

(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2005-506512

(P2005-506512A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569	GO 1 N 33/569 Z N A F	2 G O 4 5
A 6 1 K 39/04	A 6 1 K 39/04	4 B O 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 31/06	A 6 1 P 31/06	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-554720 (P2002-554720)	(71) 出願人	503245650 アメリカ合衆国
(86) (22) 出願日	平成14年1月7日 (2002.1.7)		アメリカ合衆国 ジョージア州 アトラン タ ビュフォード ハイウェー (ケー7 9) 4770 テクノロジー トランス ファー オフィス
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月8日 (2003.7.8)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/000309	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(87) 国際公開番号	W02002/054073	(72) 発明者	クイン フレデリック デイ. アメリカ合州国 ジョージア州 エイボン デール エステイツ ウィルトシャー ド ライブ 3243
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)		
(31) 優先権主張番号	60/260, 348		
(32) 優先日	平成13年1月8日 (2001.1.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/311, 235		
(32) 優先日	平成13年8月9日 (2001.8.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 潜伏性ヒト結核モデル、診断用抗原、および使用法

(57) 【要約】

本明細書においては、< i > インピトロの < / i > 肉芽腫モデルおよびその使用法が提供される。被験者における潜伏性結核を検出および/または診断する方法、ならびに、 - クリスタリンのような潜伏期特異的な抗原 (およびそれに対する抗体)、および、そのような分子を同定および使用する方法もまた提供される。例えば、潜伏性結核感染に対する免疫応答のような、被験者における免疫応答を引き出す際において使用するための免疫刺激組成物も提供される。提供される方法を実行するためのキットについても説明される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下の段階を含む、被験者における潜伏性結核を検出するための免疫学的アッセイ法：  
被験者に由来する第一の潜伏期特異的結合パートナー（LSBP）を含み得る生物学的サンプルを、対応するLSBPと接触させる段階、および  
第一のLSBPと対応するLSBPとの間の結合を検出する段階であり、そのような結合が、被験者における潜伏性結核を示唆するものであるような段階。

## 【請求項2】

第一のLSBPが抗体であり、対応するLSBPが潜伏期特異的ヒト結核菌抗原である、請求項1記載の方法。

## 【請求項3】

抗原が -クリスタリン（Acr）またはその免疫原性断片である、請求項2記載の方法。

## 【請求項4】

第一のLSBPが潜伏期特異的ヒト結核菌抗原であり、対応するLSBPが抗体である、請求項1記載の方法。

## 【請求項5】

抗原がAcrまたはその免疫原性断片である、請求項4記載の方法。

## 【請求項6】

少なくとも1つのLSBP、および、請求項1記載の方法を実行するための使用説明書を含む、被験者における潜伏性結核を検出するためのキット。

## 【請求項7】

免疫刺激量のヒト結核菌潜伏期特異的抗原もしくはその免疫原性断片、またはそのような抗原もしくは免疫原性断片をコードする核酸分子を、被験者に導入する段階を含む、被験者における免疫応答を引き出す方法。

## 【請求項8】

被験者における潜伏性結核感染を抑制する方法である、請求項7記載の方法。

## 【請求項9】

被験者における潜伏性結核感染を治療する方法である、請求項7記載の方法。

## 【請求項10】

抗原がAcrである、請求項7記載の方法。

## 【請求項11】

引き出された免疫応答が、ヒト結核菌による潜伏感染に対する被験者の感受性の低下をもたらす、請求項7記載の方法。

## 【請求項12】

免疫刺激量のヒト結核菌潜伏期特異的抗原もしくはその免疫原性断片、または、そのような抗原もしくは免疫原性断片をコードする核酸分子、および、請求項7記載の方法を実行するための使用説明書を含む、被験者における免疫応答を引き出すためのキット。

## 【請求項13】

潜伏性結核感染を有する可能性のある患者に、キットの成分を投与するための使用説明書をさらに含む、請求項12記載のキット。

## 【請求項14】

末梢血単核細胞、自己マクロファージ、およびミコバクテリアを含む、インビトロの肉芽腫。

## 【請求項15】

末梢血単核細胞が、単球、Bリンパ球、Tリンパ球、およびその組み合わせからなる群より選択されるヒトの末梢血単核細胞である、請求項14記載のインビトロの肉芽腫。

## 【請求項16】

ミコバクテリアがヒト結核菌である、請求項14記載のインビトロの肉芽腫。

## 【請求項17】

線維芽細胞をさらに含む、請求項14記載のインビトロの肉芽腫。

10

20

30

40

50

## 【請求項18】

低付着性容器において末梢血単核細胞、自己マクロファージ、およびミコバクテリアを組み合わせる段階、ならびに、その組み合わせを十分な長さの期間インキュベートし、インビトロの肉芽腫を形成させる段階を含む、インビトロの肉芽腫を製造するための方法。

## 【請求項19】

組み合わせに線維芽細胞を加える、請求項18記載の方法。

## 【請求項20】

インビトロの肉芽腫の製造を増強するために十分な量の外因性サイトカインを容器に加える段階をさらに含む、請求項18記載の方法。

## 【請求項21】

外因性サイトカインが、IL-2、IFN-、TNF-、またはその2つもしくはそれ以上の組み合わせである、請求項20記載の方法。

## 【請求項22】

末梢血単核細胞、自己マクロファージ、およびミコバクテリアを含むインビトロの肉芽腫と薬剤を組み合わせる段階、ならびに、その薬剤がミコバクテリアの生存能を阻害するかどうかを決定する段階を含む、抗結核治療活性について結核薬候補をスクリーニングする方法。

## 【請求項23】

末梢血単核細胞が、単球、Bリンパ球、Tリンパ球、およびその組み合わせからなる群より選択されるヒトの末梢血単核細胞である、請求項18または請求項22記載の方法。

## 【請求項24】

末梢血単核細胞、自己マクロファージ、および不活性化ミコバクテリアを含むインビトロの肉芽腫と薬剤を組み合わせる段階、ならびに、その薬剤が肉芽腫に含まれるミコバクテリアの再活性化を阻害するかどうかを決定する段階を含む、抗結核治療活性について結核薬候補をスクリーニングする方法。

## 【請求項25】

ミコバクテリアがヒト結核菌である、請求項18、請求項22、または請求項24記載の方法。

## 【請求項26】

末梢血単核細胞、自己マクロファージ、および突然変異ミコバクテリアを含むインビトロの肉芽腫において、野生型ミコバクテリアと比較した場合、突然変異ミコバクテリアが、潜伏期を誘導する、生き残る、再活性化する、または肉芽腫壊死を誘導する能力を低下させられているかどうかを決定する段階を含む、結核ワクチン候補をスクリーニングする方法。

## 【請求項27】

インビトロの肉芽腫が線維芽細胞をさらに含む、請求項22、請求項24、または請求項26記載の方法。

## 【請求項28】

突然変異ミコバクテリアが、潜伏期遺伝子における突然変異を有するミコバクテリア菌株を含む、請求項26記載の方法。

## 【請求項29】

突然変異ミコバクテリアが、acr、因子遺伝子、oxyRおよびaphCからなる群より選択される遺伝子における突然変異を有するヒト結核菌株である、請求項26記載の方法。

## 【請求項30】

因子遺伝子が、sigF、sigC、およびsigHからなる群より選択される、請求項29記載の方法。

## 【請求項31】

培養基、および、請求項18、22、24、または26のいずれか一項記載の方法を実行するための使用説明書を含む、インビトロの肉芽腫を製造するためのキット。

## 【請求項32】

低付着性容器をさらに含む、請求項31記載のキット。

10

20

30

40

50

## 【請求項33】

ある量のサイトカインをさらに含む、請求項31記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の参照

本出願は、2001年1月8日に出願された、米国特許仮出願第60/260,348号、および、2001年8月9日に出願された、米国特許仮出願第60/311,235号の利権を主張する。

## 【0002】

政府の支援についての声明

本発明は、米国政府機関である、連邦防疫センター（Centers for Disease Control and Prevention）によって行われた。したがって、米国政府は、本発明において、一定の権利を有する。

## 【0003】

開示の技術分野

本開示は、ミコバクテリアの潜伏期についての技術分野に関連し、特に、ミコバクテリアの研究のための、ならびに、結核薬およびワクチン候補の開発のための、インビトロの肉芽腫モデルに関連する、ならびに、免疫学的検定法を用いた潜伏性ミコバクテリア感染の検出に関連する。

## 【背景技術】

## 【0004】

背景

世界中のどこかで、およそ10秒毎に人は結核によって死亡している。結核は、感染症の中では、世界で死亡例が最も多いものであり、生殖年齢にある女性では最上位の死因となっている。開発途上国が最も多く疾患を保有しているにも関わらず、米国国民は非常に高い頻度で結核に罹患しており、2000年には16,377例が報告されている。

## 【0005】

結核のほとんど全ての症例を引き起こす感染性作用物質は、ヒト結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*（*M. tuberculosis*））である。ヒト結核菌は、空気を介して個体間で容易に伝播する。感染個体による1回の咳によって、3000個もの多くの感染飛沫核が生じ得る上、10個未満の細菌によって、感受性の個体における肺感染が始まる可能性がある。空気で運ばれる病原体を単に吸入するだけで個体が感染される可能性があるため、結核の発生を抑えることは困難であり、陰圧室に感染個体を隔離することが必要とされる。

## 【0006】

1950年代における抗生物質の開発の後、結核は遂には駆逐されると信じられていたにも関わらず、1999年、世界保健機構（World Health Organization）は、健康に関する世界的な緊急事態として、結核を分類付けた。結核が保存された主な原因の1つは、多剤耐性菌株の進化である。多剤耐性菌株は、少なくとも6ヶ月間続く薬剤療法についての感染患者の低いコンプライアンスによって、ある程度進化している。ある多剤耐性菌株、菌株Wは、全ての第一線薬剤（イソニアジド、リファンピン、エタンブトール、およびピラジジン（pyrazidine））、ならびに1つの第二線薬剤（カナマイシン）に対する耐性を進化させた。したがって、結核が、世界的に、個体にとって重大な健康脅威となり続けることは明らかである。

## 【0007】

感染は典型的に、宿主の免疫機構によって調節されるため、ヒト結核菌への一次感染は、ほんのまれにしか直接の疾患を導かない。ヒト結核菌に感染したヒトの中では、およそ5%が感染後数年以内に疾患の症状発現をする。一次感染の際に、ミコバクテリアは、不活性化マクロファージに侵襲し、そこで増殖する。急激な増殖期に続き、感染マクロファージおよびその中の細菌は、新たに補充された活性化マクロファージによって囲まれ、封じ込められる。この、感染マクロファージの封じ込めによって、特徴的な肉芽腫が生じる。

10

20

30

40

50

肉芽腫は、マクロファージのコアの周りに凝集する、Tリンパ球によって囲まれた、および後には線維芽細胞およびコラーゲンによって囲まれる、類上皮細胞および多核巨細胞を含む、活性化マクロファージの密集した組織化集塊である。

【0008】

ミコバクテリアの休眠によって、潜伏性結核と呼ばれる病期がもたらされる。潜伏性結核を有する個体は、再活性化結核の症例を後に進行させる可能性があり、実際、米国において報告された結核症例の多数は、ミコバクテリア感染の再活性化の結果生じたものであり、一次感染からのものではない (Am. Rev. Respir. Dis. 146:1623~1633, 1992)。ヒト結核菌の再活性化は、通常、多数の結核菌によって肺の小気管支の壊死が引き起こされる、肺尖において起こる。結核に特徴的な血痰は、この壊死過程の間の、小血管のびらんによって生じる。

10

【0009】

世界の人口のおよそ3分の1が、ヒト結核菌によって潜伏感染されていると見積もられた (Sudreら、Bull. W.H.O. 70:149~159, 1992)。現在のところ、ツベルクリン皮膚試験が、ヒト結核菌感染者について唯一利用可能な診断法である。あいにく、現在利用可能な試験では、潜伏感染した個体を特異的に同定することはできない。ツベルクリン試験では、病原体に曝露された、または病原体に対してワクチン接種をされた、全ての個体の同定のみが可能である。潜伏感染した個体の数が多いことにより、および、それらの個体において結核が再活性化するリスクが存在することにより、潜伏性結核を標的とする診断薬および治療薬の開発が必要とされている。さらに、ミコバクテリアの研究のための、および、結核薬およびワクチン候補の開発のための、インビトロの肉芽腫モデルの開発が望まれている。

20

【発明の開示】

【0010】

開示の概要

結核潜伏期についてのインビトロのモデルが、本開示のある態様において説明される。特に、インビトロの肉芽腫モデルおよびそのモデルを使用するための方法が提供される。ある態様においては、インビトロの肉芽腫モデルは、ヒトの末梢血単核細胞、自己マクロファージおよびミコバクテリアを含む。ある態様においては、これらの成分は、低付着性容器において組み合わせられる。特定の例においては、インビトロの肉芽腫モデルは、例えばヒトの肺線維芽細胞のような線維芽細胞をさらに含む。

30

【0011】

さらなる態様は、例えば、候補結核薬をスクリーニングするためのよう、肉芽腫に対するそれらの影響について、新しいまたは既知の化合物をスクリーニングするために、また候補結核ワクチンを同定するために、ならびに肉芽腫形成および肉芽腫壊死の過程を解析し特徴付けるために、インビトロの肉芽腫モデルを使用するための方法である。

【0012】

本明細書においては、潜伏性結核感染を検出するための免疫学的方法も提供される。そのような方法は、潜伏感染期にある結核を有する被験者においてのみ (または主に) 存在する、特異的な細菌抗原 (またはこれらの抗原に対する抗体) を検出する段階に基づく。例として、そのようなある潜伏期特異的抗原は、 $\alpha$ -クリスタリン (Acr) である。

40

【0013】

さらなる態様は、(潜伏期特異的な抗原またはそれに対する抗体のような) 第一の潜伏期特異的結合パートナー (LSBP) を含むと思われる、被験者に由来する生物学的サンプルを、第二の (対応する) LSBP に接触させる段階、および、第一のLSBPと対応するLSBPとの間の結合を検出する段階に参与するような、被験者における潜伏性結核を検出するための免疫学的アッセイを含む。第一のLSBPと第二のLSBPとの間の結合は、被験者における潜伏性結核を示唆するものである。したがって、第一のLSBPがヒト結核菌潜伏期特異的抗原 (例えばAcrまたはその免疫原性断片) であるような、ある例においては、対応するLSBPは、その抗原に結合できる抗体であり得る。第一のLSBPが抗体である場合は、(特異的結合ペ

50

アーを形成する) 対応するLSBPは抗原である。

【0014】

被験者における潜伏性結核を検出するためのキットであり、少なくとも1つのLSBP(例えば、潜伏期特異的抗原またはそれに対する抗体)、および、生物学的サンプル中において認められるコグネート(cognate)LSBPに対するLSBPの結合を検出するための、免疫学的アッセイを実行するための使用説明書を含むキットも提供される。

【0015】

例えば、細胞培養基、ならびに、選択的に、低付着性容器、および/または、インビトロの肉芽腫を増殖させるための使用説明書のような、インビトロの肉芽腫モデルの1つまたはそれ以上の構成要素を含むキットも提供される。

10

【0016】

さらなる態様は、免疫刺激量のヒト結核菌潜伏期特異的抗原(例えばAcr)、またはその免疫原性断片を被験者に投与することによって、被験者において免疫応答を引き出すための方法を提供する。そのような免疫刺激分子を含む組成物、およびそれらを投与するためのキットも提供される。

【0017】

前述の特徴および利益、ならびに他の特徴および利益は、付随する図面および配列表を参照して行われる、幾つかの態様についての以下の詳細な説明から、より明らかとなる。

【0018】

配列表

20

付随の配列表において挙げられる核酸配列およびアミノ酸配列は、37 C.F.R. 1.822において定義されるように、ヌクレオチド塩基については標準の文字略語、および、アミノ酸については3文字コードを用いて示される。各核酸配列の一方の鎖のみが示されるが、その相補鎖は、示された鎖についてのいかなる言及によっても包含されるものと理解される。付随の配列表においては：

配列番号：1および配列番号：2は、N末端FLAG-Acr融合物を作製するために使用されるプライマーの配列である。

配列番号：3および配列番号：4は、C末端Acr-FLAG融合物を作製するために使用されるプライマーの配列である。

【0019】

30

詳細な説明

I. 略語

Acr アルファ( )クリスタリン

ELISA 酵素結合イムノソルベントアッセイ

HS ヒト血清

LSA 潜伏期特異的抗原

LSBP 潜伏期特異的結合パートナー

PBMC 末梢血単核細胞

RPA リボヌクレアーゼ保護アッセイ

RT-PCR 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

40

II. 用語

特記しない限り、技術的用語は、従来の語法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Benjamin Lewin, 「遺伝子V(Genes V)」, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrewら(編), 「分子生物学辞典(The Encyclopedia of Molecular Biology)」, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびRobert A. Meyers(編), 「分子生物学およびバイオテクノロジー: 包括的な参考書(Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference)」, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)において見出すことができよう。

【0020】

本開示の様々な態様の概観を容易にするために、特定の用語について以下の説明が提供さ

50

れる：

【0021】

本明細書において使用されるような「a」、「an」、および「the」という用語は、文脈が不適切でない限り、1つまたはそれ以上を意味し、複数形を含むと定義される。

【0022】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子断片によって実質的にコードされるポリペプチドの1つまたはそれ以上を含むタンパク質（またはタンパク質複合体）を指す。認められる免疫グロブリン遺伝子は、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、および  $\mu$  定常領域遺伝子、および、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、 $V_L$  または  $C_L$  のいずれかとして分類される。重鎖は、 $V_H$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、または  $C_H$  として分類され、次に免疫グロブリンクラス、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEが各々定義される。

10

【0023】

基本的な免疫グロブリン（抗体）の構造単位は一般に四量体である。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖の組から構成され、各組は1つの「軽い」（約25 kD）鎖および1つの「重い」（約50~70 kD）鎖を有する。各鎖のN末端により、抗原認識の主な原因となる、約100~110個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域が定義付けられる。「可変軽鎖」（ $V_L$ ）および「可変重鎖」（ $V_H$ ）という用語は、各々、これらの軽鎖および重鎖を指す。

【0024】

本明細書において使用されるように、抗体という用語は、完全な免疫グロブリン、および、様々なペプチダーゼを用いた分解によって作製された、十分に特徴付けられた多くの断片、または遺伝子操作された「人工の」抗体を含む。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ部におけるジスルフィド結合の下で抗体を分解し、それ自体はジスルフィド結合によって  $V_H - C_H1$  に連結された軽鎖であるFabの二量体である  $F(ab)'_2$  を作製する。 $F(ab)'_2$  は、ヒンジ部におけるジスルフィド結合を断ち、それにより  $F(ab)'_2$  二量体をFab'単量体に変換させるために、穏やかな条件下において還元させることができる。Fab'単量体は本質的に、ヒンジ部の部分を有するFabである（「基礎免疫学(Fundamental Immunology)」, W.E. Paul編, Raven Press, N.Y., 1993を参照のこと）。完全な抗体の分解の観点から、様々な抗体断片が定義付けられている一方、化学的にか、または、組換えDNA方法論を利用するかによって、新たにFab'断片を合成することができることは理解されよう。したがって、本明細書において使用されるような抗体という用語は、抗体全体の修飾によって作製された、または、組換えDNA方法論を使用して新たに合成された、抗体断片をも含む。

20

30

【0025】

本開示の方法および装置における使用のための抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であることが可能である。単なる例として、モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein (Nature 256:495~497, 1975) の古典的な方法、または、その派生法に従って、マウスのハイブリドーマから調製することができる。モノクローナル抗体の生産についての詳細な手法は、HarlowおよびLane（「抗体、実験マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)」, CSHL, New York, 1988）において説明されている。

【0026】

「抗原」という用語は、哺乳動物における免疫応答を誘導できる分子、またはその断片を指す。本用語は、免疫原および抗原性の原因となる領域、または抗原決定基を含む。抗体の形成を誘導することができる、化学的または生化学的な構造、決定基、抗原またはその部分は、「抗原性」と呼ばれることが可能である。「抗原決定基」は、抗体によって認識される特定化されたタンパク質の領域を指す。

40

【0027】

マクロファージを指す場合、「自己」という用語は、末梢血単核細胞と同じ個体に由来するマクロファージを指す。または、限定はしないが、THP-1マクロファージ細胞系列のようなマクロファージ細胞系列が、肉芽腫モデルのマクロファージ成分として使用される。本開示のある態様においては、自己マクロファージの開始濃度は、サンプル2 ml当たりお

50

よそ $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ の間であり、選択的に、およそ $1 \times 10^6$ である。

【0028】

「生物学的サンプル」は、実験的な試験または検査のために使用される、体液または組織のサンプルである。本明細書において使用されるように、生物学的サンプルは、被験者における微生物感染の検出のために有用な全ての臨床サンプルを含む。

【0029】

組織サンプルは、口腔咽頭道から、例えば肺または気管支組織から採取することができる。サンプルは、適切なように、(気管支鏡検査法の間におけるような)バイオプシーによって、または剖検検査の間に取り出すことができる。生物学的液体には、血液、誘導体、および、血清のような血液の分画、尿、精液および痰のような口腔咽頭道の液体が含まれる。

10

【0030】

潜伏性ヒト結核菌の検出のために、本開示について使用するための検体の例は、従来の臨床サンプル、例えば、血液または血液の分画(例えば血清)、尿、気管支肺胞の洗浄液(BAL)、痰、および誘導喀痰サンプルを含む。そのようなサンプルを得るための技術は、当技術分野においてはよく知られている。血液および血液の分画は、従来の方法において調製することができる。口腔咽頭道の液体は、喀痰誘導、気管支肺胞の洗浄(BAL)、および口腔洗浄を含む、従来の技術を通して得ることができる。口腔洗浄からサンプルを得る段階は、被験者に、ある量の通常の食塩水を用いて約10~30秒間うがいさせ、その後、洗浄液をサンプルカップに吐き出させる段階に参与する。

20

【0031】

DNA鎖が合成される「条件」または「(複数の)条件」には、様々な量のヌクレオチド、カチオン、および、適切な緩衝物質の存在、ならびに、核酸分子とDNAプライマーがアニールし、オリゴヌクレオチドが合成DNA鎖に取り込まれるような温度が含まれる。

【0032】

本明細書において使用されるように、「検出する」または「検出」という用語は、調査中の生体分子の存在を、定量的または定性的に決定することを指す。

【0033】

「エピトープタグ」は、特異的な抗体をそれに対して生じさせることができる、短い一連のアミノ酸であり、ある態様においては、そのエピトープによってタグ標識されたタンパク質を特異的に同定および追跡させるような、短い一連のアミノ酸である。タグ標識された分子の検出は、多くの異なる技術を用いて達成することができる。そのような技術の例は、以下を含む：免疫組織化学、免疫沈降、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡検査法、ELISA、免疫プロット法(「ウエスタン」)、およびアフィニティークロマトグラフィー。エピトープタグの例は、FLAG、T7、HA(赤血球凝集素)およびmycを含む。

30

【0034】

本明細書において使用されるように、「肉芽腫」という用語は、Tリンパ球、線維芽細胞およびコラーゲンに囲まれた、類上皮細胞および多核巨細胞を含む、活性化マクロファージの、密集した組織化集塊を指す。しかし、「インビトロの肉芽腫」という用語が、上記に説明されるような細胞の集塊に限定されないことは理解される。「インビトロの肉芽腫」という用語は、上記に説明されるような肉芽腫を模倣するような、少なくともヒトの末梢血単核細胞および自己マクロファージを含む細胞の集塊または凝集塊を指す。インビトロの肉芽腫が、上記に説明されるような、およびインビボにおいて認められるような肉芽腫を模倣するかどうかは、細胞凝集塊の顕微鏡使用試験、例えばFACS(蛍光細胞分析分離装置)解析を介した凝集塊中の細胞の表現型解析、および、凝集塊中の細胞によるサイトカイン産生の解析のような、当業者には既知の方法によって決定される。

40

【0035】

本明細書において使用されるように、「ヒト末梢血単核細胞」(PBMC)という用語は、限定はしないが、単球、Bリンパ球、およびTリンパ球を含む。インビトロの肉芽腫モデルの例に含まれるヒトPBMCは、単球およびTリンパ球であることが可能である。選択的に、あ

50

る態様においては、インビトロの肉芽腫モデルは、サンプル2 ml当たりの開始濃度約 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ の間の単球、および、開始濃度約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ の間のTリンパ球を含む。ある態様においては、インビトロの肉芽腫モデルは、開始濃度約 $1 \times 10^6$ の単球、および、開始濃度約 $1 \times 10^6$ のTリンパ球を含む。「開始濃度」という用語が、低付着性容器に加えられる際の素材の濃度を指すことは理解される。

【0036】

ある態様においては、インビトロの肉芽腫モデルは、ヒトの肺線維芽細胞のような線維芽細胞を含む。選択的に、線維芽細胞は、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ の間の開始濃度、例えば、約 $5 \times 10^5$ の開始濃度にて加えることができる。

【0037】

「低付着性容器」は、その表面が、培養における細胞の付着を妨げる、または減少させるような容器である。ある態様においては、低付着性容器は、限定はしないが、製造業者の推奨手順に従って使用される、COSTAR (商標) Ultra Low Attachment SurfaceまたはClusters (Costar Corp., Cambridge, MA) のような、低付着性組織培養皿である。選択的に、低付着性容器は、親水性で中性に帯電している共有結合ヒドロゲル層から構成される表面を有し得、それによって、(例えば、非被覆容器と比較して5%、10%、20%、40%、50%またはそれ以上) マクロファージおよび好中球の付着および活性化が妨げられる。タンパク質および他の生体分子は、疎水性相互作用およびイオン相互作用によって、表面に受動的に吸収されるため、ヒドロゲル表面は、これらの力を介した非特異的な固定を自然に妨げ、したがって、それに続く細胞の付着が妨げられる。選択的に、低付着性容器の表面は、上記に説明される細胞の適用または細胞増殖必要条件と一致する温度にて再水和されること、および、再水和培地は、細胞および新しい培地を添加する以前に吸引またはデカンテーションされることが可能である。または、細胞は、再水和培地に直接加えることができる。

10

20

【0038】

「インビトロの増幅」は、サンプルまたは検体中における核酸分子のコピー数を増加させる技術を指す。インビトロの増幅の例は、サンプル中の核酸鋳型へのプライマーのハイブリダイゼーションを行わせる条件下にて、被験者から採集された生物学的サンプルを一組のオリゴヌクレオチドプライマーに接触させる、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である。プライマーを、適切な条件下において伸長し、鋳型から解離し、その後再アニールし、伸長し、および、核酸のコピーを増幅するために解離する。インビトロの増幅技術の他の例は、鎖置換増幅 (米国特許第5,744,311号を参照のこと) ; 転写フリー等温増幅 (米国特許第6,033,881号を参照のこと) ; 修復連鎖反応増幅 (国際公開公報第90/01069号を参照のこと) ; リガーゼ連鎖反応増幅 (EP-A-320 308を参照のこと) ; ギャップフィリングリガーゼ連鎖反応増幅 (米国特許第5,427,930号を参照のこと) ; 結合リガーゼ検出およびPCR (米国特許第6,027,889号を参照のこと) ; およびNASBA (商標) RNA転写フリー増幅 (米国特許第6,025,134号を参照のこと) を含む。インビトロの増幅産物は、標準技術を用いた、電気泳動、制限エンドヌクレアーゼ切断パターン、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションまたはライゲーション、および/または、核酸配列決定によって特徴付けることができる。

30

40

【0039】

(核酸分子、タンパク質または細胞小器官のような) 「単離された」生物学的成分は、その成分が天然に生じる生物体の細胞中における他の生物学的成分、即ち、他の染色体DNAおよびRNA、ならびに染色体外DNAおよびRNA、タンパク質ならびに/または細胞小器官から実質的に分離されている、または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質は、標準の精製法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。本用語はまた、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、および、化学的に合成された核酸をも包含する。精製されたという用語に関するように、単離された、は相対的な用語である。

【0040】

50

「標識」は、例えば分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的方法によって検出可能な任意の分子または組成物である。放射性同位体、酵素基質、補因子、リガンド、化学発光物質または蛍光物質、ハプテン、酵素、金コロイド粒子、着色ラテックス粒子、およびエピトープタグを含む標識の例は、以前に開示されており、当業者には知られている（例えば、米国特許第4,275,149号；同第4,313,734号；同第4,373,932号；および同第4,954,452号を参照のこと）。

【0041】

化合物（例えば抗体）の標識との接着は、共有結合、吸着過程、キレートおよび同様のものにおけるもののような、疎水結合および/または静電結合によるもの、または、これらの結合および相互作用の組み合わせが可能である、ならびに/または、結合基に関係し得る。

10

【0042】

「潜伏性結核」は、細菌が生存したままだがゆっくりと複製している、または、複製していない、肺内の局在病巣に被包されている可能性がある、活性な壊死疾患を引き起こさない、ヒト結核菌感染における段階を指す。潜伏期は、宿主の残りの生涯に渡って存在する可能性がある、または、例えば宿主の免疫が低下した期間に、または、他のストレス源に応じて、感染が再活性化する可能性がある。潜伏性ヒト結核菌感染は、以前には特定の同定できていないが、それらは、ツベルクリン皮膚試験で陽性となるにも関わらず活性な疾患の特徴的な症状を有さないような個体群内に存在する。

【0043】

「潜伏期特異的抗原」は、ヒト結核菌によって、その活性期または対数増殖期よりもむしろ、その休眠期または定常期において、高レベルで（または独占的に）発現される抗原である。潜伏期特異的抗原（LSA）は、例えば、標準の好気/対数増殖条件下にて増殖させた、インビトロの培養ヒト結核菌において認められるタンパク質の発現を、潜伏期を模倣する条件下にて（例えば潜伏期モデルにおいて）増殖させた細菌と比較することによって同定することができる。

20

【0044】

「結合基」は、例えば化合物と標識（例えば、抗体と標識）のような、2つの化合物の間の化学的アームである。結合における必要な化学構造を完成するために、反応物質の各々は反応基を含まねばならない。そのような基の代表的な組み合わせは、アミド結合を形成するアミノ基とカルボキシル基；エステル結合を形成するカルボキシ基とヒドロキシ基；アルキルアミノ結合を形成するアミノ基とハロゲン化アルキル；ジスルフィドを形成するチオールとチオール；または、チオエーテルを形成するチオールとマレイミドもしくはハロゲン化アルキルである。天然の化合物においては存在しない場合、ヒドロキシ基、カルボキシル基、アミノ基および他の官能基を、既知の方法によって導入することができる。

30

【0045】

同様に、広範な種類の結合基を使用することができる。結合の構造は、2つの化合物（例えば抗体に対して標識）を互いに接着するために形成された安定した共有結合であるべきである。ある例においては、結合基は、例えば修飾リガンドとそのコグネート受容体との結合特性のような望ましい特性を増強するために、親水性または疎水性のいずれかで設計することができる。共有結合は、結合された化合物が曝される溶液条件に関して安定しているべきである。

