より選択される 1 対のプライマーを用いる、配列番号 1 または配列番号 4 の特異的増幅によって得られる、請求項 9 に記載の核酸断片。

【請求項 12】

50

プライマーの対である配列番号 1 3 および配列番号 1 4 を用いる、配列番号 1 または配列番号 4 の特異的増幅によって得られる、請求項 9 に記載の核酸断片。

【請求項 1 3】

プライマーの対である配列番号 1 5 および配列番号 1 6 を用いる、配列番号 1 または配列番号 4 の特異的増幅によって得られる、請求項 9 に記載の核酸断片。

【請求項 1 4】

核酸が請求項 6、7 および 8 のいずれか一項に記載の核酸断片の少なくとも 1 個の欠失を含んでなる、請求項 1 に記載の単離または精製した核酸。

【請求項 1 5】

請求項 1、2、6、7、8 および 1 4 のいずれか一項に記載の核酸によってコードされる、単離または精製したポリペプチド。 10

【請求項 1 6】

配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 2 2、およびそれらの断片の配列を有するポリペプチドから選択される、請求項 1 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のポリペプチドをコードする、単離または精製した核酸。

【請求項 1 8】

核酸が、

配列番号 6 のポリペプチドをコードする配列番号 5、

配列番号 8 のポリペプチドをコードする配列番号 7、

配列番号 1 0 のポリペプチドをコードする配列番号 9、

配列番号 1 2 のポリペプチドをコードする配列番号 1 1、

配列番号 2 2 のポリペプチドをコードする配列番号 2 1、および

それらの断片から選択される、請求項 1 7 に記載の単離または精製した核酸。 20

【請求項 1 9】

請求項 1、2、3、5、6、7、8、9、1 1、1 2、1 3 または 1 4 のいずれか一項に記載の核酸から選択される核酸配列を含んでなる、組換えベクター。

【請求項 2 0】

2 0 0 2 年 2 月 1 8 日に CNCM に I - 2 7 9 9 で寄託された組換え *Escherichia coli* に導入された X 2 2 9 という名称のベクターからなる、請求項 1 9 に記載の組換えベクター。 30

【請求項 2 1】

1、2、3、5、6、7、8、9、1 1、1 2、1 3 または 1 4 のいずれか一項に記載の核酸から選択される核酸配列、または請求項 1 9 または 2 0 に記載のベクターを含んでなる、組換え細胞。

【請求項 2 2】

2 0 0 2 年 2 月 1 8 日に CNCM に I - 2 7 9 9 で寄託された組換え *Escherichia coli* からなる、請求項 2 1 に記載の組換え細胞。

【請求項 2 3】

遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* と、 40

生物学的試料中の *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canetti*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis* BCG とを区別して検出し同定する方法であって、

a) 分析を行う生物学的試料から DNA を単離し、または生物学的試料の RNA から cDNA を産生し、

b) 上記生物学的試料に含まれるマイコバクテリウムの核酸配列を検出し、

c) 請求項 6、7 または 8 のいずれか一項に記載の核酸断片の存在または非存在を分析する

工程を含んでなる、方法。

【請求項 24】

マイコバクテリウムの DNA 配列を、DNA 配列に相補的なヌクレオチド配列を用いて検出する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

マイコバクテリウムの DNA 配列をプライマーを用いてこれらの配列を増幅することによって検出する、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

プライマーが、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する、請求項 25 に記載の方法。 10

【請求項 27】

遺伝子 katG のコドン 463 に配列 CTG を有し且つゲノムには IS6110 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない Mycobacterium tuberculosis 株を除く Mycobacterium tuberculosis と、

生物学的試料中の Mycobacterium africanum、Mycobacterium canetti、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCG とを区別して検出し同定する方法であって、

- a) 分析を行う生物学的試料を請求項 25 または 26 に記載の少なくとも 1 対のプライマーと接触させ、この試料に含まれる DNA を、適当な場合には、予めハイブリダイゼーションに利用できるようにし、 20
- b) マイコバクテリウムの DNA を増幅し、
- c) DNA 断片の増幅を可視化する

工程を含んでなる、方法。

【請求項 28】

遺伝子 katG のコドン 463 に配列 CTG を有し且つゲノムには IS6110 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない Mycobacterium tuberculosis 株を除く Mycobacterium tuberculosis と、

生物学的試料中の Mycobacterium africanum、Mycobacterium canetti、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCG とを区別して検出し同定するためのキットであって、下記の因子： 30

- a) 請求項 25 または 26 に記載の少なくとも 1 対のプライマー、
 - b) DNA 増幅反応を行うのに必要な試薬、
 - c) 必要に応じて、増幅した断片の配列および/または大きさを明らかにしまたは比較することができる必要な成分
- を含んでなる、キット。

【請求項 29】

Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium africanum、Mycobacterium canettii、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis または Mycobacterium bovis BCG からの DNA 配列を増幅するための、請求項 25 または 26 に記載の少なくとも 1 対のプライマーの使用。 40

【請求項 30】

Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium africanum、Mycobacterium canettii、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis または Mycobacterium bovis BCG からの DNA 配列を増幅するための、請求項 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 対のプライマーまたは少なくとも 1 個の核酸断片の使用。

【請求項 31】

請求項 6、7 または 8 のいずれか一項に記載の核酸断片の全部または一部の発現産物。

【請求項 32】

遺伝子 k a t G のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない Mycobacterium tuberculosis 株を除く Mycobacterium tuberculosis に対して特異的な抗体と、
 生物学的試料中の Mycobacterium africanum、Mycobacterium canetti、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCG に対して特異的な抗体とをイン・ビトロで区別して検出する方法であって、

- a) 生物学的試料を請求項 3 1 に記載の少なくとも 1 個の産物と接触させ、
- b) 形成した抗原 - 抗体複合体を検出する

工程を含んでなる、方法。

【請求項 3 3】

Mycobacterium bovis BCG を用いる予防接種、M. bovis、M. caraettii、M. microti、M. africanum、または遺伝子 k a t G のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない M. tuberculosis 株による感染症と、哺乳類の遺伝子 k a t G のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない Mycobacterium tuberculosis 株を除く Mycobacterium tuberculosis による感染症とをイン・ビトロで区別して検出する方法であって、

- a) 細胞、より詳しくは上記哺乳類の免疫系の細胞、更に詳しくは T 細胞を調製し、
- b) 工程 a) の生物学的試料を、請求項 3 1 に記載の少なくとも 1 個の産物と共にインキュベーションし、

c) 上記産物に対する哺乳類の予備増感を示す細胞反応、特に細胞増殖および / または - インターフェロンのようなタンパク質の合成を検出する
 工程を含んでなる、方法。

【請求項 3 4】

Mycobacterium bovis BCG を用いる予防接種、M. bovis、M. caraettii、M. microti、M. africanum と、哺乳類における遺伝子 k a t G のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない M. tuberculosis 株による感染症と、哺乳類の遺伝子 k a t G のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く M. tuberculosis による感染症とをイン・ビトロで区別して診断するためのキットであって、

- a) 請求項 3 1 に記載の産物、
- b) 適当な場合には、免疫反応に適する培地を構成するための試薬、
- c) 免疫反応によって産生した抗原 - 抗体複合体を検出することができる試薬、
- d) 適当な場合には、上記産物によって認識された抗体を含まない参照用生物学的試料（ネガティブコントロール）、
- e) 適当な場合には、上記産物によって認識された抗体の予定量を含む参照用生物学的試料（ポジティブコントロール）

を含んでなる、キット。

【請求項 3 5】

請求項 3 1 に記載の産物を特異的に認識することができる、モノクローナルまたはポリクローナル抗体、そのキメラ断片またはキメラ抗体。

【請求項 3 6】

遺伝子 k a t G のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く Mycobacterium tuberculosis の抗原と、生物学的試料中の Mycobacterium africanum、Mycobacterium canetti、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCG または遺伝子 k a t G のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない Mycobacterium tuberculosis の抗原の存在を区別して検出する方法であって、

10

20

30

40

50

- a) 生物学的試料を請求項 35 に記載の抗体と接触させ、
- b) 形成した抗原 - 抗体複合体を検出する

工程を含んでなる、方法。

【請求項 37】

遺伝子 *k a t G* のコドン 463 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く *Mycobacterium tuberculosis* の抗原と、生物学的試料中の *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canetti*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis* BCG または遺伝子 *k a t G* のコドン 463 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* の抗原の存在を区別して検出するためのキットであって、

10

- a) 請求項 35 に記載の抗体、
- b) 免疫反応に適する培地を構成するための試薬、
- c) 免疫反応によって産生した抗原 - 抗体複合体を検出することができる試薬

の工程を含んでなる、キット。

【請求項 38】

少なくとも 1 個の請求項 31 に記載の産物を含んでなる、免疫原性組成物。

【請求項 39】

少なくとも 1 個の請求項 31 に記載の産物を、薬学上適合性のビヒクル、および適当な場合には、1 種類以上の適当な免疫アジュバントと組み合わせて含んでなる、ワクチン。

20

【請求項 40】

生物学的試料中の遺伝子 *k a t G* のコドン 463 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* を検出し同定するイン・ビトロ法であって、

- a) 分析を行う生物学的試料から D N A を単離しまたは生物学的試料の R N A から c D N A を産生し、
- b) 上記生物学的試料に含まれるマイコバクテリウムの核酸配列を検出し、
- c) 請求項 6、7 または 8 のいずれか一項に記載の核酸断片の存在または非存在について分析を行う

30

工程を含んでなる、イン・ビトロ法。

【請求項 41】

生物学的試料中の遺伝子 *k a t G* のコドン 463 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* を検出し同定するイン・ビトロ法であって、

- a) 分析を行う生物学的試料を、請求項 1 ~ 14、17 または 18 のいずれか一項に記載の核酸から選択される、更に好ましくは配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 を含んでなる群から選択されるプライマーから選択される、少なくとも 1 対のプライマーと接触させ、試料に含まれる D N A を、適当な場合には、予めハイブリダイゼーションを行うことができるようにしておき、
- b) マイコバクテリウムの D N A を増幅し、
- c) D N A 断片の増幅を可視化する

40

工程を含んでなる、イン・ビトロ法。

【請求項 42】

生物学的試料において、遺伝子 *k a t G* のコドン 463 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* を検出し同定するためのキットであって、下記の因子：

- a) 請求項 1 ~ 14、17 または 18 のいずれか一項に記載の核酸から選択される、

50

更に好ましくは配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8 を含んでなる群から選択される、少なくとも 1 対のプライマー、

b) DNA 増幅反応を行うのに要する試薬、

c) 必要に応じて、増幅した断片の配列および/または大きさを明らかにしまたは比較することができる必要な成分

を含んでなる、キット。

【請求項 4 3】

生物学的試料において、遺伝子 *katG* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* に対して特異的な抗体をイン

10

・ピトロで検出する方法であって、

a) 生物学的試料を請求項 3 1 に記載の少なくとも 1 個の産物と接触させ、

b) 形成した抗原 - 抗体複合体を検出する

工程を含んでなる、方法。

【請求項 4 4】

Mycobacterium 群の *Mycobacterium* 株を識別するための遺伝子マーカーとしての T b D 1 の使用。

【請求項 4 5】

Mycobacterium 群の *Mycobacterium* 株を識別するための遺伝子マーカーとしての m m p L 6^{5 5 1} 多型の使用。

20

【請求項 4 6】

R D 1、R D 2、R D 3、R D 4、R D 5、R D 6、R D 7、R D 8、R D 9、R D 1 0、R D 1 1、R D 1 3、R D 1 4、R v D 1、R v D 2、R v D 3、R v D 4、R v D 5、*katG*^{4 6 3}、*gyrA*^{9 5}、*oxyR*^{1 2 8 5}、*pncA*^{5 7}、m m p L 6^{5 5 1}、*Mycobacterium* 株を *Mycobacterium* 群と区別するための *M. canettii* の特異的挿入因子から選択される少なくとも 1 個の遺伝子マーカーに関連した請求項 4 4 に記載の遺伝子マーカーの使用。

【請求項 4 7】

生物学的試料中の *Mycobacteria* 群からマイコバクテリアを検出して同定するためのイン

30

・ピトロ法であって、

c) 請求項 6、7 または 8 のいずれか一項に記載の配列の核酸断片の存在または非存在について分析し、

d) R D 1、R D 2、R D 3、R D 4、R D 5、R D 6、R D 7、R D 8、R D 9、R D 1 0、R D 1 1、R D 1 3、R D 1 4、R v D 1、R v D 2、R v D 3、R v D 4、R v D 5、*katG*^{4 6 3}、*gyrA*^{9 5}、*oxyR*^{1 2 8 5}、*pncA*^{5 7}、m m p L 6^{5 5 1}、*M. canettii* の特異的挿入因子から選択される少なくとも 1 個の追加遺伝子マ

ーカーを分析する

工程を含んでなる、イン・ピトロ法。

【請求項 4 8】

2 個の追加マーカー、好ましくは R D 4 および R D 9 を用いる、請求項 4 7 に記載のイン

40

・ピトロ法。

【請求項 4 9】

3 個の追加マーカー、好ましくは R D 4、R D 9 および R D 1 2 を用いる、請求項 4 7 に記載のイン・ピトロ法。

【請求項 5 0】

分析を配列ハイブリダイゼーション、核酸増幅、抗原 - 抗体複合体から選択される手法によって行う、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 1】

生物学的試料中の *Mycobacterium* 群からマイコバクテリアを検出し同定するためのキットであって、下記の因子：

50

a) 請求項 1 ~ 14、17 または 18 のいずれか一項に記載の核酸から選択される、更に好ましくは配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 を含んでなる群から選択されるプライマーから選択される少なくとも 1 対のプライマー、

b) RD1、RD2、RD3、RD4、RD5、RD6、RD7、RD8、RD9、RD10、RD11、RD13、RD14、RvD1、RvD2、RvD3、RvD4、RvD5、katG^{4 6 3}、gyrA^{9 5}、oxyR^{1 2 8 5}、pncA^{5 7}、mmpL^{6 5 5 1}、M. canettiiの特異的挿入因子から選択される遺伝子マーカーに特異的な少なくとも 1 対のプライマー、

c) DNA増幅反応を行うのに要する試薬、

d) 必要に応じて、増幅した断片の配列および/または大きさを明らかにしまたは比較することができる必要な成分を含んでなる、キット。

10

【請求項 5 2】

下記の因子を含んでなる、請求項 5 1 に記載のキット：

a) 請求項 1 ~ 14、17 または 18 のいずれか一項に記載の核酸から選択される、更に好ましくは配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 を含んでなる群から選択されるプライマーから選択される少なくとも 1 対のプライマー、

b) 遺伝子マーカー RD4 に特異的な 1 対のプライマー、

c) 遺伝子マーカー RD9 に特異的な 1 対のプライマー、

d) DNA増幅反応を行うのに要する試薬、

e) 必要に応じて、増幅した断片の配列および/または大きさを明らかにしまたは比較することができる必要な成分。

20

【請求項 5 3】

配列番号 22 の配列のポリペプチドを含んでなる、免疫原性組成物。

【請求項 5 4】

配列番号 22 の配列のポリペプチドを、薬学上適合性のビヒクルと、適当な場合には、1 種類以上の適当な免疫アジュバントと組み合わせて含んでなる、ワクチン。

【請求項 5 5】

Mycobacterium群の Mycobacterium株を識別するための、RD1、RD2、RD3、RD4、RD5、RD6、RD7、RD8、RD9、RD10、RD11、RD13、RD14、RvD1、RvD2、RvD3、RvD4、RvD5、TbD1、katG^{4 6 3}、gyrA^{9 5}、oxyR^{1 2 8 5}、pncA^{5 7}、M. canettiiの特異的挿入因子から選択される少なくとも 1 個の遺伝子マーカーに関連した、請求項 4 5 に記載の遺伝子マーカーの使用。

30

【請求項 5 6】

M. canettiiの株に特異的に存在し且つ Mycobacterium群の他の総ての構成員には存在せず、配列番号 19 の 399 位 ~ 2378 位の配列を有する、核酸。

【請求項 5 7】

Mycobacterium群の Mycobacterium株を識別するための遺伝子マーカーとしての、請求項 5 3 に記載の核酸の使用。

40

【請求項 5 8】

ストリンジェント条件下で、RD1、RD4、RD9 および TbD1 遺伝子マーカーの少なくとも 8 ~ 20 個のヌクレオチドとハイブリダイゼーションすることができる少なくともポリヌクレオチド配列を含んでなる、マイコバクテリア感染症を同定するための試薬。

【請求項 5 9】

同一免疫原性分子またはその断片に対して生じた抗体または免疫血清と反応することができる RD1、RD4、RD9 および TbD1 遺伝子マーカーのそれぞれによってコード

50

される少なくとも1個のポリペプチドを含んでなる、マイコバクテリア感染症を同定するための試薬。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

