

(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2013-528386

(P2013-528386A)

(43) 公表日 平成25年7月11日(2013.7.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	B 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁)

(21) 出願番号	特願2013-513156 (P2013-513156)	(71) 出願人	512312576
(86) (22) 出願日	平成23年6月3日 (2011.6.3)		ザ テキサス エーアンドエム ユニバー シティ システム
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月31日 (2013.1.31)		アメリカ合衆国 7 7 8 4 3 - 3 3 6 9
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/001018		テキサス州 カレッジ・ステーション タ ム 3 3 6 9
(87) 国際公開番号	W02011/152883	(71) 出願人	512312727
(87) 国際公開日	平成23年12月8日 (2011.12.8)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニ ア ユニバーシティ
(31) 優先権主張番号	12/802, 340		アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 - 1 1 0 6
(32) 優先日	平成22年6月4日 (2010.6.4)		カリフォルニア州 パロ・アルト エル・ カミノ・リアル 1 7 0 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082072
			弁理士 清原 義博
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インビトロ診断、および、インビボ画像化、診断、ならびに、治療のための細菌β-ラクタマーゼの使用

(57) 【要約】

細菌酵素のための基質を用いて、病原性細菌とそれに関連する疾病を検出、定量化、区別、診断、および、画像化するための方法が本明細書で提供される。細菌の存在下で基質または酵素生成物によって発せられた蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルが対照と比較されることで、病原性細菌を検出して位置付ける。有力な治療用化合物の存在下と不在下で、基質と生成物から発せられたシグナルを測定することによって、病態生理学的状態を処置するための治療用薬剤をスクリーニングするための方法と、生物学的サンプルを基質に接触させ、マイコバクテリア - ラクタマーゼ生成物から発せられた信号を画像化することで、被験体のマイコバクテリア細菌を検出するための診断方法とが本明細書で提供される。色またはpHの変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含む蛍光発生基質または基質も提供される。

【選択図】 図 1 8

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体においてリアルタイムで病原性細菌を検出するための方法であって、
前記方法は、

被験体に、病原性細菌の - ラクタマーゼのための基質を導入する工程、または、被験体のサンプルまたは表面から得られたサンプルを、病原性細菌の - ラクタマーゼのための基質に接触させる工程と、

基質における - ラクタマーゼ活性からの生成物のためにサンプルまたは被験体を画像化する工程と、

- ラクタマーゼ生成物によって発せられた波長のシグナルを獲得する工程であって、
それによって、被験体の病原性細菌を検出する工程を含む、方法。

10

【請求項 2】

被験体の病原性細菌の位置を決定するために、発せられたシグナルの 3D 再構成を作成する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

感染細胞を定量化する工程と、生体サンプル中で非感染細胞と感染細胞を区別する工程の 1 つまたは両方をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

感染細胞を区別する工程および / または感染細胞を定量化する工程は、フローサイトメトリー法、共焦点顕微鏡法、または、蛍光分光法の 1 つ以上を用いることによって行われる、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

基質は、蛍光発生基質 CDC - 1、CDC - 2、CDC - 3、CDC - 4、CDC - 5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26、または、XHX3-32、あるいは、その誘導体またはアナログである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

基質は、色または pH の変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含む、
請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

基質は、粒子または微粒子に結合するか、あるいは、ビオチンに結合する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

生物学的サンプルは、痰、胸水、尿、血液、唾液、大便、または、被験体の関心領域からふき取って得られるサンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

病原性細菌は、バクテロイド属、クロストリジウム属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、シュードモナス属、ヘモフィルス属、レジオネラ属、マイコバクテリウム属、エシェリキア属、サルモネラ属、シゲラ属、またはリステリア属の細菌種である、
請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

病原性細菌は、マイコバクテリウムツベルクローシスコンプレックス、または、マイコバクテリウムアビウムコンプレックスを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

獲得されたシグナルは、蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

画像化波長は約 300 nm 乃至約 900 nm であり、発光波長は約 300 nm 乃至約 9

50

0 0 n mである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

画像化波長は約 5 4 0 n m乃至約 7 3 0 n mであり、発光波長は約 6 5 0 n m乃至約 8 0 0 n mである、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

被験体の病原性細菌に関連する病態生理学的状態を診断するための方法であって、
前記方法は、

病原性細菌の - ラクタマーゼ用の基質を被験体に投与する工程、あるいは、被験体に
由来する生物学的サンプルを、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の基質に接触させる工程