40

【0046】

結合基の例は、1~20個の炭素および0~10個のヘテロ原子（NH、O、S）のものであり、分岐鎖または直鎖であることが可能である。前述のものを限定せずに、化学的に適合性の原子の組み合わせのみが結合基を含むことは明らかにはずである。例えば、炭素-炭素結合と組み合わせた、アミド基、エステル基、チオエーテル基、チオールエステル基、ケト基、ヒドロキシ基、カルボキシル基、およびエーテル基は、化学的に適合性の結合基の特定の例である。

50

## 【0047】

本明細書において使用されるような「ミコバクテリア」という用語は、限定はしないが、ヒト結核菌を含む。肉芽腫を形成する任意のミコバクテリアは、本明細書において提供される組成物および方法において使用することができる。典型的なミコバクテリアは、*M. avium* (鳥型結核菌)、*M. bovis* (ウシ型結核菌)、*M. marinum*、*M. ulcerans*、*M. smegmatis* (スメグマ菌)、および*M. haemophilum*を含む。選択的に、インビトロの肉芽腫モデルにおけるミコバクテリアの開始濃度は、サンプル2 ml当たりおよそ $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$  cfuの間である。

## 【0048】

第一核酸配列が第二核酸配列と機能的な関係になるように配置される場合、第一核酸配列は第二核酸配列と「使用可能なように連結されている」。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、プロモーターは、コード配列に使用可能なように連結されている。一般に、使用可能なように連結されたDNA配列は隣接しており、2つのタンパク質コード領域を連結する必要がある場合は、同じ読み枠内にある。

10

## 【0049】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「オリゴペプチド」は、その炭素が一方のアミノ酸の炭素のカルボキシル基と、他方のアミノ酸の炭素のアミノ基の間の縮合反応によって形成されたペプチド結合を通して連結された、アミノ酸 (典型的にはL-アミノ酸) の鎖である。鎖の一方の末端における末端アミノ酸 (即ちアミノ末端) はフリーのアミノ基を有する一方、鎖の他方の末端における末端アミノ酸 (即ちカルボキシ末端) は、フリーのカルボキシル基を有する。そのように、「アミノ末端」(N-末端と略される) という用語は、ペプチドのアミノ末端におけるアミノ酸上のフリーの -アミノ基、または、ペプチド内の任意の他の位置におけるアミノ酸の -アミノ基 (ペプチド結合に関与する場合はイミノ基) を指す。「カルボキシ末端」(C-末端と略される) という用語は、ペプチドのカルボキシ末端におけるアミノ酸上のフリーのカルボキシル基、または、ペプチド内の任意の他の位置におけるアミノ酸のカルボキシル基を指す。

20

## 【0050】

典型的に、ペプチドを構成するアミノ酸は、ペプチドのアミノ末端において開始し、カルボキシ末端に向かう方向に増加するように、順番に番号付けられる。したがって、一方のアミノ酸がもう一方のアミノ酸に「続く」と言われる場合、そのアミノ酸は、前のアミノ酸よりも、ペプチドのカルボキシ末端の近くに位置付けられる。

30

## 【0051】

本明細書において使用されるように、「プライマー」または「DNAプライマー」という用語は、核酸分子に特定の方向でアニールし、新生DNA鎖を合成させるようなオリゴヌクレオチドを意味する。

## 【0052】

本明細書において使用されるように、「プライマーペア」という表現は、一方は正の向きとされ、もう一方は逆の向きとされる (センス配列およびアンチセンス配列からなる二重鎖DNA分子にアニールされた場合に、それら各々の方向に関して) ような、2つのプライマーを指す。インビトロの増幅条件下においては、フォワードプライマーはセンス配列にアニールし、センス配列の増幅のプライマーとして機能し、リバースプライマーは、アンチセンス配列にアニールし、アンチセンス配列の増幅のプライマーとして機能する。プライマーは、例えば、(プライマー二量体の形成を最小限にするため) 反応における他のプライマーと最小限の相補性を有すること、および、PCRのような増幅法のために適切な反応温度範囲の $T_m$  値を有することに基づき、増幅反応における使用のために選択することができる。さらに、プライマーは、結果的に生じるDNA増幅産物が、例えばおよそ300塩基対長またはそれ以上のように、例えば100~5000塩基対長のような特定のサイズとなるように、DNAまたはRNAの鋳型の特定の領域にアニールさせるために選択することができる。

40

## 【0053】

「プローブ」は、相補的な核酸配列を検出するための、その核酸配列との選択的ハイブリ

50

ダイゼーションのために使用することができる核酸配列を意味する。プローブは、例えば、約5~100ヌクレオチド、または約10~50ヌクレオチド、または約18~24ヌクレオチドのように、長さが異なる。「標識プローブ」は、検出可能な標識または他のレポーター分子に接着された単離核酸プローブを含む。標識するための方法、および、様々な目的のために適切な標識の選択における手引きは、例えば、Sambrookら（「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」, CSHL, New York, 1989）、および、Ausubelら（「分子生物学における最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」, John Wiley & Sons, New York, 1998）において議論されている。

#### 【0054】

「プロモーター」は、核酸の転写を司る、1つまたはそれ以上の核酸配列を含む。プロモーターは、ポリメラーゼII型プロモーターの場合はTATA配列のような、転写開始部位近くの核酸配列を含む。プロモーターはまた、転写開始部位から数千塩基対も離れて位置し得る、遠位エンハンサーまたはリプレッサー因子をも含み得る。

10

#### 【0055】

本明細書において使用されるような「精製された」という用語は、絶対純度を必要としない；むしろ、相対的な用語として意図される。したがって、例えば、精製された核酸（またはタンパク質もしくは他の化合物）調製物は、特定化された分子（または分子タイプ）が、例えば細胞内または生化学的反應チェンバー内（適切なように）のような、その発生環境におけるものよりもさらに増加されたものである。例えば実質的に純粋な核酸のような、「実質的に純粋な」物質の調製物は、望ましい核酸がその調製物の核酸の総含量の少なくとも50%に相当するように精製することができる。ある態様においては、実質的に純粋な調製物では、調製物中における望ましい分子が少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%もしくはそれ以上に相当する。

20

#### 【0056】

「組換え」核酸は、天然には生じない配列を有するもの、または、さもなければ分離されているような2つの配列セグメントの人工的な組み合わせによって作製された配列を有するものである。この人工的な組み合わせは、化学合成によって、または、より一般的には、例えば遺伝子工学技術によるような、単離核酸セグメントの人工的な操作によって達成することができる。

30

#### 【0057】

本明細書においては、「残基」という用語は、アミド結合によってペプチドに組み入れられた、アミノ酸（D型またはL型）またはアミノ酸模倣物を指すように使用される。アミノ酸はそれ自体、天然に生じるアミノ酸であることが可能である、または他に限定されない限り、天然に生じるアミノ酸と同様の仕方で機能する、天然のアミノ酸の類似体（即ちアミノ酸模倣物）を包含することが可能である。さらに、アミド結合模倣物は、当業者にはよく知られたペプチド骨格修飾を含む。

#### 【0058】

「配列同一性」という表現は、2つの核酸配列または2つのアミノ酸配列の間の類似性を指し、配列間の類似性に換算して表される。配列同一性は、しばしば、同一性パーセント（または類似性パーセントもしくは相同性パーセント）に換算して測定される；より高いパーセントであれば、2つの配列はより類似している。

40

#### 【0059】

比較のための配列アラインメントの方法は、当技術分野においてはよく知られている。以下において、様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが説明されている： SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; PearsonおよびLipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; HigginsおよびSharp, Gene, 73:237~244, 1988; HigginsおよびSharp, CABIOS 5:151~153, 1989; Corpetら, Nuc. Acids Res. 16, 10881~90, 1988; Huangら, Computer Appls. in the Biosciences 8, 155~65, 1992; ならびにPearsonら, Meth. Mol. Bio

50

. 24, 307~31, 1994. Altschulら (J. Mol. Biol. 215:403~410, 1990) は、配列アライメント法および相同性の計算について詳細な考察を与えている。

【0060】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら, J. Mol. Biol. 215:403~410, 1990) は、配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxに関連した使用について、国立バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI, Bethesda, MD) を含む、幾つかの供給源から、および、インターネット上にて入手可能である。

【0061】

2つの核酸分子が密接に関連していることを代わりに示すのは、ストリンジェントな条件下においてその2つの分子が互いにハイブリダイズすることである。ストリンジェントな条件は配列に依存し、異なる環境パラメータ下において異なる。一般に、ストリンジェントな条件は、定義付けられたイオン強度およびpHにおいて、特定の配列についての熱融点 ( $T_m$ ) より約5~20 低く選択される。 $T_m$  は、標的配列の50%が、完全にマッチするプローブまたは相補鎖にハイブリダイズしたままであるような、(定義付けられたイオン強度およびpH下における) 温度である。核酸ハイブリダイゼーションについての条件およびストリンジェンシーの計算は、Sambrookら (「分子クローニング: 実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」, CSHL, New York, 1989) およびTijssen (「生化学および分子生物学における実験技術 - 核酸プローブを用いたハイブリダイゼーションパートI (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes Part I)」, 第2章, Elsevier, New York, 1993) において見出すことができる。ストリンジェントな条件下にて標的配列にハイブリダイズする核酸分子は、典型的に、50、2×SSCの洗浄条件下において、標的タンパク質の完全コード配列、または、コード配列の選択された部分のいずれかに基づいて、プローブにハイブリダイズする。

10

20

【0062】

程度の高い同一性を示さない核酸配列は、それにも関わらず、遺伝暗号の縮重によって類似したアミノ酸配列をコードする可能性がある。全てが実質的に同じタンパク質または同一のタンパク質をコードするような、複数の核酸分子を作製するために、この縮重を用いて核酸配列における変化を生じさせ得ることは理解される。

30

【0063】

さらに、結果として生じる変異体が、基本のタンパク質の免疫刺激特性 (例えば、被験者における防御的免疫応答) のような特性または活性の実質的なある比率をなおも維持する限り、タンパク質のアミノ酸配列における個々の置換、欠失もしくは付加、または、コードされる配列において1つのアミノ酸もしくは低いパーセント (ある例においては5%未満、またはそれどころか1%未満) のアミノ酸を変化させる、付加するもしくは欠失させるような、そのタンパク質のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列における個々の置換、欠失もしくは付加が、その変化によって、あるアミノ酸の、化学的に類似したアミノ酸との置換がもたらされるような、保存的に修飾された変異であることが、当業者には認識される。特定の態様においては、結果的に生じる変異体が、基本のタンパク質の免疫刺激特性または他の特性の、実質的なある比率 (例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、またはそれ以上) を維持する限り、わずかに1つのアミノ酸の置換、わずかに約3つの置換、または、約5、10、もしくは20もの置換があるような分子が予想される。ある変異態様は、それらが由来する元のタンパク質またはペプチドよりも強い免疫刺激特性を有することが予測される。

40

【0064】

機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換表は、当業者にはよく知られている。以下の6つの群は、互いに保存的な置換と考えられるアミノ酸の例である:

1) アラニン (A)、セリン (S)、スレオニン (T);

50

- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) ;
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q) ;
- 4) アルギニン (R)、リシン (K) ;
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V) ; および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

## 【0065】

本明細書において使用されるような「特異的結合作用物質」という用語は、実質的に、定義付けられた標的のみに結合する作用物質を指す。したがって、タンパク質特異的な結合作用物質は、実質的に、特定化されたタンパク質のみに結合する。「タンパク質特異的な結合作用物質」という用語は、抗タンパク質抗体（およびその機能的な断片）、および、実質的に特定化されたタンパク質のみに結合する、（可溶性受容体のような）他の作用物質を含む。

10

## 【0066】

（抗Acr抗体のような）抗タンパク質抗体は、HarlowおよびLane（「抗体、実験マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual)」, CSHL, New York, 1988）を含む多くの教材において説明される標準の手法を用いて作製することができる。特定の作用物質が実質的に、特定化されたタンパク質、またはその成分のエピトープのみに結合することは、常用の手法を用いて、または適応させて、容易に決定することができる。ある適切なインビトロのアッセイは、ウエスタンブロット法（HarlowおよびLane（「抗体、実験マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual)」, CSHL, New York, 1988）を含む、多くの標準教材において説明される）を利用する。ウエスタンブロット法は、抗Acrモノクローナル抗体のような、所定のタンパク質結合作用物質が、実質的に、特定化されたタンパク質のみに結合することを決定するために使用することができる。

20

## 【0067】

抗体のより短い断片もまた、特異的結合作用物質としての役割を果たすことが可能である。例えば、Acrに結合する、Fabs、Fvs、および単鎖Fvs (SCFvs) は、Acr特異的結合作用物質となる。これらの抗体断片は、以下のように定義付けられる：(1) Fab、抗体全体を酵素パインを用いて分解し、1つの完全な軽鎖および1つの重鎖の部分を生じさせることによって作製される、抗体分子の一価の抗原結合断片を含む断片；(2) Fab'、抗体全体をペプシンで処理し、続いて還元し、1つの完全な軽鎖および1つの重鎖の部分を生じさせることによって得られる抗体分子の断片；2つのFab'断片が抗体分子ごとに得られる；(3) (Fab')<sub>2</sub>、後に還元せずに、抗体全体を酵素ペプシンで処理することによって得られる抗体の断片；(4) F(ab')<sub>2</sub>、2つのジスルフィド結合によって共に保持された2つのFab'断片の二量体；(5) Fv、2つの鎖として発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含む、遺伝子操作断片；ならびに(6) 単鎖抗体（「SCA」）、遺伝的に融合された単鎖分子として、適切なポリペプチドリinkerによって連結された、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含む遺伝子操作分子。これらの断片を作製する方法は常套手段である。

30

## 【0068】

「特異的結合パートナー」は、関与する分子の三次元構造に依存する、特異的な、非共有相互作用によって、別の分子の構造的な局面を認識および結合することができる、一組の分子（「特異的結合ペア」）の構成要員である。特異的結合パートナーの典型的な組は、抗原/抗体、ハプテン/抗体、ホルモン/受容体、核酸鎖/相補核酸鎖、基質/酵素、阻害剤/酵素、アポタンパク質/補因子、糖質/レクチン、ビオチン/(ストレプト)アビジン、および、ウイルス/細胞受容体を含む。

40

## 【0069】

（抗体または抗原のような）少なくとも1つの免疫学的分子を含む特異的結合ペアは、特異的免疫学的結合ペアと呼ぶことができ、その免疫学的分子を特異的免疫学的結合パートナーと呼ぶことができる。

## 【0070】

特異的結合ペアの例は、（潜伏期特異的抗原のような）潜伏期特異的分子である分子、

50

および、その潜伏期特異的分子についての特異的結合パートナーである分子を含む、潜伏期特異的結合ペアである。

【0071】

抗体に言及する場合、「分析対象物に特異的に結合する」または「に対して特異的に免疫反応性である」という表現は、タンパク質および他の生物学的分子のような不均質な分子集団における分析対象物またはエピトープの存在の決定因となる、結合反応または相互作用を指す。したがって、指定された免疫学的検定法の条件下においては、特定化された抗体は特定の分析対象物またはエピトープに結合し、サンプル中に存在する他の分析対象物またはエピトープには有意な量で結合しない。特定の分析対象物またはエピトープに対して特異的に免疫反応性である抗体を選択するために、様々な免疫学的検定法のフォーマットを使用することができる。例えば、固相ELISA免疫学的検定法は、あるタンパク質に対して特異的に免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために、常用される。特異的な免疫反応性を決定するために使用することができる免疫学的検定法のフォーマットおよび条件の説明については、HarlowおよびLane「抗体、実験マニュアル (Antibodies, A Laboratory Manual)」, CSHP, New York, 1988を参照のこと。

10

【0072】

本明細書において使用されるような「被験者」という用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む範疇である、生きた多細胞脊椎動物の生物体を指す。「被験者」という用語は、ヒトの被験者および獣医学的被験者の両方を含む。

【0073】

サイトカインまたは他の生物学的素材を指す場合、「定常状態レベル」という用語は、非感染細胞において産生されるサイトカインまたは他の生物学的素材のレベルを指す。

20

【0074】

「合成ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合を形成させるための有機化学の手段を用いて、アミノ酸を特定の順序で連結させることによって、インビトロにおいて形成されるポリペプチドを指す。

【0075】

「形質転換された」細胞は、分子生物学的技術によって核酸分子が導入された細胞である。本明細書において使用されるように、形質転換という用語は、ウイルスベクターを用いたトランスフェクション、プラスミドベクターを用いた形質転換、および、エレクトロポレーション、リポフェクションおよびパーティクルガン加速法による、裸のDNAの導入を含む、そのような細胞に核酸分子を導入することのできる全ての技術を包含する。

30

【0076】

「ワクチン」という用語は、本明細書においては、脊椎動物における特定の免疫応答を刺激するために有用な組成物を意味するように使用される。

【0077】

本明細書において使用されるような「ベクター」という用語は、宿主細胞に導入されると、それによって形質転換された宿主細胞を生じるような核酸分子を指す。ベクターは、複製起点のような、宿主細胞においてそれを複製させる核酸配列を含み得る。ベクターはまた、1つまたはそれ以上の選択可能なマーカー遺伝子、および、当技術分野において既知の他の遺伝的要素をも含み得る。

40

【0078】

他に説明されない限り、本明細書において使用される全ての技術的用語および科学的用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。核酸またはポリペプチドについて与えられる、全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および、全ての分子量または分子質量値はおおよそそのものであり、説明のために提供されることはさらに理解される。本明細書において説明されるものと同様の、または同等の方法および材料を、本開示の実施または試験において使用することはできるが、下記にて、適切な方法および材料が説明される。矛盾する場合は、用語の説明を含めて本明細書に従って統制される。さらに、材料、方法、および実施例は単に説明的なものにすぎ

50

ず、限定することを意図しない。

【0079】

III. 幾つかの態様の説明

本明細書の第一の態様においては、被験者における潜伏性結核を検出するための免疫学的アッセイ法が提供される。そのような方法は、被験者に由来する、第一の潜伏期特異的結合パートナー (LSBP) を含み得る生物学的サンプルを、対応するLSBPと接触させる段階、および、第一のLSBPと対応するLSBPとの間の結合を検出する段階を含み、そのような結合は被験者における潜伏性結核を示唆する。これらの方法のある特定の例においては、第一のLSBPは抗体であり、対応するLSBPは潜伏期特異的なヒト結核菌抗原 (例えば、 $\alpha$ -クリスタリン (Acr) またはその免疫原性断片) である。本方法の他の特定の例においては、第一のLSBPは潜伏期特異的なヒト結核菌抗原であり、対応するLSBPは抗体である。本方法のある特定の例においては、抗原はAcrまたはその免疫原性断片である。

【0080】

その他の態様は、被験者における潜伏性結核の検出のためのキットである。そのようなキットは、少なくとも1つのLSBP、および、被験者における潜伏性結核の検出のための免疫学的アッセイ法を実行するための使用説明書を含む。

【0081】

本開示はまた、被験者における免疫応答を引き出す方法をも提供する。本方法は、免疫刺激量のヒト結核菌潜伏期特異的抗原もしくはその免疫原性断片、または、そのような抗原 (例えばAcr) もしくはその免疫原性断片をコードする核酸分子を被験者に導入する段階を含む。ある特定の例においては、本方法は、被験者における潜伏性結核感染を抑制または治療する方法である。本方法の特定の例においては、引き出された免疫応答は、ヒト結核菌による潜伏感染に対する被験者の感受性の低下をもたらす。

【0082】

本開示は、被験者における免疫応答を引き出すためのキットをさらに提供する。そのようなキットは、免疫刺激量のヒト結核菌潜伏期特異的抗原もしくはその免疫原性断片、または、そのような抗原もしくは免疫原性断片をコードする核酸分子、および、被験者における免疫応答を引き出す方法を実行するための使用説明書を含む。キットの特定の例は、潜伏性結核感染を有する可能性のある患者にキットの成分を投与するための使用説明書を含む。

【0083】

さらなる態様では、末梢血単核細胞、自己マクロファージ、およびミコバクテリアを含む、インビトロの肉芽腫が提供される。そのような肉芽腫においては、末梢血単核細胞は、単球、Bリンパ球、Tリンパ球、およびその組み合わせからなる群より選択される、ヒトの末梢血単核細胞である。肉芽腫のある例においては、ミコバクテリアはヒト結核菌である。肉芽腫のある例は、線維芽細胞をさらに含む。

【0084】

インビトロの肉芽腫を作製するための方法であり、低付着性容器において末梢血単核細胞、自己マクロファージ、およびミコバクテリアを組み合わせる段階、および、その組み合わせを十分な時間インキュベートし、インビトロの肉芽腫を形成させる段階に關与する方法も提供される。ある特定の例においては、線維芽細胞を組み合わせに加える。ある特定の例においては、外因性サイトカインを、インビトロの肉芽腫の作製を増強するのに十分な量において、容器に加える。ある例においては、外因性サイトカインは、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、またはその2つもしくはそれ以上の組み合わせである。

【0085】

本明細書において提供されるその他の態様は、抗結核治療活性について、結核薬候補をスクリーニングする方法である。そのような方法は、末梢血単核細胞、自己マクロファージ、およびミコバクテリアを含むインビトロの肉芽腫と薬剤を組み合わせる段階、ならびに、その薬剤がミコバクテリアの生存能を阻害するかどうかを決定する段階を含む。ある特定の例においては、末梢血単核細胞は、単球、Bリンパ球、Tリンパ球、およびその組み合

10

20

30

40

50

わせからなる群より選択される、ヒトの末梢血単核細胞である。

【0086】

本明細書において提供されるなおもその他の態様は、末梢血単核細胞、自己マクロファージ、および不活性化ミコバクテリアを含むインビトロの肉芽腫と薬剤を組み合わせる段階、ならびに、その薬剤が肉芽腫に含まれるミコバクテリアの再活性化を阻害するかどうかを決定する段階を含む、抗結核治療活性について、結核薬候補をスクリーニングする方法である。本方法のある特定の例においては、ミコバクテリアはヒト結核菌である。

【0087】

末梢血単核細胞、自己マクロファージ、および突然変異ミコバクテリアを含むインビトロの肉芽腫において、野生型ミコバクテリアと比較して、突然変異ミコバクテリアが、潜伏期を誘導する、生き残る、再活性化する、または肉芽腫壊死を誘導する能力を低下させられているかどうかを決定する段階を含む、結核ワクチン候補をスクリーニングする方法も提供される。本方法のある特定の例においては、インビトロの肉芽腫は、線維芽細胞をさらに含む。本方法のある例においては、突然変異ミコバクテリアは、潜伏期遺伝子における突然変異を有するミコバクテリア菌株を含む。他の例においては、突然変異ミコバクテリアは、acr、因子遺伝子、oxyRおよびaphCからなる群より選択される遺伝子における突然変異を有するヒト結核菌株である。特定の例においては、因子遺伝子は、sigF、sigC、およびsigHからなる群より選択される。

10

【0088】

付加的な態様は、培養基、ならびに、末梢血単核細胞、自己マクロファージ、および突然変異ミコバクテリアを含むインビトロの肉芽腫において、野生型ミコバクテリアと比較して、突然変異ミコバクテリアが、潜伏期を誘導する、生き残る、再活性化する、または肉芽腫壊死を誘導する能力を低下させられているかどうかを決定する段階を含む、結核ワクチン候補のスクリーニングの方法を実行するための使用説明書を含む、インビトロの肉芽腫を作製するためのキットである。ある例においては、本キットは、低付着性容器をさらに含む、ある特定の例においては、本キットは、ある量のサイトカインをさらに含む。

20

【0089】

IV. インビトロの肉芽腫モデルの作製および使用

本開示は、本態様において、一貫した、複製可能な、および確実な実験系を提供するような、インビトロの肉芽腫モデルを作製および使用するための方法を提供する。インビトロの肉芽腫は、例えば、肉芽腫の形成および維持について研究するため、ならびに、肉芽腫の形成、維持、または返転(reversion)に影響を与える化合物を、同定および特徴付けるため、ならびに、特にミコバクテリアの潜伏期を含むミコバクテリアの局面について研究するためのような、多くの適用において使用することができる。

30

【0090】

一般に、インビトロの肉芽腫は、末梢血単核細胞をマクロファージおよびミコバクテリアと組み合わせることによって形成される。細胞培養における凝集塊の形成を促進するために、細胞混合物を数日間インキュベートする。ある態様においては、低付着性容器の使用によって、肉芽腫の形成はさらに促進される。細胞凝集塊の形成後、線維芽細胞を培養に選択的に加えることができる。ある態様においては、例えば、IL-2、IFN-、および/またはTNF-のような外因性サイトカインを、例えばミコバクテリアへの感染以前に、増殖培地に加える。

40

【0091】

より具体的な例として、自己マクロファージおよびミコバクテリアは、全ての付着を妨げるように処理された組織培養皿のウェルのような、低付着性容器の1つまたはそれ以上のウェルにおいて組み合わせられる。(10%ヒト血清、HSを加えたRPMI(Lampire Biological Laboratories, Pipersville, PA)のような)細胞培養基における末梢血単核細胞(PBMC)、選択的に $1 \times 10^6$ 細胞を、マクロファージおよびミコバクテリアと組み合わせ、5~7日間の間、細胞が増殖する温度においてインキュベートする。凝集塊が直径およそ1 mmに達した時点で、線維芽細胞(選択的にヒト肺線維芽細胞)を加えることができる。

50

## 【0092】

マクロファージによるヒト結核菌の貪食作用に続く、様々な走化性誘起作用サイトカインの分泌は、肉芽腫の形成にのみならず、その維持にとっても重要である。このために、サイトカインレベルを測定することによって、インビトロの肉芽腫の発達をモニタリングすることができる。サイトカイン解析のためには、上清を採集し、ろ過滅菌し、ELISAのような既知の技術によってアッセイする。

## 【0093】

ある態様においては、例えば、インビトロの肉芽腫の形成中に、外因性サイトカインを培地に加えることも有益である；ある例においては、サイトカインの添加によって、凝集塊の形成が増強される。例として、IL-2（例えば10単位/ml）、IFN- $\gamma$ （例えば2 ng/ml）、またはTNF- $\alpha$ （例えば50 ng/ml）（Endogen, Woburn, MA）または2つもしくは3つのサイトカインの組み合わせを、ミコバクテリアへの感染以前に、細胞に加える。より長期間、例えば9日間、インビトロの肉芽腫が維持される場合は、サイトカインは都合よく二回目を加えられる可能性がある。ある特定の例においては、培養開始後第5日目に同じ量および種類のサイトカインを加えた。

10

## 【0094】

同様に、インビトロの肉芽腫を特徴付けるために、遺伝子発現を使用することができる。RT-PCRまたはRPA解析のために、凝集塊を収集し、洗浄し、RNAを抽出する。組織病理学については、10%のホルマリンのような固定液において細胞を固定し、組織のように処理する。

20

## 【0095】

本開示のインビトロの肉芽腫モデルは、様々な実用性を有する。例えば、インビトロの肉芽腫モデルは、肉芽腫形成および肉芽腫壊死の過程の解析および特徴付けを行うために使用することができる。それはまた、ミコバクテリウム属が肉芽腫内に局在しない場合に対して、ミコバクテリウム属が肉芽腫内に局在する場合に、示差的に発現されるヒト結核菌遺伝子の特徴付けるために使用することもできる。

## 【0096】

本モデルは、例えば外因性サイトカインを加えずに使用された場合に、肉芽腫を構成する細胞による天然サイトカイン産生を特徴付けるために有用である。ある態様においては、インビトロの肉芽腫モデルによって産生されるサイトカインレベルを、定常状態のサイトカインレベルと比較する。肉芽腫モデルは、ミコバクテリアの生存率を解析するためにも、および、病態生理学的解析のためにも有用である。

30

## 【0097】

## V. 薬剤および免疫刺激化合物候補のスクリーニング

本明細書において説明されるインビトロの肉芽腫モデルは、例えば結核薬候補のような候補化合物を正確にスクリーニングするために使用することができる。結核薬候補をスクリーニングする方法は、インビトロの肉芽腫モデルに薬剤候補を加える段階、および、薬剤が、肉芽腫に含まれるミコバクテリアを殺すか、またはさもなくば、肉芽腫中の細菌もしくは他の細胞の生理学を変化させるかどうかを決定する段階を含む。本モデルは、選択的に、潜伏性ミコバクテリア感染の治療において使用するための薬剤をスクリーニングするために使用される。

40

## 【0098】

インビトロの肉芽腫モデルはまた、例えば結核ワクチン候補のような、免疫刺激化合物をスクリーニングするためにも有用である。例として、インビトロの肉芽腫モデルは、例えば、ヒト結核菌感染または潜伏性ミコバクテリア感染の再活性化を予防するまたは低減させるためのワクチンとして使用することができる、ヒト結核菌の突然変異菌株を試験するためのような、動物実験への前段階として使用される。動物実験の前段階は、動物実験に関連する費用および負の意味合いの削減に役立つ。本明細書において提供されるインビトロの肉芽腫モデルの例は、動物実験から生み出されるデータに頼る従来のワクチンスクリーニング試験よりも費用が安く、はるかに迅速である。

50

## 【0099】

突然変異ヒト結核菌株は、例えば、限定はしないが、acr、sigF、sigC、sigH、および他の因子、oxyRおよびaphCから選択される潜伏期遺伝子の1つにおける突然変異などの突然変異の誘導またはスクリーニングのような、当業者に既知の方法によって構築することができる。当業者に既知の方法の例は、インビトロの突然変異誘発およびインビボの突然変異誘発を含む。突然変異は、1つもしくはそれ以上のこれらの潜伏期遺伝子の、全てもしくは部分の欠失、または、1つもしくはそれ以上のこれらの潜伏期遺伝子における挿入もしくは置換であることが可能である。ミコバクテリア菌株を一般に指す場合、または、特定のヒト結核菌株を指す場合、「突然変異した」および「突然変異体」という用語は、菌株が休眠状態もしくは潜伏状態にシフトダウンすることを阻害もしくは予防する、または、菌株が休眠状態もしくは潜伏状態にシフトダウンした後に再活性化することを阻害もしくは予防する、1つまたはそれ以上の突然変異を有する菌株を指す。休眠は、細菌の複製が遅い、または停止しているが、継続中の代謝を幾らかは行う状態である一方、再活性化は、細菌の複製および対数増殖期の生化学に關与するものである。

10

## 【0100】

ワクチンとしての役割を担うことができる、突然変異した菌株を同定するための方法の例においては、本明細書において説明されるような突然変異ミコバクテリア菌株を、野生型ミコバクテリア菌株の代わりにインビトロの肉芽腫モデルに加える。突然変異ミコバクテリア菌株の有効性は、野生型ミコバクテリア菌株と比較して、突然変異菌株の、潜伏性ミコバクテリア感染状態の成立を誘導する、肉芽腫内において生き残る、潜伏状態から活性状態へ再活性化する能力の低下、および/または、突然変異菌株の、肉芽腫壊死を誘導する能力の低下に基づいて決定される。突然変異ミコバクテリア菌株を含む、インビトロの肉芽腫におけるサイトカイン産生を解析し、野生型ミコバクテリア菌株を含む対照インビトロ肉芽腫モデルにおけるサイトカイン産生と比較することもできる。