発明の分野

本発明は、生物学の分野に関し、さらに具体的には、本発明の主題は、Mycobacterium tuberculosisに起因する感染症を、Mycobacterium africanum、Mycobacterium canetti、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCGに起因する感染症から識別することができるヌクレオチド配列の同定である。本発明の主題は、これらの配列の発現産物により問題の配列を検出する方法、およびこれらを行うためのキットでもある。最後に、本発明の主題は、新規なワクチンである。

10

【0002】

背景技術

結核の病原菌であるMycobacterium tuberculosisの発見以来1世紀以上の研究がなされているにも拘わらず、この疾患はヒトの死亡率の主要な原因の一つのままである。M. tuberculosisにより年間3百万人が死亡すると予測されており(Snider, 1989 Rev. Inf. Dis. S335)、毎年新たな罹患患者数は増加しており、8.8百万人と推定されている。これらの大半は発展途上国の人々であるが、この疾患は西欧諸国においてホームレス人口の増加、AIDS流行の影響、世界的な人口移動の変化、および旅行様式により新たな重要性を呈しつつある。

20

【0003】

初期の結核は、他の総ての点では健康な人では築かれないままであることが多い。古典的な初期の診断法としては、抗酸性のマイコバクテリアについての顕微鏡下での喀痰塗抹および肺のX線の検討が挙げられる。しかしながら、ほとんどの場合に、喀痰塗抹検査は疾患の初期段階ではマイコバクテリアに対して陰性であり、感染後数ヶ月までは肺の変化はX線上では明らかにならないことがある。もう一つの複雑にする要因は、喀痰塗抹中の抗酸菌が他の種のマイコバクテリアであることが多いことである。結核の治療に用いられる抗生物質には無視できない副作用があり、3剤以上の併用として6-12ヶ月間服用しなければならない。更に、薬剤耐性結核の出現を誘発する可能性により、診断を支持するしっかりした証拠なしに投与する治療を行うことができない。現在、唯一の絶対的に信頼の置ける診断方法は、臨床標本からM. tuberculosisを培養し、それを形態学および生化学的に同定することに基づいている。これには、通常は約3-6週間ガリウム、その間に患者の病気が悪化したり、他の人々に感染する可能性がある。従って、M. tuberculosisの存在を確実に検出することができる迅速試験が、早期の検出および治療に極めて重要である。最近になり、幾つかの分子的試験、例えばGen-Probe「増幅したMycobacterium tuberculosis直接試験」がM. tuberculosisの迅速検出および同定の目的で開発されており、この試験では呼吸器標本からのM. tuberculosis 16SリボソームRNAを増幅し、化学ルミネッセンスプローブを用いて約91%の報告された感度で増幅産物を検出する。IS6110挿入因子の発見(Cave et al., Eisenach et al., 1990 J. Infectious Diseases 161:977-981; Thierry et al. 1990 J. Clin. Microbiol. 28:2668-2673)、およびこの因子がMycobacterium群(M. tuberculosis、M. bovis、M. bovis-BCG、M. africanum、M. canettiiおよびM. microti)でのみ存在することができるという確信から、全シリーズの迅速診断法が生まれた(Br isson-Noel et al., 1991 Lancet 338:364-366; Clarridge et al. 1993, J. Clin. Microbiol. 31:2049-2056; Cormican et al. 1992 J. Clin. Pathology 1992, 45:601-604; Cousins et al., 1992 J. Clin. Microbiol. 30:255-258; Del Portillo et al. 1991 J. Clin. Microbiol. 29:2163-2168; Folgueira et al., 1994 Neurology 44:1336-1338; Forbes et al. 1993, J. Clin. Microbiol. 31:1688-1694; Hermans et al. 1990 J. Clin. Microbiol. 28:1204-1213; Kaltwasser et al. 1993 Mol. Cell. Probes 7:465-470; Ko

30

40

50

cagoz et al. 1993 J. Clin. Microbiol. 31:1435-1438; Kolk et al. 1992 J. Clin. Microbiol. 30:2567-2575; Kox et al. 1994 J. Clin. Microbiol. 32:672-678; Liu et al. 1994 Neurology 44:1161-1164; Miller et al. 1994 J. Clin. Microbiol. 32:393-397; Reischl et al. 1994 Biotechniques 17:844-845; Schluger et al. 1994 Chest 105:1116-1121; Shawar et al. 1993 J. Clin. Microbiol. 31:61-65; Wilson et al. 1993 J. Clin. Microbiol. 28:2668-2673)。これらの試験は様々な手法を用いて、喀痰からDNAを抽出している。PCRを用いて、抽出したDNAからIS6110 DNA配列を増幅する。このDNAの増幅の成功は、M.tuberculosis感染症の存在を示すものと考えられている。米国特許第5,168,039号および第5,370,998号が、結核の検出に基づくIS6110に対してCrawford et al.に発行されている。欧州特許第0,461,045号明細書は、結核の検出に基づくIS6110に対してGuesdonに発行されている。

10

【0004】

従って、M.tuberculosisの検出に用いられるこれらの分子分析法は、IS6110挿入配列(約10コピー)または16SリボソームRNA(数千コピー)によって変化する。しかしながら、これらの方法は、マイコバクテリアのサブタイプに関する情報は提供しない。実際に、数十種のMycobacteriaが知られており、ほとんどはヒトに対して非病原性であるが、結核は通常はM.tuberculosisによる感染によって引き起こされ、若干の症例はM.bovis、M.canettii、およびM.africanumによって引き起こされる。適当な治療法を選択して疫学的検討を行うには、単離物を迅速且つ正確に同定できること、すなわち潜在的結核患者に由来するMycobacterium群のマイコバクテリアのサブタイプを識別できることが絶対必要である。これが、本発明が解決しようとする問題である。

20

【発明の概要】

【0005】

本発明は、Mycobacterium群から単離しまたは精製した核酸であって、

- a) T b D 1領域と呼ばれる配列番号1、
- b) 配列番号1に完全に相補的な配列を有する核酸、
- c) 配列番号1の少なくとも8、12、15、20、25、30、50、100、250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000の連続的ヌクレオチドを含んでなる核酸断片、
- d) 最適アライメント後に、a)またはb)に記載の配列と塗少なくとも90%の配列同一性を有する核酸、
- e) ストリンジェント条件下で、a)またはb)に記載の核酸とハイブリダイズする核酸

30

からなる群より選択される核酸を提供する。

【発明の具体的説明】

【0006】

本明細書で用いられる本発明により「単離」および「精製」したという用語は、最新の手法を用いて達成することができる純度のレベルを表す。本発明の分子は完全に純粋である(すなわち、他の細胞の巨大分子の分子を絶対的に含まない)必要はないが、当業者がそれらが本来見出される環境(すなわち、細胞中間)には最早存在しないことを認めるほど十分に純粋であるべきである。従って、本発明による精製または単離した分子は、それが見出される自然環境に存在する少なくとも1種類の他の巨大分子から除去されているものである。更に好ましくは、本発明の分子は本質的に精製および/または単離されており、これは、それらが存在する組成物が、本発明の分子が本来見出される環境に見出される他の巨大分子をほとんど完全にまたは完全に含まないことを意味している。従って、単離および精製は、塩、溶媒または周期律表の元素の添加または除去によって起こらないが、少なくとも幾つかの巨大分子の除去を含まなければならない。本発明に包含される核酸は、当業者に知られている適当な手法によって精製および/または単離される。このような手法は広く知られており、普通に実施され、十分に当業者の技術範囲内にあるものであ

40

50

る。本明細書で用いられる「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖DNA配列、RNA配列、cDNA配列のようなポリヌクレオチド配列を表し、このようなポリヌクレオチド配列は単離、精製または合成されおり、且つ天然または非天然ヌクレオチドで構成されていることがある。好ましい態様では、本発明のDNA分子は二本鎖DNA分子である。本明細書で用いられる「核酸」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」という用語は同一の意味を有し、区別なく用いられる。

【0007】

本発明で用いられる「Mycobacterium群」という用語は、Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium bovis、Mycobacterium africanum、Mycobacterium microti、Mycobacterium canettii、およびワクチン株Mycobacterium bovis BCGである結核を引き起こすマイコバクテリアの群を意味する。

10

【0008】

本発明は、配列番号1の全配列、その相補体およびその二本鎖形態だけでなく、この配列、の任意の断片、その相補体、およびその二本鎖形態を包含する。

【0009】

態様では、配列番号1の断片は少なくとも約8個のヌクレオチドを含んでなる。例えば、この断片は約8~30個のヌクレオチドであることができ、且つポリヌクレオチド合成のプライマーとしてデザインすることができる。もう一つの好ましい態様では、配列番号1の断片は約1,500~約2,500個のヌクレオチドを含んでなり、更に好ましくは配列番号4に対応する2,153個のヌクレオチドを含んでなる(図5参照)。本明細書で用いられる「ヌクレオチド」とは、一本鎖核酸についてのヌクレオチドの数に関して用いられる。しかしながら、この用語は、二本鎖分子も包含する。従って、本発明による2,153個のヌクレオチドを含んでなる断片は2,153個のヌクレオチドを含んでなる一本鎖分子であり、また2153個の塩基対(bp)を含んでなる二本鎖分子でもある。

20

【0010】

好ましい態様では、本発明の核酸断片は、遺伝子katGのコドン463に配列CTGを有し且つゲノムにはIS6110配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisのゲノムから特異的に欠失し、Mycobacterium africanum、Mycobacterium canetti、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCGのゲノムに含まれている。「ゲノムに挿入された僅かのIS6110」という用語は、Mycobacterium tuberculosisのゲノムにおける10未満のコピー、更に好ましくは5未満のコピー、例えば2未満のコピーを意味する。

30

【0011】

本発明の核酸断片は、好ましくは

- a) 配列番号4、
 - b) 配列番号4に完全に相補的な配列を有する核酸、
 - c) 配列番号4の少なくとも8、12、15、20、25、30、50、100、250、500、750、1000、1500、2000、2500、3000の連続的ヌクレオチド含んでなる核酸断片、
 - d) 最適アライメント後に、a)またはb)に記載の配列と少なくとも90%の配列同一性を有する核酸、
 - e) ストリンジェント条件下で、a)またはb)に記載の核酸とハイブリダイズする核酸
- からなる群より選択される。

40

【0012】

態様では、本発明による配列を決定するストリンジェント条件は、5X SSPE、2X Denhardt溶液、および65における0.5%(重量/容量)ドデシル硫酸ナトリウムと同様にストリンジェントな条件である。通常の熟練者であれば、一層ストリンジェントな条件を用いることができ、所定の分析に適当な条件は不相応なまたは過度の

50

実験を行うことなく容易且つ速やかに決定することができる。例示態様として、本発明によるポリヌクレオチドを特異的に検出するのに用いられるストリンジェントハイブリダイゼーション条件は好都合には下記の通りである：

予備ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、

- 5 X S S P E (1 X S S P E は 3 M N a C l , 3 0 m M クエン酸三ナトリウムである)、

- 2 X D e n h a r d t 溶液、

- 0 . 5 % (重量 / 容量) ドデシル硫酸ナトリウム (S D S)、

- 1 0 0 μ g m l ⁻¹ サケ精子 D N A、

を含む混合物中で 6 5 °C で行う。洗浄は、

- 実験室温度 (約 2 1 ~ 2 5 °C) で、2 X S S P E および 0 . 1 % S D S の存在下にて 1 0 分間 2 回洗浄、および

- 6 5 °C で 1 X S S P E および 0 . 1 % S D S の存在下にて 1 5 分間行う。

【 0 0 1 3 】

本発明は、本発明の単離または精製した核酸であって、上記の核酸断片の少なくとも 1 個の欠失を含んでなる核酸も包含する。好ましくは、このような本発明の単離または精製した核酸は、配列番号 4 が欠失している (存在しない) 配列番号 1 に対応する配列番号 2 1 である。

【 0 0 1 4 】

本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に開示されている配列を用いてそれらが示す同一性の割合によって特徴決定することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチド、特に配列リストの配列と 9 0 % の同一性を有するポリヌクレオチドは、本発明によって包含される。好ましくは、この配列は、配列リストのものと少なくとも 9 0 % の同一性を示す。更に好ましくは、それらは少なくとも 9 2 % の同一性、例えば 9 5 % または 9 9 % の同一性を示す。熟練技術者であれば、本発明による配列を配列分析ソフトウェアを用いることによって同定することができる (例えば、Coffin et al. 監修, 「レトロウイルス (R e t r o v i r u s e s) 」, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , p p . 7 2 3 - 7 5 5 を参照されたい) 。同定率は、N C B I (N I H) から発売されている B L A S T 配列分析プログラムセット、第 2 版を用いて計算される。総てのデフォルトパラメーターが用いられる。B L A S T (B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l) は、N C B I の B L A S T 分析ソフトウェアセットを通して利用可能なプログラム `blastp`、`blastn`、`blastx`、`tblastn` および `tblastx` によって用いられる帰納的検索アルゴリズムである。これらのプログラムは、有意性を Karlin and Altschul の統計学的方法を用いる発見に (1 9 9 0 , 1 9 9 3) によるものとしており、若干の向上が見られる。この公的に利用可能な配列分析プログラムセットを用いると、熟練技術者であれば、本発明によるポリヌクレオチドを容易に同定することができる。

【 0 0 1 5 】

本発明の核酸配列の領域を同定することは当業者の完全に技術の範囲内にあり、これはプローブ、プライマー、または他の実験上、診断上または治療上の補助として用いられる。例えば、当業者であれば、広く利用可能な配列分析プログラムのいずれかを用いて、サンプロット、ノーザンプロット、D N A 結合分析、および / または イン・ビトロ、イン・シチューまたは イン・ビボ ハイブリダイゼーションのようなハイブリダイゼーション分析法に有用なこれらの配列の領域 (断片) を選択することができるであろう。更に、当業者であれば、本発明の配列を用いて、広く利用可能な配列分析プログラムを用いて、プローブおよびプライマーとして、並びにアンチセンス分子のデザインに用いることができる領域を同定することができる。当業者によって選択された断片についての唯一の実際的制限は、それを選択する目的に対する断片の有用性である。例えば、当業者がハイブリダイゼーションプローブを選択しようとするれば、有意な結果を得るのに十分な長さおよび十分な安定性の一つの選択法を知るであろう。選択される条件は、近似的な選択された長さの

10

20

30

40

50

核酸断片について開発されたハイブリダイゼーション分析法で典型的に用いられるものである。

【0016】

従って、本発明は、プローブおよびプライマーとして有用な短いオリゴヌクレオチドを提供する。態様では、プローブおよび/またはプライマーは、本発明によるポリヌクレオチドまたはそれに相補的なポリヌクレオチドの8~30個の連続的ヌクレオチドを含んでなる。有利には、本明細書に記載の断片の長さは少なくとも8ヌクレオチドであり、これは特異的ハイブリダイゼーションを行う目的で決定されたほぼ最小限の長さである。好ましくは、核酸断片は、長さが少なくとも12ヌクレオチドであり、更に好ましくは、配列番号1または配列番号4のいずれかの20個の連続的ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドの配列は、本発明による多数の可能な配列のいずれかであることができる。好ましくは、配列は、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18の群から選択される。更に正確には、プライマーである配列番号13、配列番号14、配列番号15および配列番号16が核酸断片配列番号4に含まれる。プライマー配列番号17および配列番号18は核酸配列である配列番号1に含まれ、配列番号4の核酸断片に隣接している(図5参照)。

10

【0017】

従って、配列番号1および配列番号4のポリヌクレオチドおよびそれらの断片を用いて、特に、更に記載される増幅反応のような増幅反応のヌクレオチドプライマーを選択することができる。

20

【0018】

PCRは米国特許第4,683,202号明細書に記載されており、その内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。増幅断片は、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、キャピラリー電気泳動によって、あるいはクロマトグラフィー法(ゲル濾過、疎水性クロマトグラフィー、またはイオン交換クロマトグラフィー)によって同定することができる。増幅の特異性は、核酸プローブとして配列番号1または配列番号4のポリヌクレオチド、およびそれらの断片、これらのポリヌクレオチドまたはその断片に相補的なオリゴヌクレオチド、またはそれらの増幅産物自身を用いる分子ハイブリダイゼーションによって、および/またはDNAシーケンシングによっても確保することができる。

30

【0019】

核酸増幅に関する下記の他の手法を用いることもでき、また一般にPCR法に好ましい。鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification(SDA))法は、制限酵素が(ヘミホスホチオエート形態下にある)認識位置における鎖の1本を開裂することができること、および制限酵素によって生成した3'OH末端からの新たな鎖の合成を開始するDNAポリメラーゼの特性、および下流に局在化されている以前に合成された鎖を変位させるこのDNAポリメラーゼの特性に基づく等温増幅法である。SDA増幅法はPCR(1個だけの恒温水槽装置が必要)より容易に行われ、他の増幅法より速やかである。従って、本発明は、SDA法によるDNAまたはRNA増幅の方法における本発明による核酸断片(プライマー)の使用も含んでなる。

40

【0020】

検出を行うターゲットポリヌクレオチドがRNA、例えば、mRNAであるときには、逆転写酵素を増幅反応の前に用いて、生物学的試料に含まれるRNAからのcDNAを得る。次に、生成したcDNAを、本発明による増幅工程または検出工程で用いられるプライマーまたはプローブの核酸ターゲットとして用いる。