、
基質における - ラクタマーゼ活性の生成物のために被験体を画像化する工程、および

、
生成物によって発せられる波長のシグナル強度をリアルタイムで獲得する工程を含み、
測定された対照シグナルよりも大きなシグナル強度は、病態生理学的状態の診断と相關
する、方法。

【請求項 1 5】

病原性微生物の位置を決定するために、シグナルの 3 D再構成を作成する工程をさらに
含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

感染細胞を定量化する工程と、感染細胞を生物学的サンプル中の非感染細胞と区別する
工程の 1 つまたは両方をさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

感染細胞を区別するおよび / または定量化する工程は、フローサイトメトリー法、共焦
点顕微鏡法、または、蛍光分光法の 1 以上を用いて行われる、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

病態生理学的状態を処置するのに有効な 1 以上の治療用化合物を投与する工程を含む、
請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 9】

被験体に基質を再投与する工程、または、基質に由来する生物学的サンプルを前記基質
に接触させる工程と、

治療用化合物の有効性をモニターするために被験体を画像化する工程をさらに含み、

診断時のシグナルと比較した発せられたシグナルの減少は、病態生理学的状態に対する
治療効果を示す、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 0】

病態生理学的状態は結核である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 1】

生物学的サンプルは、痰、胸水、尿、血液、唾液、大便、または、被験体の関心領域か
らふき取って得られるサンプルである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 2】

病原性細菌は、バクテロイド属、クロストリジウム属、ストレプトコッカス属、スタフ
イロコッカス属、シュードモナス属、ヘモフィルス属、レジオネラ属、マイコバクテリウ
ム属、エシェリキア属、サルモネラ属、シゲラ属、または、リステリア属の細菌種である
、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 3】

病原性細菌は、マイコバクテリウムツベルクローシスコンプレックス、または、マイコ
バクテリウムアビウムコンプレックスを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

基質は、蛍光発生基質 C D C - 1、C D C - 2、C D C - 3、C D C - 4、C D C - 5
、C N I R 5、C N I R 5 . 2、C N I R 5 - Q S Y 2 2、C N I R 7、C N I R 7 - T
A T、C N I R 9、C N I R 1 0、C N I R 8 0 0、C N I R 8 0 0 . 2、C N I R 8 0

10

20

30

40

50

0 - 3、X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1、X H X 3 - 2、X H X 3 - 2 6、または、X H X 3 - 3 2、あるいは、その誘導体またはアナログである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 5】

基質は、色または pH の変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

基質は、粒子または微粒子に結合するか、あるいは、ビオチンに結合する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

測定されたシグナルは、蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 8】

画像化波長は約 3 0 0 n m 乃至約 9 0 0 n m であり、発光波長は約 3 0 0 n m 乃至約 9 0 0 n m である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 9】

画像化波長は約 5 4 0 n m 乃至約 7 3 0 n m であり、発光波長は約 6 5 0 n m 乃至約 8 0 0 n m である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

被験体のマイコバクテリア感染を検出するための診断方法であって、

前記方法は、

被験体から生物学的サンプルを得る工程と、

マイコバクテリアの - ラクタマーゼ酵素の基質に生物学的サンプルを接触させる工程と、

基質における - ラクタマーゼ活性の生成物のために生物学的サンプルを画像化する工程と、

生成物によって発せられた波長でシグナルの強度を測定する工程を含み、

測定された対照シグナルよりも大きなシグナルの強度は、マイコバクテリア感染の存在を示す、方法。

【請求項 3 1】

感染細胞を定量化する工程と、生体サンプル中で非感染細胞と感染細胞を区別する工程の 1 つまたは両方をさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

感染細胞を区別するおよび / または定量化する工程は、フローサイトメトリー法、共焦点顕微鏡法、または、蛍光分光法の 1 以上を用いて行われる、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

マイコバクテリア感染の検出後、被験体に施される治療計画の治療効果をモニターするために、前記方法の工程を 1 度以上繰り返す工程をさらに含み、対照と比較した測定されたシグナルの減少は、治療計画に対する肯定的な反応と相関する、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

生物学的サンプルは、痰、胸水、尿、血液、唾液、大便、または、被験体の関心領域からふき取って得られるサンプルである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

マイコバクテリア感染は、マイコバクテリウムツベルクローシス、マイコバクテリウムツベルクローシスコンプレックス、マイコバクテリウムアビウム、または、マイコバクテリウムアビウムコンプレックスによって引き起こされる、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 6】