20

## 【0101】

## VI. 潜伏期特異的抗原の同定

ミコバクテリアの休眠の分子メカニズムについての洞察を得るために、ならびに、休眠感染を検出および/または追跡するための分子を提供するために、低酸素への適応に關与すると疑われる遺伝子およびタンパク質を調べた。(本明細書において説明されるように) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)技術を用いた結果、推定上の様々なストレス応答遺伝子の示差的な発現が確証された。嫌気性(シフトダウン)肉芽腫モデルにおいて増加した活性を示す、これらの遺伝子のうち2つは、酸化ストレス応答に關与する、oxyRおよびaphCである(Dhadayauthapaniら, J. Bacteriol. 178:3641~3649, 1996)。第三の遺伝子は、マクロファージ内における細菌の増殖に必要とされることが報告された(Yuanら, Microbiol. 95, 16:9578~9583, 1998)、 $\gamma$ -クリスタリン、即ち、ATP非依存性のシャペロンをコードする(Henriquesら, J. Bacter. 179:1887~1897, 1997; Horwitz, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:10449~10453, 1992)。

30

## 【0102】

本明細書において開示される特定の態様において議論されたものに加え、潜伏期特異的な抗原は、潜伏期にないミコバクテリアと比較した、潜伏性ミコバクテリア、特にヒト結核菌による、それらの優先的な発現に基づいて同定することができる。例として、示差的な発現は、潜伏性ミコバクテリアおよび非潜伏性ミコバクテリア(例えば、低酸素条件下および好気条件下において培養された細菌)から抽出されたタンパク質の二次元ゲル電気泳動を用いて検出することができる。

40

## 【0103】

または、ミコバクテリアの潜伏性(例えば、インビトロの肉芽腫)培養対非潜伏性(即ち好気)培養における、優先的なmRNA発現を検出するために、遺伝子チップ(またはcDNAマイクロアレイ)解析を行うことができる。例えば、一方の培養または他方の培養において発現される転写産物の全てをスポットティングすることによって、サブトラクティブハイブリダイゼーションを実行することができる。チップをその後、(例えばシアニン色素を用

50

いて) 標識した潜伏性 mRNA (または cDNA) プール、および、標識した非潜伏性 mRNA (または cDNA) プールをプローブとして解析することができ、示差的な発現を、既知の技術を用いて検出することができる。

【0104】

基本型の潜伏期特異的な抗原は、 $\alpha$ -クリスタリンである；その同定および特徴付けについては、本明細書においてより詳細に説明される。

【0105】

VII. 潜伏性結核の検出

潜伏性ヒト結核菌が、潜伏性ヒト結核菌感染を有する被験者において、その抗原、および/または、それに対して反応性の抗体を検出することができる程十分に高いレベルの潜伏期特異的な抗原を産生し得ることが意外にも見出された。

【0106】

本明細書においては、潜伏性結核生物体が、被験者における免疫原性反応を引き出す特異的な抗原を産生することが実証され、潜伏期特異的な抗原、および/または、潜伏期特異的な抗原に対する抗体を検出するための、ならびに、潜伏感染を検出および/または診断するための方法がここで可能となる。

【0107】

潜伏期特異的な抗原、または、(Acrのような) ヒト結核菌潜伏期特異的なタンパク質のエピトープを認識する抗体は、例えば血清または他の生物学的液体のような、被験者からのサンプルにおいて、既知の免疫学的技術を用いて検出することができる。そのような潜伏期特異的な抗原または抗体 (例えば、Acr エピトープに対して特異的な循環抗体) の存在は、その被験者が潜伏性結核感染を有することを示唆する。

【0108】

当技術分野においては、抗原の検出および定量のための多くの技術が一般に知られている。最も一般的には、精製された抗原を基質に結合させ、サンプルの抗体を、この抗原にその Fab 部分を介して結合させ、基質をその後洗浄し、アッセイの対象である抗体の Fc 部分に結合する二次標識抗体をその後加える。二次標識抗体は、特異的な種のものとなる、即ち、血清がヒト由来の場合、二次標識抗体は抗ヒト IgG 抗体となる。基質をその後、洗浄し、結合された二次標識抗体の量を、標準法によって検出および定量する。

【0109】

ディップストリップまたは他の固定化アッセイ装置を使用する方法を含む、生物学的サンプルにおける抗体の検出のための方法の例は、例えば以下の特許において開示されている：米国特許第 5,965,356 号 (単純疱疹ウイルスタイプ特異的な血清アッセイ)；同第 6,114,179 号 (抗原および/または抗体の検出のための方法および試験キット)；同第 6,077,681 号 (抗体の検出による運動性ニューロパシーの診断)；同第 6,057,097 号 (自己免疫応答を含む病理学のための、および/または、炎症性疾患のためのマーカー)；ならびに同第 5,552,285 号 (酸化 DNA 塩基に対する抗体についての免疫学的検定法、組成物およびキット)。

【0110】

例として、(インビトロの潜伏期モデルからの培養上清、または被験者からの生物学的サンプルのような) 生物学的液体における Acr タンパク質またはその他の LSA を検出するために、マイクロスフェアアッセイ (フロービーズアッセイとも呼ばれる) も使用することができる。ルミネックス社 (Luminex Corporation) によって開発された系、および、ベクtonディッキンソン社 (Becton Dickinson) によって開発された他の系に代表されるような本技術では、1つまたは幾つかの分析対象物を検出するために、非常に少量、典型的には 20  $\mu$ l のサンプルを処理する。本アッセイの原則は、特定の量の赤色素および赤外線色素を含むマイクロスフェアに、「捕捉抗体」を結合させることに基づく。これらのマイクロスフェアをサンプル、ビオチンと結合させた二次検出抗体、および、フィコエリトリン (PE) と結合させたストレプトアビジンと共にインキュベーションした後、フローサイトメーターを用いてビーズを解析する。あるレーザーではビーズが検出され、第二のレーザーでは

10

20

30

40

50

、それらのビーズに結合したPEの強度が検出される。この技術は、複数のアッセイ、肺炎連鎖球菌の血清型決定、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）および $\alpha$ -フェトタンパク質（AFP）の同時測定、トキソプラズマ、風疹ウイルス、サイトメガロウイルス、および単純疱疹ウイルスタイプ1および2に対する血清IgGの同時検出において、サイトカインを検出するために使用されてきた（例えば、そのウェブサイトにおいて、またはそのカタログを通じて、ルミネックス社(Luminex Corp.)から入手できる技術要旨を参照のこと）。

#### 【0111】

ある態様においては、マイクロスフェア上のAcrタンパク質を捕捉するために、ポリクローナルウサギ抗血清が使用される。ある態様においては、二次検出抗体は、Acrに対するモノクローナル抗体である。そのような方法において使用される二次抗体は、例えば、ビオチンに結合することができる。

10

#### 【0112】

### VIII. 潜伏期特異的な免疫学的結合パートナーの作製

潜伏期特異的なヒト結核菌タンパク質が一旦同定されれば、そのタンパク質、および/または、そのタンパク質上の1つまたはそれ以上のエピトープを特異的に認識する抗体を、免疫学的アッセイまたは他のアッセイにおいて使用するために十分な量で作製することは有益である。タンパク質、および、同定されたタンパク質に対して反応性の抗体を作製するための方法は、当業者にはよく知られている。以下の方法は、典型的な例として提供され、限定するものとして見なされるべきではない。

#### 【0113】

### A. タンパク質の産生

潜伏期特異的なタンパク質が一旦同定されれば、そのタンパク質をコードする配列を決定するのは、よく知られた技術の問題となる。例えば、ヒト結核菌ゲノムの全コード配列が知られている（Coleら、Nature 393:537~544, 1998）；これは、単離されたある潜伏期特異的なタンパク質をコードする遺伝子を同定するために使用することができる。コード配列はその後、インビトロにおいて多量のタンパク質を作製するために使用することができる。

20

#### 【0114】

当業者には、後に精製できるように組換えタンパク質を発現するためには無数の方法があることが理解される。一般には、望ましいタンパク質をコードする核酸配列を有する発現ベクターを用い、発現のための微生物を形質転換する。そのような微生物は、原核生物（細菌）または真核生物（例えば酵母）であることが可能である。ある適切な細菌種は、実験的試験用発現系として広く使用されてきた、大腸菌（*E. coli*）である。さらに、タンパク質は、ウイルス（例えばワクシニア）に基づく発現系を用いて発現することができる。タンパク質は同様に、動物細胞組織培養において発現することもでき、そのような系は、組換えタンパク質における、または、融合タンパク質のある部分における、動物特有のタンパク質の修飾が望ましい、または必要とされる場合に、適切なものとなる。

30

#### 【0115】

培養可能な細胞の安定した形質転換に適したベクターも、よく知られている。典型的には、そのようなベクターはクローン化核酸分子の挿入のために適したマルチクローニング部位を含み、それにより、それは5'制御配列および3'制御配列の転写調節下にある。さらに、形質転換ベクターは、1つまたはそれ以上の選択可能なマーカーを含む；細菌の形質転換については、これはしばしば抗生物質耐性遺伝子である。そのような形質転換ベクターは、典型的に、マルチクローニング部位に関して各々機能的に整列された、プロモーター制御領域（例えば、誘導可能な、または、構成的な発現を調節する制御領域）、転写開始部位、リボソーム結合部位、RNAプロセッシングシグナル、および転写終結部位をも含む。大量の組換えタンパク質の産生のためには、誘導可能なプロモーターが好ましい。これにより、組換えタンパク質の選択的な産生が許容され、および、構成的プロモーターより高いレベルの産生もなされ、および、構成的に発現された場合には発現細胞にとって毒性となり得る組換えタンパク質の産生も可能になる。

40

50

## 【0116】

これらの一般的な指標に加えて、タンパク質の発現/精製キットが商品として生産されている。例えば、キアゲン社 (QIAGEN, Chatsworth, CA) からのQIAexpress (商標) 発現系、および、インビトロジェン (Invitrogen, Carlsbad, CA) によって提供される、様々な発現系を参照のこと。製造業者により提供される詳細によって、そのようなキットは、潜伏期特異的タンパク質の生産および精製のために使用することができる。

## 【0117】

当業者には、組換えポリペプチドを精製するためには無数の方法があり、そのような、タンパク質精製の典型的な方法を、潜伏期特異的タンパク質を精製するために使用できることが理解される。そのような方法は、例えば、イオン交換、ゲルろ過、HPLC、モノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィー、および、大量生成後の不溶性タンパク質封入体の単離を含む、タンパク質クロマトグラフィー法を含む。さらに、例えば、ヘキサヒスチジン配列のような精製親和性タグを、組換え技術によってタンパク質に融合または連結し、ポリペプチド精製を容易にするために使用することができる。精製後のタグの除去が望ましい場合は、そのような除去を容易にするために、例えばトロンピン特異的な分解部位のような、特異的なタンパク質分解部位を、タグと融合タンパク質の残りとの間のタンパク質に操作して入れることができる。

10

## 【0118】

商品として生産されるタンパク質の発現/精製キットによって、各系を用いて作製されるタンパク質の精製のためにあつらえたプロトコールが提供される。例えば、キアゲン社 (QIAGEN, Chatsworth, CA) からのQIAexpress (商標) 発現系、および、インビトロジェン (Invitrogen, Carlsbad, CA) によって提供される様々な発現系を参照のこと。機能化されたTGF-融合タンパク質を作製するために、商業的なキットが使用される場合、製造業者の精製プロトコールが、そのタンパク質を精製するための1つの好ましいプロトコールとなる。例えば、アミノ末端ヘキサヒスチジンタグと共に発現されたタンパク質は、ニッケル-ニトリロ三酢酸 (Ni-NTA) 金属アフィニティークロマトグラフィーマトリックス (The QIAexpressionist, QIAGEN, 1997) に結合することによって精製することができる。

20

## 【0119】

組換え潜伏期特異的タンパク質が分泌形態において産生される場合、例えば、トランスジェニック動物の乳汁に分泌される場合、精製は分泌液から行うことができる。または、例えば被験者における免疫学的反応を誘導するために、潜伏期特異的なタンパク質を分泌液 (例えば乳汁) において、被験者に直接与えることが適切な場合は、精製は不要である可能性がある。

30

## 【0120】

## B. 抗体の産生

ヒト結核菌潜伏期特異的タンパク質、またはそのようなタンパク質内の特異的なエピトープに対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を産生することができる。最適には、潜伏期特異的タンパク質に対して生み出された抗体は、特異的にそのタンパク質を検出する。即ち、そのような抗体は、Acrタンパク質を認識および結合し、生物学的サンプル中において認められる他のタンパク質を実質的には認識または結合しない。ある抗体が特異的にその標的潜伏期特異的タンパク質を検出することは、多くの標準免疫学的検定法の任意の1つによって決定される; 例えば、ウエスタンブロット技術 (Sambrookら, 「分子クローニング: 実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」, CSHL, New York, 1989)。

40

## 【0121】

(マウスにおいて産生されたもののような) 所定の抗体調製物が、標的タンパク質を特異的に検出することを、ウエスタンブロット法によって決定するために、肉芽腫のような潜伏性ヒト結核菌調製物の細胞から総細胞タンパク質を抽出し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル上における電気泳動に供する。タンパク質をその後、ウエスタンブロット法によって膜 (例えばニトロセルロース) に移行させ、膜と被験抗体調製物をイ

50

ンキュベートする。非特異的に結合した抗体を除去するために膜を洗浄した後、アルカリホスファターゼのような酵素に連結した抗マウス抗体の使用によって、特異的に結合した抗体の存在を検出する。アルカリホスファターゼ基質5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 /ニトロブルーテトラゾリウム適用によって、免疫学的局在化されたアルカリホスファターゼによる濃青色の化合物の生成がもたらされる。標的潜伏期特異的タンパク質を特異的に検出する抗体は、本技術によって、(その分子量によって決定されるゲル上の所定の位置に局在化される)標的潜伏期特異的タンパク質のバンドに結合することが示される。抗体の他のタンパク質への非特異的結合が生じる可能性があり、ウエスタンブロットゲル上の弱いシグナルとして検出可能である。この結合の非特異的な性質は、ウエスタンブロット上にて得られる、特異的抗体-潜伏期特異的タンパク質の結合から生じる強い第一シグナルと比較して弱いシグナルによって、当業者には認識される。

10

#### 【0122】

免疫原としての使用に適した実質的に純粋な潜伏期特異的タンパク質を、上記にて説明されるようにトランスフェクションした細胞、または形質転換した細胞から単離する。例えば、ml当たり数 $\mu\text{g}$ のレベルにまで、Amiconろ過装置において濃縮することによって、最終調製物におけるタンパク質の濃度を調整する。タンパク質に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体はその後、以下のように調製することができる：

#### 【0123】

##### i. ハイブリドーマ融合による、モノクローナル抗体の産生

説明されるように同定および単離された、潜伏期特異的タンパク質(例えばAcr)のエピトープに対するモノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein(Nature 256:495, 1975)の古典的な方法、またはその派生法に従って、マウスのハイブリドーマから調製することができる。簡潔に言えば、数週間の期間に渡って、選択されたタンパク質の数 $\mu\text{g}$ を用いて、マウスに繰り返し接種する。マウスをその後殺し、脾臓の抗体産生細胞を単離する。ポリエチレングリコールによって、脾臓細胞はマウス骨髄腫細胞と融合され、アミノプテリンを含む選択培地(HAT培地)上における系の増殖によって、過剰な非融合細胞は破壊される。首尾よく融合した細胞を希釈し、希釈液のアリコートをし、培養の増殖が続けられるマイクロタイプレートウェルの中に入れる。抗体産生クローンは、Engvall(Enzymol. 70:419, 1980)によって初めに説明されたようなELISA、およびその派生法のような、免疫学的検定法による、ウェルの上清液中の抗体の検出によって同定される。選択された陽性クローンは増殖させることができ、それらのモノクローナル抗体産物を使用するために収集することができる。モノクローナル抗体産生についての手法の詳細は、HarlowおよびLane(「抗体、実験マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)」, CSHL, New York, 1988)において説明されている。

20

30

#### 【0124】

##### ii. 免疫化によるポリクローナル抗体の産生

1つのタンパク質の不均質なエピトープに対する抗体を含むポリクローナル抗血清は、修飾しないもの、または、免疫原性を増強するために修飾したものであり得る発現タンパク質を用いて、適切な動物個体を免疫化することによって調製することができる。有効なポリクローナル抗体産生は、抗原および宿主種の双方に関連する多くの要因によって影響される。例えば、小分子は、他のものより免疫原性がより弱い傾向があり、担体およびアジュバントの使用を必要とする可能性がある。さらに、宿主動物は、接種部位および用量に応じて変化し、不十分または過剰な抗原用量のいずれかによって力価の低い抗血清を生じさせる。複数の皮内部位において投与される、低用量( $\text{ng}$ レベル)の抗原が最も確実であると考えられる。ウサギについての有効な免疫化プロトコールは、Vaitukaitisら(J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:988~991, 1971)において見出すことができる。

40

#### 【0125】

一定の間隔にてブースター(追加抗原)注入を与え、例えば、既知の濃度の抗原に対する寒天内二重免疫拡散法によって半定量的に決定されるように、その抗体価が低下し始める時点で、抗血清を採集することができる。例えば、Ouchterlonyら(「実験免疫学ハンド

50

ブック(Handbook of Experimental Immunology)」, Wier, D.(編) 第19章, Blackwell, 1973)を参照のこと。抗体のプラトー濃度は通常、血清中約0.1~0.2 mg/ml(約12 $\mu$ M)の範囲にある。抗血清の抗原に対する親和性は、例えばFisher(「臨床免疫学マニュアル(Manual of Clinical Immunology)」, 第42章, 1980)によって説明されるように、競合結合曲線を作成することによって決定される。

【0126】

#### iii. 合成ペプチドに対して生じさせる抗体

潜伏期特異的タンパク質に対する抗体を生み出すための第三のアプローチは、潜伏期特異的タンパク質の予測されるアミノ酸配列に基づき、商品として入手可能なペプチドシンセサイザーにおいて合成される、合成ペプチドを使用するものである。

10

【0127】

ほんの一例として、化学的に合成されたペプチドをウサギに注入することによる、よく知られた技術によって、Acr内の特異的なペプチドに対するポリクローナル抗体を作製することができる。

【0128】

#### iv. 潜伏期特異的タンパク質をコードする配列の注入によって生じさせる抗体

抗体は、潜伏期特異的タンパク質を発現するDNAベクターを、マウスのような実験動物に皮下注射することによって、潜伏期特異的タンパク質に対して生じさせることができる。動物個体への組換えベクターの送達は、Tangら(Nature 356:152~154, 1992)によって説明されるように、Biolisticシステム(Sanfordら, Particulate Sci. Technol. 5:27~37, 1987)のハンディ形態を用いて達成することができる。この目的に適した発現ベクターは、ヒト $\gamma$ -アクトチンプロモーターまたはサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターのいずれかの転写調節下においてZ47コード配列を発現するものを含み得る。

20

【0129】

潜伏期特異的抗原またはそのエピトープに対して調製された抗体調製物は、生物学的サンプル中の抗原を有する物質の濃度を決定する定量的免疫学的検定法において有用である；それらはまた、本明細書において説明されるように、生物学的サンプル中における抗原の存在を同定するために、半定量的または定性的に使用される。

【0130】

#### IX. 潜伏性結核に対する免疫学的反応の刺激

本明細書における、潜伏性結核感染に特有の抗原の提供により、被験者におけるそのような抗原に対する免疫応答を刺激するための方法がここで可能になる。ある態様においては、そのような免疫応答は、被験者における潜伏性結核感染の成立に対して防御的なものとなる。潜伏期特異的なタンパク質(例えばAcr)は、例えば、潜伏性結核の治療、改善、または予防における免疫原性作用物質として使用することができる。このタイプの治療について選択される被験者は、潜伏性結核感染を有することが知られているもの、または有することが疑われるもの、または感染のリスクを有するものである。そのようなヒトの例は、ツベルクリン皮膚試験で陽性となるが、活性な疾患の根拠(例えば、疲労、食欲不振、体重減少、熱、夜間発汗、咳、喀血のような臨床的症状、または、活性な疾患を示唆するものとして認識されるX線撮影、もしくは他の検査による根拠)がない、または限られた根拠のみを有するようなものである。

30

40

【0131】

(Acrのような)潜伏期特異的タンパク質に由来する、提供される免疫刺激タンパク質またはペプチドは、ヒト被験者または動物被験者に免疫刺激組成物またはワクチンとして投与するために、薬学的に許容される担体または溶媒と組み合わせられる。ある態様においては、1つの調製物を形成するために、1つより多いタンパク質またはペプチド断片を組み合わせることができる。

【0132】

免疫原性製剤は、単位用量形態にて都合よく与えられ、従来の薬学的技術を用いて調製されることが可能である。そのような技術は、活性な成分と薬学的担体または賦形剤との

50

会合をもたらす段階を含む。一般には、製剤は、均一および十分に、活性な成分と液体担体との会合をもたらすことによって調製される。非経口投与に適した製剤は、意図されるレシピエントの血液と製剤を等張にする、抗酸化剤、緩衝液、静菌薬および溶質を含み得る、水性および非水性の滅菌注射溶液；ならびに、懸濁剤および粘稠化剤を含み得る、水性および非水性の滅菌懸濁液を含む。製剤は、例えば密閉アンプルおよび密閉バイアルのような、単位用量分を包装した容器または複数回の用量分を包装した容器において与えることができ、使用直前に、例えば注射用水のような滅菌液体担体の添加のみが必要とされる、凍結乾燥状態において保存することができる。即座に使用できる注射溶液および懸濁液は、当業者に一般に使用される滅菌粉末、顆粒および錠剤から調製することができる。

【0133】

ある態様においては、単位用量製剤は、投与される成分のある用量または単位、またはその適切な画分を含むものである。上記にて特に言及される成分に加え、本明細書に包含される製剤が、当業者によって一般に使用される他の作用物質を含み得ることは理解されるべきである。

【0134】

免疫刺激作用物質またはワクチンとしての使用のためのものを含む、本明細書において提供される組成物は、口腔および舌下を含む経口、直腸、非経口、エアロゾル、点鼻、筋内、皮下、皮内、および局所のような、異なる経路によって投与することができる。それらは、限定はしないが、溶液、エマルジョンおよび懸濁液、ミクロスフェア、粒子、マイクロ粒子、ナノ粒子、およびリポソームを含む、異なる形態において投与することができる。

【0135】

投与容量は投与経路によって変化する。例として、筋内注射は、約0.1~1.0 mlに渡り得る。当業者には、異なる投与経路についての適切な量が知られる。

【0136】

各ワクチン用量におけるタンパク質の量は、著しい、有害な副作用を起こさずに、免疫防御的応答を誘導する量として選択される。そのような量は、どの特異的な免疫原が使用され、それがどのように与えられるかによって変化する。初回注入は、約1 $\mu$ g~1 mgの範囲に渡ることが可能であり、幾つかの態様では約10~800 $\mu$ gとなり、なおも他の態様では約25~500 $\mu$ gの範囲になり得る。初回ワクチン接種に続いて、被験者は、1回または数回の、ブースターによる免疫化を適切な間隔で受けることが可能である。ブースター注入は、1 $\mu$ g~1 mgの範囲に渡り得、他の態様ではおよそ10~750 $\mu$ g、およびなおも他の態様では約50~500 $\mu$ gの範囲になり得る。例えば3年間隔のような、1~5年間隔での定期的ブースター投与は、防御免疫の望ましいレベルを維持するのに望ましい可能性がある。

【0137】

国際公開公報第95/01441号において説明されるように、免疫化の過程に続いて、ESAT6またはST-CFと共培養されたPBL(末梢血リンパ球)のインピトロの増殖アッセイ、特に、感作リンパ球から放出されたIFNレベルの測定を行うことができる。本アッセイはよく知られており、米国特許第3,791,932号；同第4,174,384号および同第3,949,064号を含む文献において広く説明されている。

【0138】

免疫刺激化合物(例えばワクチン)の技術分野において最近開発されたものは、ペプチド抗原をコードする核酸分子の直接注入である(JanewayおよびTravers,「免疫生物学:健康および疾患における免疫機構(Immunobiology: The Immune System In Health and Disease)」, 13.25, Garland Publishing, Inc., New York, 1997;ならびにMcDonnellおよびAskari, N. Engl. J. Med. 334:42~45, 1996において幅広く説明されている)。本明細書において説明される核酸分子を含む、または、(Acrのような)潜伏期特異的ポリペプチドの免疫原性ペプチドもしくはペプチド断片をコードする核酸配列を含む、または潜伏期特異的ポリペプチドに由来する(例えば融合タンパク質としての)免疫原性ペプチドもしくはペプチド断片をコードする核酸配列を含むプラスミドは、そのようなDNAワクチ

10

20

30

40

50

ン接種法において利用することができる。

【0139】

したがって、本明細書において使用されるような「免疫刺激調製物」および「ワクチン」という用語は、(Acrのような)潜伏期特異的ポリペプチドまたはその断片をコードする核酸分子が被験者に薬学的組成物の形態において投与される、核酸ワクチンをも含む。遺伝子免疫について、当業者には知られている適切な送達法は、プラスミドDNAの筋肉への直接注入(Wolffら, Hum. Mol. Genet. 1:363, 1992)、特定のタンパク質担体と複合体形成されたDNAの送達(Wuら, J. Biol. Chem. 264:16985, 1989)、リン酸カルシウムとDNAの共沈降(BenvenistyおよびReshef, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:9551, 1986)、DNAのリポソームへのカプセル化(Kanedaら, Science 243:375, 1989)、パーティクルボン

10

【0140】

同様に、核酸ワクチン調製物は、ウイルス担体を介して投与することができる。

【0141】

最初に細胞をインビトロにて刺激し、免疫応答を引き出すために、その刺激された細胞をその後被験者に投与することにより、提供される免疫刺激分子および調製物を被験者に間接的に投与し得ることも考慮される。

【0142】

X. 免疫学的組成物および薬学的組成物

免疫学的エリシター組成物およびワクチンを含む免疫学的組成物、および、潜伏期特異的ポリペプチドまたはその抗原性断片を含む、他の薬学的組成物は、ミコバクテリア感染、特に潜伏性ヒト結核菌感染を低減させる、改善する、治療する、またはことによると予防するために有用である。1つまたはそれ以上のポリペプチドは、ワクチン技術分野における当業者に知られる方法および材料を用いて、単独で、またはアジュバントもしくは他の抗原と組み合わせて、製剤化および包装される。そのような免疫学的組成物に対する被験者の免疫学的反応は、治療的に、または予防的に使用することができ、ある態様においては、細胞傷害性Tリンパ球またはCD4<sup>+</sup>Tリンパ球のようなTリンパ球によって生み出されるもののような、抗体免疫および/または細胞性免疫を提供する。

20

30

【0143】

免疫原性を増強するために、1つまたはそれ以上の免疫原性ポリペプチドまたは断片(例えばハプテン)を、担体分子と結合することができる。免疫原性担体分子は、アルブミン、ヘモシアニン、サイログロブリンおよびその誘導体、特にウシ血清アルブミン(BSA)およびキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)のようなタンパク質、ポリペプチドまたはペプチド、多糖類、炭水化物、ポリマー、および固相を含む。他のタンパク質由来の物質、または非タンパク質由来の物質が、当業者には知られている。免疫原性担体は、典型的に、少なくとも1,000ダルトンの分子量を有し、ある態様においては、10,000ダルトンよりも大きい分子量を有する。担体分子はしばしば、ハプテンへの共有結合を容易にするための反応基を含む。アミノ酸のカルボン酸基もしくはアミン基、または糖タンパク質の糖基はしばしば、この方法において使用される。そのような基を欠く担体はしばしば、それらを作製するために、適切な化学物質と反応させることができる。または、タンパク質もしくはポリペプチドの多コピーを含む多抗原性ポリペプチド、または、抗原性について、もしくは免疫学的に同等なポリペプチドは、担体を使用せずに免疫原性を高めるために十分に抗原性であり得る。

40

【0144】

潜伏期特異的ポリペプチドは、結合体に対する免疫原性反応を増強するために有効な量のアジュバントと共に投与することができる。今のところ、ヒトにおいて広く使用されている唯一のアジュバントはミョウバン(リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム)である。研究および獣医学的な適用において用いられる、サポニンおよびその精製成分Quil

50

A、フロイント完全アジュバントおよび他のアジュバントには毒性があり、それによって、ヒトのワクチンにおけるそれらの潜在的な使用は制限される。しかし、ムラミルジペプチド、モノホスホリルリピドAのような、化学的に定義付けられた調製物、Goodman-Snitkoffら (J. Immunol. 147:410~415, 1991) によって説明されるもののようなリン脂質結合体、Millerら (J. Exp. Med. 176:1739~1744, 1992) によって説明されるようなプロテオリポソーム内への結合体のカプセル化、および脂質小胞内へのタンパク質のカプセル化も有用であり得る。

【0145】

ワクチンとしての役割を果たすように製剤化されたものを含む、本明細書において提供される組成物は、約-100~4の温度において保存することができる。それらはまた、室温のようなより高い温度を含む、異なる温度において、凍結乾燥された状態にて保存することができる。調製物は、当業者には既知の従来的な方法によって滅菌することができる。そのような方法は、限定はしないが、ろ過、放射線および熱を含む。調製物はまた、細菌の増殖を抑制するために、チメロサールのような静菌薬と組み合わせることができる。

10

【0146】

当業者に知られる様々なアジュバントは、提供されるワクチン組成物において、タンパク質と共に投与することができる。そのようなアジュバントは、限定はしないが、以下を含む：ポリマー、ブロックポリマーを含むポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーのようなコポリマー；ポリマーP1005；フロイント完全アジュバント（動物個体について）；フロイント不完全アジュバント；ソルビタンモノオレアート；スクアレン；CRL-8300アジュバント；ミョウバン；QS21、ムラミルジペプチド；CpGオリゴヌクレオチドモチーフおよびCpGオリゴヌクレオチドモチーフの組み合わせ；トレハロース；ミコバクテリア抽出物を含む細菌抽出物；解毒エンドトキシン；膜脂質；またはその組み合わせ。

20

【0147】

特定の態様においては、ワクチンは、非経口（即ち、筋内、皮内または皮下）投与または鼻咽頭の（即ち、鼻内）投与による免疫化のための単回投薬量において包装される。ある態様においては、ワクチンは三角筋に筋内注射される。ワクチンは、投与を容易にするために、薬学的に許容される担体と組み合わせることができる。担体は、保存剤を含む、または含まない、例えば水、または緩衝塩類溶液である。ワクチンは、投与時の再懸濁のために凍結乾燥することができる、または溶液中にあることが可能である。

30

【0148】

ポリペプチドを結合することができる担体は、重合体の遅延型放出系であることも可能である。ワクチンの製剤化においては、抗原の制御放出に影響を与えるために、合成ポリマーは特に有用である。