【0021】

本発明の非標識ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、プローブとして直接用いることができる。しかしながら、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは一般に放射性元素(^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{125}I)または非同位体分子(例えば、ビオチン、アセチルアミノフルオセン、ジゴキシゲニン、5-プロモデソキシウリジン、フルオレ

50

セイン)によって標識され、多くの用途で有用なプローブを生成する。核酸断片の非放射性標識の例は、仏国特許第FR 78 10975号明細書、およびUrdea et al.(1988, Nucleic Acids Research 11:4937-4957)またはSanchez-Pescador et al.(1988, J. Clin. Microbiol. 26 (10):1934-1938)に記載されており、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。仏国特許第FR 2 422 956号明細書およびFR 2 518 755号明細書に記載されているような他の標識法を用いることもできる。ハイブリダイゼーション段階は、様々な方法で行うことができる。例えば、Matthews et al., 1988, Anal. Biochem. 169:1-25を参照されたい。一般的方法は、生物学的試料から抽出した核酸を基剤(例えば、ニトロセルロース、ナイロン、ポリスチレン)上で固定した後、定義された条件でターゲット核酸をプローブと共にインキュベーションすることを含んでなる。ハイブリダイゼーション段階の後に、過剰量の特異的プローブを廃棄して、形成したハイブリッド分子を適当な方法(放射能、蛍光または酵素活性測定など)によって検出する。

10

【0022】

増幅したヌクレオチド断片は、特に本発明による1個のポリヌクレオチドの存在を検出したまたは突然変異を検出するためのハイブリダイゼーション反応で用いられるプローブとして有用である。プライマーをオリゴヌクレオチドプローブとして用いて、本発明によるポリヌクレオチドを特異的に検出することもできる。

【0023】

本発明によるオリゴヌクレオチドプローブは、基材上に固定されたプローブのマトリックスライブラリーを含んでなる検出装置で用いることもでき、所定の長さのそれぞれのプローブの配列は1または数個の塩基のシフトに局在しており、一方、マトリックスライブラリーのそれぞれのプローブはこれによりターゲット核酸の異なる配列に相補的である。必要に応じて、マトリックスの基剤は電子供与体として作用することができる材料であることができ、ハイブリダイゼーションが起こったマトリックスの検出が次に電子装置によって決定される。プローブのこのようなマトリックスライブラリーおよびターゲット核酸を特異的に検出する方法は、欧州特許出願第0 713 016号明細書(Affymax technologies)および米国特許第5, 202, 231号明細書(Drmanac)にも記載されている。マイコバクテリアの染色体のほぼ全長はBACに基づくゲノムDNAライブラリーによって被覆されている(すなわち、*M.tuberculosis*染色体の97%はBACライブラリー I-1945によって被覆されている)ので、これらのDNAライブラリーは、BACの規範的セットをハイブリダイゼーション研究のマトリックスとして用いることができるマイコバクテリア遺伝子発現研究のような多数のゲノム後の応用において重要な役割を果たす。従って、核酸細片、更に正確には本発明の核酸またはポリペプチドをそれぞれ含んでなるDNA細片またはタンパク質細片を提供することも本発明の範囲にある。

20

30

【0024】

本発明は、本発明の単離DNA分子を含んでなるベクターも提供している。「ベクター」とは、別のポリヌクレオチドセグメントが付着して、付着したセグメントに複製および/または発現を生じさせるレプリコンである。ベクターは、1以上の制限エンドヌクレアーゼ認識部位であって、DNA配列をベクターの本質的な生物学的機能を喪失することなく確定可能なやり方で切断することができ且つDNA断片をスプライシングしてその複製およびクローニングを生じさせることができる部位を有することができる。ベクターは、更にプライマー位置(例えば、PCRのための)、転写および/または翻訳開始および/または調節位置、組換えシグナル、レプリコン、選択可能マーカなどを提供することができる。相同組換えまたは制限酵素を用いて所望なDNA断片をベクターに挿入することの他に、PCR断片のUDGクローニング(米国特許第5, 334, 575号明細書)、T:Aクローニングなどを応用することもできる。クローニングベクターは、このクローニングベクターを用いて形質転換した細胞の同定に用いるのに適当な選択可能マーカを含むこともできる。

40

【0025】

50

ベクターは当業者に知られている任意の有用なベクターであることができ、クローニングベクター、挿入ベクター、または発現ベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターの例としては、プラスミド、ファージ、コスミド、ファージミド、酵母の人工染色体 (YAC)、細菌の人工染色体 (BAC)、ヒトの人工染色体 (HAC)、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、およびイン・ビトロまたは宿主細胞で複製するまたは複製させることができまたは所望な DNA セグメントを宿主細胞中の所望な位置に送達することができる他の DNA 配列が挙げられる。

【0026】

本発明の好ましい態様によれば、組換えベクターは BAC pBel0BAC11 であって、*M. tuberculosis* H37Rv のゲノムの座 1,760,753 bp ~ 1,830,364 bp に対応する領域にわたる *Mycobacterium bovis*-BCG のゲノム領域が HindIII 制限部位に挿入されているものであり、この組換えベクターは X229 と命名されている。この領域において、本発明者らは、遺伝子 katG のコドン 463 に配列 CTG を有し且つゲノムには IS6110 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* のほとんどにおいて配列番号 4 に対応する 2153 bp の断片の欠失を示した。それが、本発明者らがこの欠失を 2153 bp T b D 1 (「*M. tuberculosis* 特異的欠失 1」) と命名した理由である。T b D 1 には、配列 GGC CTG GTC AAA CGC GGC TGG ATG CTG および AGA TCC GTC TTT GAC ACG ATC GAC G が隣接している。T b D 1 の外側のこのような配列またはそれに相補的な配列とハイブリダイズする外部プライマーを T b D 1 の増幅に用いて、T b D 1 の欠失の存在または非存在をチェックすることができる。本発明者らは、例えば、下記のプライマー：

5'-CTA CCT CAT CTT CCG GTC CA-3' (配列番号 17)

5'-CAT AGA TCC CGG ACA TGG TG-3' (配列番号 18)

をデザインしている。ハイブリダイゼーション実験用の特異的な 500 pb のプローブを得るために、T b D 1 に含まれる断片の PCR 増幅をプラスミド X229 をマトリックスとして用いて実現することができる。T b D 1 に含まれる約 500 bp の断片の増幅は、下記のプライマー：

5'-CGT TCA ACC CCA AAC AGG TA-3' (配列番号 13)

5'-AAT CGA ACT CGT GGA ACA CC-3' (配列番号 14)

を用いて行うことができる。T b D 1 に含まれる約 2000 bp の断片の増幅は、下記のプライマー

5'-ATT CAG CGT CTA TCG GTT GC-3' (配列番号 15)

5'-AGC AGC TCG GGA TAT CGT AG-3' (配列番号 16)

を用いて行うことができる。PCR 条件は下記の通りである：95 で 1 分間変性した後、35 サイクルの増幅 [95 で 30 秒間、58 で 1 分間]、次いで 72 で 4 分間伸長。

【0027】

従って、本発明は、本発明によるポリヌクレオチドまたは組換えベクターを含む組換え細胞宿主にも関する。細胞宿主をポリヌクレオチドまたは組換えベクターで形質転換またはトランスフェクションして、所望なポリヌクレオチドを一過的、安定的または制御して発現することができる。例えば、目的とするポリヌクレオチドをプラスミド中のプロモーターから下流のクローニング位置における発現プラスミドにサブクローニングすることができ、プラスミドを発現が起こり得る宿主細胞に導入することができる。組換え細胞は、真核細胞または微生物のような当業者に知られている任意の適当な宿主であることができる。例えば、宿主は、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、昆虫細胞、および酵母から選択される細胞であることができる。本発明の好ましい態様によれば、組換え細胞宿主は、以前に記載された X229 と命名した BAC を含む市販の *Escherichia coli* DH10B (Gibco) である。この X229 と命名した BAC を含む *Escherichia coli* DH10B (Gibco)

10

20

30

40

50

o)は、2002年2月18日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, パリ, フランスにCNCMI - 2799の番号で寄託されている。

【0028】

本発明のもう一つの態様は、遺伝子k a t Gのコドン463に配列C T Gを有し且つ上記のようにゲノムにはI S 6 1 1 0配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisのゲノムから特異的に欠失した核酸断片などの本発明による核酸の全部または一部の発現の産物である。「発現の産物」という表現は、上記ヌクレオチド配列の全部または一部の発現から生じる任意の単離または精製したタンパク質、ポリペプチドまたはポリペプチド断片を意味するものと理解される。それらの発現の産物の中では、配列番号6に対応する膜タンパク質m m p L 6、配列番号3または配列番号10に対応する膜タンパク質m m p S 6(2つの配列番号3および配列番号10は同一である)、および本発明による核酸断片の欠失によるそれらの切り詰めまたは再編成形態を挙げることができる。例えば、配列番号8はm m p L 6タンパク質の切り詰め形態であり、配列番号12はm m p S 6タンパク質の切り詰め形態であり、配列番号22はいずれも再編成したm m p L 6およびm m p S 6タンパク質の融合産物[m m p S 6 - m m p L 6]である。

10

【0029】

従って、プラスミド、ファージおよびファージミドのような発現ベクターを用いる遺伝子工学の手法によってタンパク質を多量に産生することが容易である。本発明のポリペプチドは適当なポリヌクレオチドをベクター中の適当な位置の適当な発現ベクターに挿入することによって産生することができる。このようなポリヌクレオチドの操作は周知であり、当業者によって広く実施されている。ポリペプチドは、これらの組換えベクターからイン・ビトロまたはイン・ビボで産生することができる。本発明のポリペプチドをコードする総ての単離または精製した核酸は、本発明の範囲にある。本発明のポリペプチドは、本明細書に記載のストリンジェント条件下で配列番号1または4のいずれかにハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドである。

20

【0030】

更に好ましくは、本発明による上記の単離または精製した核酸は、

- 配列番号1に含まれ且つ配列番号6のタンパク質m m p L 6をコードする、配列番号5の配列のm m p L 6遺伝子、
- 配列番号4のT b D 1に含まれ且つ配列番号8の配列のm m p L 6タンパク質の切り詰め形態をコードする配列番号7の配列のm m p L 6遺伝子の切り詰め形態、
- 配列番号1に含まれ且つ配列番号10の配列のm m p S 6遺伝子をコードする、配列番号9のm m p S 6遺伝子、
- 配列番号4の配列のT b D 1に含まれ且つ配列番号12のm m p S 6タンパク質の切り詰め形態をコードする、配列番号11の配列のm m p S 6遺伝子の切り詰め形態、
- 遺伝子k a t Gのコドン463に配列C T Gを有し且つゲノムにはI S 6 1 1 0配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないM. tuberculosis株を除くM. tuberculosisのゲノムからT b D 1の欠失による切り詰めm m p S 6およびm m p L 6遺伝子の融合によって生じた配列番号21のキメラ遺伝子、

から選択される。このキメラ遺伝子は、配列番号22の配列の融合ポリペプチド[m m p S 6 - m m p L 6]をコードする。

30

40

【0031】

本発明は、
遺伝子k a t Gのコドン463に配列C T Gを有し且つゲノムにはI S 6 1 1 0配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisを

生物学的試料中のMycobacterium africanum、Mycobacterium canettii、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCG

50

と区別して検出し同定する方法であって、

- a) 分析を行う生物学的試料からDNAを単離し、または生物学的試料のRNAからのcDNAを産生し、
- b) 生物学的試料に含まれるマイコバクテリウムの核酸配列を検出し、
- c) 前記したように、遺伝子k a t Gのコードン463に配列CTGを有し且つゲノムにはIS6110配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisをゲノムから特異的に欠失した核酸断片の存在または非存在を分析する工程を含んでなる、方法も提供する。

【0032】

本発明による生物学的試料とは、特に喀痰、唾液、血漿、尿または精液のような生物学的流体、または生検材料のような組織を表す。

【0033】

所望な配列の分析は、例えば、アガロースゲル電気泳動によって行うことができる。予想した位置に移動するDNA断片の存在が見られる場合には、分析した試料はマイコバクテリアDNAを含んでいたと結論することができる。この分析は、核酸プローブを用いる分子ハイブリダイゼーション法によって行うこともできる。このプローブは、非放射性(コールドプローブ)または放射性元素で標識されているのが有利である。マイコバクテリアDNA配列の検出は、上記DNA配列に相補的なヌクレオチド配列を用いて行うのが有利である。例えば、それらは標識または未標識ヌクレオチドプローブを包含することができ、増幅用プライマーを包含することもできる。用いられる増幅法はPCRでよいが、SDA鎖置換増幅(Strand Displacement Amplification)法、TAS法(転写に基づく増幅システム)、NASBA(核酸配列に基づく増幅)法、またはTMA(転写依存性増幅)法のような他の代替手法を用いることもできる。

【0034】

本発明によるプライマーは、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18を含んでなる群から選択されるヌクレオチド配列を有する。プライマー配列番号13、配列番号14、配列番号15および配列番号16は配列番号4の核酸断片に含まれ、プライマー配列番号17および配列番号18は配列番号1の核酸に含まれるが配列番号4の核酸断片には含まれない。

【0035】

異なる態様では、本発明の主題は、
遺伝子k a t Gのコードン463に配列CTGを有し且つゲノムにはIS6110配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisを、

生物学的試料中のMycobacterium africanum、Mycobacterium canetti、Mycobacterium microti、Mycobacterium bovis、Mycobacterium bovis BCGと

区別して検出し同定する方法であって、

- a) 分析を行う生物学的試料を上記で定義した少なくとも1対のプライマーと接触させ、この試料に含まれるDNAを、適当な場合には、予めハイブリダイゼーションに利用できるようにし、
- b) マイコバクテリウムのDNAを増幅し、
- c) DNA断片の増幅を可視化する

工程を含んでなる方法でもある。

【0036】

増幅断片は、アガロースまたはポリアクリルアミド原子電気泳動によって、キャピラリー電気泳動によって、またはクロマトグラフィー的手法(ゲル濾過、疎水性クロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィー)によって同定することができる。増幅の様子は、プローブ、これらの配列を含むプラスミド、または増幅のそれらの産物を用いる分子ハイブリダイゼーションによって制御することができる。増幅したヌクレオチド断片を

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーション反応における試薬として用いて、生物学的試料における上記増幅ヌクレオチド断片の配列に相補的な配列を有するターゲット核酸の存在を検出することができる。これらのプローブおよびアンプリコンは、放射性元素、または酵素または蛍光成分のような非放射性分子で標識することができる。

【0037】

本発明の主題は、

遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* を、

生物学的試料中の *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canetti*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis BCG* と 10
区別して検出し同定するためのキットであって、下記の因子

a) 上記で定義した少なくとも 1 対のプライマー、

b) D N A 増幅反応を行うのに必要な試薬、

c) 必要に応じて、増幅した断片の配列および / または大きさを明らかにしまたは比較することができる必要な成分 30
を含んでなる、キットでもある。

【0038】

実際に、本発明に関連して、用いるプライマーの対によっては、非常に異なる結果を得ることができる。例えば、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6 の 20
ような T b D 1 欠失に含まれるプライマーを用いて、増幅産物が遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く *M. tuberculosis* で検出されず、且つ増幅産物が *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canettii*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis BCG*、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を 30
有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* で検出可能であるようにする。配列番号 1 7 および配列番号 1 8 のような T b D 1 欠失の外側で 1 対のプライマーを用いると、同様に *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canettii*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis BCG*、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つ 30
ゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* に約 2 1 0 0 b p のアンプリコンを生じ、一方 T b D 1 欠失の外側で 1 対のプライマーを用いると、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く *M. tuberculosis* で約数 b p のアンプリコンを生じる。

【0039】

更に一般的には、本発明は、*Mycobacterium tuberculosis*、または *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canettii*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis BCG* であって、*Mycobacterium tuberculosis* が遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたは 40
ごく僅かしか挿入していないものからの D N A 配列の増幅の目的で上記で定義した通りの少なくとも 1 対のプライマーの使用に関する。

【0040】

実際に、本発明の主題は、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* を除く *Mycobacterium tuberculosis* に対して特異的な抗体と、生物学的試料中の *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canettii*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis BCG*、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 40
に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* に対して特異的な抗体とをイン・ビ 50

トロで区別して検出する方法であって、下記の

a) 生物学的試料を、上記で定義した通りに遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *M. tuberculosis* の株を除く *M. tuberculosis* で特異的に欠失した核酸断片の全部または一部の少なくとも 1 個の発現産物と接触させ、

b) 生成した抗原 - 抗体複合体を検出する

工程を含んでなる方法でもある。

【 0 0 4 1 】

本発明の主題は、*Mycobacterium bovis* BCG を用いる予防接種、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *M. bovis*、*M. carettii*、*M. microti*、*M. africanum*、または *M. tuberculosis* 株による感染症と、哺乳類の遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* による感染症をイン・ビトロで区別して検出する方法であって、下記の

a) 細胞、更に具体的には上記哺乳類の免疫系の細胞、更に具体的には T 細胞を調製し、

b) 工程 a) の生物学的試料を、上記で定義した通り遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *M. tuberculosis* の株を除く *M. tuberculosis* において特異的に欠失した核酸断片の全部または一部の少なくとも 1 個の発現産物と共にインキュベーションし、

c) 上記産物に対する哺乳類の予備増感を示す細胞反応、特に細胞増殖および/または - インターフェロンのようなタンパク質の合成を検出する工程を含んでなる、方法でもある。細胞増殖は、例えば、³ H - チミジンを組込むことによって測定することができる。