基質は、蛍光発生基質 C D C - 1、C D C - 2、C D C - 3、C D C - 4、C D C - 5、C N I R 5、C N I R 5 . 2、C N I R 5 - Q S Y 2 2、C N I R 7、C N I R 7 - T

10

20

30

40

50

A T、C N I R 9、C N I R 1 0、C N I R 8 0 0、C N I R 8 0 0 . 2、C N I R 8 0 0 - 3、X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1、X H X 3 - 2、X H X 3 - 2 6、または、X H X 3 - 3 2、あるいは、その誘導体またはアナログである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 7】

基質は、色または p H の変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含む、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 8】

基質は、粒子または微粒子に結合するか、あるいは、ビオチンに結合する、請求項 3 7 に記載の方法。

10

【請求項 3 9】

測定されたシグナルは、蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 4 0】

画像化波長は約 3 0 0 n m 乃至約 9 0 0 n m であり、発光波長は約 3 0 0 n m 乃至約 9 0 0 n m である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 4 1】

画像化波長は約 5 4 0 n m 乃至約 7 3 0 n m であり、発光波長は約 6 5 0 n m 乃至約 8 0 0 n m である、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

20

被験体の病原性細菌に関連する病態生理学的状態を処置するために有効な治療用化合物を選抜するための方法であって、

前記方法は、

病原性細菌に有効な治療用化合物を選択する工程と、

細菌細胞または細菌細胞を含む生物学的サンプルを、その細菌 - ラクタマーゼの基質に接触させる工程と、

細菌細胞または細菌細胞を含む生物学的サンプルを、有効な治療用化合物に接触させる工程と、

有効な治療用化合物の存在下および不在下で、細菌細胞によって生成された蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルを測定する工程を含み、

30

治療用化合物の不在下でのシグナルと比べて、治療用化合物の存在下でのシグナルの減少は、病原性細菌に対する化合物の治療効果を示す、方法。

【請求項 4 3】

基質は、蛍光発生基質 C C 1、C C 2、C H P Q、C R 2、C N I R 1、C N I R 2、C N I R 3、C N I R 4、C N I R 5、C N I R 5 . 2、C N I R 5 - Q S Y 2 2、C N I R 7、C N I R 7 - T A T、C N I R 9、C N I R 1 0、C N I R 8 0 0、C N I R 8 0 0 . 2、C N I R 8 0 0 - 3、C D C - 1、C D C - 2、C D C - 3、C D C - 4、C D C - 5、X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1、X H X 3 - 2、X H X 3 - 2 6、または、X H X 3 - 3 2、あるいは、その誘導体またはアナログである、請求項 4 2 に記載の方法。

40

【請求項 4 4】

基質は、色または p H の変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

基質は、粒子または微粒子に結合するか、あるいは、ビオチンに結合する、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

病原性細菌は、バクテロイド属、クロストリジウム属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、シュードモナス属、ヘモフィルス属、レジオネラ属、マイコバクテリウム属、エシェリキア属、サルモネラ属、シゲラ属、または、リステリア属の細菌種である

50

、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】

病原性細菌は、マイコバクテリウムツベルクローシスコンプレックス、または、マイコバクテリウムアビウムコンプレックスを含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

病態生理学的状态は結核である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 9】

細菌細胞によって生成されたシグナルは、約 3 0 0 n m 乃至約 9 0 0 n m の波長を有する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 5 0】

細菌細胞によって生成されたシグナルは、約 6 5 0 n m 乃至約 8 0 0 n m の波長を有する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

- ラクタマーゼ活性後の検出可能な蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルを生成する細菌の - ラクタマーゼのための基質。

【請求項 5 2】

基質は、蛍光発生基質 C D C - 1、C D C - 2、C D C - 3、C D C - 4、C D C - 5、C N I R 5、C N I R 5 . 2、C N I R 5 - Q S Y 2 2、C N I R 7、C N I R 7 - T A T、C N I R 9、C N I R 1 0、C N I R 8 0 0、C N I R 8 0 0 . 2、C N I R 8 0 0 - 3、X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1、X H X 3 - 2、X H X 3 - 2 6、または、X H X 3 - 3 2、あるいは、その誘導体またはアナログである、請求項 5 1 に記載の基質。

【請求項 5 3】

基質は、基質における - ラクタマーゼ活性後の色または p H の変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含む、請求項 5 1 に記載の基質。