【0149】

ポリペプチドのマイクロカプセル化も、制御放出を与えるものである。多くの要因が、マイクロカプセル化のための特定のポリマーの選択の一因となる。ポリマー合成およびマイクロカプセル化工程の再現性、マイクロカプセル化の材料および過程にかかるコスト、毒物学的プロファイル、可変の放出動態についての必要条件、および、ポリマーと抗原の物理化学的適合性は全て、考慮しなければならない要因である。有用なポリマーの例は、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリウレタン、ポリオルトエステル、ポリアミド、ポリ-(d,l-ラクチド-コ-グリコリド) (PLGA) および他の生分解性ポリマーである。

40

【0150】

薬学的組成物またはワクチンのヒトへの投与のための用量は、例えばおよそ1 mg/kgのように、約0.01~10 mg/kgであり得る。この範囲に基づき、より重い（または軽い）体重について同等の投薬量を決定することができる。用量は、組成物が投与される個体に適するように調整することができ、個体の年齢、体重および代謝について、ならびに被験者の健康について変化させることができる。そのような決定は、主治医、または被験者および/もしくははその特定の状況に熟知したその他の者に委ねられる。ワクチンは付加的に、安定

50

剤、または、チメロサル（エチル（2-メルカプトベンゾエート-S）水銀ナトリウム塩）（シグマケミカル社（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）のような、生理学的に許容される保存剤を含み得る。

【0151】

#### XI. キット

インビトロの肉芽腫を増殖させるために、または、免疫学的結合反応を用いて生物学的サンプル中における潜伏期特異的抗原および/もしくは抗体の存在（もしくは不在）を決定するために、必要な試薬を含むキットが提供される。診断キットにおいて提供される使用説明書は、決定された（例えば実験的に測定された）値または他の結果と比較するために、検量線、ダイアグラム、説明図、または図表もしくは同様のものを含み得る。

10

【0152】

#### A. インビトロの肉芽腫を増殖させるためのキット

インビトロの肉芽腫を増殖させるためのキットは、例えば、細胞培養基（例えばRPMIに10%のヒト血清、HSを加えたもの）を含み、選択的に、低付着性容器（例えば、全ての付着を妨げるように処理した組織培養皿）、フィルター、および/または固定液を含み得る。そのようなキットの特定の例は、例えばIL-2、IFN-、および/またはTNF-のような、ある量の1つまたはそれ以上のサイトカインをも含む。キットにおいて供給される試薬は、別々の容器に含まれることが可能である。

【0153】

キットは、例えばELISA試薬、RT-PCRのための試薬、および/またはRPA試薬のような、肉芽腫の解析のための方法をも含み得、それらは、あるキットにおいては1つまたはそれ以上の別々の容器にて同様に提供することができる。細胞培養、ELISA、RT-PCR、およびRPA技術は、当業者にはよく知られている。

20

【0154】

反応容器および緩衝液、酵素等のような補助的な試薬も、キット中に含むことができる。

【0155】

あるキットにおける付加的な成分は、細胞培養および/またはそれに続く解析を実行するための使用説明書を含む。提供される場合、使用者は、使用説明書により、インビトロの肉芽腫を増殖させ、それらを使用して潜伏期特異的抗原を同定し、ワクチンのような免疫刺激化合物および薬剤をスクリーニングすることができるであろう。

30

【0156】

#### B. 潜伏期特異的抗原の検出のためのキット

潜伏期特異的ヒト結核菌タンパク質発現の検出のためのキットは、例えば、少なくとも1つの標的タンパク質特異的結合作用物質（例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体または抗体断片）を含み、少なくとも1つの対照を含み得る。潜伏期特異的タンパク質特異的結合作用物質および対照は、別々の容器に含まれることが可能である。本キットはまた、例えば作用物質を検出可能なように標識することができる、標的タンパク質：作用物質複合体を検出するための方法をも含み得る。検出可能な作用物質が標識されない場合は、それは、例えばあるキットにおいて1つまたはそれ以上の別々の容器にて同様に提供することができる、二次抗体またはプロテインAによって検出することができる。そのような技術はよく知られている。

40

【0157】

あるキットにおける付加的な成分は、アッセイを実行するための使用説明書を含む。使用説明書は、使用者に、例えば対照サンプルとの比較において、潜伏期特異的タンパク質の発現レベルが変化させられるかどうかを決定させるようなものである。反応容器および色素原、緩衝液、酵素等のような補助的な試薬も、キットに含むことが可能である。

【0158】

ほんの一例として、酵素結合イムノソルベントアッセイのような有効かつ便利な免疫学的検定法のキットを、ヒト血清における抗Acr抗体を試験するために構築することができる。発現ベクターは、（上記にて説明されるように）細菌またはバキュロウイルスのいずれ

50

かにおいて組換えAcrタンパク質を産生するために、Acr cDNAを用いて構築することができる。アフィニティー精製によって、制限されない量の純粋な組換え潜伏期特異的タンパク質（Acrなど）を生成することができる。

【0159】

C. 潜伏期特異的抗原に対する抗体の検出のためのキット

アッセイキットの他の例では、抗原として組換え潜伏期特異的タンパク質、二次抗体として酵素結合ヤギ抗ヒトIgGが提供される。そのようなキットの例はまた、1つまたはそれ以上の酵素の基質をも含み得る。そのようなキットは、被験者からの生物学的サンプルが潜伏期特異的タンパク質に対する抗体を含むかどうかを試験するために使用することができる。

10

【0160】

本開示は、以下の限定はしない実施例によってさらに例証される。

【0161】

実施例

実施例1：インビトロの肉芽腫モデルの調製および特徴付け

ミコバクテリア感染に対するヒト宿主の主な防御は、Tリンパ球に囲まれた、および後にはマクロファージのコアの周りに凝集する線維芽細胞およびコラーゲンに囲まれる、類上皮細胞および多核巨細胞を含む、活性化マクロファージの密集した組織化集塊である、肉芽腫の形成である。肉芽腫は、侵襲する生物体を隔離することによって、活性化（非潜伏性の）疾患を予防し得る。肉芽腫が維持される場合、これらの細菌は何年間も潜伏性のま

20

【0162】

肉芽腫形成のこの過程について、および、宿主の防御が損なわれた場合の肉芽腫のその後の崩壊について研究するために、インビトロのモデルを開発した。本実施例は、モデル系として使用することができるインビトロの肉芽腫を作製するためのある方法、および、本モデルを特徴付けるために使用される幾つかの方法についての説明を提供する。概観において、ヒト末梢血単核細胞、自己マクロファージおよびミコバクテリアを、低付着性組織培養皿において組み合わせた。結果的に生じる凝集塊を、顕微鏡検査法および免疫組織化学的染色を用いて特徴付けた。ELISA、および、RT-PCRにより検出される細菌のmRNAによって、サイトカイン産生を評価した。

30

【0163】

末梢血単核細胞（ $1 \times 10^6$ ）、自己マクロファージ（ $1 \times 10^6$ ）およびミコバクテリア（ $1 \times 10^1$ ）を、低付着性組織培養皿（COSTAR(商標)Ultra Low Attachment Clusters, Costar Corp., Cambridge, MA）において組み合わせ、5% CO<sub>2</sub>、37 °Cにおいてインキュベートした。ヒト末梢血単核細胞（PBMC、10% HSを加えたRPMI中に $1 \times 10^6$ 細胞）を24時間後に加え、混合物を5~7日間インキュベートした。凝集塊形成が認められた。凝集塊が直径およそ1 mmとなった時点で、ヒトの肺線維芽細胞（細胞系列33Luに由来する）を加えた。

【0164】

標準法を用いた顕微鏡検査法および免疫組織化学的染色を使用して、凝集塊を特徴付けた。ヒトの肺線維芽細胞の添加により、輪郭がよりはっきりとなるよう発達した培養において、小さな、円形の凝集塊構造物が形成された。免疫染色法を用いた、これらの凝集塊の顕微鏡使用試験によって、CD68<sup>+</sup>上皮様マクロファージ、および、わずかな、小さい円形のCD3<sup>+</sup>リンパ球が認められ、それは、複合体において、臨床病理学的検体にて認められる小肉芽腫に似ていた。肉芽腫を構成する細胞内および細胞間には、抗酸性染色細菌が認められた（図1）。

40

【0165】

形態学に加え、サイトカイン産生をELISAによって評価した。特に、早期のヒト結核菌感染の間アップレギュレートされることが知られるサイトカインについて解析した。

【0166】

感染に続く24時間によって、凝集塊は、非感染対照細胞において認められるレベルを越え

50

て十分に上昇した、TNF、IL-8、およびIL-6レベルを生じることが認められた。48時間後には、IFNレベルが同様に、対照よりも増加した。このサイトカイン産生の増加は、9日間の実験期間に渡って続いた。結果は、48時間をピークとするが、実験の過程を通して対照のレベルを越えるものであり続けるような、IL-2およびIL-12のレベルの増加をも示す。これらのサイトカインの全ては、健全な対照と比較した場合、結核患者においては、有意により高いレベルで検出される。

#### 【0167】

実施例2：肉芽腫モデルにおけるAcr mRNAの示差的な転写の検出

低酸素チェンバーにおいて培養された細菌を用いて、利用可能な酸素の大部分が利用された後に示差的に発現されたヒト結核菌遺伝子を同定した。示差的に発現された遺伝子は、acr、sigF、oxyRおよびaphCであった。これらの4つの遺伝子のうち、acrは、ミコバクテリウム属によって分泌されるタンパク質（ $\alpha$ -クリスタリン）をコードする。

10

#### 【0168】

インビトロの肉芽腫モデルにおいてこれらの遺伝子が発現されることを確認するために、RT-PCRおよびRNA保護アッセイを実行した。これらのアッセイから、ミコバクテリア遺伝子acr、aphC、およびsigFに由来するmRNAが転写されることが示された。これらの転写産物は、非感染インビトロ肉芽腫対照においては認められなかった。

#### 【0169】

代表的な実験からの典型的な結果は、リボヌクレアーゼ保護アッセイ（RPA）のプロットである、図2および図3において示される。図2においては、4つの時点全てにおいてacr mRNAが認められた一方、RpoB mRNAは、好氣的に増殖させた培養においてのみ認められた。図3においては、acr mRNAおよびRpoB mRNAは、7日間または12日間の双方のインキュベーションにて、インビトロの肉芽腫モデルにおいて認められ、これは、肉芽腫中に好気性細菌が存在したことを示唆すると考えられる。

20

#### 【0170】

実施例3：他のインビトロの潜伏期モデル

以下の実施例は、（例えば、薬剤および免疫刺激化合物をスクリーニングするために、ならびに、潜伏期特異的抗原を同定するために、）例えば、インビトロの肉芽腫モデルについて得られた結果を確認するために使用することができる、他のインビトロの潜伏期モデルを提供する。

30

#### 【0171】

モルモットエアロゾル感染モデル

少数のヒト結核菌を用いてエアロゾル接種によって感染させた場合、細菌が、深部の肺胞における肺胞上皮細胞と関連した肉芽腫の形成を引き起こすことが認められた。これらの肉芽腫は明らかに、感染を完全に抑えることができず、細菌は結局はこの動物個体を圧倒するが、ヒトの肉芽腫と多くの類似点がある。例えば、これらの肉芽腫は壊死領域に集中し、類上皮細胞および多核巨細胞およびTリンパ球を含むマクロファージを主に含む。これらの肉芽腫においては、細菌のAcr遺伝子の示差的な転写が検出された。

#### 【0172】

インビトロの低酸素チェンバーモデル

40

WayneおよびHayesは、調節された攪拌を伴う、密閉容器におけるインキュベーションにより、ヒト結核菌から徐々に酸素を剥奪する、インビトロの存続モデルを開発した（WayneおよびHayes, *Infect. Immun.* 64:2062~2069, 1996）。これらの条件下における増殖は、操作上、2つの非複製存続（NRP）状態：グリシンデヒドロゲナーゼ活性の誘導に関連する微好気状態（NRP1）、およびそれに続く、グリシンデヒドロゲナーゼ活性が低下し、薬剤感受性における変化が明らかとなる、さらなる低酸素状態（NRP2）に分けることができる。具体的には、多分DNA超らせん性および細胞の透過性の各々における変化によって、細胞は、シプロフロキサシン（ciprofloxacin）に対して耐性となり、メトロニダゾールに対して感受性となる（WayneおよびHayes, *Infect. Immun.* 64:2062~2069, 1996）。これらの観察は、1つの抗生物質療法に対する臨床的TBの難治性と関連付けられる（Dickinson

50

およびMitchison, Am. Rev. Respir. Dis. 123:367 ~ 371, 1981)。

【0173】

(光学密度培養集団、酸素濃度、pHを含む)幾つかの環境的な増殖条件のモニタリングを行わせ、および、低酸素テンションにおいてのみ誘導される酵素をアッセイさせるような、ならびに、病原体の封入、および、容器の直接遠心分離による核酸の容易な収集を提供するような、この密閉容器の改変型が開発されている(図5)。この系を用い、ヒト結核菌は複製を停止するが、低酸素条件下において数ヶ月間、代謝的には活性なままであることが示された(図12)。

【0174】

実施例4: Acr-FLAG融合タンパク質の構築

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のためのオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、作製した。これらのプライマーは、どのプライマーペアが使用されたかによって、Acrのアミノ末端またはカルボキシ末端に融合されるFLAG(Sigma)エピトープタグを加えて、ヒト結核菌からのhspX遺伝子(Acrをコードする)を増幅させるよう設計された。プライマーの設計は、これらの増幅配列のクローニングおよび発現に関与する、後の組換えDNA法を容易にするための、制限エンドヌクレアーゼ認識部位の導入をも含んだ。N末端のFLAG-Acr融合を生み出すプライマーの配列は、配列番号:1および配列番号:2であった。C末端のAcr-FLAG融合を生み出すプライマーの配列は、配列番号:3および配列番号:4であった。

【0175】

1 $\mu$ gのMTB H37RvゲノムDNAを鋳型として用い、20 mMのTris-HCl、pH 8.4、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、および2.5単位のAmpliTaq(Gibco BRL)熱安定DNAポリメラーゼを用いて、PCR反応を実行した。以下のサイクルパラメータを用いてPCRを実行した:94、5分間(1 $\times$ )、94、1分間;55、30秒間;72、2.5分間(2 $\times$ )、94、1分間;60、30秒間;72、2.5分間(30 $\times$ )、72、7分間(1 $\times$ )。PCR増幅に続き、増幅DNA断片を精製し、制限エンドヌクレアーゼによって分解し、同様に分解されたプラスミドベクターpMV261.1とライゲーション(連結)した。ライゲーションに続き、反応液によって大腸菌を形質転換し、抗生物質耐性によって陽性コロニーを選択した。選択されたコロニーを、PCRによって組換えインサートの存在についてスクリーニングし、各陽性クローンのDNA配列決定によって配列の確認を行った。その後、陽性のN末端Acr-FLAG融合プラスミドおよびC末端Acr-FLAG融合プラスミドによってスメグマ菌およびヒト結核菌の両方を形質転換し、抗生物質耐性によって形質転換コロニーを選択した。

【0176】

ウエスタンブロット法によって、融合タンパク質の発現を確認した;代表的なブロットは、図6(N末端融合)および図7(C末端融合)において示される。

【0177】

実施例5: Acrの免疫沈降

Acr-FLAG融合タンパク質を、製造業者の使用説明書に従い、シグマ社(Sigma)から得られるFLAG免疫沈降キットを用いて免疫沈降した。製造業者の使用説明書に従って、Acrに対して生じさせたポリクローナルウサギ抗体が結合されたセファロースCL4Bビーズ(Pharmacia)を用い、ミコバクテリア溶解産物について、天然Acrの免疫沈降を行った。手短に言えば、溶解産物から、セファロースビーズに非特異的に結合し得るいかなるタンパク質をも取り除くために、予備除去段階を実行した。これは、1.5 mLの微量遠心管において、975 $\mu$ lのTSA(0.01 M Tris-HCl、pH 8; 0.14 M NaCl; 0.025% NaN<sub>3</sub>)および16 $\mu$ lのMTB溶解産物(2.3 mg/mL)に50 $\mu$ lの非結合セファロースを加えることによって達成された。溶液を、常時揺り動かしながら4にて1時間インキュベートした。溶液をその後、14,000 rpmにて5秒間、遠心分離機にかけ、セファロースをペレット化し、上清を取り除き、新しい微量遠心管に移した。25 $\mu$ lの抗Acr抗体に結合させたセファロースビーズを上清に加え、常時揺り動かしながら4にて1時間インキュベートした。溶液をその後、以前に説明されたように遠心分離機にかけ、上清を除去して捨てた。セファロースペレットをその後、1) TSAに溶解した0.1%のTriton X-100、2) TSAに溶解した0.1%のTriton X-100、3) T

10

20

30

40

50

SA、4) pH 6.8の0.05 M Tris-HClの各1 mLを用いて4回洗浄した。各溶液の添加に続き、セファロースペレットを再懸濁し、5秒間遠心分離機にかけ、セファロースを再ペレット化し、洗浄上清を除去した。最終的に、40  $\mu$ lの2 $\times$ ゲル充填緩衝液 (Novex) をセファロースペレットに加え、懸濁液を56にて1.5時間インキュベートした。セファロースを再ペレット化するために最終遠心分離を行い、上清 (免疫沈降Acrタンパク質を含む) を取り除き、ウエスタンブロット法による解析のために残しておいた。

【0178】

#### 実施例6：ウエスタンブロット法

200ボルトの定電圧における、1時間の、既製の4~12% bis-Trisポリアクリルアミド勾配ゲル (Novex) を用いたドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって、免疫沈降Acrサンプルまたはミコバクテリア溶解産物を分離した。電気泳動に続き、分離されたタンパク質を、製造業者の使用説明書に従って、150 ミリアンペア定電流における1時間の電気毛管移動により、カット済みの0.2ミクロンポリビニリデンジフルオリド膜 (PVDF, Novex) に移行させた。Acrの検出のために、メタノール中に浸すことによって乾燥膜を調製し、3%のゼラチンを含むTBS Tween20 (BioRad) 中において、常時揺り動かしながら膜を1時間インキュベートすることによって、非結合PVDF表面をブロックした。膜をその後、Tween20を加えたTBSを用いて、常時揺り動かしながら各々10分間、3回洗浄した。

【0179】

1%のゼラチンを含むTween20を加えたTBSにおいて、5,000倍希釈の、Acrに対して生じさせたポリクローナルウサギ抗体、または20,000倍希釈の抗-FLAG M2モノクローナル抗体 (Sigma)、または250倍希釈のウサギ抗ホスホチロシン抗体 (Zymed) と膜を、常時揺り動かしながら1時間インキュベートすることによってAcrの検出を達成した。その後、上記に説明されるように膜を洗浄した。1%のゼラチンを含むTween20を加えたTBS中に溶解した、10,000倍希釈のビオチン化ヤギ抗ウサギIgGをその後プロットに適用し、常時揺り動かしながら1時間インキュベートした。続いて、上記に説明されるようにプロットを洗浄した。Tween20を加えたTBS中において、10,000倍希釈のストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (AP) 結合体とプロットの最終インキュベーションを、常時揺り動かしながら30分間行った。APの存在の検出は、NBT+BCIP (Novex) 溶液中におけるプロットのインキュベーションによって達成された。染色が望ましいレベルに達した時点で、インキュベーションを中断し、水中におけるプロットのさらなる洗浄によって停止させた。プロットは記録のために乾燥させた。

【0180】

図8は、説明されるように調製された、全細胞ミコバクテリア細胞溶解産物のウエスタンブロットから切り出された5つのストリップを示す；矢印は、組換えAcrタンパク質の位置を示す。ストリップは、図に示した一次抗体を用いて染色バンドを展開した。対照抗体に加え、このプロットは、最終のストリップにおけるチロシンリン酸化の存在を示す。

【0181】

図9は、説明されるように調製された、図面の簡単な説明において示される条件下にて増殖させたヒト結核菌の培養上清からの2つのウエスタンブロットを示す。図9Aは、ウサギ抗Acr抗体をプローブとして解析したものである；図9Bは、対照プロットである。Acrタンパク質は、7日間および12ヶ月間の低酸素培養およびインビトロの肉芽腫において検出される。12ヶ月間の培養およびインビトロの肉芽腫の上清においては、より低い分子量の変異体が認められる。比較のため、図11では、図に示した条件下にて培養されたヒト結核菌からの培養上清のクーマシー染色SDS-PAGEゲルを示す。

【0182】

#### 実施例7：二次元ゲル電気泳動

Acr-FLAG融合プラスミドを有するスメグマ菌およびヒト結核菌の溶解産物を調製した。細菌の懸濁培養を遠心分離機にかけること (5,000 rpm、10分間) によってペレット化し、リン酸緩衝液 (PBS) で細菌のペレットを洗浄した。ペレットをその後、1 mLの9 M 尿素

中にて再懸濁し、懸濁液を、およそ200 $\mu$ lの直径0.1 mmガラスビーズ (Biospec products) を含む2 mLの微量遠心管に移した。細胞をその後、ミニビーズビーター (Minibeadbeater) (Biospec products) における急速な振とう (3回、各1分間) によって溶解した。溶解に続き、遠心分離によって細胞の破砕物およびガラスビーズをペレット化し、上清を取り除いた。比色BioRadタンパク質アッセイ (BioRad) を用いてタンパク質の定量を行った。

#### 【0183】

一次元目におけるタンパク質サンプルの分離のために、92.5 $\mu$ lの可溶性緩衝液 (9 M 尿素、140 mM DTT、4% Triton X-100) に150 $\mu$ gのタンパク質を加え、9 M 尿素によって最終容量185 $\mu$ Lとした。室温にて常時揺り動かしながら、懸濁液を1時間インキュベートした。このインキュベーションに続き、1 $\mu$ lのBiolytes電解質溶液 (BioRad、最終濃度0.2%)、および、プロモフェノールブルー (Fisher) の幾つかの結晶を加えた。IPGストリップの水和、および、タンパク質溶液のストリップへの適用を、IPGストリップ水和装置 (Pharmacia) において一晩中に行った。水和に続き、ストリップを、以下のパラメータを用いてPharmacia EPS 3500 XL電気泳動装置を使用し、LKB MultiPhor II装置 (Pharmacia) において電気泳動に供した：350 V、30分間、350~3500 V (1.5時間勾配)、3500 V、3.5時間、最終的に泳動時間15,200 ボルトアワーを与える。

10

#### 【0184】

二次元目を行うために、分離したIPGストリップを、2% w/v DTT (10分間)、および、2.5%のヨードアセトアミド (10分間) を含む、平衡化緩衝液中 (6 M 尿素、0.375 M Tris、pH 8.8、2% SDS、および20% グリセロール) において平衡化させた。平衡化ストリップを、製造業者の使用説明書に従い、Criterion (BioRad) 8~16% ポリアクリルアミドゲル上において、200ボルト定電圧において1時間分離させた。

20

#### 【0185】

図10は、低酸素条件下において増殖させたヒト結核菌から採取されたサンプルの、代表的な二次元ゲル電気泳動解析である。Acrタンパク質は、丸によって示される。

#### 【0186】

実施例8：Acrの検出

クローン化ヒト結核菌 Acrタンパク質に対して生じさせたポリクローナル抗体を用い、低酸素チェンバーおよびインビトロの肉芽腫モデルからの培養上清において、分泌された細菌のAcrを検出した (図9)。エアロゾル感染モルモット肺肉芽腫組織におけるミコバクテリアを検出するためにも、Acrタンパク質に対するポリクローナル抗血清を使用した (図1C)。

30

#### 【0187】

Acrタンパク質は、低酸素増殖させたヒト結核菌からの上清および細胞溶解産物においては検出されたが、好気増殖させたヒト結核菌からのものでは検出されなかった (図9)。ヒト結核菌溶解産物からAcrを免疫沈降させた。低酸素培養、または、感染させたインビトロの肉芽腫においては、Acrの分子量の変化が検出されたが、好気増殖培養においては検出されなかった (図9)。ヒト結核菌 *acr* mRNAは、低酸素培養においては検出されたが、好気培養では検出されなかった、ならびに、*acr* mRNAおよび真核細胞アクチンmRNAは、感染モルモット肺においては検出されたが、非感染対照モルモット肺では検出されなかった (図4)。

40

#### 【0188】

本開示は、インビトロの肉芽腫モデルおよび使用方法、ならびに、被験者における潜伏性結核を検出するための免疫学的方法を提供する。インビトロの肉芽腫モデルは、例えば、潜伏期特異的抗体を同定するために、ならびに、薬剤および免疫刺激化合物をスクリーニングするために、使用することができる。免疫学的方法は、例えば、被験者から対応する抗体を検出するために、潜伏期特異的ヒト結核菌抗原を使用する段階、または、潜伏期特異的抗原を検出するために抗体を使用する段階を含み得る。本開示は、そのような方法において使用するための、潜伏期特異的抗原 (およびそれらの対応する抗体) を同定するた

50

めの方法、ならびに、*acr*-クリスタリンのような特定の潜伏期特異的抗原をさらに提供する。説明される方法の厳密な詳細を、説明される開示の精神から逸脱せずに、変化または改変し得ることは明らかとなる。本発明者らは、下記の請求項の範囲内および精神内にある、全てのそのような改変および変更を主張する。

【図面の簡単な説明】

【0189】

【図1】図1は、エアロゾル感染させたモルモットの肺肉芽腫組織の、一連の顕微鏡写真である。図1Aは、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)によって染色された組織を示す。図1Bは、抗酸性染色によって染色された組織を示す；*Mycobacterium*属を表す部分は、矢印によって示される。図1Cは、*acr*タンパク質に対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色を受けた組織を示す；矢印は、2つの染色された*Mycobacteria*を示す。

10

【図2】図2は、リボヌクレアーゼ保護アッセイ(RPA)のプロットである。レーン1~5は、示されるような、様々な負の対照および正の対照である。レーン6~9は、好氣的に、または低酸素チェンバー中のいずれかにて5日間または7日間増殖させた*Mycobacteria*に由来するmRNAへのハイブリダイゼーションを示す。*acr* mRNAは、4つの時点全てにおいて認められた一方、*rpoB* mRNAは、好氣的に増殖させた培養においてのみ認められた。

【図3】図3は、RPAプロットである。レーン1および2は、インビトロの肉芽腫モデルにおいて、7日間または12日間インキュベーションした後に抽出された*Mycobacteria*に由来するmRNAへのハイブリダイゼーションを示す。*acr*および*rpoB*の双方のmRNAは、両時点において認められ、肉芽腫において好気性細菌が存在していることを示す可能性が高い。レーン3および4は正の対照である；各々、*acr* mRNA、ならびに*acr* DNAおよび*rpoB* DNAである。

20

【図4】図4は、RT-PCRの結果を示す一組のアガロースゲルである。*acr*転写産物は、インビボモデルにおいて、より長い感染により明らかに誘導され(レーン2、3および4)、低酸素培養においてはさらにより強く誘導される(レーン5)。 注解：レーン1、非感染モルモット肺；レーン2、MTB感染モルモット肺 - 3週間のP.I；レーン3、MTB感染モルモット肺 - 5週間のP.I；レーン4、MTB感染モルモット肺 - 10週間のP.I；レーン5、MTB - 7日間の低酸素培養。

【図5】図5は、低酸素増殖容器の例の概要図である。

30

【図6】図6は、形質転換体3におけるN末端構築物*acr*-N-FLAGの生成を示す、一組のウエスタンプロットである。図6Aにおけるプロットは、抗*acr*ポリクローナル免疫グロブリンをプローブとして解析された。図6Bにおけるプロットは、抗FLAGエピトープ免疫グロブリンをプローブとして解析された。

【図7】図7は、2つのスメグマ菌形質転換菌株における、対して、非形質転換スメグマ菌およびヒト結核菌対照における、C末端構築物*acr*-C-FLAGの生成を示す、全細胞溶解産物の一組のウエスタンプロットである。図7Aにおけるプロットは、抗FLAG免疫グロブリンをプローブとして解析した。図7Bにおけるプロットは、抗*acr*免疫グロブリンをプローブとして解析した。

【図8】図8は、全細胞溶解産物のウエスタンプロットから切り出した5つのストリップを示す；矢印は、組換え*acr*タンパク質の位置を示す。ストリップは、図に示した一次抗体を用いて展開した。対照抗体に加え、このプロットは、最終ストリップにおけるチロシンリン酸化の存在を示す。

40

【図9】図9は、様々な条件下において増殖させたヒト結核菌の培養上清からの2つのウエスタンプロットを示す。図9Aは、ウサギの抗*acr*抗体をプローブとして用いて解析された；図9Bは、対照プロットである。タンパク質は、7日間および12ヶ月間の低酸素培養、ならびにインビトロの肉芽腫において検出される。より低い分子量の変異体が、12ヶ月の培養およびインビトロの肉芽腫の上清において認められる。 注解：レーン1、分子量マーカー；レーン2、3日間の好気増殖；レーン3、7日間の好気増殖；レーン4、7日間の低酸素増殖；レーン5、空レーン；レーン6、7日間の反応；レーン7、12ヶ月間の反応；レーン8

50

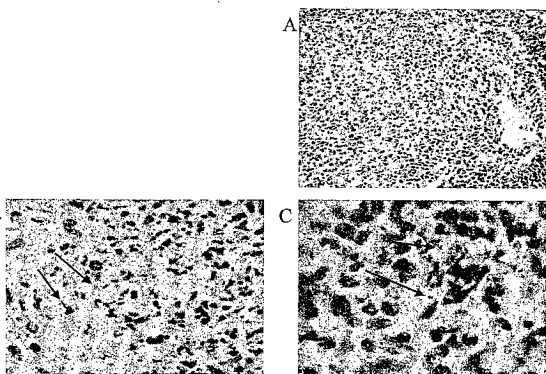
、対照細胞；レーン9、7日間のインビトロの肉芽腫；レーン10、ヒト結核菌溶解産物。

【図10】図10は、低酸素条件下にて増殖させたヒト結核菌から採取されたサンプルの二次元ゲル電気泳動解析である。Acrタンパク質は、丸によって示される。

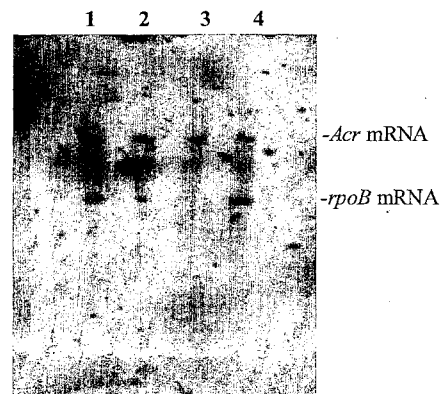
【図11】図11は、様々な条件下において培養された、ヒト結核菌からの培養上清の、クーマシー染色したSDS-PAGEゲルである。 注解：レーン1、分子量マーカー；レーン2、5日間の好気増殖（対数増殖）；レーン3、12ヶ月間の低酸素増殖；レーン4、7日間の低酸素増殖；レーン5、30時間の好気増殖 再活性化（対数増殖）；レーン6、分子量マーカー。