【 0 0 4 2 】

本発明は、*M. bovis* BCG を用いる予防接種、*M. bovis*、*M. carettii*、*M. microti*、*M. africanum* による感染症と、哺乳類における遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く *M. tuberculosis* による感染症とをイン・ビトロで区別して診断するためのキットであって、

a) 上記で定義した通りの遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *M. tuberculosis* の株を除く *M. tuberculosis* で特異的に欠失した核酸断片の全部または一部の発現の産物、

b) 適当な場合には、免疫反応に適する培地を構成するための試薬、

c) 免疫反応によって産生した抗原 - 抗体複合体を検出することができる試薬、

d) 適当な場合には、上記産物によって認識された抗体を含まない参照用生物学的試料 (ネガティブコントロール)、

e) 適当な場合には、上記産物によって認識された抗体の予定量を含む参照用生物学的試料 (ポジティブコントロール) を含んでなる、キットにも関する。

【 0 0 4 3 】

抗原 - 抗体複合体を検出することができる試薬はマーカーを有していることがあり、または次に更に具体的には用いられる抗体が標識されていない場合には、標識試薬によって認識されることができる。

【 0 0 4 4 】

本発明の主題は、本発明による発現の産物を特異的に認識することができるモノまたはポリクローナル抗体、それらのキメラ断片または抗体でもある。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

従って、本発明は、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く *Mycobacterium tuberculosis* の抗原と、生物学的試料中の *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canettii*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis*-BCG、および遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* の抗原の存在を区別して検出する方法であって、下記の

- a) 生物学的試料を本発明の抗体と接触させ、
- b) 形成した抗原 - 抗体複合体を検出する

10

工程を含んでなる、方法にも関する。

【 0 0 4 6 】

本発明は、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *M. tuberculosis* の株を除く *Mycobacterium tuberculosis* の抗原の存在と、生物学的試料中の *Mycobacterium africanum*、*Mycobacterium canettii*、*Mycobacterium microti*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium bovis* BCG または遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* の抗原の存在を区別して検出するためのキットであって、下記の

20

- a) 上記の通りの抗体、
- b) 免疫反応に適する培地を構成するための試薬、
- c) 免疫反応によって産生した抗原 - 抗体複合体を検出することができる試薬

の段階を含んでなる、キットにも関する。

【 0 0 4 7 】

上記の試薬は当業者には周知であり、彼らは本発明の状況に容易に適合させることができる。

【 0 0 4 8 】

本発明の主題は、本発明による少なくとも 1 個の発現産物を含んでなる免疫原性組成物でもある。このような免疫原性組成物を用いて、動物およびヒトを *M. africanum*、*M. bovis*、*M. canettii*、*M. microti* および *M. tuberculosis* による感染症から保護する。

30

【 0 0 4 9 】

特定の態様では、このような免疫原性組成物は、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *Mycobacterium tuberculosis* 株を除く *Mycobacterium tuberculosis* のゲノムで特異的に欠失した核酸断片の全部または一部の発現産物を含んでなる。また、好ましい態様では、このような免疫原性組成物は T b D 1 の全部または一部の発現産物を含んでなる。この場合に、このような免疫原性組成物を用いて、動物およびヒトを *M. africanum*、*M. bovis*、*M. canettii*、*M. microti* および遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない *M. tuberculosis* による感染症から保護する。

40

【 0 0 5 0 】

他の特定の態様では、このような免疫原性組成物は配列番号 2 2 の融合産物 [m m p S 6 - m m p L 6] を含んでなる。この融合産物は、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く *M. tuberculosis* において T b D 1 が含まれていないことによる。この融合産物を含んでなる免疫原性組成物を用いて、特に、遺伝子 *k a t G* のコドン 4 6 3 に配列 C T G を有し且つゲノムには I S 6 1 1 0 配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない株を除く *M. tuberculosis* のほとんどによる感染症から動物およびヒトを保護する。

50

【0051】

本発明による免疫原性組成物は、薬学上許容可能なビヒクルと、必要に応じてミョウバンまたはムラミルペプチドのファミリーの代表的なモノまたは不完全フロイントアジュバントのような1種類以上の免疫アジュバントと組み合わせると提供されるときには、ワクチンの組成を扱うのが好都合である。

【0052】

本発明は、少なくとも1個の本発明の発現産物を、薬学上適合性のビヒクル、および適当な場合には、1種類以上の適当な免疫アジュバントと組み合わせると含んでなる、ワクチンにも関する。

【0053】

本発明は、生物学的試料中の遺伝子k a t Gのコドン463に配列C T Gを有し且つゲノムにはI S 6 1 1 0配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisを検出し同定するイン・ビトロ法であって、下記の

- a) 分析を行う生物学的試料からD N Aを単離しまたは生物学的試料のR N Aからc D N Aを産生し、
 - b) 上記生物学的試料に含まれるマイコバクテリウムの核酸配列を検出し、
 - c) 本発明の核酸断片の存在または非存在について分析を行う
- 工程を含んでなる、イン・ビトロ法も提供する。

【0054】

もう一つの態様では、本発明は、生物学的試料中の遺伝子k a t Gのコドン463に配列C T Gを有し且つゲノムにはI S 6 1 1 0配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisを検出し同定するイン・ビトロ法であって、下記の

- a) 分析を行う生物学的試料を、本発明の核酸断片から選択された、更に好ましくは配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18を含んでなる群から選択されるプライマーから選択された少なくとも1対のプライマーと接触させ、試料に含まれるD N Aを、適当な場合には、予めハイブリダイゼーションを行うことができるようにしておき、
 - b) マイコバクテリウムのD N Aを増幅し、
 - c) D N A断片の増幅を可視化する
- 工程を含んでなる、イン・ビトロ法を提供する。

【0055】

本発明は、生物学的試料において、遺伝子k a t Gのコドン463に配列C T Gを有し且つゲノムにはI S 6 1 1 0配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisを検出し同定するためのキットであって、下記の因子：

- a) 本発明の核酸断片から選択された、更に好ましくは配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18を含んでなる群から選択されたプライマーから選択された少なくとも1対のプライマー、
 - b) D N A増幅反応を行うのに要する試薬、
 - c) 必要に応じて、増幅した断片の配列および/または大きさを明らかにしまたは比較することができる必要な成分
- を含んでなる、キットも提供する。

【0056】

本発明は、生物学的試料において、遺伝子k a t Gのコドン463に配列C T Gを有し且つゲノムにはI S 6 1 1 0配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないMycobacterium tuberculosis株を除くMycobacterium tuberculosisに対して特異的な抗体をイン・ビトロで検出する方法であって、

- a) 生物学的試料を遺伝子k a t Gのコドン463に配列C T Gを有し且つゲノムに

10

20

30

40

50

はIS6110配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないM. tuberculosis株を除くM. tuberculosisで特異的に欠失した核酸断片の全部または一部の少なくとも1個の発現産物と接触させ、

b) 形成した抗原 - 抗体複合体を検出する工程を含んでなる、方法にも関する。

【0057】

Mycobacterium群のMycobacterium株を識別するための遺伝子マーカーとしてのTbD1欠失の使用も、本発明の目的である。

【0058】

Mycobacterium群のMycobacterium株を識別するための遺伝子マーカーとしてのmmpL6^{5 5 1}多型の使用も、本発明の目的である。 10

【0059】

RD1、RD2、RD3、RD4、RD5、RD6、RD7、RD8、RD9、RD10、RD11、RD13、RD14、RvD1、RvD2、RvD3、RvD4、RvD5、katG^{4 6 3}、gyrA^{9 5}、oxyR^{1 2 8 5}、pncA^{5 7}、およびM. canettii (IS canettii)の特異的挿入因子から選択される少なくとも1個の遺伝子マーカーに関連した(複数の)遺伝子マーカーを使用することによって、Mycobacterium株をMycobacterium群と区別することができる(例4参照)。

【0060】

本発明は、生物学的試料中のMycobacteria群からマイコバクテリアを検出して同定するためのイン・ビトロ法であって、 20

a) 生物学的試料を遺伝子katGのコドン463に配列CTGを有し且つゲノムにはIS6110配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していないM. tuberculosis株を除くM. tuberculosisで特異的に欠失した核酸断片の存在または非存在について分析し、

d) RD1、RD2、RD3、RD4、RD5、RD6、RD7、RD8、RD9、RD10、RD11、RD13、RD14、RvD1、RvD2、RvD3、RvD4、RvD5、katG^{4 6 3}、gyrA^{9 5}、oxyR^{1 2 8 5}、pncA^{5 7}、M. canettiiの特異的挿入因子から選択される少なくとも1個の追加遺伝子マーカーを分析する工程を含んでなる、イン・ビトロ法を提供する。 30

【0061】

好ましい態様では、2種類の追加マーカー、好ましくはRD4およびRD9を用いる。分析は、配列ハイブリダイゼーション、核酸増幅、抗原 - 抗体群から選択した手法によって行う。

【0062】

本発明の目的は、生物学的試料中のMycobacterium群からマイコバクテリアを検出し同定するためのキットであって、下記の因子：

a) 本発明の核酸断片から選択される、更に好ましくは配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18を含んでなる群から選択されるプライマーから選択される少なくとも1対のプライマー、 40

b) RD1、RD2、RD3、RD4、RD5、RD6、RD7、RD8、RD9、RD10、RD11、RD13、RD14、RvD1、RvD2、RvD3、RvD4、RvD5、katG^{4 6 3}、gyrA^{9 5}、oxyR^{1 2 8 5}、pncA^{5 7}、M. canettiiの特異的挿入因子から選択される遺伝子マーカーに特異的な少なくとも1対のプライマー、

c) DNA増幅反応を行うのに要する試薬、

d) 必要に応じて、増幅した断片の配列および/または大きさを明らかにしまたは比較することができる必要な成分を含んでなる、キットを提供することでもある。

【0063】

好ましい態様では、このキットは、下記の因子：

- a) 本発明の核酸断片から選択される、更に好ましくは配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18を含んでなる群から選択されるプライマーから選択される少なくとも1対のプライマー、
- b) 遺伝子マーカーRD4に特異的な1対のプライマー、
- c) 遺伝子マーカーRD9に特異的な1対のプライマー、
- d) DNA増幅反応を行うのに要する試薬、
- e) 必要に応じて、増幅した断片の配列および/または大きさを明らかにしまたは比較することができる必要な成分を含んでなる。

10

【0064】

下記の図および例は、当業者に対する更に別の指針として提供されるものであり、本発明を制限するものと解釈すべきではない。

【実施例】

【0065】

1. 材料および方法：

1.1. 細菌株：

100個の結核菌群株は、30カ国で単離された46種の *M. tuberculosis* 株、14種の *M. africanum* 株、5カ国に由来する28種の *M. bovis* 株、2種の *M. bovis* BCGワクチン株 (PasteurおよびJapan)、5種の *M. microti* 株、および5種の *M. canettii* 株から構成された。これらの株はヒトおよび動物供給源から単離し、多中心研究(8)で用いた60株を包含する広い多様性を示すように選択した。*M. africanum* 株はWadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, New Yorkのコレクションから得て、*M. bovis* 単離物の大部分はUniversity of Zaragoza, スペインのコレクションから入手した。4種類の *M. canettii* 株は、Institut Pasteur, Paris, フランスのカルチャーコレクションからのものである。株は、リファレンスタイピング法、すなわちIS6110制限断片長多型(RFLP)タイピングおよびスポリゴタイピングによって徹底的に特性決定した。*M. tuberculosis* H37Rv、*M. tuberculosis* H37Ra、*M. tuberculosis* CDC1551、*M. bovis* AF2122/97、*M. microti* OV254、および *M. canettii* CIPT 140010059が、リファレンス株として包含された。DNAは、上記の方法で調製した(10)。

20

30

【0066】

1.2. ゲノム比較およびプライマーデザイン

M. tuberculosis と *M. bovis* のゲノムの予備的比較には、ウェブサイト <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> および http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_bovis/、並びに社内データベースを用いた。プライマーデザインには、RDおよびRV領域内部またはこれに隣接する配列を、同じウェブサイトから得た。プライマーは、リファレンス株における約500塩基対断片を増幅するプライマー3ウェブサイト http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi を用いてデザインした(表1)。

【0067】

1.3. RD-PCR分析

反応は96穴プレートで行い、反応当たり1.25μlの10xPCR緩衝液(600mM Tris HCl pH8.8、20mM MgCl₂、170mM (NH₄)₂SO₄、100mM -メルカプトエタノール)、1.25μlの20mMヌクレオチドミックス、50nMのそれぞれのプライマー、1~10ngの鋳型DNA、10%DMSO、0.2単位のTaqポリメラーゼ(Gibco-BRL)を含み、滅菌蒸留水を加えて12.5μlとした。熱循環を、PTC-100増幅装置(MJ Inc.)で、95で90秒間の初期変性段階の後、95で30秒間、58度で1分間および72で4分間の35サイクルを行った。

40

【0068】

1.4. 接合領域(RDs、TbD1)、katG、gyrA、oryRおよびpn

50

c A 遺伝子シーケンシング

PCR産物は、上記のように、表1に挙げたプライマーを用いて得た。

プライマー除去については、6 μ lのPCR産物をシュリンプアルカリホスファターゼ (USB) 1単位、エキソヌクレアーゼI (USB) 10単位、および5x緩衝液 (200 mM Tris HCl pH 8.8、5 mM MgCl₂) 2 μ lと共に37 で15分間インキュベーションした後、80 で15分間インキュベーションした。この反応混合物にBig Dyeシーケンシングミックス (Applied Biosystems) 2 μ l、プライマー2 μ l (2 μ M)、および5x緩衝液 (5 mM MgCl₂、200 mM Tris HCl pH 8.8) 3 μ lを加え、35サイクル (96 で30秒間; 56 で15秒間; 60 で4分間)をサーモサイクラー (MJ-research Inc., Watertown, MA)で行った。DNAを76%エタノール80 μ lを用いて沈澱させ、70%エタノールで濯いで、乾燥した。反応物をホルムアミド/EDTA緩衝液2 μ lに溶解し、変性して、48 cmの4%ポリアクリルアミドゲルに装填し、電気泳動を377自動化DNAシーケンサー (Applied Biosystems)で10~12時間行った。あるいは、反応物を0.3 mM EDTA緩衝液に溶解し、3700 DNAシーケンサー (Applied Biosystems)で自動化シーケンシングを行った。反応物は、一般に500~700 bpの明確な配列を生じた。

【0069】

1.5. 受領番号

遺伝子mmpS6およびmmpL6を含む祖先M. tuberculosis株No. 74 (参考文献8)からのTbD1領域の配列を、EMBLに受領番号AJ426486で寄託した。BCGにおいてRD4、RD7、RD8、RD9およびRD10に接している配列は、それぞれ受領番号AJ003103、AJ007301、AJ131210、Y18604、およびAJ132559で入手可能である。

【0070】

2. 実験データ:

結核菌のゲノムにおける挿入-欠失事象から生じる20可変領域の分布を、全部で100株のMycobacterium tuberculosis、M. africanum、M. canettii、M. microti、およびM. bovisで評価した。この方法は、これらの多型の大部分は結核菌群の異なる株では独立して起きないが、共通の祖先株における古い不可逆的遺伝事象から生じる。M. tuberculosisの特異的欠失 (TbD1)の有無に基づいて、M. tuberculosis株を祖先および「近代」株に分類し、後者がBeijing、HaarlemおよびAfrican M. tuberculosis群のような主要な流行病の代表的なものを構成することができる。更に、FD9によって反映されるDNAの連続的喪失とそれに続く他の欠失を同定して、進化系統をTbD1が起こる前に現在のM. tuberculosis株の祖先から分岐したM. africanum、M. microtiおよびM. bovisによって表わした。これらの知見は、ヒト結核の病原体であるM. tuberculosisがウシの疾患の病原体であるM. bovisから進化したというしばしば提出される仮説と矛盾する。これらの欠失領域を全く欠いていないM. canettiiおよび先祖のM. tuberculosis株は、M. africanum->M. bovis系統がM. tuberculosis系統から分離する前に存在した結核菌の直接の子孫であると思われる。これは、結核菌の共通の先祖がM. tuberculosisまたはM. canettiiに似ており、既に十分にヒトの病原体となっていたことを示唆している。