【請求項 5 4】

粒子、微粒子、または、それらに結合したビオチンをさらに含む、請求項 5 1 に記載の基質。

【請求項 5 5】

生物学的サンプル中の病原性細菌を明白に検出するためのアッセイ装置であって、

前記アッセイ装置は、

生物学的サンプルと、病原性細菌に関連する - ラクタマーゼ酵素用の発色基質とを含む培養混合物を収容するための手段、および、収容手段と流体連通する基質における - ラクタマーゼ活性によって生じる有色生成物を捕捉して濃縮するための手段を含む、プラットフォームを含んでいる、アッセイ装置。

【請求項 5 6】

有色生成物のみが収容手段から下流に流れることを可能にするための手段をさらに含む、請求項 5 5 に記載のアッセイ装置。

【請求項 5 7】

収容手段から下流の内部制御をさらに含む、請求項 5 5 に記載のアッセイ装置。

【請求項 5 8】

収容手段から下流の流体を吸収するための手段をさらに含む、請求項 5 5 に記載のアッセイ装置。

【請求項 5 9】

基質は、有色色素または化学試薬を含む、請求項 5 5 に記載のアッセイ装置。

【請求項 6 0】

基質は、粒子または微粒子に結合する、請求項 5 5 に記載のアッセイ装置。

【請求項 6 1】

基質は化学試薬を含み、前記アッセイ装置は、化学試薬から発色するための手段として第 2 の試薬を含む、請求項 5 5 に記載のアッセイ装置。

10

20

30

40

50

【請求項 6 2】

基質はビオチンに結合し、前記アッセイ装置はビオチンに結合した基質を捕捉するための手段としてアビジンをさらに含む、請求項 5 5 に記載のアッセイ装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

< 関連出願への相互参照 >

この国際出願は、2010年6月4日に提出された係属中の米国一部継続特許出願 12 / 802, 340 号の合衆国法典第 35 巻の第 120 条の下で優先権の利益を主張し、該文献は、2009年8月6日に提出された係属中の米国非仮特許出願 12 / 462, 644 号の合衆国法典第 35 巻の第 120 条の下で優先権の利益を主張し、該文献は、2008年12月24日に提出され、放棄された米国特許出願 61 / 203, 605 号と、2008年8月6日に提出され、放棄された米国仮特許出願 61 / 188, 112 号の合衆国法典第 35 巻の第 119 条 (e) の下で優先権の利益を主張し、これらのすべての内容はそのまま引用されることによって本明細書に組み込まれる。

10

【背景技術】

【0002】

本発明は、一般的に医学、病原性の微生物学、および、画像化技術の分野に関する。より具体的には、本発明は、被験体のインビトロ (in vitro) またはインビボ (in vivo) での画像化中に病原性微生物を検出し特定するのに有用な化合物およびレポーターに関する。

20

【0003】

< 関連技術の詳細 >

多くの細菌感染は、世界中でかなりの罹患率および死亡率を引き起こし、最も重要な細菌種の多くは - ラクタマーゼ陽性であり、標準的なペニシリン様抗生物質に対する耐性をつけている。これらの多くの感染症とペニシリン耐性の存在を診断することは、困難なことがしばしばあり、易罹患性の決定に先立って、診断施設での大規模な培養を必要とする。

【0004】

例えば、結核は現在、世界の人口のほぼ 3 分の 1 に影響を与え、依然として公衆衛生の深刻な脅威である。簡単に治療することができない複数の薬物耐性かつ広範囲な薬物耐性株が世界中にずっと存在していることを考えると、懸念は一層大きくなる。研究室で、培養細胞中で、および、動物モデルとヒトで感染中に、結核菌の生存率を定量化して評価する方法は、コロニー形成単位 (CFU) および / または組織や痰の顕微鏡検査に限定される。これらの方法は時間がかかり、しばしば解釈するのが難しく、比較的感度が低い。ほとんどの方法は、動物と人間の場合に、死後行わなければならない侵襲的な手順を必要とする。これらの欠点ゆえに、動物モデルと患者との両方で、疾患の進行、ワクチンの有効性、および、治療上の結果をはっきりと理解するのが難しい。光学撮像法は、感染中の結核菌の生存率、治療の有効性、および、疾患中の細菌の位置特定の直接的な確認を、非侵襲的な方法でリアルタイムに行うことを可能にする。