【図12】図12は、低酸素増殖条件下および好気増殖条件下におけるヒト結核菌の増殖（580 nmにおける光学密度によって測定される）を示すグラフである。

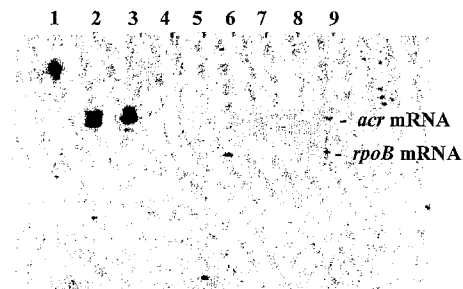
【図1】



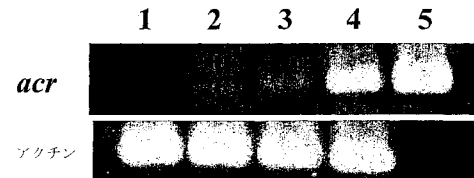
【図3】



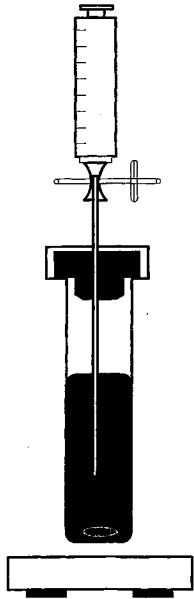
【図2】



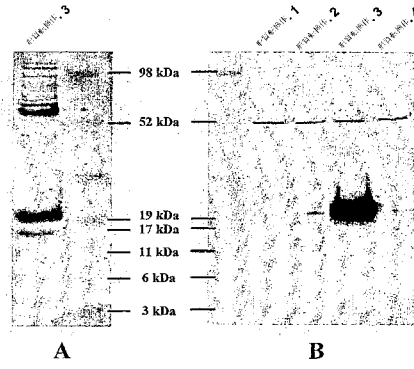
【図4】



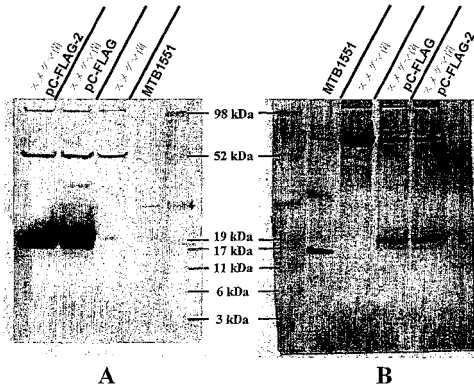
【 図 5 】



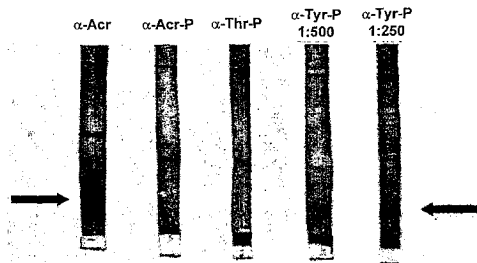
【 図 6 】



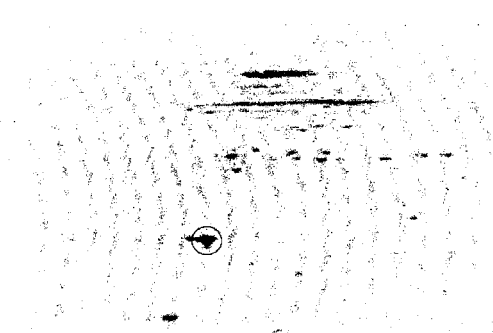
【 図 7 】



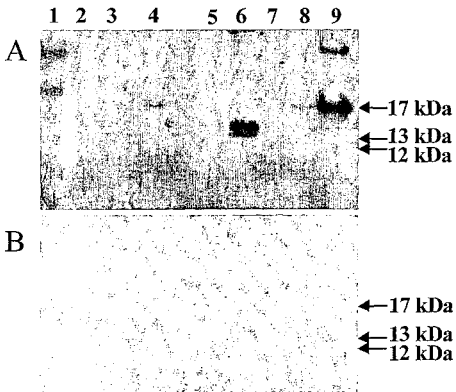
【 図 8 】



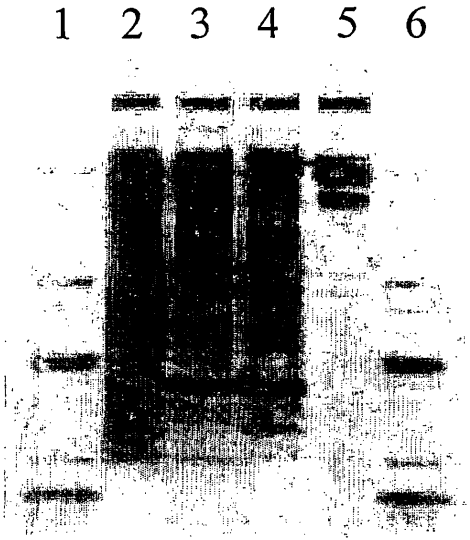
【 図 10 】



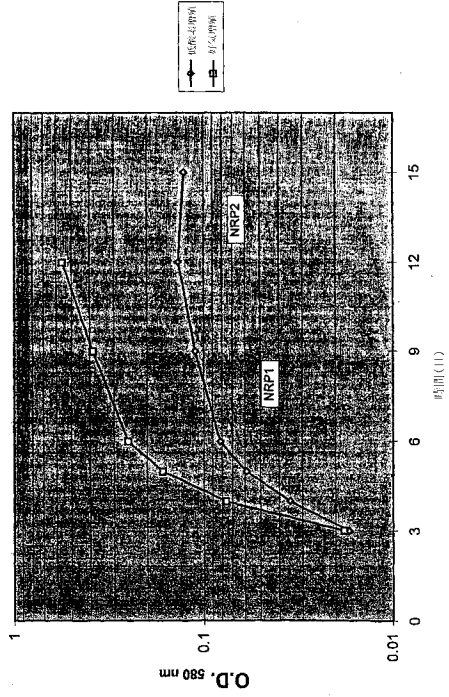
【 図 9 】



【図 1 1】



【図 1 2】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/054073 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/569 BEALL, David, S. [US/US]; 2352 Sanford Road, Decatur, GA 30033 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/00309
- (22) International Filing Date: 7 January 2002 (07.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/260,348 8 January 2001 (08.01.2001) US  
60/311,235 9 August 2001 (09.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES [US/US]; Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road N.E. (H267), Atlanta, GA 30333 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): QUINN, Frederick, D. [US/US]; 3243 Wilshire Drive, Avondale Estates, GA 30002 (US); BIRKNESS, Kristin, A. [US/US]; 268 Eighth Street #7, Atlanta, GA 30309 (US); DESLAURIERS, Manon [CA/US]; 4006 Northlake Creek Court, Tucker, GA 30084 (US); KING, Peter [US/US]; 4709 Wood Creek Drive, Nacogdoches, TX 75961 (US).
- (74) Agent: HARDING, Tanya, M.; Klarquist, Sparkman, LLP, Suite 1600, One World Trade Center, 121 SW Salmon Street, Portland, OR 97204 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, 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, KH, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HE, IE, IT, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/054073 A2

(54) Title: LATENT HUMAN TUBERCULOSIS MODEL, DIAGNOSTIC ANTIGENS, AND METHODS OF USE

(57) Abstract: Provided herein is an *in vitro* granuloma model and methods of its use. Methods of detecting and/or diagnosing latent tuberculosis in a subject are also provided, as are latency-specific antigens (and antibodies thereto), such as  $\alpha$ -crystallin, and methods of identifying and using such molecules. Also provided are immunostimulatory compositions, for instance for use in eliciting an immune response in a subject, such as an immune response to a latent tuberculosis infection. Kits for carrying out the provided methods are also described.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 1 -

**LATENT HUMAN TUBERCULOSIS MODEL, DIAGNOSTIC ANTIGENS,  
AND METHODS OF USE**

**REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

5 This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/260,348, filed January 8, 2001, and U.S. Provisional Application No. 60/311,235, filed August 9, 2001.

**STATEMENT OF GOVERNMENT SUPPORT**

10 This invention was made by the Centers for Disease Control and Prevention, an agency of the United States Government. Therefore, the U.S. Government has certain rights in this invention.

**FIELD OF THE DISCLOSURE**

15 The present disclosure relates to the field of mycobacterial latency, and in particular relates to an *in vitro* granuloma model for the study of mycobacteria and for the development of tuberculosis drug and vaccine candidates, and to the detection of latent mycobacterial infection using immunoassays.

**BACKGROUND**

20 Approximately every ten seconds, a person dies of tuberculosis somewhere in the world. Tuberculosis is the world's number one killer among infectious diseases and the leading cause of death among women of reproductive age. Although developing countries bear the greatest burden of disease, the United States is greatly affected by tuberculosis, reporting 16,377 cases in 2000.

25 The infectious agent causing almost all cases of tuberculosis is *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). *M. tuberculosis* is easily spread between individuals through the air. A single cough by an infected individual can generate as many as 3000 infected droplet nuclei, while less than 10 bacilli may initiate a pulmonary infection in a susceptible individual. Because simply inhaling an airborne pathogen may infect individuals, tuberculosis outbreaks are difficult to contain and require isolating the infected individuals in negative air pressure rooms.

30 Although it was believed that tuberculosis would eventually be eliminated after the development of antibiotics in the 1950s, in 1999, tuberculosis was labeled as a global health emergency by the World Health Organization. One of the major reasons for the perseverance of tuberculosis is the evolution of multi-drug resistant strains. Multi-drug resistant strains have evolved in part due to infected patients' poor compliance with drug therapy, which lasts for a period of at least six months. One multi-drug resistant strain, strain W, has evolved resistance to all first-line drugs (isoniazid, rifampin, ethambutol, and pyrazinamide), as well as one second-line drug (kanamycin). It is therefore evident that tuberculosis continues to be a serious health threat to individuals worldwide.

35 Initial infection with *M. tuberculosis* only rarely leads to immediate disease because the infection is typically controlled by the host's immune system. Among people infected with *M. tuberculosis*, approximately 5% manifest the disease within a few years after infection. Upon initial

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 2 -

infection, the mycobacteria enter unactivated macrophages and multiply therein. Following a rapid growth phase, infected macrophages and their bacillary cargo are surrounded and walled off by newly recruited activated macrophages. This walling off of the infected macrophages results in the characteristic granuloma. The granuloma is a compact, organized collection of activated  
5 macrophages, including epithelioid and multinucleated giant cells, surrounded by T lymphocytes, and later by fibroblasts and collagen, which aggregate around the macrophage core.

Mycobacterial dormancy results in a disease stage termed latent tuberculosis. An individual with latent tuberculosis may later develop a case of reactivated tuberculosis, and in fact, the majority of the tuberculosis cases reported in the United States are the result of reactivation of a mycobacterial infection and not an initial infection. (*Am. Rev. Respir. Dis.* 146:1623-1633, 1992). Reactivation of  
10 the *M. tuberculosis* bacilli usually occurs in the apex of the lung where large numbers of tubercle bacilli cause necrosis of the small bronchi of the lung. The characteristic bloodstained sputum of tuberculosis results from the erosion of small blood vessels during this necrotic process.

Approximately one-third of the population worldwide has been estimated to be latently  
15 infected with *M. tuberculosis*. (Sudre *et al.*, *Bull. W.H.O.* 70:149-159, 1992). Currently, the tuberculin skin test is the only available diagnostic for those infected with *M. tuberculosis*. Unfortunately, no currently available test can specifically identify latently infected individuals. The tuberculin test is only capable of identifying all individuals either exposed to the pathogen or vaccinated against the pathogen. Due to the high number of latently infected individuals and the risk  
20 of reactivation of tuberculosis in those individuals, diagnostics and therapeutics targeted to latent tuberculosis need to be developed. In addition, the development of an *in vitro* granuloma model for the study of mycobacteria and for the development of tuberculosis drug and vaccine candidates would be desirable.

#### 25 SUMMARY OF THE DISCLOSURE

An *in vitro* model for tuberculosis latency is described in certain embodiments of this disclosure. In particular, an *in vitro* granuloma model and methods for using the model are provided. In some embodiments, the *in vitro* granuloma model contains human peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages and mycobacteria. In some embodiments these components are  
30 combined in a low-attachment container. In specific examples, the *in vitro* granuloma model further contains fibroblasts, for example, human lung fibroblasts.

Further embodiments are methods for using the *in vitro* granuloma model to screen new or known compounds for their effects on granuloma, for instance to screen candidate tuberculosis drugs, to identify candidate tuberculosis vaccines, and to analyze and characterize the process of granuloma  
35 formation and granuloma necrosis.

Also provided herein are immunological methods for detecting latent tuberculosis infections. Such methods are based on detecting specific bacterial antigens (or antibodies against these antigens) that are present in a subject with tuberculosis only (or predominately) during latent infection. By way of example, one such latency-specific antigen is alpha-crystallin (Acr).

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 3 -

Further embodiments include an immunological assay for detection of latent tuberculosis in a subject, which assay involves contacting a biological sample from the subject, wherein the sample is suspected of containing a first latency-specific binding partner (LSBP) (such as a latency-specific antigen or an antibody thereto), with a second (corresponding) LSBP, and detecting binding between the first LSBP and the corresponding LSBP. Binding between the first and second LSBPs is indicative of latent tuberculosis in the subject. Thus, in one example where the first LSBP is a *M. tuberculosis* latency-specific antigen (for instance, *Acr* or an immunogenic fragment thereof), the corresponding LSBP may be an antibody that is capable of binding to that antigen. Where the first LSBP is an antibody, the corresponding LSBP (to make a specific binding pair) is an antigen.

Also provided are kits for the detection of latent tuberculosis in a subject, which kits include at least one LSBP (e.g., a latency-specific antigen or antibody thereto) and instructions for carrying out an immunological assay to detect binding of the LSBP to a cognate LSBP found in a biological sample.

Also provided are kits comprising one or more elements of an *in vitro* granuloma model, for instance cell culture media and, optionally, low-attachment containers and/or instructions for growing *in vitro* granulomas.

Further embodiments provide methods for eliciting an immune response in a subject by administering to the subject an immune stimulatory amount of a *M. tuberculosis* latency-specific antigen (e.g., *Acr*), or immunogenic fragment thereof. Compositions containing such immunostimulatory molecules, and kits for their administration, are also provided.

The foregoing and other features and advantages will become more apparent from the following detailed description of several embodiments, which proceeds with reference to the accompanying figures and sequence listing.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 is a series of micrographs of aerosol-infected guinea pig lung granuloma tissue. FIG. 1A shows tissue that was stained with hematoxylin and eosin (H & E). FIG. 1B shows tissue that was stained with acid-fast stain; representative mycobacterium are indicated by the arrows. FIG. 1C shows tissue that was subjected to immunohistochemical staining using a polyclonal antibody against the *Acr* protein; the arrows indicate two stained mycobacteria.

FIG. 2 is a ribonuclease protection assay (RPA) blot. Lanes 1-5 are various negative and positive controls, as indicated. Lanes 6-9 represent hybridizations to mRNA from mycobacteria grown 5 or 7 days either aerobically or in the anoxic chamber. *Acr* mRNA was observed at all four time points while *rpoB* mRNA was only observed in aerobically grown cultures.

FIG. 3 is a RPA blot. Lanes 1 and 2 represent hybridizations to mRNA from mycobacteria extracted after 7- or 12-day incubations in the *in vitro* granuloma model. Both *acr* and *rpoB* mRNA were observed at both time points, likely indicating that aerobic bacilli were present in the granuloma. Lanes 3 and 4 are positive controls; *acr* mRNA and *acr* and *rpoB* DNA, respectively.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 4 -

FIG. 4 is a pair of agarose gels, showing the results of RT-PCR. *Acr* transcript is clearly induced with longer infection in the *in vivo* model (lanes 2, 3, and 4), and is even more strongly induced in anoxic culture (lane 5).

Key: Lane 1, Uninfected Guinea Pig Lung; lane 2, MTB-Infected Guinea Pig Lung – 3 weeks P.I.; lane 3, MTB-Infected Guinea Pig Lung – 5 weeks P.I.; lane 4, MTB-Infected Guinea Pig Lung – 10 weeks P.I.; lane 5, MTB-7 Day Anoxic Culture.

FIG. 5 is a schematic drawing of an example anoxic growth vessel.

FIG. 6 is a pair of Western blots demonstrating the production of the N-terminal construct *Acr-N-FLAG* in transformant 3. The blot in FIG. 6A was probed with anti-*Acr* polyclonal immunoglobulin. The blot in FIG. 6B was probed with anti-FLAG epitope immunoglobulin.

FIG. 7 is a pair of Western blots of whole cell lysates demonstrating the production of the C-terminal construct *Acr-C-FLAG* in two *Mycobacterium smegmatis* transformed strains versus non-transformed *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* controls. The blot in FIG. 7A was probed with anti-FLAG immunoglobulin. The blot in FIG. 7B was probed with anti-*Acr* immunoglobulin.

FIG. 8 shows five strips cut from a Western blot of whole cell lysates; the arrows indicate the location of recombinant *Acr* protein. The strips were developed with the indicated primary antibodies. In addition to the control antibody, this blot demonstrates the presence of tyrosine phosphorylation in the final strip.

FIG. 9 shows two Western blots from culture supernatants of *M. tuberculosis* bacilli grown under various conditions. FIG. 9A was probed using rabbit anti-*Acr* antibody; FIG. 9B is a control blot. Protein is detected in 7 day and 12 month anoxic cultures and *in vitro* granuloma. Lower molecular weight variants are observed in the 12-month and *in vitro* granuloma supernatants.

Key: Lane 1, molecular weight marker; lane 2, 3 day aerobic growth; lane 3, 7 day aerobic growth; lane 4, 7 day anoxic growth; lane 5, blank; lane 6, 7 day react.; lane 7, 12 months react.; lane 8, control cells; lane 9, 7 day *in vitro* granulomas; lane 10, *M. tuberculosis* lysate.

FIG. 10 is a two-dimensional gel electrophoresis analysis of a sample taken from *M. tuberculosis* grown under anoxic conditions. *Acr* protein is indicated by the circle.

FIG. 11 is a Coomassie stained SDS-PAGE gel of culture supernatants from *M. tuberculosis* bacilli cultured under a variety of conditions.

Key: Lane 1, MW marker; lane 2, 5-day aerobic (logarithmic); lane 3, anoxic 12 months; lane 4, anoxic 7 days; lane 5, 30-hour aerobic reactivated (logarithmic); lane 6, MW marker.

FIG. 12 is a graph showing the growth (measured by optical density at 580 nm) of *M. tuberculosis* under anoxic and aerobic growth conditions.

35

#### SEQUENCE LISTING

The nucleic and amino acid sequences listed in the accompanying sequence listing are shown using standard letter abbreviations for nucleotide bases, and three letter code for amino acids, as defined in 37 C.F.R. 1.822. Only one strand of each nucleic acid sequence is shown, but the

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 5 -

complementary strand is understood as included by any reference to the displayed strand. In the accompanying sequence listing:

SEQ ID NOs: 1 and 2 are the sequences of primers used to generate the N-terminal FLAG-Acr fusion.

5 SEQ ID NOs: 3 and 4 are the sequences of primers used to generate the C-terminal Acr-FLAG fusion.

#### DETAILED DESCRIPTION

##### I. Abbreviations

10	Acr	alpha ( $\alpha$ ) crystallin
	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
	HS	human serum
	LSA	latency-specific antigen
	LSBP	latency-specific binding partner
15	PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
	RPA	ribonuclease protection assay
	RT-PCR	reverse-transcription polymerase chain reaction

##### II. Terms

20 Unless otherwise noted, technical terms are used according to conventional usage.

Definitions of common terms in molecular biology may be found in Benjamin Lewin, *Genes V*, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); and Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk*

25 *Reference*, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

In order to facilitate review of the various embodiments of the disclosure, the following explanations of specific terms are provided:

The terms "a," "an," and "the" as used herein are defined to mean one or more and include the plural unless the context is inappropriate.

30 The term "antibody" refers to a protein (or protein complex) that includes of one or more polypeptides substantially encoded by immunoglobulin genes or fragments of immunoglobulin genes. The recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon and mu constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha, delta, or

35 epsilon, which in turn define the immunoglobulin classes, IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively.

The basic immunoglobulin (antibody) structural unit is generally a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD). The N-terminus of each chain defines a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The terms

40 "variable light chain" ( $V_L$ ) and "variable heavy chain" ( $V_H$ ) refer, respectively, to these light and heavy chains.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 6 -

As used herein, the term antibodies includes intact immunoglobulins as well as a number of well-characterized fragments produced by digestion with various peptidases, or genetically engineered "artificial" antibodies. Thus, for example, pepsin digests an antibody below the disulfide linkages in the hinge region to produce  $F(ab)'$ , a dimer of Fab which itself is a light chain joined to  $V_H-C_H 1$  by a disulfide bond. The  $F(ab)'$  may be reduced under mild conditions to break the disulfide linkage in the hinge region thereby converting the  $F(ab)'$  dimer into an Fab' monomer. The Fab' monomer is essentially a Fab with part of the hinge region (see, *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y., 1993). While various antibody fragments are defined in terms of the digestion of an intact antibody, it will be appreciated that Fab' fragments may be synthesized de novo either chemically or by utilizing recombinant DNA methodology. Thus, the term antibody as used herein also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies or synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies.

Antibodies for use in the methods and devices of this disclosure can be monoclonal or polyclonal. Merely by way of example, monoclonal antibodies can be prepared from murine hybridomas according to the classical method of Kohler and Milstein (*Nature* 256:495-497, 1975) or derivative methods thereof. Detailed procedures for monoclonal antibody production are described in Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1988).

The term "antigen" refers to a molecule, or fragment thereof, which can induce an immune response in a mammal. The term includes immunogens and regions responsible for antigenicity or antigenic determinants. A chemical or biochemical structure, determinant, antigen or portion thereof that is capable of inducing the formation of an antibody can be referred to as being "antigenic." "Antigenic determinant" refers to a region of a specified protein that is recognized by an antibody.

When referring to macrophages, the term "autologous" refers to macrophages that are derived from the same individual as the peripheral blood mononuclear cells. Alternatively, a macrophage cell line such as, but not limited to the THP-1 macrophage cell line is used as the macrophage component of the granuloma model. In one embodiment of the present disclosure, the beginning concentration of the autologous macrophages is between approximately  $5 \times 10^4$  and  $1 \times 10^6$ , per two-milliliter sample, and optionally at a beginning concentration of approximately  $1 \times 10^6$ .

A "biological sample" is a sample of bodily fluid or tissue used for laboratory testing or examination. As used herein, biological samples include all clinical samples useful for detection of microbial infection in subjects.

Tissue samples may be taken from the oropharyngeal tract, for instance from lung or bronchial tissue. Samples can be taken by biopsy (such as during a bronchoscopy) or during autopsy examination, as appropriate. Biological fluids include blood, derivatives, and fractions of blood such as serum, urine, semen and fluids of the oropharyngeal tract, such as sputum.

Examples of specimens for use with the current disclosure for the detection of latent *M. tuberculosis* include conventional clinical samples, for instance blood or blood-fractions (e.g., serum), urine, bronchoalveolar lavage (BAL), sputum, and induced sputum samples. Techniques for acquisition of such samples are well known in the art. Blood and blood fractions can be prepared in

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 7 -

traditional ways. Oropharyngeal tract fluids can be acquired through conventional techniques, including sputum induction, bronchoalveolar lavage (BAL), and oral washing. Obtaining a sample from oral washing involves having the subject gargle with an amount normal saline for about 10-30 seconds and then expectorate the wash into a sample cup.

5 The "condition" or "conditions" under which a DNA strand is synthesized include the presence of nucleotides, cations, and appropriate buffering agents in amounts and at temperatures such that the nucleic acid molecule and a DNA primer will anneal and oligonucleotides will be incorporated into a synthesized DNA strand.

10 As used herein, the terms "detecting" or "detection" refers to quantitatively or qualitatively determining the presence of a biomolecule under investigation.

"Epitope tags" are short stretches of amino acids to which a specific antibody can be raised, which in some embodiments allow one to specifically identify and track a protein tagged with the epitope. Detection of the tagged molecule can be achieved using a number of different techniques. Examples of such techniques include: immunohistochemistry, immunoprecipitation, flow cytometry, 15 immunofluorescence microscopy, ELISA, immunoblotting ("western"), and affinity chromatography. Examples of epitope tags include FLAG, T7, HA (hemagglutinin) and myc.

As used herein, the term "granuloma" refers to a compact, organized collection of activated macrophages, including epithelioid and multinucleated giant cells, surrounded by T lymphocytes, fibroblasts and collagen. It is to be understood, however, that the term "*in vitro* granuloma" is not 20 limited to a collection of cells as described above. The term "*in vitro* granuloma" refers to a collection or aggregate of cells containing at least human peripheral blood mononuclear cells and autologous macrophages, wherein the collection or aggregate of cells mimics the granuloma as described above. Whether the *in vitro* granuloma mimics the granuloma as described above, and as found *in vivo*, is determined by methods known to those skilled in the art, such as microscopic examination of the cell aggregates, phenotypic analysis of cells within the aggregates, via FACS 25 (fluorescence activated cell sorter) analysis for example, and analysis of cytokine production by the cells within the aggregates.

As used herein, the term "human peripheral blood mononuclear cells" (PBMCs) includes, but is not limited to, monocytes, B lymphocytes, and T lymphocytes. The human PBMCs included in 30 examples of the *in vitro* granuloma model can be monocytes and T lymphocytes. Optionally, in certain embodiments the *in vitro* granuloma model contains monocytes at a beginning concentration of between approximately  $5 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$ , per two milliliter sample, and T lymphocytes at a beginning concentration of between approximately  $1 \times 10^4$  and  $1 \times 10^6$ . In some embodiments, the *in vitro* granuloma model contains monocytes at a beginning concentration of approximately  $1 \times 10^5$  35 and T lymphocytes at a beginning concentration of approximately  $1 \times 10^6$ . It is to be understood that the term "beginning concentration" refers to the concentration of material as it is added to a low attachment container.

In some embodiments, the *in vitro* granuloma model contains fibroblasts, such as human lung fibroblasts. Optionally, the fibroblasts can be added at a beginning concentration of between

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 8 -

approximately  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$ , for instance, at a beginning concentration of approximately  $5 \times 10^5$ .

A "low attachment container" is a container whose surface inhibits or reduces the attachment of cells in culture. In some embodiments, the low attachment container is a low attachment tissue culture dish such as, but not limited to, the COSTAR™ Ultra Low Attachment Surface or Clusters (Costar Corp., Cambridge, MA) used in accordance with the manufacturer's recommended procedures. Optionally, the low attachment container can have a surface composed of a covalently bound hydrogel layer that is hydrophilic and neutrally charged, so that it inhibits (for instance, by 5%, 10%, 20%, 40%, 50% or more compared to a non-coated container) the attachment and activation of macrophages and neutrophils. Because proteins and other biomolecules passively adsorb to surfaces through hydrophobic and ionic interactions, a hydrogel surface naturally inhibits non-specific immobilization via these forces, thus inhibiting subsequent cell attachment. Optionally, the surface of the low attachment container may be rehydrated at a temperature consistent with the application or cell growth requirements of the cells described above and the rehydration media aspirated or decanted prior to the addition of cells and fresh media. Alternatively, the cells may be added directly to the rehydration media.

"*In vitro* amplification" refers to techniques that increase the number of copies of a nucleic acid molecule in a sample or specimen. An example of *in vitro* amplification is the polymerase chain reaction (PCR), in which a biological sample collected from a subject is contacted with a pair of oligonucleotide primers, under conditions that allow for the hybridization of the primers to a nucleic acid template in the sample. The primers are extended under suitable conditions, dissociated from the template, and then re-annealed, extended, and dissociated to amplify copies of the nucleic acid. Other examples of *in vitro* amplification techniques include strand displacement amplification (see U.S. Patent No. 5,744,311); transcription-free isothermal amplification (see U.S. Patent No. 6,033,881); repair chain reaction amplification (see WO 90/01069); ligase chain reaction amplification (see EP-A-320 308); gap filling ligase chain reaction amplification (see U.S. Patent No. 5,427,930); coupled ligase detection and PCR (see U.S. Patent No. 6,027,889); and NASBA™ RNA transcription-free amplification (see U.S. Patent No. 6,025,134). The product of *in vitro* amplification may be characterized by electrophoresis, restriction endonuclease cleavage patterns, oligonucleotide hybridization or ligation, and/or nucleic acid sequencing, using standard techniques.

An "isolated" biological component (such as a nucleic acid molecule, protein or organelle) has been substantially separated or purified away from other biological components in the cell of the organism in which the component naturally occurs, *i.e.*, other chromosomal and extra-chromosomal DNA and RNA, proteins and/or organelles. Nucleic acids and proteins that have been "isolated" include nucleic acids and proteins purified by standard purification methods. The term also embraces nucleic acids and proteins prepared by recombinant expression in a host cell, as well as chemically synthesized nucleic acids. As with the term purified, isolated is a relative term.

A "label" is any molecule or composition that is detectable by, for instance, spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, electrical, optical, or chemical means. Examples of

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 9 -

labels, including radioactive isotopes, enzyme substrates, co-factors, ligands, chemiluminescent or fluorescent agents, haptens, enzymes, colloidal gold particles, colored latex particles, and epitope tags, have been disclosed previously and are known to those of ordinary skill (see, for instance, U.S. Patents No. 4,275,149; 4,313,734; 4,373,932; and 4,954,432).

5 The attachment of a compound (e.g., an antibody) to a label can be through covalent bonds, adsorption processes, hydrophobic and/or electrostatic bonds, as in chelates and the like, or combinations of these bonds and interactions and/or may involve a linking group.

10 "Latent tuberculosis" refers to a stage in the *M. tuberculosis* infection where the bacilli remain viable but are slowly replicating or non-replicating, may be encapsulated in localized lesions within the lung, and do not cause active necrotic disease. The latent stage may exist for the remainder of a host's life, or the infection may reactivate during, for instance, a period of decreased host immunity or in response to other stressors. Though latent *M. tuberculosis* infections have not previously been able to be specifically identified, they are within the group of individuals that possess a positive tuberculin skin test but do not possess the characteristic symptoms of active disease.

15 A "latency specific antigen" is an antigen that is expressed at higher levels (or exclusively) by a *M. tuberculosis* bacterium in its dormant or stationary rather than its active or logarithmic phase of growth. Latency specific antigens (LSAs) can be identified, for instance, by comparing the protein expression found in *in vitro* cultured *M. tuberculosis* grown under standard aerobic/logarithmic conditions with bacilli grown under conditions that mimic latency (e.g., in a latency model).

20 A "linking group" is a chemical arm between two compounds, for instance a compound and a label (e.g., an antibody and a label). To accomplish the requisite chemical structure of the linkage, each of the reactants must contain a reactive group. Representative combinations of such groups are amino with carboxyl to form amide linkages; carboxy with hydroxy to form ester linkages; amino with alkyl halides to form alkylamino linkages; thiols with thiols to form disulfides; or thiols with maleimides or alkylhalides to form thioethers. Hydroxyl, carboxyl, amino and other functionalities, where not present in the native compound, may be introduced by known methods.