【0071】

結核菌群に分類されたマイコバクテリアはヌクレオチドレベルおよび同一16SrRNA配列で99.9%の同一性を有することを特徴とするが(1,2)、それらの宿主親和性、表現型、および病原性に関しては大きく異なっている。それらが総て共通の祖先に由来すると仮定すると、幾つかはもっぱらヒト (M. tuberculosis、M. africanum、M. canettii) または齧歯類の病原体 (M. microti) であるが、他のものは広い宿主スペクトルを有する (M. bovis) ことは興味深いことである。結核菌の最後の共通の祖先の遺伝子構成はどのようなものであり、またどの宿主で生きられたのか。どのような遺伝学的事象が、宿主スペクトルが非常に異なっており且つしばしば特異的であるという事実に影響したの

であろうか。どこでいつ、M. tuberculosisは進化したのか。これらの疑問に対する回答は、結核の病原性と包括的疫学のより一層理解する上で重要であり、この疾患の将来の趨勢を予測する助けとなることがある。

【0072】

それらのハウスキーピング遺伝学の保存度が著しく高いため、結核菌群の菌は約15,000~20,000年前に起きたと推定される種形成時に進化を妨げられたことが示唆されている(2)。動物の病原体をヒト宿主に特異的に適合することによって、ヒト結核の最も広範囲に存在するM. tuberculosisはウシの病原体であるM. bovisから進化したとも推定されている(3)。しかしながら、いずれの仮説も、M. tuberculosisの全ゲノム配列(4)が利用可能となる前に且つ比較ゲノム学(comparative genomics)により結核菌群の菌における幾つかの可変ゲノム領域が発見される前に提案されたものであった。示差的ハイブリダイゼーション配列により、M. tuberculosis H37Rvに関してBCG Pasteurには欠けている2~12.7 kbの大きさの14の領域(RD1-14)を同定した(5,6)。同時に、結核菌群の他の菌に関してM. tuberculosis H37Rvゲノムを欠いている6個の領域、RvD1-5およびTbD1が、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法(5,7)、およびほぼ完全なM. bovis AF2122/97ゲノム配列とM. tuberculosis H37Rv配列のイン・シリコ比較を用いる比較ゲノム法によって明らかにされた。

10

【0073】

本研究では、本発明者らは、結核菌群に属する100株の代表的且つ様々な組におけるゲノムの周りに配置されたこれら20個の可変領域(表1)の分布を分析した。株は、様々な宿主、広範囲の地理学的起源から単離し、IS6110のような広いタイピング特性のスペクトルとスポリゴタイプハイブリダイゼーションパターンまたはマイコバクテリア散在性反復単位の可変数縦列反復配列(MIRU-VNTR)を示す(8,9)。本発明者らは、ある種の可変ゲノム領域の欠失は、Mycobacterium群の様々な株で独立して起こらない顕著な証拠を見出し、この群の様々な系統間の染色体セグメントにはほとんどまたは全く組換えがないことを仮定すれば、本発明者らはMycobacterium群の進化およびヒト結核の起源に全く新たなシナリオを提案できる。

20

【0074】

可変ゲノム領域および結核菌M. tuberculosis群の菌におけるそれらの存在

46のM. tuberculosis、14のM. africanum、5のM. canettii、5のM. microti、28のM. bovisおよび2のBCG株中の20の可変領域(表1)についてのPCRスクリーニング分析では、既知のRDsおよびRvDsに対して内部のオリゴヌクレオチド、並びにこれらの領域に隣接するオリゴヌクレオチド(表1)を用いた。この方法は、内部プライマーを用いて得たPCRアンプリコンは隣接プライマー対を有する適当な大きさのアンプリコンの非存在と相関し、逆もまた同じであるので、上部で信頼性の高い大きなデータセットを生じた。

30

【0075】

可変領域に隣接する接合配列が保存されることにより、3種類の領域であってそれぞれが進化マーカーとして異なる重要性を有するものが識別された。第一のタイプはプロフェージphiRv1(RD3)およびphiRv2(RD11)および挿入配列IS1532(RD6)およびIS6110(RD5)のような可動性遺伝因子を包含し、結核菌におけるその分布は極めて多岐にわたっていた(表2)。第二のタイプの欠失は介在DNAセグメント(RvD2、RvD3、RvD4およびRvD5(7))の喪失を生じる隣接IS6110挿入因子間の相同組換えによって伝達され、且つ株毎に可変である(表2)。

40

【0076】

第三のタイプは、境界を定めているゲノム領域が典型的には反復配列を含まない欠失を包含する。このタイプの欠失は、M. tuberculosis群の他の株において完全なままである遺伝学の切り詰めを生じるコード領域で起こることが多かった。このタイプの欠失を生じる正確な機構は未だよく知られていないが、DNAポリメラーゼのまれに起こる可能性が

50

ある鎖のずれの誤差がこの事象に寄与している可能性がある。下記に詳細に示すように、R D 1、R D 2、R D 4、R D 7、R D 8、R D 9、R D 10、R D 12、R D 13、R D 14 および T b D 1 がこの第三の群の代表的なものであり、100株中の分布から結核菌群の菌についての進化のシナリオが提案され、結核菌の共通の祖先に極めて近接した関連のあるものとして M. tuberculosis および / または M. canettii が同定された。

【0077】

2.1. M. tuberculosis 株 :

欠失分析による46のM. tuberculosis株の検討によって、ほとんどのR D領域が試験を行った総てのM. tuberculosis株に存在することが明らかになった(表2)。M. tuberculosis H37Rvの2種類のプロフェージ phi Rv1 および phi Rv2 に対応する領域 R D 3 および R D 11 (4)、挿入配列 I S 1532 を含む R D 6、および I S 6110 のコピーが隣接している R D 5 (5) のみが、幾つかの株に含まれていなかった。M. tuberculosis株は R D 1、R D 2、R D 4、R D 7、R D 8、R D 9、R D 10、R D 12、R D 13 および R D 14 に関して高度に保存され且つこれらの R D は M. tuberculosis 株をそれらの地理学的起源およびそれらのタイピング特性から独立して結核菌群のある種の他の菌から区別できる領域を表すことを示唆するので、これは重要な観察である。

10

【0078】

対照的に、M. tuberculosis株における R v D 領域の有無は可変性であった。試験した46のM. tuberculosis株の中の18は R v D 2 を持たなかったため、最大の可変性を示す領域は R v D 2 領域であった。I S 6110 の高いコピー数 (> 14) を有する株では、コピー数が僅かな株よりも領域 R v D 2 - R v D 5 がないことが多い。例えば、Beijing 群に属する6個総ての試験した株(8)は、領域 R v D 2 および R v D 3 を欠いていた。これは、この欠失事象における I S 6110 の2つの隣接コピーの組換えについて提案された関連と一致する(7)。

20

【0079】

しかしながら、R v D 領域に関して最も意外な知見は、Haarlem、Beijing および Africa 群のような主要な伝染病由来の代表的株を含む試験を行った M. tuberculosis 株の40には含まれなかったことであった(8)。この結果を強調するため、本発明者らはこの領域を「M. tuberculosis 特異的欠失1」(T b D 1)と命名した。M. tuberculosis H37Rv と M. bovis AF2122/97 の対応する部分とのイン・シリコ配列比較によって、M. bovis では、この座は大きなファミリーに属する膜タンパク質をコードする2個の遺伝子を含んでなり、一方、M. tuberculosis H37Rv では、これらの遺伝子の一つ (mmpS6) は含まれておらず、第二のものは切り詰められていた (mmpL6)。R v D 2 - R v D 5 欠失とは異なり、T b D 1 領域は M. tuberculosis H37Rv における I S 6110 のコピーが隣接しておらず、挿入因子 2153bp 断片の欠失には関与していないことが示唆された。T b D 1 領域を欠いている40の M. tuberculosis 株が M. tuberculosis H37Rv と同じこの座のゲノム構成を有するかどうかを更に検討するため、様々な株の T b D 1 - 接合領域を、欠失領域に隣接するプライマーを用いる PCR によって増幅した(表1)。この方法は、複数の株から得たアンプリコンの大きさが均一であることを示し(図1)、次の PCR 産物の配列分析により、試験を行った総ての T b D 1 欠失株では、接合領域の配列は M. tuberculosis H37Rv の配列と同一であることが明らかになった(図2)。地理的に極めて多岐にわたる T b D 1 欠失株の接合配列が完全に保存されることは、欠失を生じた遺伝事象が共通の祖先で起きたことを示唆している。しかしながら、6個の M. tuberculosis 株であって、いずれも I S 6110 および互いに類似しているスポリゴタイプのコピー数が極めて少数であるかまたは全くないことを特徴とするものは(図3)、未だに T b D 1 領域が存在している。興味深いことには、これらの6個の株は、MIRU-VNTR 分析によって1群にまとめられた(9)。

30

40

【0080】

異なる結核菌間で可変であると記載されている oxyR、pncA、katG、および gyrA の部分遺伝子配列の分析によって(2、11、12、13)、試験を行った総て

50

の *M. tuberculosis* 株は *M. tuberculosis* に典型的な *oxyR* および *pncA* 部分配列を示すことが明らかになった (*oxyR* - ヌクレオチド 285 (*oxyR*²⁸⁵) : G、*pncA* - コドン 57 (*pncA*⁵⁷ : CAC)。 *katG* コドン 463 (*katG*⁴⁶³) および *gyrA* コドン 95 (*gyrA*⁹⁵) 配列多型に基づいて、Sreevatsan と共同研究者ら (2) は、結核菌からの 3 群であって、群 1 が *katG*⁴⁶³ CTG (Leu)、*gyrA*⁹⁵ ACC Thr) を示し、群 2 が *katG*⁴⁶³ CGG (Arg)、*gyrA*⁹⁵ ACC (Thr) を示し、群 3 が *katG*⁴⁶³ CGG (Arg)、*gyrA*⁹⁵ AGC (Ser) を示すものを定義した。この略図によれば、本発明者らの研究では、試験を行った 46 の *M. tuberculosis* 株の 16 が群 1 に属し、27 株が群 2 に属し、3 個の単離株のみが群 3 に属した。領域 T b D 1 を欠失した 40 株の中の 9 株が群 1 の特徴を示し、Beijing 群に属する株を包含し、群 2 の 28 が Haarlem および Africa 群由来の株を包含し、群 3 の 3 は H37Rv および H37Ra を包含した。最も興味深いことには、T b D 1 領域が欠失していない 6 種類総ての *M. tuberculosis* 株は *katG*⁴⁶³ にロイシンを含み、これは先祖の *M. tuberculosis* 株に特徴的であると記載された (群 1) (2)。図 4 に示されるように、*M. tuberculosis* の進化の際に、領域 T b D 1 を欠失した先祖株でコドン 463 で *katG* 突然変異 CTG (Leu) -> CGG (Arg) が起きたことを示唆している。この提案は、群 1 に属する株が欠失領域 T b D 1 を有しまたは持たないことがあり、一方群 2 および 3 に属する 30 総ての株は T b D 1 を欠いていたという知見によって支持される (図 4)。更に、群 2 および 3 の総ての株は直接反復 (DR) 領域においてスペーサー配列 33 ~ 36 を特徴的に欠いていた (図 3)。このようなスペーサーは喪失するが得られないことがあると思われる (14)。従って、T b D 1 欠失株は、以後は「近代」*M. tuberculosis* 株と表す。

【0081】

2.2. *M. canettii*:

M. canettii は、通常はアフリカ出身またはアフリカに関連した患者から単離される *M. tuberculosis* の極めてまれなスムーズ変異体である。*M. canettii* 株は *Mycobacterium* 群の他の菌と同一の 16S rRNA 配列を共有するが、ある種のハウス・キーピング遺伝子における多型、IS1081 コピー数、コロニー形態、および細胞壁の脂質含量など多くの点で異なっている (15, 16)。従って、本発明者らは *M. canettii* において、プロファージ (*phiRv1*, *phiRv2*) を除く総ての RD、RvD、および T b D 1 領域が存在することを見出したことに驚愕した。対照的に、本発明者らは、RD12 と部分的に重複した 5 個総ての *M. canettii* 株から本質的に存在しない領域 (RD^{can}) を同定した (図 4)。

【0082】

多くの記載および観察された差に関して *M. canettii* のゲノムにおいて RD、RvD、および T b D 1 領域が保存されることは、結核菌の系統において RD、RvD、および T b D 1 が起こる前に *M. canettii* が *Mycobacterium* 群の共通の先祖から分岐したことを示唆している (図 4)。この仮説は、*M. canettii* が直接反復配列領域に 26 のユニークスペーサー配列を有することが示され、この配列は *Mycobacterium* 群の任意の他の菌には最早存在しないという知見によって支持される。*M. canettii* の他の特有の特徴は、*Mycobacterium* 群 (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* および *M. microti* など) の他の菌株では成功しなかった PCR およびハイブリダイゼーション法を用いることによる配列を探索した挿入因子の存在である。この挿入因子は、2 個の逆方向反復配列によって枠に嵌められた推定的トランスポザーゼをコードする ORF を含んでいた。この挿入因子の配列は図 6 および配列番号 19 に表されており、これは 399 位で始まり、2378 位で終わっている。推定的トランスポザーゼのアミノ酸配列を、配列番号 20 に示す。この挿入因子自体は、同じ T b D 1、RD4 および RD9 プロフィールを示すことがある *M. tuberculosis* 先祖株と *M. canettii* 株とを区別するのに用いることができる。従って、*M. canettii* は魅力的な結核菌であり、その詳細なゲノム分析により *Mycobacterium* 群の進化を更に洞察することができる。

【0083】

2.3. M. africanum:

本明細書で検討したM. africanumと呼ばれる単離物は西および東アフリカに起源がある。11株はシエラレオーネ、ナイジェリアおよびギニアで単離され、2株はウガンダで単離された。1株は、オランダに由来する。

【0084】

11株の西アフリカ単離物について、RD分析したところ、これらの株はいずれもcobLを含むRD9領域を欠くことを示していた。RD9接合領域の配列分析は、西アフリカ株におけるこの座の遺伝子構成は、cobLの5'部分並びに遺伝子Rv2073cおよびRv2074cがない点においてM. bovisおよびM. microtiのモノと同一であることを示した。更に、6個の株(2個はシエラレオーネ由来、4個はギニア由来)もRD7、RD8およびRD10を欠いていた(表2)。RD9についての接合配列と同様に、RD7、RD8およびRD10と境を接している接合配列は、M. bovisおよびM. microti株のものと同じであった。2個のプロファージphiRv1およびphiRv2に関して、西アフリカ株はいずれもphiRv2を含んでいたが、sphiRv1はなかった。変動性は、RvD領域については見られなかった。RvD1-RvD5およびTbD1は、試験した総ての西アフリカ株に存在した。これは、西アフリカで流行しているM. africanumは、領域RD9が存在せず且つ領域TbD1するという少なくとも2個の可変遺伝子マーカーによって「近代的」(modern) M. tuberculosisから区別することができることを示している。

【0085】

対照的に、東アフリカのM. africanumおよびオランダに由来する単離物については、それらをM. tuberculosis株と区別することができる遺伝子マーカーは見出されなかった。プロファージphiRv1 (RD3)を除き、ウガンダおよびオランダに由来する3株は、RD欠失を全く示さなかったが、「近代的」M. tuberculosis株と同様にTbD1領域を欠いていた。TbD1領域がないことは、TbD1接合領域の配列分析によっても明らかにされ、これはTbD1欠失M. tuberculosis株のものと同じであることが見出された。これらの結果は、これらの株のM. tuberculosisに極めて近接した遺伝学的関連性を示しており、それらはM. africanumよりはむしろM. tuberculosisと見なすべきであることを示唆している。

【0086】

2.4. M. microti:

M. microti株は、1930年代にハタネズミから単離され(17)、更に最近では免疫抑制患者から単離された(18)。これらの株は同一の特徴的なスポリゴタイプを有することを特徴とするが、それらのIS6110プロフィールは異なっている。ハタネズミおよびヒト単離物はいずれも領域RD7、RD8、RD9およびRD10、並びにM. microtiから特異的に欠失した領域(RD^{mic})を欠いていた。RD^{mic}は、M. microti Bacterial Artificial Chromosome(BAC)ライブラリー由来のクローンを用いるM. microtiの詳細な比較ゲノム学的検討によって明らかにされた(19)。RD^{mic}は、部分的にBCG由来のRD1と重複している(データは示さず)。更に、ハタネズミ単離物はRD5領域の一部を欠いているが、この領域はヒト単離物には存在する。M. microtiにおけるRD5の接合領域はBCGのものとは異なっているので(データは示さず)、RD5は進化マーカーとして用いなかった。

【0087】

2.5. M. bovisおよびM. bovis BCG:

M. bovisは、ヒトを含む多くの哺乳動物種に感染する極めて大きな宿主スペクトルを有する。RDおよびRvD領域についてスクリーニングしたM. bovis株のコレクションは、3個のヤギ単離物、3個のアザラシ単離物、2個のオリックス単離物、および一層多数のIS6110のコピーを提供するヒト由来の2個のM. bovis株の他に、2個のBCG株と一般的にウシ由来のIS6110の1または2コピーを特徴とする18個の「古典的」(c