30

40

【0005】

したがって、細菌性疾患を画像化して診断する方法を改善する必要性が当該技術分野で認められている。より具体的には、先行技術は、細菌感染を診断して見つけ出し、新しい治療法を迅速に探り、新しい薬剤標的を特定するために、インビトロで、かつ、生存している被験体内で用いることが可能な、 - ラクタマーゼ陽性細菌のための高感度で特異的なリアルタイムでの光学画像化が欠けている。本発明は当該技術分野でのこの長年の必要性と要求を満たすものである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

50

本発明は被験体においてリアルタイムで病原性細菌を検出するための方法を対象としている。本方法は、被験体または被験体からの生物学的サンプルに、病原性細菌の - ラクタマーゼのための蛍光性、発光性、または、発色性の基質を導入する工程と、基質における - ラクタマーゼ活性からの生成物のためにサンプルまたは被験体を画像化する工程を含む。 - ラクタマーゼ生成物によって発せられた波長のシグナルが獲得され、それによって、被験体の病原性細菌を検出する。本発明は、被験体の病原性細菌の位置を決定するために、発せられたシグナルの3D再構成を作成する工程をさらに含む、関連する方法を対象としている。本発明は、測定された対照シグナルよりも大きな発せられたシグナル強度に基づいて病原性細菌に関連した病態生理学的状態をリアルタイムで診断する工程をさらに含む、別の関連する方法を対象としている。例えば、蛍光性、発光性、または、発色性の基質は、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、ケージドルシフェリン、比色試薬、または、その誘導体あるいはアナログである。

10

【0007】

本発明はリアルタイムで病原性細菌を検出するための関連した方法を対象としている。本方法は、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の基質を被験体へ導入する工程、被験体からの、または、表面から得られた生物学的サンプルを病原性細菌の - ラクタマーゼ用の基質に接触させる工程、および、基質における - ラクタマーゼ活性からの生成物のためにサンプルまたは被験体を画像化する工程を含む。 - ラクタマーゼ生成物によって発せられた波長のシグナルが獲得され、それによって、被験体の病原性細菌を検出する。本発明は、感染細胞を定量化する工程と、生物学的サンプル中で非感染細胞と感染細胞を区別する工程の1つまたは両方をさらに含む、関連した方法を対象としている。本発明は、被験体の病原性細菌の位置を決定するために、発せられたシグナルの3D再構成を作成する工程をさらに含む、別の関連する方法を対象としている。例えば、基質は、蛍光発生基質CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5-2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800-2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26、または、XHX3-32、その誘導体またはアナログであってもよく、あるいは、基質は、基質における - ラクタマーゼ活性による色またはpHの変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含んでもよい。

20

30

【0008】

本発明は、被験体の病原性細菌に関連する病態生理学的状態を診断する方法も対象としている。本方法は、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の蛍光性または発光性の基質を被験体に投与する工程、あるいは、被験体に由来する生物学的サンプルを、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の蛍光性または発光性の基質に接触させる工程、および、基質における - ラクタマーゼ活性の生成物のために被験体を画像化する工程を含む。蛍光性、発光性、または、発色性のシグナル強度は、測定された対照シグナルよりも大きな蛍光性、発光性、または、発色性のシグナル強度が病態生理学的状態の診断と相関するように、生成物によって発せられた波長でリアルタイムで測定される。本発明は、病原性微生物の位置を決定するために、シグナルの3D再構成を作成する工程をさらに含む関連方法を対象としている。本発明は、病態生理学的状態を処置するのに有効な1つ以上の治療用化合物を投与する工程をさらに含む、別の関連する方法を対象としている。本発明は、被験体に蛍光性化合物を再投与する工程、および、被験体を再画像化する工程または被験体に由来する生物学的サンプルを前記蛍光発生基質に接触させる工程と、診断時のシグナルと比較して発せられたシグナルの減少が病態生理学的状態に対する治療効果を示唆するように、治療用化合物の有効性をモニターするために、被験体または前記生物学的サンプルを画像化する工程を含む、さらに関連する方法を対象としている。例えば、蛍光発生基質または発光基質は、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、ケージドルシフェリン、比