25 Likewise, a wide variety of linking groups may be employed. The structure of the linkage should be a stable covalent linkage formed to attach two compounds to each other (e.g., the label to the antibody). In some cases the linking group may be designed to be either hydrophilic or hydrophobic in order to enhance a desired characteristic, for instance a binding characteristic of a modified ligand and its cognate receptor. The covalent linkages should be stable relative to the solution conditions to which linked compounds are subjected.

30 Examples of linking groups will be from 1-20 carbons and 0-10 heteroatoms (NH, O, S) and may be branched or straight chain. Without limiting the foregoing, it should be obvious that only combinations of atoms that are chemically compatible comprise the linking group. For example, amide, ester, thioether, thiol ester, keto, hydroxyl, carboxyl, and ether groups in combinations with carbon-carbon bonds are particular examples of chemically compatible linking groups.

35 The term "mycobacteria" as used herein includes, but is not limited to, *M. tuberculosis*. Any mycobacteria that form granulomas can be used in the compositions and methods provided herein.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 10 -

Exemplary mycobacteria include *M. avium*, *M. bovis*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. smegmatis*, and *M. haemophilum*. Optionally, the beginning concentration of mycobacteria in the *in vitro* granuloma model is between approximately  $1 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$  cfu/2 ml sample.

5 A first nucleic acid sequence is "operably linked" with a second nucleic acid sequence when the first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with the second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Generally, operably linked DNA sequences are contiguous and, where necessary to join two protein-coding regions, in the same reading frame.

10 "Peptides," "polypeptides," and "oligopeptides" are chains of amino acids (typically L-amino acids) whose alpha carbons are linked through peptide bonds formed by a condensation reaction between the carboxyl group of the alpha carbon of one amino acid and the amino group of the alpha carbon of another amino acid. The terminal amino acid at one end of the chain (*i.e.*, the amino terminal) has a free amino group, while the terminal amino acid at the other end of the chain (*i.e.*, the carboxy terminal) has a free carboxyl group. As such, the term "amino terminus" (abbreviated N-terminus) refers to the free alpha-amino group on the amino acid at the amino terminal end of the peptide, or to the alpha-amino group (imino group when participating in a peptide bond) of an amino acid at any other location within the peptide. The term "carboxy terminus" (abbreviated C-terminus) refers to the free carboxyl group on the amino acid at the carboxy terminal end of a peptide, or to the carboxyl group of an amino acid at any other location within the peptide.

20 Typically, the amino acids making up a peptide are numbered in order, starting at the amino terminus and increasing in the direction toward the carboxy terminus of the peptide. Thus, when one amino acid is said to "follow" another, that amino acid is positioned closer to the carboxy terminal end of the peptide than the preceding amino acid.

25 As used herein, the term "primer" or "DNA primer" means an oligonucleotide that anneals to a nucleic acid molecule in a particular orientation to allow for the synthesis of a nascent DNA strand.

As used herein, the phrase "primer pair" refers to two primers, one having a forward designation and the other having a reverse designation (relative to their respective orientations when annealed to a double-stranded DNA molecule that consists of a sense and antisense sequence). Under *in vitro* amplification conditions, the forward primer anneals to and primes amplification of the sense sequence and the reverse primer anneals to and primes amplification of the antisense sequence. Primers can be selected for use in an amplification reaction on the basis, for instance, of having minimal complementarity with other primers in the reaction (to minimize the formation of primer dimers) and having  $T_m$  values with a range of reaction temperatures appropriate for the amplification method, such as PCR. In addition, primers can be selected to anneal with specific regions of a DNA or RNA template such that the resulting DNA amplification product of specific size, for instance from 100 to 5000 base pairs in length, for instance around 300 base pairs in length or longer.

35 By "probe" is meant a nucleic acid sequence that can be used for selective hybridization with complementary nucleic acid sequences for their detection. The probe varies in length, for

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 11 -

instance from about 5 to 100 nucleotides, or from about 10 to 50 nucleotides, or about 18 to 24 nucleotides. A "labeled probe" comprises an isolated nucleic acid probe attached to a detectable label or other reporter molecule. Methods for labeling and guidance in the choice of labels appropriate for various purposes are discussed, e.g., in Sambrook *et al.* (In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989) and Ausubel *et al.* (In *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1998).

5 A "promoter" includes one or more nucleic acid sequences that direct transcription of a nucleic acid. A promoter includes nucleic acid sequences near the start site of transcription, such as, in the case of a polymerase II type promoter, a TATA element. A promoter may also include distal enhancer or repressor elements that can be located as much as several thousand base pairs from the start site of transcription.

10 The term "purified" as it is used herein does not require absolute purity; rather, it is intended as a relative term. Thus, for example, a purified nucleic acid (or protein or other compound) preparation is one in which the specified molecule (or type of molecule) is more enriched than it is in its generative environment, for instance within a cell or in a biochemical reaction chamber (as appropriate). A preparation of a "substantially pure" substance, for instance a substantially pure nucleic acid, may be purified such that the desired nucleic acid represents at least 50% of the total nucleic acid content of the preparation. In certain embodiments, a substantially pure preparation will represent at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, or at least 95% or more desired molecule in the preparation.

20 A "recombinant" nucleic acid is one that has a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two otherwise separated segments of sequence. This artificial combination can be accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques.

25 The term "residue" is used herein to refer to an amino acid (D or L), or an amino acid mimetic, that is incorporated into a peptide by an amide bond. As such, the amino acid may be a naturally occurring amino acid or, unless otherwise limited, may encompass analogs of natural amino acids that function in a manner similar to the naturally occurring amino acids (*i.e.*, amino acid mimetics). Moreover, an amide bond mimetic includes peptide backbone modifications well known to those of ordinary skill in the art.

30 The phrase "sequence identity" refers to the similarity between two nucleic acid sequences, or two amino acid sequences, and is expressed in terms of the similarity between the sequences. Sequence identity is frequently measured in terms of percentage identity (or similarity or homology); the higher the percentage, the more similar the two sequences are.

35 Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Various programs and alignment algorithms are described in: Smith & Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman & Wunsch *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; Pearson & Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988; Higgins & Sharp *Gene*, 73: 237-244, 1988; Higgins & Sharp *CABIOS* 5: 151-

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 12 -

153, 1989; Corpet *et al. Nuc. Acids Res.* 16, 10881-90, 1988; Huang *et al. Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992; and Pearson *et al. Meth. Mol. Bio.* 24, 307-31, 1994. Altschul *et al. (J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990), presents a detailed consideration of sequence alignment methods and homology calculations.

5 The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al., J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990) is available from several sources, including the National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) and on the Internet, for use in connection with the sequence analysis programs blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx.

10 An alternative indication that two nucleic acid molecules are closely related is that the two molecules hybridize to each other under stringent conditions. Stringent conditions are sequence-dependent and are different under different environmental parameters. Generally, stringent conditions are selected to be about 5° C to 20° C lower than the thermal melting point (T<sub>m</sub>) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T<sub>m</sub> is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence remains hybridized to a perfectly matched  
15 probe or complementary strand. Conditions for nucleic acid hybridization and calculation of stringencies can be found in Sambrook *et al. (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSFL, New York, 1989) and Tijssen (*Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology -- Hybridization with Nucleic Acid Probes Part I*, Chapter 2, Elsevier, New York, 1993). Nucleic acid molecules that hybridize under stringent conditions to a target sequence will typically hybridize to a  
20 probe based on either an entire target protein encoding sequence, or selected portions of the encoding sequence, under wash conditions of 2 x SSC at 50° C.

Nucleic acid sequences that do not show a high degree of identity may nevertheless encode similar amino acid sequences, due to the degeneracy of the genetic code. It is understood that changes in nucleic acid sequence can be made using this degeneracy to produce multiple nucleic acid  
25 molecules that all encode substantially the same protein or the identical protein.

Furthermore, one of ordinary skill in the art will recognize that individual substitutions, deletions or additions in the amino acid sequence of the protein, or in the nucleotide sequence encoding for the amino acids in the protein, which alter, add or delete a single amino acid or a small percentage of amino acids (in some instances less than 5%, or even less than 1%) in an encoded  
30 sequence are conservatively modified variations, wherein the alterations result in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid, and so long as the resultant variant still retains a substantial proportion of a property or activity, such as an immunostimulatory property (*e.g.*, a protective immune response in a subject), of the base protein. Envisioned in specific embodiments are molecules in which there is no more than one amino acid substitution, no more than about three  
35 substitutions, or about 5, 10, or even 20 substitutions, so long as the resultant variant retains a substantial proportion (*e.g.*, at least 20%, at least 30%, at least 50%, at least 75%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 98%, or more) of an immunostimulatory or other property of the base protein. Some variant embodiments are expected to have greater immunostimulatory properties than the protein or peptide from which they are derived.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 13 -

Conservative amino acid substitution tables providing functionally similar amino acids are well known to one of ordinary skill in the art. The following six groups are examples of amino acids that are considered to be conservative substitutions for one another:

- 5 1) Alanine (A), Serine (S), Threonine (T);
- 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E);
- 3) Asparagine (N), Glutamine (Q);
- 4) Arginine (R), Lysine (K);
- 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V); and
- 10 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W).

The term "specific binding agent" as used herein refers to an agent that binds substantially only to a defined target. Thus a protein-specific binding agent binds substantially only the specified protein. The term "protein specific binding agent" includes anti-protein antibodies (and functional  
15 fragments thereof) and other agents (such as soluble receptors) that bind substantially only to the specified protein.

Anti-protein antibodies (such as anti-Acr antibodies) may be produced using standard procedures described in a number of texts, including Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1988). The determination that a particular agent binds substantially only  
20 to the specified protein, or component epitopes thereof, may readily be made by using or adapting routine procedures. One suitable *in vitro* assay makes use of the Western blotting procedure (described in many standard texts, including Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1988)). Western blotting may be used to determine that a given protein binding agent, such as an anti-Acr monoclonal antibody, binds substantially only to the specified protein.

25 Shorter fragments of antibodies can also serve as specific binding agents. For instance, Fabs, Fvs, and single-chain Fvs (SCFvs) that bind to Acr would be Acr-specific binding agents. These antibody fragments are defined as follows: (1) Fab, the fragment which contains a monovalent antigen-binding fragment of an antibody molecule produced by digestion of whole antibody with the enzyme papain to yield an intact light chain and a portion of one heavy chain; (2) Fab', the fragment  
30 of an antibody molecule obtained by treating whole antibody with pepsin, followed by reduction, to yield an intact light chain and a portion of the heavy chain; two Fab' fragments are obtained per antibody molecule; (3) (Fab')<sub>2</sub>, the fragment of the antibody obtained by treating whole antibody with the enzyme pepsin without subsequent reduction; (4) F(ab')<sub>2</sub>, a dimer of two Fab' fragments held together by two disulfide bonds; (5) Fv, a genetically engineered fragment containing the variable region of the light chain and the variable region of the heavy chain expressed as two chains; and (6)  
35 single chain antibody ("SCA"), a genetically engineered molecule containing the variable region of the light chain, the variable region of the heavy chain, linked by a suitable polypeptide linker as a genetically fused single chain molecule. Methods of making these fragments are routine.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 14 -

A "specific binding partner" is a member of a pair of molecules (the "specific binding pair") capable of recognizing and binding to a structural aspect of another molecule by means of specific, noncovalent interactions that depend on the three-dimensional structures of the molecules involved. Typical pairs of specific binding partners include antigen/antibody, hapten/antibody, 5 hormone/receptor, nucleic acid strand/complementary nucleic acid strand, substrate/enzyme, inhibitor/enzyme, apoprotein/cofactor, carbohydrate/lectin, biotin/(strept)avidin, and virus/cellular receptor.

A specific binding pair that includes at least one immunological molecule (such as an antibody or antigen) can be referred to as a specific immunological binding pair, and the 10 immunological molecule(s) as specific immunological binding partner(s).

An example of a specific binding pair is a latency-specific binding pair, which includes a molecule that is a latency-specific molecule (such as a latency-specific antigen) and a molecule that is a specific binding partner for that latency-specific molecule.

The phrase "specifically binds to an analyte" or "specifically immunoreactive with," when 15 referring to an antibody, refers to a binding reaction or interaction which is determinative of the presence of the analyte or epitope in a heterogeneous population of molecules such as proteins and other biological molecules. Thus, under designated immunoassay conditions, specified antibodies bind to a particular analyte or epitope and do not bind in a significant amount to other analytes or epitope present in the sample. A variety of immunoassay formats may be used to select antibodies 20 specifically immunoreactive with a particular analyte or epitope. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select monoclonal antibodies specifically immunoreactive with a protein. See Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHP, New York (1988), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity.

The term "subject" as used herein refers to living multi-cellular vertebrate organisms, a 25 category that includes both human and non-human mammals. The term "subject" includes both human and veterinary subjects.

When referring to cytokines or other biological materials, the term "steady state level" refers to the level of the cytokine or biological material produced in uninfected cells.

The term "synthetic polypeptide" refers to a polypeptide formed, *in vitro*, by joining amino 30 acids in a particular order, using the tools of organic chemistry to form the peptide bonds.

A "transformed" cell is a cell into which has been introduced a nucleic acid molecule by molecular biology techniques. As used herein, the term transformation encompasses all techniques 35 by which a nucleic acid molecule might be introduced into such a cell, including transfection with viral vectors, transformation with plasmid vectors, and introduction of naked DNA by electroporation, lipofection, and particle gun acceleration.

The term "vaccine" is used herein to mean a composition useful for stimulating a specific immune response in a vertebrate.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 15 -

The term "vector" as used herein refers to a nucleic acid molecule as introduced into a host cell, thereby producing a transformed host cell. A vector may include nucleic acid sequences that permit it to replicate in a host cell, such as an origin of replication. A vector may also include one or more selectable marker genes and other genetic elements known in the art.

5

Unless otherwise explained, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this disclosure belongs. It is further to be understood that all base sizes or amino acid sizes, and all molecular weight or molecular mass values, given for nucleic acids or polypeptides are approximate, and are provided for description. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present disclosure, suitable methods and materials are described below. In case of conflict, the present specification, including explanations of terms, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

15 *III. Description of several embodiments*

Provided herein in a first embodiment is an immunological assay method for detection of latent tuberculosis in a subject. Such methods include contacting a biological sample that may contain a first latency-specific binding partner (LSBP) from the subject with a corresponding LSBP, and detecting binding between the first LSBP and the corresponding LSBP, wherein such binding is indicative of latent tuberculosis in the subject. In some specific examples of these methods, the first LSBP is an antibody, and the corresponding LSBP is a latency-specific *M. tuberculosis* antigen (for instance,  $\alpha$ -crystallin (Acr) or an immunogenic fragment thereof). In other specific examples of the methods, the first LSBP is a latency-specific *M. tuberculosis* antigen, and the corresponding LSBP is an antibody. In certain specific examples of the methods, the antigen is Acr or an immunogenic fragment thereof.

20

25 Another embodiment is a kit for the detection of latent tuberculosis in a subject. Such kits include at least one LSBP and instructions for carrying out an immunological assay method for detection of latent tuberculosis in a subject.

This disclosure also provides a method of eliciting an immune response in a subject. The methods include introducing into the subject an immune stimulatory amount of a *M. tuberculosis* latency-specific antigen or immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid molecule encoding such an antigen (e.g., Acr) or immunogenic fragment thereof. In certain specific examples, the method is a method of inhibiting or treating a latent tuberculosis infection in the subject. In particular examples of the methods, the elicited immune response results in decreased susceptibility of the subject to latent infection by *M. tuberculosis*.

30

35 This disclosure further provides a kit for eliciting an immune response in a subject. Such kits include an immune stimulatory amount of a *M. tuberculosis* latency-specific antigen or immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid molecule encoding such an antigen or immunogenic fragment, and instructions for carrying out a method of eliciting an immune response in a subject.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 16 -

Particular examples of the kit include instructions for administering a component of the kit to a patient with a possible latent tuberculosis infection.

Further embodiments provide *in vitro* granulomas that include peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and mycobacteria. In such granulomas, the peripheral blood  
5 mononuclear cells are human peripheral blood mononuclear cells selected from the group consisting of monocytes, B lymphocytes, T lymphocytes, and combinations thereof. In certain examples of the granuloma, the mycobacteria are *M. tuberculosis*. Certain examples of the granuloma further include fibroblasts.

Also provided is a method for producing an *in vitro* granuloma, which method involves  
10 combining peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and mycobacteria in a low attachment container and incubating the combination for a sufficient amount of time to form the *in vitro* granuloma. In some, specific examples, fibroblasts are added to the combination. In some specific examples, exogenous cytokine(s) are added to the container in sufficient amount to enhance production of the *in vitro* granuloma. In some instances, the exogenous cytokine is IL-2, IFN- $\gamma$ ,  
15 TNF- $\alpha$ , or a combination of two or more thereof.

Another embodiment provided herein is a method of screening a tuberculosis drug candidate for anti-tuberculosis therapeutic activity. Such methods include combining the drug with an *in vitro* granuloma comprising peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and mycobacteria, and determining whether the drug inhibits mycobacterial viability. In some specific  
20 examples, the peripheral blood mononuclear cells are human peripheral blood mononuclear cells selected from the group consisting of monocytes, B lymphocytes, T lymphocytes, and combinations thereof.

Still another embodiment provided herein is a method of screening a tuberculosis drug candidate for anti-tuberculosis therapeutic activity that includes combining the drug with an *in vitro* granuloma comprising peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and inactivated mycobacteria, and determining whether the drug inhibits reactivation of mycobacteria contained in the granuloma. In certain specific examples of the methods, the mycobacteria are *M. tuberculosis*.  
25

Also provided is a method of screening a tuberculosis vaccine candidate that includes determining whether a mutant mycobacteria has a reduced ability, when compared against a wild type mycobacteria, to induce latency, survive, reactivate or induce granuloma necrosis in an *in vitro* granuloma comprising peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and the mutant mycobacteria. In some specific examples of the methods, the *in vitro* granuloma further comprises fibroblasts. In certain examples of the methods, the mutant mycobacteria includes a mycobacteria strain having a mutation in a latency gene. In other examples, the mutant mycobacteria is a  
30 *Mycobacterium tuberculosis* strain having a mutation in a gene selected from the group consisting of *acr*, a sigma factor gene, *oxyR* and *aphC*. In particular examples, the sigma factor gene is selected from the group consisting of *sigF*, *sigC*, and *sigH*.  
35

Additional embodiments are kits for producing an *in vitro* granuloma, including a culture medium and instructions for carrying out a method of screening a tuberculosis vaccine candidate that

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 17 -

includes determining whether a mutant mycobacteria has a reduced ability, when compared against a wild type mycobacteria, to induce latency, survive, reactivate or induce granuloma necrosis in an *in vitro* granuloma comprising peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and the mutant mycobacteria. In certain examples, the kit further includes a low attachment container and in certain specific examples, the kit further includes an amount of a cytokine.

IV. *Production and Use of the In Vitro Granuloma Model*

This disclosure provides in this embodiment methods for producing and using an *in vitro* granuloma model, which model provides a consistent, replicable, and reliable laboratory system. The *in vitro* granuloma can be used in many applications, for instance to study granuloma formation and maintenance, as well as to identify and characterize compounds that affect granuloma formation, maintenance, or reversion, and to study aspects of mycobacterial, including particularly mycobacterial latency.

In general, the *in vitro* granuloma is formed by combining peripheral blood mononuclear cells with macrophages and mycobacteria. The mixture of cells is incubated for a number of days to encourage formation of aggregates in the cell culture. Formation of the granulomas is further encouraged by use of low attachment containers in certain embodiments. After formation of cell aggregates, fibroblasts can optionally be added to the culture. In some embodiments, exogenous cytokines are added to the growth medium, for instance, IL-2, IFN- $\gamma$ , and/or TNF- $\alpha$ , for instance prior to infection with mycobacteria.

By way of more specific example, autologous macrophages and mycobacteria are combined in one or more wells of a low attachment container, such as wells of a tissue culture dish treated to inhibit all attachment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), optionally  $1 \times 10^6$  cells in a cell culture media (such as RPMI plus 10% human serum, HES (Lampire Biological Laboratories, Pipersville, PA)), are combined with the macrophages and mycobacteria and incubated at a temperature at which the cells will grow for between 5 and 7 days. When aggregates reach a diameter of approximately 1 mm, fibroblasts (optionally human lung fibroblasts) may be added.

Secretion of a variety of chemoattractant cytokines following phagocytosis of *M. tuberculosis* bacilli by the macrophage is important not only to the formation of the granuloma but also to its maintenance. Because of this, progression of the *in vitro* granuloma can be monitored by measuring cytokine levels. For cytokine analysis, supernatants are harvested, filter sterilized, and assayed by a known technique such as ELISA.

It is also beneficial in some embodiments to add exogenous cytokine to the medium, for instance during formation of the *in vitro* granuloma; in some instances, addition of cytokine enhances aggregate formation. By way of example, IL-2 (at 10 units/ml, for instance), IFN- $\gamma$  (at 2 ng/ml, for instance), or TNF- $\alpha$  (at 50 ng/ml, for instance) (Endogen, Woburn, MA) or combinations of two or three cytokines are added to the cells prior to mycobacterial infection. When *in vitro* granulomas were maintained for longer periods of time, for instance for 9 days, cytokines could beneficially be

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 18 -

added a second time. In some specific examples, the same amounts and kinds of cytokines were added at day 5 after starting the cultures.

Similarly, gene expression can be used to characterize the *in vitro* granuloma. For RT-PCR or RPA analysis, aggregates are collected, washed and the RNA extracted. For histopathology, cells are fixed in a fixative, such as 10% formalin, and processed as tissue.

The *in vitro* granuloma model of the present disclosure has a variety of uses. For example, the *in vitro* granuloma model can be used to analyze and characterize the process of granuloma formation and granuloma necrosis. It can also be used to characterize *M. tuberculosis* genes that are differentially expressed when the mycobacterium is located inside a granuloma versus when the mycobacterium is not located inside a granuloma.

The model, for instance when employed without the addition of exogenous cytokines, is useful to characterize native cytokine production by the cells composing a granuloma. In one embodiment, the cytokine levels produced by the *in vitro* granuloma model are compared to the steady state levels of the cytokines. The granuloma model is also useful for analyzing mycobacterial viability, as well as for pathophysiological analyses.

#### V. Drug and Immune-Stimulating Compound Candidate Screening

The *in vitro* granuloma model described herein can be used for accurately screening candidate compounds, for instance, tuberculosis drug candidates. Methods of screening a tuberculosis drug candidate include adding the drug candidate to the *in vitro* granuloma model and determining whether the drug kills mycobacteria contained in the granuloma or otherwise alters the physiology of the bacilli or other cells in the granuloma. The model is optionally used to screen drugs for use in treating latent mycobacterial infections.

The *in vitro* granuloma model is also useful for screening immunostimulatory compounds, for example tuberculosis vaccine candidates. By way of example, the *in vitro* granuloma model is used as a precursor to animal studies, for instance to test mutant strains of *M. tuberculosis* that may be used as vaccines to prevent or reduce *M. tuberculosis* infection or the reactivation of latent mycobacterial infections. Animal study precursors help to reduce the costs and negative connotations associated with animal experimentation. Examples of the *in vitro* granuloma model provided herein are less expensive and much more rapid than conventional vaccine screening tests that rely on data generated from animal experiments.

A mutant *M. tuberculosis* strain can be constructed by methods known to those of skill in the art, for instance by inducing or screening for a mutation, such as a mutation in one of the latency genes selected from, but not limited to, *acr*, *sigF*, *sigC*, *sigH*, and other sigma factors, *oxyR* and *aphC*. Examples of methods known to those of skill in the art include *in vitro* mutagenesis and *in vivo* mutagenesis. The mutation can be a deletion of all or part of one or more of these latency genes or an insertion or substitution in one or more of these latency genes. When referring to mycobacterial strains in general or an *M. tuberculosis* strain specifically, the terms "mutated" and "mutant" refer to strains having one or more mutations that inhibit or prevent the strain from shifting down into a

dormant or latent state, or that inhibit or prevent the strain from reactivating after shifting down into a dormant or latent state. Dormancy is a state of slow or stopped bacterial replication, but with some ongoing metabolism, whereas reactivation involves bacterial replication and log phase biochemistry.

In examples of methods for identifying mutated strains that can serve as vaccines, a mutated mycobacterial strain as described herein is added to the *in vitro* granuloma model in place of a wild-type mycobacteria strain. The efficacy of the mutated mycobacteria strain is determined based upon a reduced ability of the mutated strain to induce formation of a latent mycobacterial infection state, survive within the granuloma, reactivate from a latent state to an active state, and/or a reduced ability of the mutant strain to induce granuloma necrosis as compared to a wild-type mycobacterial strain. Cytokine production in the *in vitro* granuloma containing the mutated mycobacteria strain also can be analyzed and compared to cytokine production in a control *in vitro* granuloma model containing a wild-type mycobacteria strain.

#### VI. Identification of Latency-Specific Antigens

To gain insight into the molecular mechanisms of mycobacterial dormancy, and to provide molecules for detecting and/or tracking dormant infection, genes and proteins suspected of being involved in the adaptation to anoxia have been investigated. Results using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technology (as described herein) have confirmed differential expression of various putative stress-response genes. Two of these genes that demonstrate increased activity in the anaerobic (shift-down) granuloma model are involved in oxidative stress response, *oxyR* and *aphC* (Dhadayauthapani *et al.*, *J. Bacteriol.* 178:3641-3649, 1996). The third encodes  $\alpha$ -crystallin, an ATP-independent chaperon (Henriques *et al.*, *J. Bacter.* 179:1887-1897, 1997; Horwitz, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:10449-10453, 1992), reported to be required for bacilli growth within macrophages (Yuan *et al.*, *Microbiol.* 95, 16:9578-9583, 1998).

Latency-specific antigens in addition to those discussed in specific embodiments disclosed herein can be identified based on their preferential expression by latent mycobacteria, particularly *M. tuberculosis*, in comparison to mycobacteria that are not in latent phase. By way of example, differential expression can be detected using two-dimensional gel electrophoresis of proteins extracted from latent and non-latent mycobacteria (*e.g.*, bacteria cultured under anoxic conditions and aerobic conditions).

Alternatively, gene-chip (or cDNA microarray) analysis can be performed to detect preferential mRNA expression in latent (*e.g.*, *in vitro* granuloma) versus non-latent (*i.e.*, aerobic) cultures of mycobacteria. For instance, subtractive hybridization can be carried out by spotting all of the transcripts expressed in one culture or the other. The chip can then be probed using labeled (*e.g.*, with a cyanine dye) latent and labeled non-latent mRNA (or cDNA) pools, and differential expression detected using known techniques.

The prototypical latency-specific antigen is  $\alpha$ -crystallin; its identification and characterization is described in more detail herein.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 20 -

VII. *Detection of Latent Tuberculosis*

It has been surprisingly found that latent *M. tuberculosis* can produce a high enough level of latency-specific antigens that such antigens, and/or antibodies reactive therewith, can be detected in subjects with latent *M. tuberculosis* infection.

With the demonstration herein that latent tuberculosis organisms produce specific antigens that elicit immunogenic responses in subjects, methods for the detection of latency-specific antigens, and/or antibodies to latency-specific antigens, and for the detection and/or diagnosis of latent infections, are now enabled.

Latency-specific antigens, or antibodies that recognize an epitope of a *M. tuberculosis* latency-specific protein (such as Acr) can be detected in samples from a subject, for instance serum or other biological fluid, using known immunological techniques. The presence of such latency-specific antigens or antibodies (*e.g.*, circulating antibodies specific for an Acr epitope) indicates that the subject suffers from a latent tuberculosis infection.

Many techniques are commonly known in the art for the detection and quantification of antigen. Most commonly, purified antigen will be bound to a substrate, the antibody of the sample will bind via its Fab portion to this antigen, the substrate will then be washed and a second, labeled antibody will then be added which will bind to the Fc portion of the antibody that is the subject of the assay. The second, labeled antibody will be species specific, *i.e.*, if the serum is from a human, the second, labeled antibody will be anti-human-IgG antibody. The substrate will then be washed and the amount of the second, labeled antibody that has been bound will be detected and quantified by standard methods.

Examples of methods for the detection of antibodies in biological samples, including methods employing dip strips or other immobilized assay devices, are disclosed for instance in the following patents: U.S. Patents No. 5,965,356 (Herpes simplex virus type specific seroassay); 6,114,179 (Method and test kit for detection of antigens and/or antibodies); 6,077,681 (Diagnosis of motor neuropathy by detection of antibodies); 6,057,097 (Marker for pathologies comprising an auto-immune reaction and/or for inflammatory diseases); and 5,552,285 (Immunoassay methods, compositions and kits for antibodies to oxidized DNA bases).

By way of example, a microsphere assay (also called flow beads assays) also can be used to detect Acr protein or another LSA in biological fluids (such as a culture supernatant from an *in vitro* latency model, or biological samples from a subject). This technology, as represented by systems developed by Luminex Corporation and other systems developed by Becton Dickinson, allows one to process a very small amount of sample, typically 20  $\mu$ l, to detect one or several analytes. The principle of this assay is based on the coupling of a "capture antibody" to microspheres containing specific amounts of a red dye and an infrared dye. After incubation of these microspheres with the sample, a secondary detection antibody coupled with biotin and streptavidin coupled with phycoerythrin (PE), the beads are analyzed with a flow cytometer. One laser detects the beads and a second one detects the intensity of the PE bound to those beads. This technology has been used to

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 21 -

detect cytokines in multiplex assays, serotyping of *Streptococcus pneumoniae*, simultaneous measurement of human chorionic gonadotropin (hCG) and alpha-fetoprotein (AFP), simultaneous detection of serum IgG to *Toxoplasma gondii*, Rubella virus, Cytomegalovirus, and Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 (see technical notes available from Luminex Corp., for instance at their Web-site or through their catalog)

In certain embodiments, a polyclonal rabbit antiserum is used to capture the Acr protein on the microspheres. In some embodiments, the secondary detection antibody is a monoclonal antibody to Acr. Secondary antibodies used in such methods can be coupled to, for instance, biotin.

10 VIII. *Production of Latency-Specific Immunological Binding Partners*

Once a latency-specific *M. tuberculosis* protein is identified, it is advantageous to produce that protein, and/or antibodies that specifically recognize one or more epitopes on the protein, in sufficient amounts to be used in immunological or other assays. Methods for production of proteins, and antibodies reactive with identified proteins, are well known to those of ordinary skill in the art.

15 The following methods are provided as representative examples, and should not be viewed as limiting.

A. *Production of proteins*

Once a latency-specific protein is identified, it is a matter of well-known techniques to determine the sequence that encodes the protein. For instance, the entire coding sequence of the *M. tuberculosis* genome is known (Cole *et al.*, Nature 393:537-544, 1998); this can be used to identify the gene that encodes an isolated latency-specific protein. The encoding sequence can then be used to produce quantities of protein *in vitro*.