10

20

30

40

50

lassical) *M. bovis*株からなっていた。

【0088】

プロファージを除き、RDの分布により、試験を行った*M. bovis*株から5個の主要な群を区別することができた。第一の群は、RD7、RD8、RD9およびRD10を欠いている株によって形成された。この群の典型的nMのは3個のアザラシ単離物、およびIS6110のコピーを3~5個含む2個のヒト単離物である(データは示さず)。IS6110のコピーを17~20個含む2個のオリックス単離物は、RD7-RD10の他にRD5を欠き、*M. microti*単離物に極めて類似している第二の群を形成した。しかしながら、それらは*M. microti*株に特徴的な欠失であるRD^{m i c}を示さなかった(データは示さず)。群1および2に属する株由来の部分oxyRおよびpnca配列の分析では、*M. tuberculosis*株に特徴的な配列多型を示した(oxyR²⁸⁵:G、pnca⁵⁷:CAC、参考文献12,13)。

【0089】

群3は、領域RD5、RD7、RD8、RD9、RD10、RD12およびRD13を欠いているヤギ単離物からなっている。Arana zと共同研究者らによって以前に報告されているように、これらの株は「古典的」*M. bovis*株に特異的なoxyR偽遺伝子の285位にアデノシンを示したが、pnca⁵⁷多型の配列は*M. tuberculosis*の配列と同一であった(20)。これは、配列分析からの本発明者らの結果(表2)、およびRD4を除いて、ヤギ単離物は「古典的」*M. bovis*株と同じ欠失を示すという知見と良好な一致を示す。まとめると、これは、RD4が失われる前に、oxyR²⁸⁵突然変異(G->A)が*M. bovis*株で起きたことを示唆している。興味深いことには、アルゼンチン、オランダ、英国およびスペイン産のウシ、並びにヒトから単離した最も普通の*M. bovis*株(「古典的」*M. bovis*(21))(例えば、スペインからの多剤耐性*M. bovis*(22))は最大数のRD欠失を示し、*M. tuberculosis*群の他の菌に関してDNAの損失が最大になると思われる。これらは領域RD4、RD5、RD6、RD7、RD8、RD9、RD10、RD12およびRD13を欠き、リファレンス株で得た結果が確認された(5,6)。これらの株は2個のBCG株と共に、*M. bovis*に特徴的なoxyR²⁸⁵突然変異(G->A)の他にpnca⁵⁷多型GAC(Asp)を示した唯一のものであった。BCG株の分析では、明らかに減衰過程中または後に起きたRD1、RD2およびRD14の他に「古典的」*M. bovis*株と同じRD領域をBCGが欠いていたことを示している(図4)(6,23)。

【0090】

RDとは対照的に、rvD領域は*M. bovis*株では高度に保存されていた。rvD2、rvD3およびrvD4を欠く2個のIS6110リッチオリックス単離物をのぞき、他の総ての株は5個のrvD領域を有した。TbD1が総ての*M. bovis*株に存在したことは特に注目に値する。

【0091】

しかしながら、群1からのIS6110の3~5コピーを含む2個のヒト単離物を除き、*M. bovis*と命名された株は、コドンAACを特徴とする*M. canettii*、*M. africanum*および先祖*M. tuberculosis*に対して、mmpL6遺伝子のコドン551(AAG)のTbD1領域において単一のヌクレオチド多型を示した。*M. tuberculosis*のようなoxyRまたはpnca座を有し且つ古典的*M. bovis*株より欠失領域が少ないアザラシおよびオリックスから単離した株であっても、*M. bovis*株および*M. microti*に典型的なmmpL6⁵⁵¹AAG多型を示した(表2、図4)。この多型それ自体は、RD7、RD8、RD9およびRD10を欠き且つ*M. bovis*または*M. africanum*として分類されている株の区別に極めて有用な遺伝子マーカーとして訳だったが、同一分類群の他の株とは異なることがある。

【0092】

3. 討論

3.1. ヒト結核の起源

10

20

30

40

50

多年の間、ヒト結核は動物の病原体をヒト宿主に適合させることによってウシ疾患から進化したと考えられていた(3)。この仮説は、*M. tuberculosis*の特性がほぼ全くヒト病原体のみであり、一方*M. bovis*はずっと広い宿主範囲を有することに基づいている。しかしながら、この研究からの結果は*M. tuberculosis*と比較して*M. bovis*が多くの欠失を行ってきたことを明白に示している。これは、ウシから単離された「古典的」*M. bovis*株である*M. bovis* AF2122/97のほぼ完全なゲノム配列の予備分析によって確かめられ、*M. bovis*に特異的に閉じ込められた新たな遺伝子クラスターを示さなかった。これは、*M. bovis*のゲノムが*M. tuberculosis*のゲノムより小さいことを示している(24)。*M. bovis*は、*M. tuberculosis*単離物の先祖から分岐した*M. africanum*(RD9)、*M. microti*(RD7、RD8、RD9、RD10)および*M. bovis*(RD4、RD5、RD7、RD8、RD9、RD10、RD12、RD13)(25)によって表される別系統の最後の菌であることが妥当と思われる。DNAの連続的喪失は、クローン伸長およびある種の新たな宿主における更に順当な病原体の出現の一員となる可能性がある。

10

【0093】

M. africanum→*M. bovis*系統が*M. tuberculosis*系統から分離したときには、現存する*M. tuberculosis*株の先祖が既に病原体であるかどうかを考察の主題である。しかしながら、これがその通りであると信ずるに足る2つの理由がある。第一は、*M. tuberculosis*および*M. africanum*の分離前の最後の共通祖先に類似している6個の祖先*M. tuberculosis*株(TbD1⁺, RD9⁺)(図3)が総てヒト病原体であることである。第二に、*M. tuberculosis*群の任意の他の既知の菌の前の今日の*M. tuberculosis*株の共通祖先から分岐したと思われる*M. canettii*も、ヒト病原体であることである。まとめて考えれば、これは、*M. tuberculosis*の祖先に極めて類似していると考えられる結核菌がヒト病原体であり且つ動物病原体ではないことを意味する。また、興味深いことには、これらの株のほとんどはアフリカまたはインド起源であった(図3)。これらの祖先株は主に固有病巣に由来し(15, 26)、一方TbD1を喪失した「近代的」*M. tuberculosis*株は流行性結核の世界的蔓延の結果として更に最近同じ地理学的地域に導入された流行性*M. tuberculosis*株であることがある。

20

【0094】

3.2. 結核菌群の進化期間

ハウスキーピング遺伝子で配列が高度に保存されるので、Sreevatsan et al.は、以前に結核菌が15,000~20,000年以前に主要な隘路にであったと仮定した(2)。試験を行った総てのTbD1欠失株でのTbD1接合配列の保存が単一クローンに由来することを示唆しているので、TbD1欠失は、今日の結核症例の大半を説明する「近代的」*M. tuberculosis*株は確実にこのような隘路を経験した後に世界中に広がったことを完全に示している。

30

【0095】

結果の節で詳細に説明したように、本発明者らの分析は、Sreevatsanと共同研究者らが提案した結核菌の進化経路の群2および3を命名するのに用いたkatG⁴⁶³CTG→CGGおよびそれに続くgyrA⁹⁵ACC→AGC突然変異(2)が、既にTbD1を喪失している*M. tuberculosis*株の系統で起こったことを示した(図4)。欠失は反転を受けることがある点突然変異より安定なマーカーであるが、欠失と点突然変異の完全な相関を試験株について見出した。

40

【0096】

この知見は、18および19世紀の自然にミイラ化したハンガリー人村民から増幅した*M. tuberculosis* DNAがkatG⁴⁶³/gyrA⁹⁵群2および3に属することを示したFlecherと共同研究者による最近の研究結果と一緒にあって、TbD1欠失が18世紀以前に*M. tuberculosis*の系統で起こったことを示唆している。これは、結核の症例が18世紀以後にヨーロッパで劇的に増加したことが主として「近代的」*M. tuberculosis*株が伴うことを意味する可能性があった。更に、結核は*M. tuberculosis*によって引き起こされ且つ*M. bovis*によっては引き起こされないことを示しており、この事実は田舎の

50

中世的英国での場合についても記載されている(28)。

【0097】

マイコバクテリア感染症は数千年前にヒトで起こったという良好な証拠がある。ファラオの治世中のエジプトで結核があったことが知られており、結核に特徴的な脊髄および肋骨の病巣がその時代からのミイラで同定されているからである(29)。ペルーのミイラからの抗酸性桿菌並びにPCR増幅の同定(30)も、結核が中央および南アメリカのコロンブス以前の社会に存在したことを示唆している。TbD1隘路がいつ起きたかを推定する目的で、エジプトおよび南アメリカのミイラのTbD1が欠失しているかまたはまたは欠失していないM. tuberculosis DNAを有するかどうかを知ることは極めて興味深いことであろう。

10

【0098】

M. africanum->M. microti->M. bovis系統の菌について起こったと思われる他の主要な隘路は、RD9、およびそれに続くRD7、RD8およびRD10欠失によって示される(図4)。これらの欠失は、今日では、アフリカのヒト、オークニー諸島(英国)のハタネズミ、アルゼンチンのアザラシ、スペインのヤギ、および英国のアナグマと同様に多様な天然宿主スペクトルを示す結核菌の先祖で起こったと思われる。このため、RD9欠失菌のそれらの特異的宿主への蔓延および適合は、M. tuberculosis群の種分化の推定15,000~20,000年中に生じた可能性があると思像することは困難である。

【0099】

しかしながら、この問題を更なる洞察は、17,000年前の野牛の骨格から単離した古代のDNA試料、例えばマイコバクテリアDNAのRD分析によって行うことができた(31)。DNAを増幅したマイコバクテリアは、M. africanumのパターンに極めて近接した関連を有し且つ系統M. africanum->M. bovisの初期の典型的nMのであった可能性があるスポリゴタイプを示した。本発明者らが本明細書で供給するTbD1およびRD9接合配列を用いると、古代DNAのPCR分析を極めて集中して行い、M. tuberculosis群の菌が進化した期間について更に学ぶことができる。

20

【0100】

3.3. 結論

本発明者らの研究は、広汎な結核菌の可変領域の多様性および保存の全体像を提供する。様々な宿主および国由来の100株の欠失分析により、ほとんどがアフリカ起源の幾つかの進化的に「古い」(old) M. canettii、M. tuberculosisおよびM. africanum株、並びに「近代的」M. tuberculosis株であって、北京、ハールレムおよびアフリカのような主要な流行クラスターからの典型的なものなどを同定した。特異的突然変異の分子タイピングおよび分析と共同した欠失分析の使用は、結核菌の進化の研究および進化マーカーの同定のための極めて強力な方法であることが示された。更に実際的な観点では、これらの領域、主としてRD9およびTbD1であるが、RD1、RD2、RD4、RD7、RD8、RD10、RD12、およびRD13も、M. tuberculosis群の菌を迅速且つ明確に同定するための強力な診断手段の発展のための極めて興味深い候補である(32)。この発生学的な区別の方法を用いて、M. tuberculosis群の混乱することが多い伝統的な分類を厳密に確定した亜種とすることができる。

30

40

【0101】

更に、機能分析により、TbD1欠失が「近代的」M. tuberculosisに幾らかの選択的利点を付与するかどうか、または他の環境がTbD1を欠失したM. tuberculosis株の世界的流行の一員となるかが示される。

【0102】

例4

M. tuberculosis群の菌は異常なほど高い保存度を共有しており、市販の核酸プローブおよび増幅分析ではこれらの生物を区別することはできない。その上、従来と同定法は曖昧で、扱い難く、生物の増殖が遅いため時間がかかることが多い。

【0103】

50

本発明では、本発明者らは、M. tuberculosis群中で分化の目的で臨床マイコバクテリア学実験室が直面した問題を欠失分析によって解決する。

【0104】

この方法は、TbD1を含む少なくとも3個のマーカを用いることによって生物学的流体について診断を行うことができる。下表3は、マイコバクテリア群の菌を識別するのに十分な組合せを示す。

【0105】

【表1】

表3

マイコバクテリア株	マーカー		
	RD4	RD9	TbD1
<i>M. bovis</i> BCG	—	—	+
<i>M. bovis</i>	—	—	+
<i>M. africanum</i>	+	—	+
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	—
<i>M. tuberculosis ancestral</i>	+	+	+
<i>M. canettii</i>	+	+	+

10

20

【0106】

その上、TbD1マーカー、好ましくは少なくとも2個の他のマーカーを用いるべきである。文献で入手可能なこのような追加マーカーを、下表1に示す。

【0107】

Mycobacterium tuberculosisの先祖株は全Mycobacterium tuberculosis株の5%に過ぎないが、Mycobacterium tuberculosisの先祖株をMycobacterium canettiiの株から区別することに興味のある者は、遺伝子マーカーRD12を表3に記載の3個のマーカーと組み合わせて用いることを考察することができる。領域RD^{can}はMycobacterium canettiiのゲノムにおいてRD12と部分的に重複しているので、表1に記載のフランキングプライマーはMycobacterium canettiiのゲノムDNAでハイブリダイズしない。従って、これらのフランキングプライマーを用いるPCR増幅によりMycobacterium tuberculosisで2.8kb PCR産物を生じ、Mycobacterium canettiiではPCR産物を生成しない。

30

【0108】

Mycobacterium tuberculosisの先祖株をMycobacterium canettiiから識別する他の方法は、M. canettii株に特異的であり且つ配列番号19に対応する挿入因子の検出である。

40

【0109】

【表 2】

補足データ:

表1: RD、RvDおよびTbD1領域、および選択したプライマー

BCGの ない領域	遺伝子	大きさ (kb)	内部プライマー対	フランキングプライマー または第二の内部プライマー対*
RD1	Rv3871-Rv3879c	9.5	RD1in-Rv3878F GTC AGC CAA GTC AGG CTA CC RD1in-Rv3878R CAA CGT TGT GGT TGT TGA GG	RD1-flank.left GAA ACA GTC CCC AGC AGG T RD1-flank.right TTC AAC GGG TTA CTG CGA AT
RD2	Rv1978-Rv1988	10.8	RD2-Rv1979.int.F TAT AGC TCT CGG CAG GTT CC RD2-Rv1979-int.R ATC GGC ATC TAT GTC GGT GT	RD2-flank.F CTC GAC CGC GAC GAT GTG C RD2-flank.R CCT CGT TGT CAC CGC GTA TG
RD3*	Rv1573-Rv1586c	9.2	RD3-Rv1586.int.F TTA TCT TGG CGT TGA CGA TG RD3-Rv1586.int.R CAT ATA AGG GTG CCC GCT AC	RD3-int-REP.F CTG ACG TCG TTG TCG AGG TA* RD3-int-REP.R GTA CCC CCA GGC GAT CTT*
RD4	Rv1505c-Rv1516c	12.7	RD4-Rv1516.int.F CAA GGG GTA TGA GGT TCA CG RD4-Rv1516.int.R CGG TGA TTC GTG ATT GAA CA	RD4-flank.F CTC GTC GAA GGC CAC TAA AG RD4-flank.R AAG GCG AAC AGA TTC AGC AT

10

20

RD5*	Rv2346c-Rv2353c	9.0	RD5A-Rv2348.int.F AAT CAC GCT GCT GCT ACT CC	RD5B-pleA.int.F CAA GTT GGG TCT GGT CGA AT	
			RD5A-Rv2348.int.R GTG CTT TTG CCT CTT GGT C	RD5B-pleA.int.R GCT ACC CAA GGT CTC CTG GT	
RD6*	Rv3425-Rv3428c	4.9	RD6-IS1532F CAG CTG GTG AGT TCA AAT GC	ND	
			RD6-IS1532R CTC CCG ACA CCT GTT CGT	ND	
RD7	Rv1964-Rv1977	12.7	RD7-Rv1976.int.F TGG ATT GTC GAC GGT ATG AA	RD7-flank.F GGT AAT CGT GGC CGA CAA G	10
			RD7-Rv1976.int.R GGT CGA TAA GGT CAC GGA AC	RD7-flank.R CAG CTC TTC CCC TCT CGA C	
RD8	<i>ephA-lpqG</i>	5.9	RD8-ephA.F GGT GTG ATT TGG TGA GAC GAT G	RD8-flank.F CAA TCA GGG CTG TGC TAA CC	
			RD8-ephA.R AGT TCC TCC TGA CTA ATC CAG GC	RD8-flank.R CGA CAG TTG TGC GTA CTG GT	
RD9	<i>cobL</i> -Rv2075	2.0	RD9-intF CGA TGG TCA ACA CCA CTA CG	RD9-flankF GTG TAG GTC AGC CCC ATC C	
			RD9-intR CTG GAC CTC GAT GAC CAC TC	RD9-flankR GCC CAA CAG CTC GAC ATC	20
RD10	Rv0221-Rv0223	1.9	RD10-intF GTA ACC GCT TCA CCG GAA T	RD10-flankF CTG CAA CCA TCC GGT ACA C	
			RD10-intR GTC AAC TCC ACG GAA AGA CC	RD10-flankR GTC ATG AAC GCC GGA CAG	
RD11	Rv2645-Rv2695c	11.0	RD11-Rv2646F CGG CAG CTA GAC GAC CTC	RD11-fla-F TCA CAT AGG GGC TGC GAT AG	
			RD11-Rv2646R AAC GTG CTG CGA TAG GTT TT	RD11-fla-R AGA GGA ACC TTT CGG TGG TT	
RD12	<i>sseC</i> -Rv3121	2.8	RD12-Rv3120.int.F GAA ATA CGA GTG CGC TGA CC	RD12-flank.F GCC ATC AAC GTC AAG AAC CT	30
			RD12-Rv3120.int.R CTC TGA ACC ATC GGT GTC G	RD12-flank.R CGG CCA GGT AAC AAG GAG T	
RD13	Rv1255c-Rv1257c	3.0	RD13intF GGA TGT CAC TCG GAA CGG CA	RD13-flank.F CGA TGG TGT TTC TTG GTG AG	
			RD13intR CAC CGG GCT GAT CGA GCG A	RD13-flank.R GGA TCG GCT CAG TGA ATA CC	
RD14	Rv1765c-Rv1773c	9.0	RD14-Rv1769.int.F GTG GAG CAC CTT GAC CTG AT	RD14-flankF TTG ATT CGC CAA CAA CTG AA	
			RD14-Rv1769.int.R CGT CGA ATA CGA GTC GAA CA	RD14-flankR GGG CTG GTT AGT GTC GAT TC	40