40

50

色試薬、または、その誘導体あるいはアナログである。

【0009】

本発明は、被験体の病原性細菌に関連する病態生理学的状態を診断するための関連方法を対象としている。本方法は、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の基質を被験体に投与する工程、あるいは、被験体に由来する生物学的サンプルを、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の基質に接触させる工程、および、基質における - ラクタマーゼ活性の生成物のために被験体を画像化する工程を含む。例えば、蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルなどのシグナル強度は、生成物によって発せられた波長でリアルタイムで測定され、測定された対照シグナルよりも大きなシグナルの強度は病態生理学的状態の診断に相関する。本発明は、感染細胞を定量化する工程と、生物学的サンプル中で非感染細胞と感染細胞を区別する工程の1つまたは両方をさらに含む、関連する方法を対象としている。本発明は、病原性微生物の位置を決定するために、シグナルの3D再構成を作成する工程をさらに含む別の関連方法を対象としている。特に、基質は、蛍光発生基質CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、HHX2-81、HHX2-91、HHX3-1、HHX3-2、HHX3-26、または、HHX3-32であってもよく、あるいは、その誘導体またはアナログは、基質における - ラクタマーゼ活性による色またはpHの変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含んでもよい。

10

20

【0010】

本発明は、被験体のマイコバクテリア感染を検出するための診断方法をさらに対象としている。本方法は、被験体から生物学的サンプルを得る工程と、マイコバクテリアの - ラクタマーゼ酵素の基質に生物学的サンプルを接触させる工程を含む。生物学的サンプルは、基質における - ラクタマーゼ活性の生成物を検出するために画像化され、シグナルの強度は、生成物によって発せられた波長で測定され、測定された対照シグナルよりも大きなシグナルの強度はマイコバクテリア感染の存在を示す。本発明は、感染細胞を定量化する工程と、生物学的サンプル中で非感染細胞と感染細胞を区別する工程の1つまたは両方をさらに含む、関連する方法を対象としている。本発明は、マイコバクテリア感染の検出後、被験体に施される治療計画の治療効果をモニターするために、これらの方法工程を1度以上繰り返す工程をさらに含む別の関連する方法を対象としており、対照と比較して測定されたシグナルの減少は、治療計画に対する肯定的な反応と相関する。基質は、蛍光発生基質CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、HHX2-81、HHX2-91、HHX3-1、HHX3-2、HHX3-26、または、HHX3-32であってもよく、あるいは、その誘導体またはアナログは、基質における - ラクタマーゼ活性による色またはpHの変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含んでもよい。

30

40

【0011】

本発明は、被験体の病原性細菌に関連する病態生理学的状態を処置するために有効な治療用化合物を選抜するための方法を対象としている。本方法は、病原性細菌に有力な治療用化合物を選択する工程と、細菌細胞または細菌細胞を含む生物学的サンプルを、蛍光性、発光性、または、発色性の検出剤に接触させる工程と、細菌細胞を有力な治療用化合物と接触させる工程を含む。細菌細胞または細菌細胞を含む生物学的サンプルによって生じる蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルは、有力な化合物の存在下と不在下で測定され、有力な化合物の不在下でのシグナルと比較して有力な化合物の存在下でのシグナルの減少は、病原性細菌に対する化合物の治療効果を示す。例えば、蛍光性、発光性、または、発色性の検出剤は、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、ケージドルシフェリン、比色試薬、または、その誘導体である。

50

【 0 0 1 2 】

本発明は、被験体の病原性細菌に関連する病態生理学的状態を処置するために有効な治療化合物を選抜するための方法を対象としている。本方法は、C D C - 1、C D C - 2、C D C - 3、C D C - 4、C D C - 5、C N I R 5、C N I R 5 . 2、C N I R 5 - Q S Y 2 2、C N I R 7、C N I R 7 - T A T、C N I R 9、C N I R 1 0、C N I R 8 0 0、C N I R 8 0 0 . 2、C N I R 8 0 0 - 3、X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1、X H X 3 - 2、X H X 3 - 2 6、または、X H X 3 - 3 2、あるいは、その誘導体またはアナログである蛍光発生基質を検出剤として用いて、直前に記載の工程を含むか、あるいは、該基質における - ラクタマーゼ活性後の色またはp Hの変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含んでもよい。

10

【 0 0 1 3 】

本発明は、病原性細菌を画像化するための方法をさらに対象としている。本方法は、病原性細菌をその - ラクタマーゼ酵素用の蛍光発生基質に接触させる工程と、基質における - ラクタマーゼ活性の生成物のために励起波長を病原性細菌に送る工程と、生成物から発せられた蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルを獲得する工程を含む。獲得したシグナルの3 D再構成が生成され、それによって、病原性細菌を画像化する。