One skilled in the art will understand that there are myriad ways to express a recombinant protein such that it can subsequently be purified. In general, an expression vector carrying the nucleic acid sequence that encodes the desired protein will be transformed into a microorganism for expression. Such microorganisms can be prokaryotic (bacteria) or eukaryotic (*e.g.*, yeast). One appropriate species of bacteria is *Escherichia coli* (*E. coli*), which has been used extensively as a laboratory experimental expression system. Also, protein can be expressed using a viral (*e.g.*, vaccinia) based expression system. Protein can also be expressed in animal cell tissue culture, and such a system will be appropriate where animal-specific protein modifications are desirable or required in the recombinant protein, or in one portion of a fusion protein.

Vectors suitable for stable transformation of culturable cells are also well known. Typically, such vectors include a multiple-cloning site suitable for inserting a cloned nucleic acid molecule, such that it will be under the transcriptional control of 5' and 3' regulatory sequences. In addition, transformation vectors include one or more selectable markers; for bacterial transformation this is often an antibiotic resistance gene. Such transformation vectors typically also contain a promoter regulatory region (*e.g.*, a regulatory region controlling inducible or constitutive expression), a transcription initiation start site, a ribosome binding site, an RNA processing signal, and a

transcription termination site, each functionally arranged in relation to the multiple-cloning site. For production of large amounts of recombinant proteins, an inducible promoter is preferred. This permits selective production of the recombinant protein, and allows both higher levels of production than constitutive promoters, and enables the production of recombinant proteins that may be toxic to the expressing cell if expressed constitutively.

5 In addition to these general guidelines, protein expression/purification kits are produced commercially. See, for instance, the *QIAexpress*<sup>TM</sup> expression system from QIAGEN (Chatsworth, CA) and various expression systems provided by InVitrogen (Carlsbad, CA). Depending on the details provided by the manufactures, such kits can be used for production and purification of  
10 latency-specific proteins.

One skilled in the art will understand that there are myriad ways to purify recombinant polypeptides, and such typical methods of protein purification may be used to purify latency-specific proteins. Such methods include, for instance, protein chromatographic methods including ion exchange, gel filtration, HPLC, monoclonal antibody affinity chromatography and isolation of  
15 insoluble protein inclusion bodies after over production. In addition, purification affinity-tags, for instance a six-histidine sequence, may be recombinantly fused or linked to the protein and used to facilitate polypeptide purification. A specific proteolytic site, for instance a thrombin-specific digestion site, can be engineered into the protein between the tag and the remainder of the fusion to facilitate removal of the tag after purification, if such removal is desired.

20 Commercially produced protein expression/purification kits provide tailored protocols for the purification of proteins made using each system. See, for instance, the *QIAexpress*<sup>TM</sup> expression system from QIAGEN (Chatsworth, CA) and various expression systems provided by InVitrogen (Carlsbad, CA). Where a commercial kit is employed to produce a functionalized TGF- $\beta$  fusion protein, the manufacturer's purification protocol is a preferred protocol for purification of that  
25 protein. For instance, proteins expressed with an amino-terminal hexa-histidine tag can be purified by binding to nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal affinity chromatography matrix (*The QIAexpressionist*, QIAGEN, 1997).

If the recombinant latency-specific protein is produced in a secreted form, *e.g.*, secreted into the milk of a transgenic animal, purification can be from the secreted fluid. Alternatively,  
30 purification may be unnecessary if it is appropriate to apply the latency-specific protein directly to the subject in the secreted fluid (*e.g.*, milk), for instance to induce an immunological response in a subject.

#### B. Production of antibodies

35 Monoclonal or polyclonal antibodies may be produced to *M. tuberculosis* latency-specific proteins, or to specific epitopes within such proteins. Optimally, antibodies raised against a latency-specific protein would specifically detect that protein. That is, such antibodies would recognize and bind the Acr protein and would not substantially recognize or bind to other proteins found in a biological sample. The determination that an antibody specifically detects its target latency-specific protein is made by any one of a number of standard immunoassay methods; for instance, the Western

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 23 -

blotting technique (Sambrook *et al.*, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1989).

To determine that a given antibody preparation (such as one produced in a mouse) specifically detects the target protein by Western blotting, total cellular protein is extracted from cells of a latent *M. tuberculosis* preparation, such as granulomas, and electrophoresed on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. The proteins are then transferred to a membrane (for example, nitrocellulose) by Western blotting, and the test antibody preparation is incubated with the membrane. After washing the membrane to remove non-specifically bound antibodies, the presence of specifically bound antibodies is detected by the use of an anti-mouse antibody conjugated to an enzyme such as alkaline phosphatase. Application of an alkaline phosphatase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium results in the production of a dense blue compound by immunolocalized alkaline phosphatase. Antibodies that specifically detect the target latency-specific protein will, by this technique, be shown to bind to the target latency-specific protein band (which will be localized at a given position on the gel determined by its molecular weight). Non-specific binding of the antibody to other proteins may occur and may be detectable as a weak signal on the Western blot. The non-specific nature of this binding will be recognized by one skilled in the art by the weak signal obtained on the Western blot relative to the strong primary signal arising from the specific antibody-latency-specific protein binding.

Substantially pure latency-specific protein suitable for use as an immunogen is isolated from the transfected or transformed cells as described above. Concentration of protein in the final preparation is adjusted, for example, by concentration on an Amicon filter device, to the level of a few micrograms per milliliter. Monoclonal or polyclonal antibody to the protein can then be prepared as follows:

i. Monoclonal Antibody Production by Hybridoma Fusion

Monoclonal antibody to epitopes of a latency-specific protein identified and isolated as described (*e.g.*, Acr) can be prepared from murine hybridomas according to the classical method of Kohler and Milstein (*Nature* 256:495, 1975) or derivative methods thereof. Briefly, a mouse is repetitively inoculated with a few micrograms of the selected protein over a period of a few weeks. The mouse is then sacrificed, and the antibody-producing cells of the spleen are isolated. The spleen cells are fused by means of polyethylene glycol with mouse myeloma cells, and the excess unfused cells destroyed by growth of the system on selective media comprising aminopterin (HAT media). The successfully fused cells are diluted and aliquots of the dilution placed in wells of a microtiter plate where growth of the culture is continued. Antibody-producing clones are identified by detection of antibody in the supernatant fluid of the wells by immunoassay procedures, such as ELISA, as originally described by Engvall (*Enzymol.* 70:419, 1980), and derivative methods thereof. Selected positive clones can be expanded and their monoclonal antibody product harvested for use. Detailed procedures for monoclonal antibody production are described in Harlow and Lane (*Antibodies, A Laboratory Manual*, CSHL, New York, 1988).

#### ii. Polyclonal Antibody Production by Immunization

5 Polyclonal antiserum containing antibodies to heterogeneous epitopes of a single protein can be prepared by immunizing suitable animals with the expressed protein, which can be unmodified or modified to enhance immunogenicity. Effective polyclonal antibody production is affected by many factors related both to the antigen and the host species. For example, small molecules tend to be less immunogenic than others and may require the use of carriers and adjuvant. Also, host animals vary in response to site of inoculations and dose, with either inadequate or excessive doses of antigen resulting in low titer antisera. Small doses (ng level) of antigen administered at multiple intradermal sites appear to be most reliable. An effective immunization protocol for rabbits can be found in Vaitukaitis *et al.* (*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33:988-991, 1971).

10 Booster injections can be given at regular intervals, and antiserum harvested when antibody titer thereof, as determined semi-quantitatively, for example, by double immunodiffusion in agar against known concentrations of the antigen, begins to fall. See, for example, Ouchterlony *et al.* (*Handbook of Experimental Immunology*, Wier, D. (ed.) chapter 19. Blackwell, 1973). Plateau concentration of antibody is usually in the range of about 0.1 to 0.2 mg/ml of serum (about 12  $\mu$ M). Affinity of the antisera for the antigen is determined by preparing competitive binding curves, as described, for example, by Fisher (*Manual of Clinical Immunology*, Ch. 42, 1980).

#### iii. Antibodies Raised against Synthetic Peptides

15 A third approach to raising antibodies against a latency-specific protein is to use synthetic peptides synthesized on a commercially available peptide synthesizer based upon the predicted amino acid sequence of the latency-specific protein.

By way of example only, polyclonal antibodies to specific peptides within Acr can be generated through well-known techniques by injecting rabbits with chemically synthesized peptide.

#### iv. Antibodies Raised by Injection of Latency-Specific Protein Encoding Sequence

20 Antibodies may be raised against a latency-specific protein by subcutaneous injection of a DNA vector that expresses the latency-specific protein into laboratory animals, such as mice. Delivery of the recombinant vector into the animals may be achieved using a hand-held form of the Biolistic system (Sanford *et al.*, *Particulate Sci. Technol.* 5:27-37, 1987) as described by Tang *et al.* (*Nature* 356:152-154, 1992). Expression vectors suitable for this purpose may include those that express the Z47 encoding sequence under the transcriptional control of either the human  $\beta$ -actin promoter or the cytomegalovirus (CMV) promoter.

30 Antibody preparations prepared against a latency-specific antigen or epitope of such are useful in quantitative immunoassays that determine concentrations of antigen-bearing substances in biological samples; they are also used semi-quantitatively or qualitatively to identify the presence of antigen in a biological sample, as described herein.

#### IX. Stimulation of Immunological Responses to Latent Tuberculosis

With the provision herein of antigens specific to latent tuberculosis infections, methods are now enabled for the stimulation of immune responses to such antigens in subjects. In certain

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 25 -

embodiments, such immune responses will be protective against formation of latent tuberculosis infection in the subject. Latency-specific proteins (e.g., Acr) can be used, for instance, as immunogenic agents in the treatment, amelioration, or prevention of latent tuberculosis. Subjects selected for this type of treatment are those who are known to have, or are suspected of having or are at risk of suffering, a latent tuberculosis infection. An example of such a person is someone who has a positive tuberculin skin test, but has no or limited evidence of active disease (for example clinical symptoms such as fatigue, anorexia, weight loss, fever, nocturnal diaphoresis, cough, hemoptysis, or radiographic or other laboratory evidence recognized as indicative of active disease).

The provided immunostimulatory proteins or peptides, derived from latency-specific proteins (such as Acr) are combined with a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle for administration as an immunostimulatory composition or a vaccine to human or animal subjects. In some embodiments, more than one protein or peptide fragment may be combined to form a single preparation.

The immunogenic formulations may be conveniently presented in unit dosage form and prepared using conventional pharmaceutical techniques. Such techniques include the step of bringing into association the active ingredient and the pharmaceutical carrier(s) or excipient(s). In general, the formulations are prepared by uniformly and intimately bringing into association the active ingredient with liquid carriers. Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents and thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampules and vials, and may be stored in a freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of a sterile liquid carrier, for example, water for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions may be prepared from sterile powders, granules and tablets commonly used by one of ordinary skill in the art.

In certain embodiments, unit dosage formulations are those containing a dose or unit, or an appropriate fraction thereof, of the administered ingredient. It should be understood that in addition to the ingredients particularly mentioned above, formulations encompassed herein may include other agents commonly used by one of ordinary skill in the art.

The compositions provided herein, including those for use as immunostimulatory agents or vaccines, may be administered through different routes, such as oral, including buccal and sublingual, rectal, parenteral, aerosol, nasal, intramuscular, subcutaneous, intradermal, and topical. They may be administered in different forms, including but not limited to solutions, emulsions and suspensions, microspheres, particles, microparticles, nanoparticles, and liposomes.

The volume of administration will vary depending on the route of administration. By way of example, intramuscular injections may range from about 0.1 ml to 1.0 ml. Those of ordinary skill in the art will know appropriate volumes for different routes of administration.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 26 -

The amount of protein in each vaccine dose is selected as an amount that induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects. Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and how it is presented. Initial injections may range from about 1 µg to 1 mg, with some embodiments having a range of about 10 µg to 800 µg, and still other embodiments a range of from approximately 25 µg to 500 µg. Following an initial vaccination, subjects may receive one or several booster immunizations, adequately spaced. Booster injections may range from 1 µg to 1 mg, with other embodiments having a range of approximately 10 µg to 750 µg, and still others a range of about 50 µg to 500 µg. Periodic boosters at intervals of 1-5 years, for instance three years, may be desirable to maintain the desired levels of protective immunity.

As described in WO 95/01441, the course of the immunization may be followed by *in vitro* proliferation assays of PBL (peripheral blood lymphocytes) co-cultured with ESAT6 or ST-CF, and especially by measuring the levels of IFN-released from the primed lymphocytes. The assays are well known and are widely described in the literature, including in U.S. Patent Nos. 3,791,932; 4,174,384 and 3,949,064.

A recent development in the field of immune stimulatory compounds (e.g., vaccines) is the direct injection of nucleic acid molecules encoding peptide antigens (broadly described in Janeway & Travers, *Immunobiology: The Immune System In Health and Disease*, page 13.25, Garland Publishing, Inc., New York, 1997; and McDonnell & Askari, *N. Engl. J. Med.* 334:42-45, 1996). Plasmids that include nucleic acid molecules described herein, or that include a nucleic acid sequence encoding an immunogenic peptide or peptide fragment of a latency specific polypeptide (such as Acr) or derived from a latency specific polypeptide (for instance, as a fusion protein, may be utilized in such DNA vaccination methods.

Thus, the terms "immunostimulatory preparation" and "vaccine" as used herein also include nucleic acid vaccines in which a nucleic acid molecule encoding a latency-specific polypeptide (such as Acr), or a fragment thereof, is administered to a subject in a pharmaceutical composition. For genetic immunization, suitable delivery methods known to those skilled in the art include direct injection of plasmid DNA into muscles (Wolff *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* 1:363, 1992), delivery of DNA complexed with specific protein carriers (Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264:16985, 1989), co-precipitation of DNA with calcium phosphate (Benvenisty and Reshef, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:9551, 1986), encapsulation of DNA in liposomes (Kaneda *et al.*, *Science* 243:375, 1989), particle bombardment (Tang *et al.*, *Nature* 356:152, 1992) and (Eisenbraun *et al.*, *DNA Cell Biol.* 12:791, 1993), and *in vivo* infection using cloned retroviral vectors (Seeger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:5849, 1984).

Similarly, nucleic acid vaccine preparations can be administered via viral carrier.

It is also contemplated that the provided immunostimulatory molecules and preparations can be administered to a subject indirectly, by first stimulating a cell *in vitro*, which stimulated cell is thereafter administered to the subject to elicit an immune response.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 27 -

*X. Immunological and Pharmaceutical Compositions*

Immunological compositions, including immunological elicitor compositions and vaccines, and other pharmaceutical compositions containing latency-specific polypeptides or antigenic fragments thereof are useful for reducing, ameliorating, treating, or possibly preventing mycobacterial infection, particularly latent *M. tuberculosis* infection. One or more of the polypeptides are formulated and packaged, alone or in combination with adjuvants or other antigens, using methods and materials known to those skilled in the vaccine art. An immunological response of a subject to such an immunological composition may be used therapeutically or prophylactically, and in certain embodiments provides antibody immunity and/or cellular immunity such as that produced by T lymphocytes such as cytotoxic T lymphocytes or CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

To enhance immunogenicity, one or more immunogenic polypeptides or fragments (e.g., haptens) may be conjugated to a carrier molecule. Immunogenic carrier molecules include proteins, polypeptides or peptides such as albumin, hemocyanin, thyroglobulin and derivatives thereof, particularly bovine serum albumin (BSA) and keyhole limpet hemocyanin (KLH), polysaccharides, carbohydrates, polymers, and solid phases. Other protein-derived or non-protein-derived substances are known to those of ordinary skill in the art. An immunogenic carrier typically has a molecular weight of at least 1,000 Daltons, and in some embodiments greater than 10,000 Daltons. Carrier molecules often contain a reactive group to facilitate covalent conjugation to the hapten. The carboxylic acid group or amine group of amino acids or the sugar groups of glycoproteins are often used in this manner. Carriers lacking such groups can often be reacted with an appropriate chemical to produce them. Alternatively, a multiple antigenic polypeptide comprising multiple copies of the protein or polypeptide, or an antigenically or immunologically equivalent polypeptide may be sufficiently antigenic to improve immunogenicity without the use of a carrier.

The latency-specific polypeptides may be administered with an adjuvant in an amount effective to enhance the immunogenic response against the conjugate. At this time, the only adjuvant widely used in humans has been alum (aluminum phosphate or aluminum hydroxide). Saponin and its purified component Quil A, Freund's complete adjuvant and other adjuvants used in research and veterinary applications have toxicities which limit their potential use in human vaccines. However, chemically defined preparations such as muramyl dipeptide, monophosphoryl lipid A, phospholipid conjugates such as those described by Goodman-Snitkoff *et al.* (*J. Immunol.* 147:410-415, 1991), encapsulation of the conjugate within a proteoliposome as described by Miller *et al.* (*J. Exp. Med.* 176:1739-1744, 1992), and encapsulation of the protein in lipid vesicles may also be useful.

The compositions provided herein, including those formulated to serve as vaccines, may be stored at temperatures of from about -100° C to 4° C. They may also be stored in a lyophilized state at different temperatures, including higher temperatures such as room temperature. The preparation may be sterilized through conventional means known to one of ordinary skill in the art. Such means include, but are not limited to filtration, radiation and heat. The preparations also may be combined with bacteriostatic agents, such as thimerosal, to inhibit bacterial growth.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 28 -

A variety of adjuvants known to one of ordinary skill in the art may be administered in conjunction with the protein(s) in the provided vaccine composition. Such adjuvants include but are not limited to the following: polymers, co-polymers such as polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers, including block co-polymers; polymer P1005; Freund's complete adjuvant (for animals); 5 Freund's incomplete adjuvant; sorbitan monooleate; squalene; CRL-8300 adjuvant; alum; QS 21, muramyl dipeptide; CpG oligonucleotide motifs and combinations of CpG oligonucleotide motifs; trehalose; bacterial extracts, including mycobacterial extracts; detoxified endotoxins; membrane lipids; or combinations thereof.

In a particular embodiment, a vaccine is packaged in a single dosage for immunization by 10 parenteral (*i.e.*, intramuscular, intradermal or subcutaneous) administration or nasopharyngeal (*i.e.*, intranasal) administration. In certain embodiments, the vaccine is injected intramuscularly into the deltoid muscle. The vaccine may be combined with a pharmaceutically acceptable carrier to facilitate administration. The carrier is, for instance, water, or a buffered saline, with or without a preservative. The vaccine may be lyophilized for resuspension at the time of administration or in solution.

15 The carrier to which the polypeptide may be conjugated may also be a polymeric delayed release system. Synthetic polymers are particularly useful in the formulation of a vaccine to effect the controlled release of antigens.

Microencapsulation of the polypeptide will also give a controlled release. A number of 20 factors contribute to the selection of a particular polymer for microencapsulation. The reproducibility of polymer synthesis and the microencapsulation process, the cost of the microencapsulation materials and process, the toxicological profile, the requirements for variable release kinetics and the physicochemical compatibility of the polymer and the antigens are all factors that must be considered. Examples of useful polymers are polycarbonates, polyesters, polyurethanes, polyorthoesters polyamides, poly-(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) and other biodegradable 25 polymers.

Doses for human administration of a pharmaceutical composition or a vaccine may be from about 0.01 mg/kg to 10 mg/kg, for instance approximately 1 mg/kg. Based on this range, equivalent dosages for heavier (or lighter) body weights can be determined. The dose may be adjusted to suit 30 the individual to whom the composition is administered, and may vary with age, weight, and metabolism of the individual, as well as the health of the subject. Such determinations are left to the attending physician or another familiar with the subject and/or the specific situation. The vaccine may additionally contain stabilizers or physiologically acceptable preservatives, such as thimerosal (ethyl(2-mercaptobenzoate-S)mercury sodium salt) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

#### 35 XI. Kits

Kits are provided which contain the necessary reagents for growing *in vitro* granulomas or for determining the presence (or absence) of a latency-specific antigen and/or antibody in a biological sample, using an immunological binding reaction. Instructions provided in the diagnostic kits can

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 29 -

include calibration curves, diagrams, illustrations, or charts or the like to compare with the determined (*e.g.*, experimentally measured) values or other results.

*A. Kits for Growing In Vitro Granulomas*

5 Kits for growing *in vitro* granulomas include, for instance, cell culture media (*e.g.*, RPMI plus 10% human serum, HES) and optionally may include a low attachment container (*e.g.*, a tissue culture dish treated to inhibit cell attachment), a filter, and/or a fixative. Specific examples of such kits also include an amount of one or more cytokine, for instance IL-2, IFN- $\gamma$ , and/or TNF- $\alpha$ . Reagents supplied in the kits may be contained in separate containers.

10 The kits may also include means for granuloma analysis, for instance ELISA reagents, reagents for RT-PCR, and/or RPA reagents, which may also be provided in some kits in one or more separate containers. Cell culture, ELISA, RT-PCR, and RPA techniques are well known to those of ordinary skill in the art.

15 Reaction vessels and auxiliary reagents such as buffers, enzymes, *etc.* may also be included in the kits.

Additional components in some kits include instructions for carrying out the cell culture and/or subsequent analysis. Where provided, instructions may allow the tester to grow *in vitro* granulomas and use them to identify latency-specific antigens and screen drugs and immunostimulatory compounds, such as vaccines.

20 *B. Kits For Detection of Latency-Specific Antigen*

Kits for the detection of latency-specific *M. tuberculosis* protein expression include for instance at least one target protein specific binding agent (*e.g.*, a polyclonal or monoclonal antibody or antibody fragment) and may include at least one control. The latency-specific protein specific binding agent and control may be contained in separate containers. The kits may also include means 25 for detecting target protein:agent complexes, for instance the agent may be detectably labeled. If the detectable agent is not labeled, it may be detected by second antibodies or protein A, for example, which may also be provided in some kits in one or more separate containers. Such techniques are well known.

Additional components in some kits include instructions for carrying out the assay.

30 Instructions will allow the tester to determine whether latency-specific protein expression levels are altered, for instance in comparison to a control sample. Reaction vessels and auxiliary reagents such as chromogens, buffers, enzymes, *etc.* may also be included in the kits.

By way of example only, an effective and convenient immunoassay kit such as an enzyme-linked immunosorbent assay can be constructed to test anti-Acr antibody in human serum.

35 Expression vectors can be constructed using the Acr cDNA to produce the recombinant Acr protein in either bacteria or baculovirus (as described above). By affinity purification, unlimited amounts of pure recombinant latency-specific protein (such as Acr) can be produced.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 30 -

C. *Kits for Detection of Antibody to Latency-Specific Antigens*

Other examples of assay kits provide a recombinant latency-specific protein as an antigen and enzyme-conjugated goat anti-human IgG as a second antibody. Examples of such kits also can include one or more enzymatic substrates. Such kits can be used to test if a biological sample from a  
5 subject contains antibodies against a latency-specific protein.

The disclosure is further illustrated by the following non-limiting Examples.

10

**EXAMPLES*****Example 1: Preparation and Characterization of an In Vitro Granuloma Model***

The principal defense of the human host against a mycobacterial infection is the formation of granulomas, which are compact, organized collections of activated macrophages, including  
15 epithelioid and multinucleated giant cells, surrounded by T lymphocytes, and later by fibroblasts and collagen that aggregate around the macrophage core. The granuloma may prevent active (non-latent) disease by sequestering the invading organisms. If the granuloma is maintained, these bacteria may remain latent for many years.

To study this process of granuloma formation and the granuloma's subsequent breakdown  
20 when host defenses are compromised, an *in vitro* model was developed. This example provides a description of one method for producing the *in vitro* granuloma that can be used as a model system, as well as several methods used to characterize the model. In overview, human peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages and mycobacteria were combined in low attachment  
25 tissue culture dishes. The resulting aggregates were characterized using microscopy and immunohistochemical staining. Cytokine production was assessed by ELISA and bacterial mRNA detected by RT-PCR.

Peripheral blood mononuclear cells ( $1 \times 10^6$ ), autologous macrophages ( $1 \times 10^6$ ) and  
mycobacteria ( $1 \times 10^5$ ) were combined in low attachment tissue culture dishes (COSTAR™ Ultra  
Low Attachment Clusters, Costar Corp., Cambridge, MA) and incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.  
30 Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs,  $1 \times 10^6$  cells in RPMI plus 10% HS) were added after 24 hours, and the mixture incubated for 5-7 days. Aggregate formation was observed. Human lung fibroblasts (from the cell line 33Lu) were added when the aggregates were  
approximately 1 mm in diameter.

The aggregates were characterized using microscopy and immunohistochemical staining  
35 with standard methodology. Small, rounded aggregate structures were formed in the cultures, which developed more defined edges with the addition of human lung fibroblasts. Microscopic examination of these aggregates using immunostaining found CD68<sup>+</sup> epithelioid macrophages and sparse, small round CD3<sup>+</sup> lymphocytes that, in complex, resembled small granulomas seen in clinicopathologic

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 31 -

specimens. Acid-fast staining bacteria were observed within and between the cells composing the granulomas (Figure 1).

In addition to morphology, cytokine production was assessed by ELISA. In particular, cytokines that are known to be upregulated during early stage *M. tuberculosis* infection were analyzed.

By 24 hours following infection, the aggregates were found to generate levels of TNF, IL-8, and IL-6 that were elevated well above levels found in uninfected control cells. After 48 hours levels of IFN were likewise increased above controls. This elevated cytokine production continued over the nine day duration of the experiment. Results also indicate increased levels of IL-2 and IL-12, peaking at 48 hours, but remaining above control levels throughout the course of the experiment. All of these cytokines are detected at significantly higher levels in tuberculosis patients when compared to healthy controls.

**Example 2: Detection of Differential Transcription of *Acr* mRNA in a Granuloma Model**

Using bacteria cultured in an anoxic chamber, *M. tuberculosis* genes were identified that were differentially expressed after much of the available oxygen had been utilized. The genes that were differentially expressed were *acr*, *sigF*, *oxyR* and *aphC*. Of these four genes, *acr* encodes a protein ( $\alpha$ -crystallin) that is secreted by the *Mycobacterium*.

In order to confirm that these genes are expressed in the *in vitro* granuloma model, RT-PCR and RNA protection assays were performed. These assays showed that mRNA from mycobacterial genes *acr*, *aphC*, and *sigF* were transcribed. These transcripts were not found in uninfected *in vitro* granuloma controls.

Typical results from representative experiments are shown in Figures 2 and 3, which are ribonuclease protection assay (RPA) blots. In Figure 2, *acr* mRNA was observed at all four time points while *RpoB* mRNA was only observed in aerobically grown cultures. In Figure 3, *acr* and *RpoB* mRNA were observed both at 7- or 12-day incubations in the *in vitro* granuloma model, which is believed to indicate that aerobic bacilli were present in the granuloma.

**Example 3: Other In Vitro Latency Models**

The following example provides other *in vitro* latency models, which can be used, for example, to confirm results obtained with the *in vitro* granuloma model (e.g., to screen drugs and immunostimulatory compounds and to identify latency-specific antigens).

**Guinea pig aerosol infection model.**

When infected by aerosol inoculation using a small number of *M. tuberculosis* bacilli, it was observed that the bacteria cause formation of granulomas associated with the epithelial pneumocytes in the deep alveoli of the lung. Though these granulomas apparently are not able to completely contain the infection, and the bacteria eventually overwhelm this animal, there are a number of similarities with human granulomas. For example, these granulomas center on necrotic areas and

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 32 -

contain predominantly macrophages, including epithelioid and multinucleated giant cells and T-lymphocytes. Differential transcription of the bacterial *Acr* gene has been detected in these granulomas.

5 *In vitro anoxic chamber models.*

Wayne and Hayes developed an *in vitro* persistence model that subject *M. tuberculosis* bacilli to gradual oxygen deprivation by incubation in sealed containers with controlled agitation (Wayne and Hayes, *Infect. Immun.* 64:2062-2069, 1996). Growth under these conditions can be operationally divided into two non-replicating persistent (NRP) states: a microaerophilic state associated with induction of glycine dehydrogenase activity (NRP1), and a subsequent lower oxygen state (NRP2), in which glycine dehydrogenase activity declines and alterations in drug susceptibility are manifest. Specifically, cells become resistant to ciprofloxacin and sensitive to metronidazole, possible due to changes in DNA superhelicity and cell permeability, respectively (Wayne and Hayes, *Infect. Immun.* 64:2062-2069, 1996). These observations correlate with the intractability of clinical

15 TB to single antibiotic therapy (Dickinson and Mitchison, *Am. Rev. Respir. Dis.* 123:367-371, 1981). A modified version of this sealed vessel has been developed (Figure 5), which allows monitoring of several environmental growth conditions (including optical density culture population, oxygen concentration, pH, and assaying of enzymes induced only under low oxygen tension), as well as providing containment of the pathogen and easy nucleic acid harvest by direct centrifugation of the vessel. Using this system, it has been shown that *M. tuberculosis* bacilli cease to replicate but remain metabolically active for several months under conditions of low oxygen (Figure 12).

**Example 4: Construction of Acr-FLAG fusion proteins.**

Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction (PCR) were designed and generated. These primers were designed to allow the amplification of the *hspX* gene from *M. tuberculosis* (encoding *Acr*) with the addition of the FLAG (Sigma) epitope tag fused to amino- or carboxy-terminus of *Acr* depending on which primer pair was used. Primer design also included the introduction of restriction endonuclease recognition sites to facilitate subsequent recombinant DNA methodologies involved in cloning and expression of these amplified sequences. Sequences of the primers to generate the N-terminal FLAG-*Acr* fusion were SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2. Sequences of the primers to generate the C-terminal *Acr*-FLAG fusion were SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4.

PCR reactions were performed using one microgram MTB H37Rv genomic DNA as template and 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2.5 units AmpliTaq (Gibco BRL) thermostable DNA polymerase. PCR was performed with the following cycle parameters: 94 °C, 5 minutes (1X), 94 °C, 1 minute; 55 °C, 30 seconds; 72 °C, 2.5 minutes (2x), 94 °C, 1 minute; 60 °C, 30 seconds; 72 °C, 2.5 minutes (30x), 72 °C, 7 minutes (1x). Following PCR amplification the amplified DNA fragments were purified and digested by restriction endonuclease, and ligated into

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 33 -

likewise digested plasmid vector pMV261.1. Following ligation, the reactions were transformed into *E. coli* and positive colonies selected by antibiotic resistance. Selected colonies were screened for the presence of the recombinant insert by PCR, and sequence verification was achieved by DNA sequencing of each positive clone. Positive N-terminal and C-terminal Act-FLAG fusion plasmids were subsequently transformed into both *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* and transformed colonies selected by antibiotic resistance.

Expression of the fusion proteins was confirmed by Western blotting; representative blots are shown in Figure 6 (N-terminal fusion) and Figure 7 (C-terminal fusion).