M. tuberculosis H37Rvから欠落している領域

RvD1*		5.0	RvD1-int1F AGC GCG TCG AAC ACC GGC RvD1-int1R CCT GAA TCC GCG CAA TTC CAT	RvD1-int2F GAG CCA CTC CGA TGT TGA CT RvD1-int2R CAC GCG AAC CCT ACC TAC AT	
RvD2*	<i>plcD</i>	5.1	RvD2-int1F GTT CTC CTG TCG AAC CTC CA RvD2-int1R ACT TCA CCG GTT TCA TCT CG	RvD2-int2F GGA CGG TGA CGG TAT TTG TC RvD2-int2R TCG CCA ACT TCT ATG GAC CT	10
RvD3		1.0	RvD3-intF ATC GAT CAG GTC GTC AAT GC RvD3-intR ACG CCA CCA TCA AGA TCC	RvD3-flank.F AAA CCA TGC AGC GTC TGC CA RvD3-flankR GCG TTT CTG CGT CTG GTT GA	
RvD4*	PPE gene	0.8	RvD4-intF-PPE GGT TGC CAA CGT TAC CGA TGC RvD4-intR-PPE CCG GTG GTG GTG GCG GCT	ND ND	
RvD5	<i>moa</i>	4.0	RvD5intF GGG TTC ACG TTC AYT ACT GTT C RvD5intR CCT GCG CTT ATC TCT AGC GG	RvD5-flankF CCC ATC GTG GTC GTT CAC C RvD5-flankR GTA CCC GCA CCA CCT GCT G	20
TbD1	<i>mmpL6</i>	2.1	TBD1intS.F CGT TCA ACC CCA AAC AGG TA TBD1intS.R AAT CGA ACT CGT GGA ACA CC	TBD1fla1-F CTA CCT CAT CTT CCG GTC CA TBD1fla1-R CAT AGA TCC CGG ACA TGG TG	
<i>katG</i> , <i>gyrA</i> , <i>oxyR</i> , <i>pncA</i> , <i>mmpL6</i> PCRおよびシーケンシングプライマー					
<i>katG</i> ⁴⁶³			<i>katG</i> -2154,225-PCR-F CTA CCA GCA CCG TCA TCT CA <i>katG</i> -2155,157-PCR-R AGG TCG TAT GGA CGAACA CC	<i>katG</i> -2154,372-SEQ-R ACA AGC TGA TCC ACC GAG AC	30
<i>gyrA</i> ⁹⁵			<i>gyrA</i> -7,127-PCR-F GTT CGT GTG TTG CGT CAA GT <i>gyrA</i> -8,312-PCR-R CAG CTG GGT GTG CTT GTA AA	<i>gyrA</i> -7,461F CGG GTG CTC TAT GCA ATG TT	
<i>oxyR</i> ²⁸⁵			<i>oxyR</i> 2725,559F TAT GCG ATC AGG CGT ACT TG <i>oxyR</i> -2726,024-PCR-R CAA AGC AGT GGT TCA GCA GT	<i>oxyR</i> -2726,024-SEQ-R CAA AGC AGT GGT TCA GCA GT	40
<i>pncA</i> ⁵⁷			<i>pncA</i> -2288,678-PCR-F ATC AGG AGC TGC AAA CCA AC <i>pncA</i> -2289,319-PCR-R GGC GTC ATG GAC CCT ATA TC	<i>pncA</i> -2289,319-SEQ-R GGC GTC ATG GAC CCT ATA TC	
<i>mmpL6</i> ⁵⁵¹			<i>mmpL</i> -seq5F GTA TCA GAG GGA CCG AGC AG TBD1fla1-R CAT AGA TCC CGG ACA TGG TG	<i>mmpL</i> -seq5F GTA TCA GAG GGA CCG AGC AG	50

【 0 1 1 0 】

この表で用いた R D 命名法は Brosch et al. (2000) (参考文献 25) が用いた命名法に基づいており、Behr と共同研究者らによって提案されたものとは異なる (1999) (参考文献 6)。プライマー配列は、5' → 3' 方向で示す。

* フランキング反復領域および / または可動性遺伝因子により、フランキングプライマーよりもむしろ内部プライマーの第二の対を用いた領域。

【 0 1 1 1 】

参考文献

【 表 3 】

1. Boddingtonhaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H. & Bottger, E. C. (1990) *J Clin Microbiol* **28**, 1751-9. 10
2. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S. & Musser, J. M. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 9869-74.
3. Stead, W. W., Eisenach, K. D., Cave, M. D., Beggs, M. L., Templeton, G. L., Thoen, C. O. & Bates, J. H. (1995) *Am J Respir Crit Care Med* **151**, 1267-8.
4. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaiia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B. G. & et al. (1998) *Nature* **393**, 537-44. 20
5. Gordon, S. V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K. & Cole, S. T. (1999) *Mol Microbiol* **32**, 643-55.
6. Behr, M. A., Wilson, M. A., Gill, W. P., Salamon, H., Schoolnik, G. K., Rane, S. & Small, P. M. (1999) *Science* **284**, 1520-3.
7. Brosch, R., Philipp, W. J., Stavropoulos, E., Colston, M. J., Cole, S. T. & Gordon, S. V. (1999) *Infect Immun* **67**, 5768-74. 30

8. Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W. H., Hermans, P. W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B. B., Riley, L. W., Yakrus, M. A., Musser, J. M. & van Embden, J. D. (1999) *J Clin Microbiol* **37**, 2607-18.
9. Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D., & Locht, C. (2001) *J Clin Microbiol* **39**, 3563-71.
10. Van Soolingen, D., de Haas, P. E. W., Hermans, P. W. M. & van Embden, J. D. A. (1994) *Methods Enzymol* **235**, 196-205.
11. Heym, B., Honore, N., Truffot-Pernot, C., Banerjee, A., Schurra, C., Jacobs, W. R., Jr., van Embden, J. D., Grosset, J. H. & Cole, S. T. (1994) *Lancet* **344**, 293-8. 10
12. Scorpio, A., Collins, D., Whipple, D., Cave, D., Bates, J. & Zhang, Y. (1997) *J Clin Microbiol* **35**, 106-10.
13. Sreevatsan, S., Escalante, P., Pan, X., Gillies, D. A., 2nd, Siddiqui, S., Khalaf, C. N., Kreiswirth, B. N., Bifani, P., Adams, L. G., Ficht, T., Perumaalla, V. S., Cave, M. D., van Embden, J. D. & Musser, J. M. (1996) *J Clin Microbiol* **34**, 2007-10.
14. Van Embden, J. D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B. A. & Schouls, L. M. (2000) *J Bacteriol* **182**, 2393-401. 20
15. Van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P. E., Hermans, P. W., Koedam, M. A., Teppema, K. S., Brennan, P. J., Besra, G. S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L. M. & Van Embden, J. D. (1997) *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1236-45.
16. Papa, F., Laszlo, A., David, H. L. & Daffe, M. (1989) *Acta Leprol* **7** (Suppl.) 98-101.
17. Wells, A. Q., (1937) *Lancet* 1221.
18. Van Soolingen, D., Van der Zanden, A. G., de Haas, P. E., Noordhoek, G. T., Kiers, A., Foudraine, N. A., Portaels, F., Kolk, A. H., Kremer, K. & Van Embden, J. D. (1998) *J Clin Microbiol* **36**, 1840-5. 30
19. Brodin, P., *et al.* (2002) in preparation
20. Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J. C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G. & Dominguez, L. (1999) *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1263-73.
21. Van Soolingen, D., P.E.W. de Haas, J. Haagsma, T. Eger, P.W.M. Hermans, V. Ritacco, A. Alito, & J.D.A van Embden. (1994) *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2425-33. 40
22. Samper, S., Martin, C., Pinedo, A., Rivero, A., Blazquez, J., Baquero, F., van Soolingen, D. & Van Embden, J. (1997) *Aids* **11**, 1237-42.
23. Mahairas, G. G., Sabo, P. J., Hickey, M. J., Singh, D. C. & Stover, C. K. (1996) *J Bacteriol* **178**, 1274-82.

24. Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Brosch, R., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S. T. & Hewinson, R. G. (2001) *Tuberculosis* **81**, 157-63.
25. Brosch, R., S. V. Gordon, K. Eiglmeier, T. Garnier, F. Tekaiia, E. Yeramianian, & S. T. Cole. (1999) in *Molecular genetics of mycobacteria*, eds. Hatful G. F. & Jacobs, W. R. Jr. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.), pp. 19-36.
26. Radhakrishnan, I., K. M. Y., Kumar, R. A. & Mundayoor, S. (2001) *J Clin Microbiol* **39**, 1683. 10
27. Fletcher, H. A., Donoghue, H. D., Holton, J., Pap, I. & Spigelman, M. (2002) *Am. J. Phys. Anthropol.*, in press.
28. Mays, S., Taylor, G. M., Legge, A. J., Young, D. B. & Turner-Walker, G. (2001) *Am J Phys Anthropol* **114**, 298-311.
29. Nerlich, A. G., Haas, C. J., Zink, A., Szeimies, U. & Hagedorn, H. G. (1997) *Lancet* **350**, 1404.
30. Salo, W. L., Aufderheide, A. C., Buikstra, J. & Holcomb, T. A. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 2091-4. 20
31. Rothschild, B. M., Martin, L. D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G. K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M. & Brittain, D. (2001) *Clin Infect Dis* **33**, 305-11.
32. Parsons, L.M., Brosch, R., Cole, S. T., Somoskovi, A., Loder, A., Britzel, G., van Soolingen, D., Hale, Y., & Salfinger, M. (2001) in preparation

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 2 】

【図 1】存在または欠失が示されたゲノム領域を有する株から得たアンプリコン。それぞれの群におけるアンプリコンの大きさは均一である。数字は、Kremer et al. (1999, J. Clin Microbiol. 37:2607-2618) (参考文献 8) および Supply et al (2001, J. Clin. Microbiol. 39:3563-3571) (参考文献 9) で用いた株の名称に対応する。 30

【図 2】様々な地理学的地域の株から得た T b D 1 領域の配列。 * は、Sreevatsan と共同研究者によって定義された $k a t G^{c 4 6 3} / g y r A^{c 9 5}$ 配列に基づく群を表す (参考文献 2)。数字は、Kremer et al. (1999, J. Clin Microbiol. 37:2607-2618) (参考文献 8) および Supply et al (2001, J. Clin. Microbiol. 39:3563-3571) (参考文献 9) で用いた株の名称に対応する。

【図 3】選択した *M. tuberculosis* および *M. bovis* 株のスポリゴ型 (spoligo types)。数字は、Kremer et al. (1999, J. Clin Microbiol. 37:2607-2618) (参考文献 8) および Supply et al (2001, J. Clin. Microbiol. 39:3563-3571) (参考文献 9) で用いた株の名称に対応する。 40

【図 4】所定の系統 (灰色ボックス) における DNA の連続的喪失を示す結核菌の進化経路を提案した略図。この略図は、保存された欠失領域の有無および 5 個の選択した遺伝子での配列多型に基づいている。ある分岐間の距離は、他の方法で計算した実際の系統発生的差に対応しないことがある。黒塗り矢印は、群 1 に典型的な $k a t G^{c 4 6 3}$ CTG (Leu)、 $g y r A^{c 9 5}$ ACC (Thr) を特徴とする株を示す。白線を有する矢印は、 $k a t G^{c 4 6 3}$ CGG (Arg)、 $g y r A^{c 9 5}$ ACC (Thr) を特徴とする群 2 に属する株を示す。白抜きボックスを有する矢印は、Sreevatsan と強度研究者 (Sreevatsan et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci USA 151:9869-9874) (参考文献 2) によって定義された $k a t G^{c 4 6}$ 50

³ CGG (Arg)、g y r A ^{c 9 5} AGC (Ser)を特徴とする群3に属する株を示す。

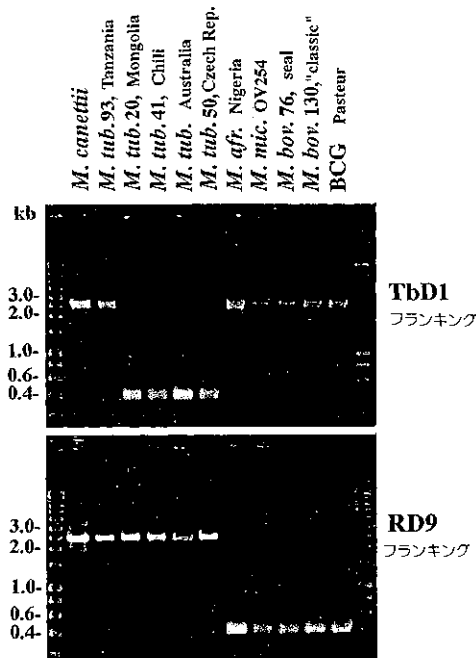
【図5】 *Mycobacterium*複合体におけるT b D 1欠失および周囲の領域の略図。 A : *M. bovis*、*M. bovis* BCG、*M. africanum*、*M. canettii*、*M. microti*、および遺伝子k a t Gのコドン4 6 3に配列C T Gを有し且つゲノムにはI S 6 1 1 0配列を全く挿入していないかまたはごく僅かしか挿入していない*M. tuberculosis*の先祖株のゲノムにおけるT b D 1および周囲の領域の略図。m m p L 6遺伝子、m m p S 6遺伝子、異なるプライマー、それらによってコードされる異なる核酸断片およびポリペプチドは、近似的にこの領域に配置されている。*M. tuberculosis*の祖先株を除く*M. tuberculosis*で特異的に欠失したT b D 1と呼ばれる2 1 5 3 p bの欠失は、その2個の末端点によって明確に設定されている。 B : *M. tuberculosis*の祖先株を除く*M. tuberculosis*のゲノムにおけるT b D 1および周囲の領域の略図。*M. tuberculosis* H37Rv株のゲノムにおけるT b D 1欠失および配列番号1の配列の位置は、図の下部に印を付けている。T b D 1の非存在から生じるキメラO R F [m m p S 6 - m m p L 6]は引き抜かれ、このキメラO R Fの配列である配列番号2 1およびコードされたポリペプチドの配列である配列番号2 2は、図の上部に近似的に配置されている。

10

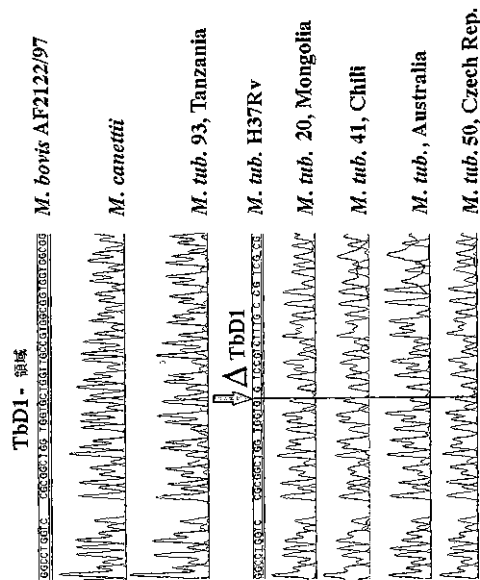
【図6】 *Mycobacterium canettii*株のゲノムにおける特異的挿入因子の配列。この挿入因子の開始は3 9 9位であり、この挿入因子の終わりは2 3 7 8位である。この挿入因子は、*Mycobacterium smegmatis*のトランスポザーゼと有意な相同性を示す推定的トランスポザーゼのコード配列(5 1 7位から2 3 0 7位までの太文字の配列)を含む。このコード配列は2個の2 0 b p逆方向反復配列(3 9 9 - 4 1 8位および2 3 5 9 - 2 3 7 8位の下線を施した配列)の枠に嵌められている。

20

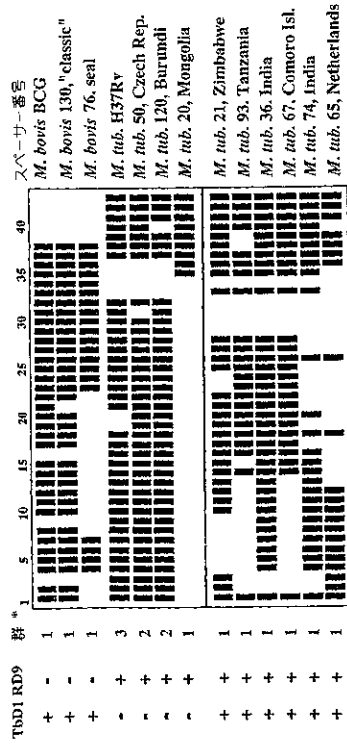
【図1】



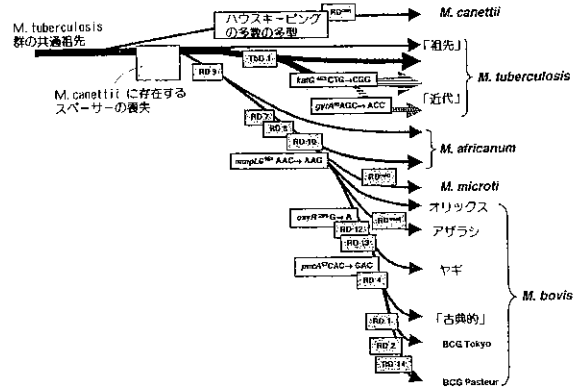
【図2】



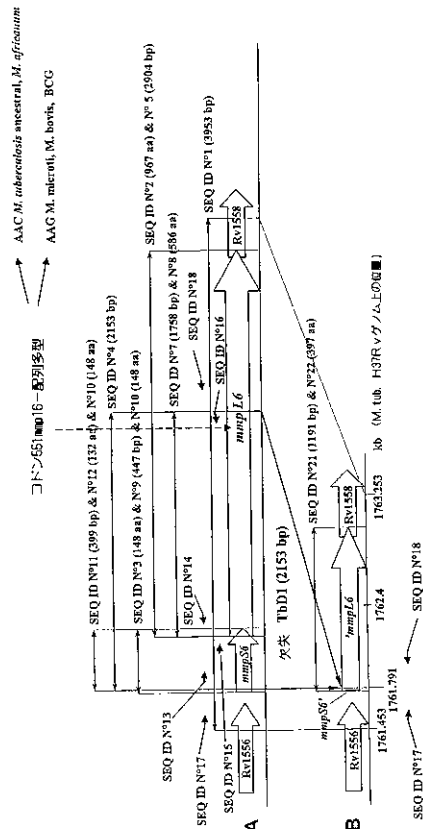
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

```

gatccggctg cggcgagct gaagctggc ggggggccc cagccccc cggcgagctc 60
gtctggcgg gcaaaagc acggcgccc acagccggc cgggtctct ggcctctgg 120
caacagacc tgcraaac cttaagact gggccggcg cgaactcgt cagctctcc 180
ggcttccgg ctgcttgg cggcgcca cacagctagc gcaaccagc ctgctggtt 240
ccatggcgt gmcctgctc ttagctctg ctgcttact cggcgctg ggcaccggg 300
gctctctgt tagcgcaca agggctgta gggcaccgt cggcgctg cgtcttact 360
cggccccc gactccgga gggcgagga cggcgctg tagcgcagat ttcctctctg 420
tagggcggg ctgactcc atctctctg tggcgagtg tttctctgt caactctct 480
caactctct cactctctt tggcaatg ctggcgctg cactctctg tagcctctt 540
atggcgctg cggcgctca taagaatct atgtactca cggcgctc caaacgggga 600
tcccggcgg cgtctctgt ggggaaag ttccgcgaa agggagagt caagcgggt 660
acctctgca acctctcc ctggcggg caaacgctg ccagactga cggcgctt 720
aaaggtctg cggcggga ctgggata gggcgact tcatctca ccagactg 780
cggcagggt atgtggcg gttggcgg accggcga agctggcat acccgctg 840
atggcctc cggcgctg gggcgacc ctgctctg cactctctg cggcgctt 900
atggcgctg gatgcaat gggctctg cggcgctc gggcgact gggcgact 960
acgtgggtg cgtctctg tctctctg gggcgact ccagactg tagcctctg 1020
gctggcgtg tggcgaca agcggctc gaaacgct tggcgagtg gactctctg 1080
aaagcctc cgtctctc tggctctc tggcgctg tggcgact cactctctg 1140
ctggcgctg tggcgact cggcgact gggcgact gggcgact cactctctg 1200
ctgtctgt caccaggg agcggctg gcaactggg tttctctg caaacctct 1260
ggcgcaaa ctctgaaag caaatgac agctcaaaa cggctctg gttgaccc 1320
atggcctg tggcgact gggctctc cctctctg gactctctg agctctctg 1380
cggcgact tggctctg cggcgact cggcgact agataagt cctctctg 1440
cggcgact tggctctg gggcgact gggcgact gggcgact cactctctg 1500
gactctctg tggcgact gggctctc caaacctg cctctctg agcggctg 1560
cggcgact cggcgact gggctctc gaaagctg gggcgact cggcgact 1620
ggcgcaaa agctcaat gggcgact tttctctg actctctg agcggctg 1680
agctcaaa gaaacgaa agctctg cggcgact cctctctg cactctctg 1740
ctctcaaa gctctctg caaacctg gggcgact agctctg cactctctg 1800
gactctctg agcggctg cctctctg accctcaaa cggcgact cctctctg 1860
atggcctg agctctctg cggcgact gggcgact gggcgact gctctctg 1920
tactctctg gggcgact cggcgact gggcgact gggcgact gctctctg 1980
cggcgact cggcgact cggcgact gggcgact gggcgact cactctctg 2040
ctctcaaa cggcgact agcggctg gggcgact gggcgact agcggctg 2100
ctctcaaa cggcgact agcggctg gggcgact gggcgact agcggctg 2160
ctctcaaa cggcgact agcggctg gggcgact gggcgact agcggctg 2220
gttctcaaa cggcgact gggcgact gggcgact gggcgact agcggctg 2280
cacaaccc gggcgact gggcgact gggcgact gggcgact gggcgact 2340
cacaaccc gggcgact gggcgact gggcgact gggcgact gggcgact 2390

```

Figure 6

【配列表】

2005518203000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB 03/00986
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 C12R1/32 C07K16/12 C07K14/35 A61K39/04 G01N33/569 C12N5/10 C12N15/70		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, EMBL, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	COLE S T ET AL: "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 393, 11 June 1998 (1998-06-11), pages 537-544, XP002087941 ISSN: 0028-0836 figure 1 table 1	1-5,9, 15-19, 21,29, 30,42, 51-53
X	& DATABASE GENBANK Online! NCBI; 7 September 2001 (2001-09-07) COLE S.T. ET AL.: "Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome." retrieved from HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV Database accession no. NC_000962 the whole document	1-5,9, 15-19, 21,29, 30,42, 51-53
--- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 October 2003		16/10/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ulbrecht, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB 03/00986

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE GENBANK 'Online! NCBI; 3 August 2001 (2001-08-03) COLE S.T. ET AL.: "Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 69/162" retrieved from HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV Database accession no. Z74020 XP002206252 the whole document</p>	<p>1-5,9, 15-19, 21,29, 30,42, 51-53</p>
A	<p>WO 00 55362 A (BILLAULT ALAIN ;COLE STEWART (FR); GARNIER THIERRY (FR); GORDON ST) 21 September 2000 (2000-09-21) page 5, line 9 -page 17, line 21 page 22, line 15 -page 32, line 3 figure 1D tables 1-3 claims 3,6,14</p>	<p>46-52, 55,58,59</p>
A	<p>US 6 291 190 B1 (BEHR MARCEL ET AL) 18 September 2001 (2001-09-18) column 11, line 66 -column 18, line 58 table 1</p>	<p>46-52, 55,58,59</p>
A	<p>MAHAIRAS G G ET AL: "MOLECULAR ANALYSIS OF GENETIC DIFFERENCES BETWEEN MYCOBACTERIUM BOVIS BCG AND VIRULENT M. BOVIS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 178, no. 5, 1 March 1996 (1996-03-01), pages 1274-1282, XP000647583 ISSN: 0021-9193 cited in the application figure 2</p>	<p>46-52, 55,58,59</p>
A	<p>GORDON S V ET AL: "IDENTIFICATION OF VARIABLE REGIONS IN THE GENOMES OF TUBERCLE BACILI USING BACTERIAL ARTIFICIAL CHROMOSOME ARRAYS" MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 32, no. 3, May 1999 (1999-05), pages 643-655, XP000933429 ISSN: 0950-382X cited in the application tables 1-3</p>	<p>46-52, 55,58,59</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal	Application No
PCT/IB	03/00986

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE TAXONOMY BROWSER 'Online! NCBI; Host: http://www.ncbi.nih.gov, "Mycobacterium tuberculosis complex" XP002206354 Link: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browse r/wwwtax.cgi?id=77643 Retrieved on: 16.07.2001 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	45-47, 51,55
A	<p>SREEVATSAN SRINAND ET AL: "Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 94, no. 18, 1997, pages 9869-9874, XP002206250 1997 ISSN: 0027-8424 page 9870, left-hand column table 1 figure 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	46-51,55
T	<p>BROSCH R ET AL: "A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 6, 19 March 2002 (2002-03-19), pages 3684-3689, XP002206251 http://www.pnas.org March 19, 2002 ISSN: 0027-8424 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-56,58, 59
T	<p>-& DATABASE GENBANK 'Online! NCBI; 16 March 2002 (2002-03-16) BROSCH R ET AL.: "Mycobacterium tuberculosis mmpS6 gene and mmpL6 gene" retrieved from HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV, accession no. AJ426486 XP002251350 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-56,58, 59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/IB 03/00986
--

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 6, 27-29, 51, 52, 58-59 (partially)
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB 03 00986

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 6,27-29,51,52,58-59 (partially)

Present claims 6, 27-29, 51, 52, 58 and 59 relate to products defined by reference to a desirable characteristic or property, namely

- a fragment specifically deleted in certain *M. tuberculosis* strains (claim 6),
- primers defined by reference to claim 25 which relates to a method wherein primers able of amplifying a genomic region harbouring the TbD1 deletion are used (claims 27-29)
- primers specific for various genetic markers (claim 51(b) and claim 52 (b) and (c))
- polynucleotide sequences capable to hybridise with the genetic the RD1, RD4, RD9 and TbD1 genetic markers (claim 58)
- a polypeptide encoded by each of the RD1, RD4, RD9 and TbD1 genetic markers capable to react with an antibody/immune serum raised against the same immunogenic molecules or fragments thereof (claim 59).

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Art. 6 PCT and is reproducible within the meaning of Art. 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Art. 6 PCT). An attempt is made to define the products by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to

- a nucleic acid as defined by SEQ ID Nos. 4 and 13-16 or their complementary sequences, which nucleic acid is deleted in certain *M. tuberculosis* strains, but present in other *Mycobacteria* of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (claim 6)
 - the sequences defined in claim 26 (claims 27-29)
 - the primer pairs specific for RD4 and RD9 as given by Table 1 (claim 52)
 - the oligonucleotide probes/primers specific for RD1, RD4 or RD9 as represented in Table 1, or specific for TbD1 as defined by claim 7 (claim 58)
 - the polypeptides as defined by claim 16 (claim 59).
- As the polypeptides encoded by RD1, RD4 and RD9 referred to in claim 59 are not defined, they were not searched at all.

Additionally, claim 51 relates to an extremely large number of possible products. In fact, claim 51 contains so many options, variables and possible permutations that a lack of clarity and conciseness within the meaning of Art. 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claim impossible. Said claim relates to any combination of

International Application No. PCT/IB 03 00986

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

primers defined in claims 1-14, 17 and 18 with at least one primer pair specific for 24 different genetic markers. Moreover, the primers are defined in terms of the result to be achieved, namely by their specificity for the said 24 different genetic markers (*supra*) (Art. 6 PCT).

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear and concise, namely a kit as defined by claim 52, wherein the primer pairs specific for RD4 and RD5 are those given in Table 3.

The nucleic acid referred to in claim 57 is defined by reference to claim 53 which, however, does not relate to any nucleic acids. Claim 57 was thus interpreted as referring to claim 56 (Art. 6 PCT).

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal	pplication No
PCT/IB 03/00986	

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0055362	A	21-09-2000	FR 2791067 A1	22-09-2000
			AU 3298900 A	04-10-2000
			CA 2368088 A1	21-09-2000
			EP 1161562 A1	12-12-2001
			WO 0055362 A1	21-09-2000
US 6291190	B1	18-09-2001	AU 5394699 A	14-03-2000
			EP 1108060 A1	20-06-2001
			WO 0011214 A1	02-03-2000
			US 2002176873 A1	28-11-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/35	C 0 7 K 16/12	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/04	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	F
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, PT, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, M X, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74) 代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74) 代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(74) 代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72) 発明者 スチュワート、コール

フランス国パリ、セデックス、15、リュ、デュ、ドクトゥール、ルー、25-28、ケアオブ、アンスティテュ、パストゥール アンテ、デ、ジュネティーク、モレキュレ、バクテリン

(72) 発明者 ローランド、プロッシュ

フランス国パリ、セデックス、15、リュ、デュ、ドクトゥール、ルー、25-28、ケアオブ、アンスティテュ、パストゥール アイピー、パリス、アンテ、デ、ジュネティーク、モレキュレ、バクテリン

(72) 発明者 ステファン、ゴードン

イギリス国サリー、アデルストーン、ニュー、ホー、ウッダム、レーン、ベテリナリー、ラボラトリーズ、エイジェンシー、グリーン、ヒューインソン

(72) 発明者 カリン、アイグルマイヤー

フランス国パリ、セデックス、15、リュ、デュ、ドクトゥール、ルー、25-28、ケアオブ、アンスティテュ、パストゥール、アンテ、デ、ジュネティーク、モレキュレ、バクテリン

(72) 発明者 ティエリー、ガルニエ

フランス国パリ、セデックス、15、リュ、デュ、ドクトゥール、ルー、25-28、ケアオブ、アンスティテュ、パストゥール アンテ、デ、ジュネティーク、モレキュレ、バクテリン

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA04 CA09 CA12 CA20 DA01 DA02

DA05 DA06 DA11 GA11 HA11 HA13 HA14

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ06 QQ43 QQ53 QQ79 QR08 QR32

	QR35	QR39	QR42	QR56	QR62	QS16	QS25	QS34	QS36	QX01
	QX02									
4B064	AG27	CA10	CA20	CC01	CC24	DA01	DA13			
4B065	AA01X	AA26X	AA36Y	AA58X	AA72X	AA87X	AB01	AC14	BA02	CA24
	CA43	CA45	CA46							
4C084	AA01	AA02	BA44	NA14	ZB35					
4C085	AA03	AA38	BA09	BB07	CC07	FF21				
4H045	AA10	AA11	AA20	AA30	BA10	BA41	CA11	CA40	DA75	DA76
	EA20	EA52	FA71	FA72	FA74					

专利名称(译)	M.TUBERCULOSIS的缺失序列，使用这些序列检测分枝杆菌的方法和疫苗		
公开(公告)号	JP2005518203A	公开(公告)日	2005-06-23
申请号	JP2003569872	申请日	2003-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 兽医实验室AGENCY		
申请(专利权)人(译)	法国巴斯德研究所 兽医，实验室，代理		
[标]发明人	スチュワートコール ローランドプロッシュ ステファンゴードン カリンアイグルマイヤー ティエリーガルニエ		
发明人	スチュワート、コール ローランド、プロッシュ ステファン、ゴードン カリン、アイグルマイヤー ティエリー、ガルニエ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/04 A61K39/39 A61P31/06 C07K14/35 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/70 C12P21/08 C12Q1/04 C12Q1/68 C12R1/32 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61P31/06 C07K14/35 C12Q1/689 C12Q2600/156 G01N33/5695		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/04 A61K39/39 A61P31/06 C07K14/35 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/04 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/569.F C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ06 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA36Y 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/NA14 4C084/ZB35 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BA09 4C085/BB07 4C085/CC07 4C085/FF21 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA52 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	2002290458 2002-02-25 EP		
其他公开文献	JP4738740B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明是核苷酸序列的鉴定，该核苷酸序列特别使得有可能区分由结核分枝杆菌引起的感染与由非洲分枝杆菌，卡尼蒂分枝杆菌，微量分枝杆菌，牛分枝杆菌，牛分枝杆菌BCG引起的感染。本发明的主题还是通过这些序列的表达产物检测所讨论序列的方法以及用于实施这些方法的试剂盒。最后，本发明的主题是新型疫苗。

マイコバクテリア株	マーカー		
	RD4	RD9	TbD1
<i>M. bovis</i> BCG	-	-	+
<i>M. bovis</i>	-	-	+
<i>M. africanum</i>	+	-	+
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-
<i>M. tuberculosis ancestral</i>	+	+	+
<i>M. canettii</i>	+	+	+