10 **Example 5: Immunoprecipitation of Acr.**

Acr-FLAG fusion proteins were immunoprecipitated with a FLAG Immunoprecipitation Kit acquired from Sigma according to the manufacturer's instructions. Native Acr immunoprecipitations were performed on mycobacterial lysates using sepharose CL4B beads (Pharmacia) to which polyclonal rabbit antibodies generated against Acr had been conjugated according to the manufacturer's instructions. Briefly, a pre-clearing step was performed to remove any proteins from the lysate that might non-specifically bind to the sepharose beads. This was accomplished by adding 50  $\mu$ l of unconjugated sepharose to 975  $\mu$ l of TSA (0.01M Tris-HCl, pH 8; 0.14M NaCl; 0.025% NaN<sub>3</sub>) and 16  $\mu$ l of MTB lysate (2.3 mg/mL) in a 1.5 mL microfuge tube. The solution was incubated for one hr at 4 °C with constant rocking. The solution was then centrifuged for 5 sec at 14,000 rpm to pellet the sepharose and the supernatant removed and transferred to a new microfuge tube. 25  $\mu$ l of anti-Acr antibody conjugated sepharose beads were added to the supernatant and incubated for one hour at 4 °C with constant rocking. The solution was then centrifuged as previously described and the supernatant was removed and discarded. The sepharose pellet was then washed 4 times with 1 mL each of 1) 0.1% Triton X-100 in TSA, 2) 0.1% Triton X-100 in TSA, 3) TSA, 4) 0.05M Tris-HCl, pH 6.8. Addition of each solution was followed by resuspension of the sepharose pellet, a 5-second centrifugation to repellet the sepharose, and removal of the wash supernatant. Finally, 40  $\mu$ l of 2x gel loading buffer (Novex) was added to the sepharose pellet, and the suspension incubated for 1.5 hours at 56 °C. A final centrifugation was performed to re-pellet the sepharose and the supernatant (containing the immunoprecipitated Acr protein) was removed and saved for analysis by Western blot.

35 **Example 6: Western Blot.**

Immunoprecipitated Acr samples or mycobacterial lysates were resolved by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) with pre-cast 4-12% bis-Tris polyacrylamide gradient gels (Novex) for one hour at 200 volts constant. Following electrophoresis, the resolved proteins were transferred to a pre-cut 0.2-micron polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Novex) according to the manufacturer's instructions by electrocapillary transfer at 150 milliamps constant for one hour. Dried membranes were prepared for Acr detection by immersion in methanol and unconjugated PVDF surfaces were blocked by incubation of the membrane in TBS Tween 20

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 34 -

containing 3% gelatin (BioRad) for one hour with constant rocking. The membrane was then washed 3 times for 10 minutes each with TBS + Tween 20 with constant rocking.

Detection of Acr was accomplished by incubation of the membrane with a 1 to 5,000 dilution of polyclonal rabbit antibodies generated against Acr, or a 1:20,000 anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma), or a 1 to 250 dilution of rabbit anti-phosphotyrosine antibody (Zymed) in TBS + Tween 20 containing 1% gelatin for one hour with constant rocking. Subsequently, the membrane was washed as described above. A one-to-10,000 dilution of biotinylated goat-anti-rabbit IgG in TBS + Tween 20 with 1% gelatin was then applied to the blot, and incubated for one hour with constant rocking. Subsequently, the blot was washed as described above. A final incubation of the blot with a 1 to 10,000 dilution of a streptavidin - alkaline phosphatase (AP) conjugate in TBS + Tween 20 was incubated with the blot for 30 minutes with constant rocking. Detection of the presence of AP was accomplished by the incubation of the blot in a solution of NBT+BCIP (Novex). The incubation was halted when the desired level of color development was achieved, and stopped by extensive washing of the blot in water. Blots were dried for archiving.

Figure 8 shows five strips cut from a Western blot prepared as described of whole cell mycobacteria cell lysates; the arrows indicate the location of recombinant Acr protein. The strips were developed with the indicated primary antibodies. In addition to the control antibody, this blot demonstrates the presence of tyrosine phosphorylation in the final strip.

Figure 9 shows two Western blots prepared as described from culture supernatants of *M. tuberculosis* bacilli grown under the conditions indicated in the Brief Description of the Figures. Figure 9A was probed using rabbit anti-Acr antibody; Figure 9B is a control blot. Acr protein is detected in 7 day and 12 month anoxic cultures and *in vitro* granuloma. Lower molecular weight variants are observed in the 12 month and *in vitro* granuloma supernatants. For comparison, Figure 11 shows a Coomassie stained SDS-PAGE gel of culture supernatants from *M. tuberculosis* bacilli cultured under the indicated conditions.

#### Example 7: 2-Dimensional Gel Electrophoresis.

Lysates of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* carrying the Acr-FLAG fusion plasmids were prepared. Bacterial suspension cultures were pelleted by centrifugation (5,000 rpm, 10 minutes) and the bacterial pellet washed with phosphate buffered saline (PBS). Pellets were then resuspended in 1 mL of 9M urea and the suspension transferred to 2 mL microfuge tubes containing approximately 200  $\mu$ l of 0.1 mm diameter glass beads (Biospec products). The cells were then lysed by rapid shaking (three times, one minute each) in a Minibeadbeater (Biospec products). Following lysis, the cellular debris and glass beads were pelleted by centrifugation and the supernatant removed. Protein quantification was performed using the colorimetric BioRad protein assay (BioRad).

For resolution of the protein sample in the first dimension, 150 micrograms of protein was added to 92.5  $\mu$ l of solubilization buffer (9M Urea, 140 mM DTT, 4% Triton X-100) and brought to a final volume of 185  $\mu$ L with 9M urea. The suspension was incubated for one hour with constant rocking at room temperature. Following this incubation, 1  $\mu$ l Biolytes electrolyte solution (BioRad,

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 35 -

0.2% final), and several crystals of Bromophenol Blue (Fisher) were added. Hydration of the IPG strips and application of the protein solution to the strips was carried out overnight in a IPG strip hydration apparatus (Pharmacia). Following hydration the strips were subjected to electrophoresis in a LKB MultiPhor II apparatus (Pharmacia) using a Pharmacia EPS 3500 XL electrophoresis apparatus with the following parameters: 350V, 30 minutes, 350V-3500V (1.5 hour gradient), 3500V, 3.5 hours, to give a final running time of 15,200 Volt-hours.

For running the second dimension, the resolved IPG strips were equilibrated in equilibration buffer (6M Urea, 0.375M Tris, pH 8.8, 2% SDS, and 20% Glycerol) containing 2% w/v DTT (10 minutes) and 2.5% iodoacetamide (10 minutes). The equilibrated strips were resolved on Criterion (BioRad) 8-16% polyacrylamide gels according to the manufacturer's instructions for one hour at 200 volts constant.

Figure 10 is a representative two-dimensional gel electrophoresis analysis of a sample taken from *M. tuberculosis* grown under anoxic conditions. Acr protein is indicated by the circle.

15 **Example 8: Detection of Acr**

Using polyclonal antibodies produced against the cloned *M. tuberculosis* Acr protein, secreted bacterial Acr was detected in culture supernatants from anoxic chamber and the *in vitro* granuloma model (Figure 9). Polyclonal antiserum to Acr protein was also used to detect mycobacteria in aerosol infected guinea pig lung granuloma tissue (Figure 1C).

20 Acr protein was detected in supernatants and cell lysates from anoxic but not aerobic grown *M. tuberculosis* (Figure 9). Acr was immunoprecipitated from *M. tuberculosis* lysates. Changes in molecular weight of Acr were detected in anoxic or infected *in vitro* granulomas but not aerobic grown cultures (Figure 9). *M. tuberculosis* *acr* mRNA was detected in anoxic but not aerobic cultures and *acr* and eukaryotic actin mRNA in infected but not uninfected control guinea pig lungs (Figure 4).

This disclosure provides an *in vitro* granuloma model and methods of use, as well as immunological methods for the detection of latent tuberculosis in a subject. The *in vitro* granuloma model can be used, for example, to identify latency-specific antibodies and to screen drugs and immunostimulatory compounds. The immunological methods can include, for example, using a latency-specific *M. tuberculosis* antigen to detect a corresponding antibody from the subject, or using an antibody to detect the latency-specific antigen. The disclosure further provides methods for identifying latency-specific antigens (and their corresponding antibodies) for use in such methods, and specific latency-specific antigens such as  $\alpha$ -crystallin. It will be apparent that the precise details of the methods described may be varied or modified without departing from the spirit of the described disclosure. We claim all such modifications and variations that fall within the scope and spirit of the claims below.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 36 -

## CLAIMS

We claim:

- 5 1. An immunological assay method for detection of latent tuberculosis in a subject, comprising
- contacting a biological sample that may contain a first latency-specific binding partner (LSBP) from the subject with a corresponding LSBP, and
- 10 detecting binding between the first LSBP and the corresponding LSBP, wherein such binding is indicative of latent tuberculosis in the subject.
2. The method of claim 1, wherein the first LSBP is an antibody, and the corresponding LSBP is a latency-specific *M. tuberculosis* antigen.
3. The method of claim 2, wherein the antigen is  $\alpha$ -crystallin (Acr) or an immunogenic fragment thereof.
- 15 4. The method of claim 1, wherein the first LSBP is a latency-specific *M. tuberculosis* antigen, and the corresponding LSBP is an antibody.
5. The method of claim 4, wherein the antigen is Acr or an immunogenic fragment thereof.
6. A kit for the detection of latent tuberculosis in a subject, comprising at least one
- 20 LSBP and instructions for carrying out the method of claim 1.
7. A method of eliciting an immune response in a subject, comprising introducing into the subject an immune stimulatory amount of a *M. tuberculosis* latency-specific antigen or immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid molecule encoding such an antigen or immunogenic fragment.
- 25 8. The method of claim 7, which is a method of inhibiting a latent tuberculosis infection in the subject.
9. The method of claim 7, which is a method of treating a latent tuberculosis infection in the subject.
10. The method of claim 7, wherein the antigen is Acr.
- 30 11. The method of claim 7, wherein the elicited immune response results in decreased susceptibility of the subject to latent infection by *M. tuberculosis*.
12. A kit for eliciting an immune response in a subject, comprising an immune stimulatory amount of a *M. tuberculosis* latency-specific antigen or immunogenic fragment thereof, or a nucleic acid molecule encoding such an antigen or immunogenic fragment, and instructions for
- 35 carrying out the method of claim 7.
13. The kit of claim 12, further comprising instructions for administering a component of the kit to a patient with a possible latent tuberculosis infection.
14. An *in vitro* granuloma comprising peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and mycobacteria.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 37 -

15. The *in vitro* granuloma of claim 14, wherein the peripheral blood mononuclear cells are human peripheral blood mononuclear cells selected from the group consisting of monocytes, B lymphocytes, T lymphocytes, and combinations thereof.
16. The *in vitro* granuloma of claim 14, wherein the mycobacteria are *M. tuberculosis*.
- 5 17. The *in vitro* granuloma of claim 14, further comprising fibroblasts.
18. A method for producing an *in vitro* granuloma comprising combining peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and mycobacteria in a low attachment container and incubating the combination for a sufficient amount of time to form the *in vitro* granuloma.
19. The method of claim 18, wherein fibroblasts are added to the combination.
- 10 20. The method of claim 18, further comprising adding exogenous cytokine to the container in sufficient amount to enhance production of the *in vitro* granuloma.
21. The method of claim 20, wherein the exogenous cytokine is IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , or a combination of two or more thereof.
22. A method of screening a tuberculosis drug candidate for anti-tuberculosis
- 15 therapeutic activity comprising combining the drug with an *in vitro* granuloma comprising peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and mycobacteria, and determining whether the drug inhibits mycobacterial viability.
23. The method of claim 18 or claim 22, wherein the peripheral blood mononuclear cells are human peripheral blood mononuclear cells selected from the group consisting of monocytes,
- 20 B lymphocytes, T lymphocytes, and combinations thereof.
24. A method of screening a tuberculosis drug candidate for anti-tuberculosis therapeutic activity comprising combining the drug with an *in vitro* granuloma comprising peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and inactivated mycobacteria, and determining whether the drug inhibits reactivation of mycobacteria contained in the granuloma.
- 25 25. The method of claim 18, claim 22, or claim 24, wherein the mycobacteria are *M. tuberculosis*.
26. A method of screening a tuberculosis vaccine candidate comprising determining whether a mutant mycobacteria has a reduced ability, when compared against a wild type mycobacteria, to induce latency, survive, reactivate or induce granuloma necrosis in an *in vitro*
- 30 granuloma comprising peripheral blood mononuclear cells, autologous macrophages, and the mutant mycobacteria.
27. The method of claim 22, claim 24, or claim 26, wherein the *in vitro* granuloma further comprises fibroblasts.
28. The method of claim 26, wherein the mutant mycobacteria comprises a
- 35 mycobacteria strain having a mutation in a latency gene.
29. The method of claim 26, wherein the mutant mycobacteria is a *Mycobacterium tuberculosis* strain having a mutation in a gene selected from the group consisting of *acr*, a sigma factor gene, *oxyR* and *aphC*.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

- 38 -

30. The method of claim 29, wherein the sigma factor gene is selected from the group consisting of *sigE*, *sigC*, and *sigH*.
31. A kit for producing an *in vitro* granuloma, comprising a culture medium and instructions for carrying out the method of any one of claims 18, 22, 24, or 26.
- 5 32. The kit of claim 31, further comprising a low attachment container.
33. The kit of claim 31, further comprising an amount of a cytokine.

WO 02/054073

PCT/US02/00309

1/7

FIGURE 1

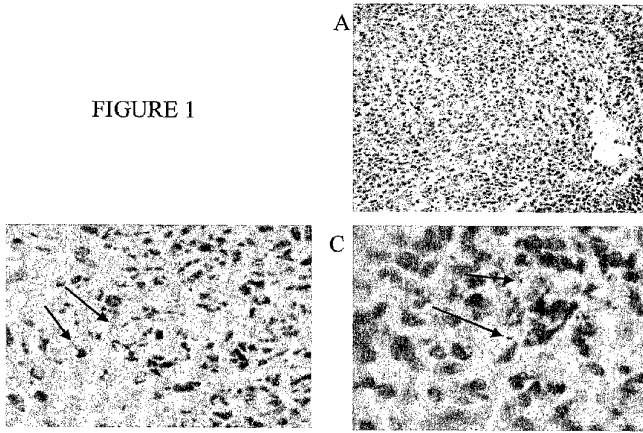
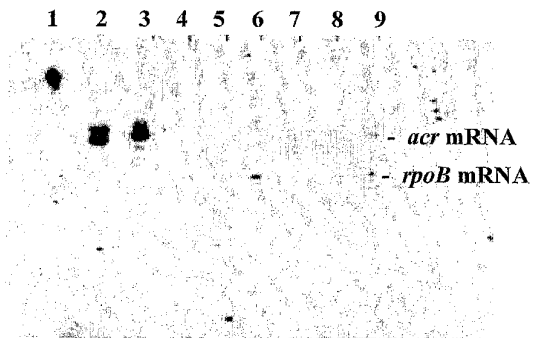


FIGURE 2

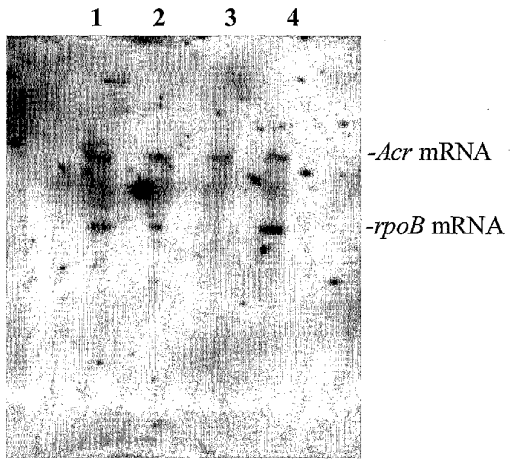


WO 02/054073

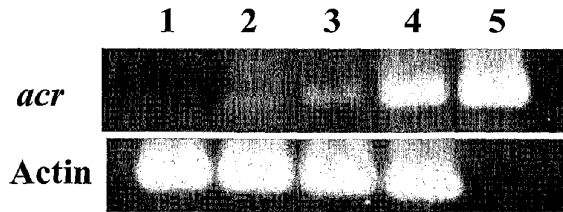
PCT/US02/00309

**FIGURE 3**

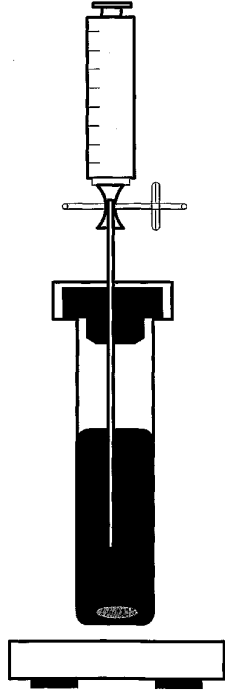
2/7



**FIGURE 4**



**FIGURE 5**



WO 02/054073

PCT/US02/00309

4/7

FIGURE 6

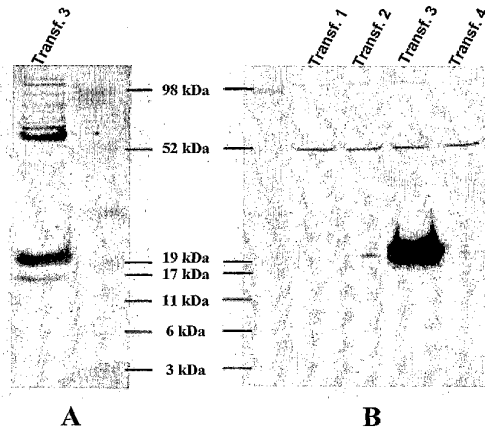
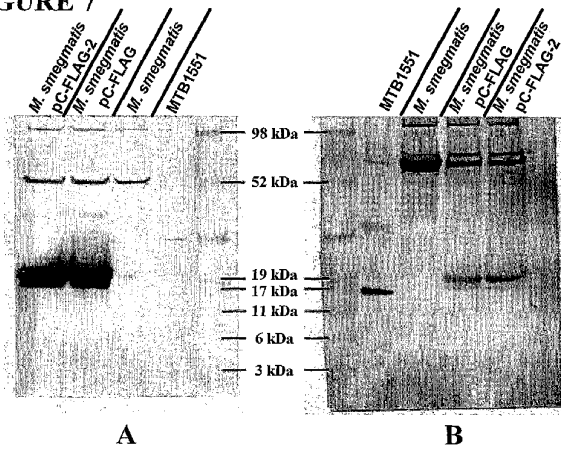
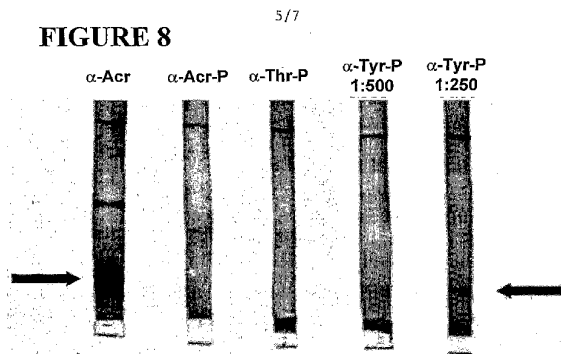


FIGURE 7

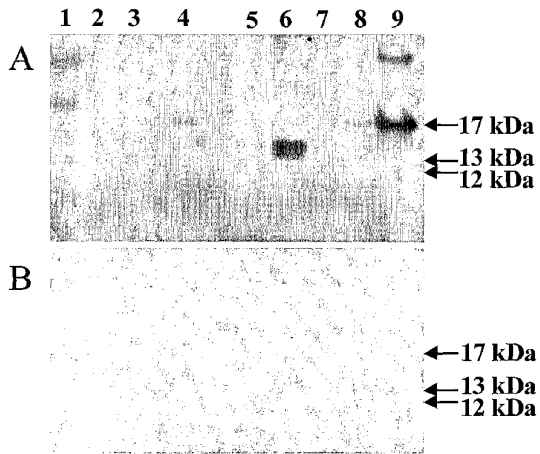


WO 02/054073

PCT/US02/00309



**FIGURE 9**

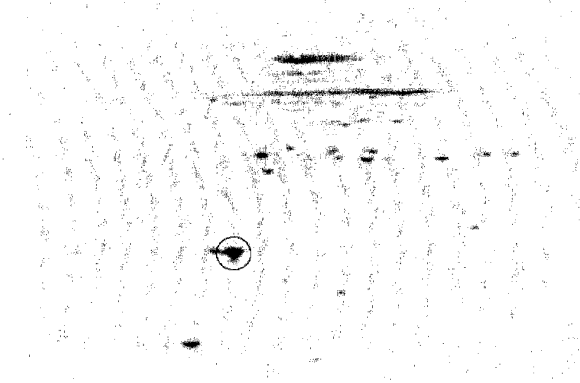


WO 02/054073

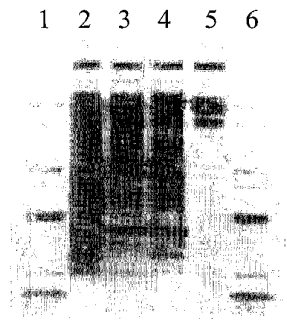
PCT/US02/00309

6/7

**FIGURE 10**



**FIGURE 11**



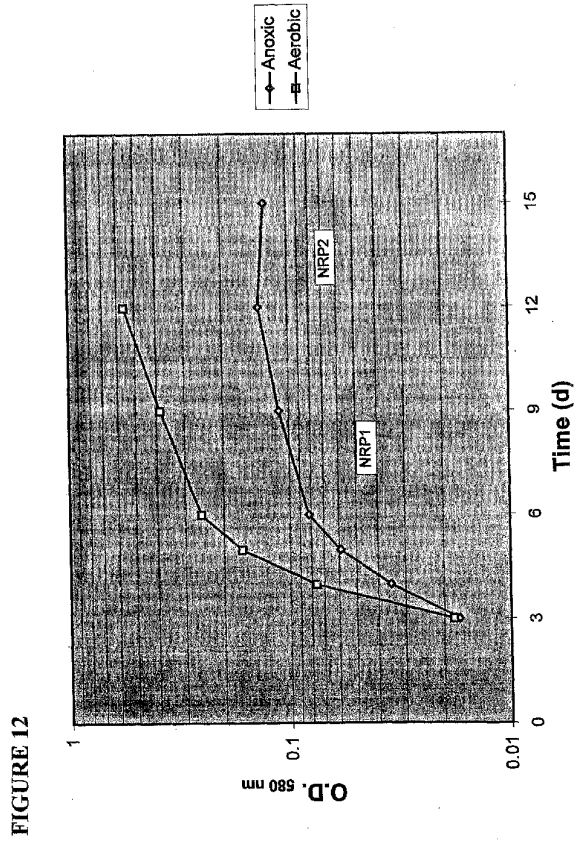


FIGURE 12

WO 02/054073

PCT/US02/00309

## SEQUENCE LISTING

<110> THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY,  
DEPARTMENT OF HEALTH & HUMAN SERVICES  
Quinn, Frederick  
Birkness, Kristin  
Deslauriers, Manon  
King, Peter  
Beall, David

<120> LATENT HUMAN TUBERCULOSIS MODEL, DIAGNOSTIC ANTIGENS, AND METHODS OF  
USE

<130> 6395-61943

<150> US 60/260,348  
<151> 2001-01-08

<150> US 60/311,235  
<151> 2001-08-09

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 1  
cgggatcca gattataaag atgatgatga taaaatggcc acaacccttc ccgt 54

<210> 2  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 2  
cgggatcct cagthggtgg acggatctg aat 33

<210> 3  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 3  
cgggatcca atggccacca cccttccg 29

WO 02/054073

PCT/US02/00309

<210> 4  
<211> 57  
<212> DNA  
<213> artificial sequence  
  
<220>  
<223> Synthetic Oligonucleotide  
  
<400> 4  
cgggatcct catttatcat catcatcttt ataatcggtg gggaccgca tctgaat 57

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/054073 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/569, C12R 1/32 BEALL, David, S. [US/US]; 327 10th Street, Atlantic Beach, FL 32233 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/00309 (74) Agent: HARDING, Tanya, M.; Klarquist, Sparkman, LLP, Suite 1600, One World Trade Center, 121 SW Salmon Street, Portland, OR 97204 (US).
- (22) International Filing Date: 7 January 2002 (07.01.2002)
- (25) Filing Language: English (81) Designated States (national): AH, AG, AI, 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, GH, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (26) Publication Language: English (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Priority Data: 60/260,348 8 January 2001 (08.01.2001) US  
60/311,235 9 August 2001 (09.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA as represented by THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [US/US]; Technology Transfer Office, 4770 Buford Highway (K79), Atlanta, GA 30341 (US).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): QUINN, Frederick, D. [US/US]; 3243 Wiltshire Drive, Avondale Estates, GA 30002 (US); BIRKNESS, Kristin, A. [US/US]; 268 Lighth Street #7, Atlanta, GA 30309 (US); DESLAURIERS, Manon [CA/US]; 4006 Northlake Creek Court, Tucker, GA 30084 (US); KING, Peter [US/US]; 4709 Wood Creek Drive, Nacogdoches, TX 75961 (US).
- Published:  
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 28 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/054073 A3

(54) Title: LATENT HUMAN TUBERCULOSIS MODEL, DIAGNOSTIC ANTIGENS, AND METHODS OF USE

(57) Abstract: Provided herein is an *in vitro* granuloma model and methods of its use. Methods of detecting and/or diagnosing latent tuberculosis in a subject are also provided, as are latency-specific antigens (and antibodies thereto), such as  $\alpha$ -crystallin, and methods of identifying and using such molecules. Also provided are immunostimulatory compositions, for instance for use in eliciting an immune response in a subject, such as an immune response to a latent tuberculosis infection. Kits for carrying out the provided methods are also described.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 02/00309
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/569 C12R1/32		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 29132 A (UNIV NEW YORK) 9 July 1998 (1998-07-09) claims 10,12,20	1,2,6
Y	claims 10,12,20	1-13
X	WO 97 26007 A (BERNARDO JOHN ;UNIV BOSTON (US); RAJNA JAWAHAR L (US); FENTON MATT) 24 July 1997 (1997-07-24) page 22, line 24 - line 25 -/-	1,2
<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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 May 2003	Date of mailing of the international search report 06.06.03	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo-nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Cuendet, P	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/US 02/00309

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILKINSON R J ET AL: "Human T- and B-cell reactivity to the 16kDa alpha-crystallin protein of Mycobacterium tuberculosis." SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 48, no. 4, October 1998 (1998-10), pages 403-409, XP002217751 ISSN: 0300-9475 page 403, right-hand column -page 404, left-hand column, paragraph 1	7
Y	CUNNINGHAM ADAM F ET AL: "Mycobacterial stationary phase induced low oxygen tension: Cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 180, no. 4, February 1998 (1998-02), pages 801-808, XP002217752 ISSN: 0021-9193 abstract page 801	1-13
X	page 807, paragraph 3	14-21, 31-33
X	WO 99 02670 A (BARRY CLIFTON E III ;CRANE DEBORAH (US); US HEALTH (US); YUAN YING) 21 January 1999 (1999-01-21) page 13, line 25 -page 14, line 5 page 20 -page 24	14-31
X	YUAN ET AL: "Stationary phase-associated protein expression in Mycobacterium tuberculosis: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 178, no. 15, 1 August 1996 (1996-08-01), pages 4484-4492, XP002086106 ISSN: 0021-9193 page 4484, right-hand column, paragraph 1 page 4491, left-hand column, paragraph 2	14-31
X	WAYNE LAWRENCE G ET AL: "An in vitro model for sequential study of shift-down of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 64, no. 6, 1996, pages 2062-2069, XP002240188 ISSN: 0019-9567 cited in the application abstract	14-31

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 02/00309
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: <b>Claims 7-11 relate to Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy; nevertheless these claims were searched.</b></p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: 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:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p>	
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

International Application No. PCT/US 02/00309

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. Claims: 1-13

detecting latent tuberculosis by use of latency-specific binding partners.

## 2. Claims: 14-33

in vitro granuloma and its use for screening a tuberculosis drug.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No	
Information on patent family members				PCT/US 02/00309	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Publication date	Publication date
WO 9829132 A	09-07-1998	AU 746752 B2	02-05-2002		
		AU 5905198 A	31-07-1998		
		EP 0952849 A1	03-11-1999		
		WO 9829132 A1	09-07-1998		
WO 9726007 A	24-07-1997	AU 1750197 A	11-08-1997		
		WO 9726007 A1	24-07-1997		
WO 9902670 A	21-01-1999	AU 8296498 A	08-02-1999		
		EP 0994944 A1	26-04-2000		
		WO 9902670 A1	21-01-1999		
		US 6403100 B1	11-06-2002		

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/06	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	E

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 バークネス クリスティン エー .

アメリカ合州国 ジョージア州 アトランタ エイトス ストリート # 7 2 6 8

(72) 発明者 デスローリエス マノン

アメリカ合州国 ジョージア州 タッカー ノースレイク クリーク コート 4 0 0 6

(72) 発明者 キング ピーター

アメリカ合州国 テキサス州 ナコドチェス ウッド クリーク ドライブ 4 7 0 9

(72) 発明者 ビーオール デイヴィッド エス .

アメリカ合州国 フロリダ州 アトランティック ビーチ 1 0 ス ストリート 3 2 7

F ターム(参考) 2G045 BB10 BB20 BB24 BB50 BB51 CB01 CB21 DA13 DA36 FB02

FB03 FB05

4B024 AA13 CA04 DA02 GA11 HA17

4B063 QA18 QQ02 QQ06 QQ08 QQ20 QQ98 QR75 QR77 QS24 QX01

4B065 AA36X AA93X AC20 BA22 BB34 CA46

4C084 AA13 AA17 CA04 DC50 NA14 ZA591 ZA592 ZB351 ZB352

4C085 AA03 BA09 CC07 DD01 EE01

专利名称(译)	潜在的人类TB模型，诊断抗原和用法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005506512A</a>	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2002554720	申请日	2002-01-07
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	クインフレデリックディ パークネスクリスティンエー デスローリエスマノン キングピーター ビーオールデイヴィッドエス		
发明人	クイン フレデリック ディ. パークネス クリスティン エー. デスローリエス マノン キング ピーター ビーオール デイヴィッド エス.		
IPC分类号	A61K39/04 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/06 C12N5/06 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5695 C12Q1/025 G01N33/5047 G01N33/56955		
FI分类号	G01N33/569.ZNA.F A61K39/04 A61K45/00 A61K48/00 A61P31/06 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N15/00.A C12N5/00.E		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA13 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA17 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ20 4B063/QQ98 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QS24 4B063/QX01 4B065/AA36X 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BA22 4B065/BB34 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/CA04 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/BA09 4C085/CC07 4C085/DD01 4C085/EE01		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/260348 2001-01-08 US 60/311235 2001-08-09 US		
其他公开文献	JP2005506512A5 JP3944452B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

在此，提供了体外*in vitro*肉芽肿模型及其用途。还提供了用于检测和/或诊断受试者中潜伏性结核的方法，以及潜伏期特异性抗原（及其抗体），例如α-晶状体蛋白，以及鉴定和使用此类分子的方法。这一点。还提供了免疫刺激组合物，用于在受试者中引发免疫应答，例如对潜伏性结核感染的免疫应答。还描述了用于执行所提供的方法的套件。

【 2 】