【 0 0 1 4 】

本発明は、基質における - ラクタマーゼ活性後の検出可能な蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルを生成する細菌の - ラクタマーゼのための基質をさらに対象としている。代表的な基質は、限定されないが、C D C - 1、C D C - 2、C D C - 3、C D C - 4、C D C - 5、C N I R 5、C N I R 5 . 2、C N I R 5 - Q S Y 2 2、C N I R 7、C N I R 7 - T A T、C N I R 9、C N I R 1 0、C N I R 8 0 0、C N I R 8 0 0 . 2、C N I R 8 0 0 - 3、X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1、X H X 3 - 2、X H X 3 - 2 6、または、X H X 3 - 3 2、あるいは、その誘導体またはアナログを含み、あるいは、該基質は、該基質における - ラクタマーゼ活性後の色またはp Hの変化をもたらすのに効果的な有色色素または化学試薬を含む。本発明は、粒子、微粒子、または、それに結合したビオチンをさらに含む、別の関連する基質を対象としている。

20

【 0 0 1 5 】

本発明は、被験体のリアルタイムでの病原性細菌を検出するための方法をさらに対象としている。本方法は、ガンマ放射に関連する同位体で放射標識された基質を被験体に導入する工程を含み、基質は、 - ラクタマーゼ、他の酵素、または、タンパク質に関して病原性細菌に特有である。被験体は、放射放出された基質の活性のあいだ、放射放出された基質からのガンマ放出について画像化され、放出されたガンマ線によって生じたシグナルが獲得される。ガンマ線によって生じたシグナルの強度に基づいた被験体における放射標識の濃度の3 D再構成が作成され、それによって、病原性細菌を検出する。本発明は、その検出に基づいて病原性細菌に関連した病態生理学的状態をリアルタイムで診断する工程をさらに含む関連する方法を対象としている。本発明は、病態生理学的状態を処置するのに有効な1つ以上の治療用化合物を投与する工程をさらに含む別の関連する方法を対象としている。本発明は、被験体に放射標識された基質を再投与する工程と、治療用化合物の有効性をモニターするために被験体を再画像化する工程をさらに含むさらに別の関連する方法を対象としており、ここで、診断時のガンマ放出と比較したガンマ放出の減少は、病態生理学的状態に対する治療効果を示す。

30

40

【 0 0 1 6 】

本発明は、本明細書に記載されるようなP E TまたはS P E C Tイメ - ジングに適した細菌の - ラクタマーゼのための放射標識された基質をさらに対象としている。

【 0 0 1 7 】

本発明は、生物学的サンプル中の病原性細菌を明白に検出するためのアッセイ装置をさらに対象としている。アッセイ装置は、生物学的サンプルと、病原性細菌に関連する - ラクタマーゼ酵素用の発色基質とを含む培養混合物を収容するための手段、および、収容手段と流体連通する基質における - ラクタマーゼ活性によって生じる有色生成物を捕捉

50

して濃縮するための手段を含む、プラットフォームを含んでいる。本発明は、有色生成物のみが収容手段から下流に流れることを可能にするための手段をさらに含む関連する発明を対象としている。本発明は、収容手段から下流の内部制御を含む、関連する発明を対象としている。本発明は、基質が化学試薬を含み、装置が、化学試薬から発色するための手段として第2の試薬を含む、別の関連する発明を対象としている。本発明は、基質がビオチンに結合し、装置が、ビオチンに結合した基質を捕捉するための手段としてアビジンをさらに含む、別の関連する発明を対象としている。他のおよびさらなる目的、特徴、および、利点は、開示目的で与えられる本発明の現在好ましい実施形態の以下の記載から明白になるであろう。

【図面の簡単な説明】

10

【0018】

したがって、明らかになるであろう本発明の上記の列挙された特徴、長所、および、目的と、それ以外のものが達成され、詳細に理解されうる事柄、とりわけ、上記で簡潔に要約された本発明の記載は、添付の図面で例証される特定の実施形態を参照することによって保持されてもよい。これらの図面は明細書の一部を形成する。しかしながら、添付の図面は、本発明の好ましい実施形態を例証しており、したがって、その範囲に限定されるものとは考慮されない。

【図1】1A乃至1Cは、CNIR4に浸漬させる前のBlac変異結晶(mutant crystal)(1A)、CNIR4基質を保持するBlac変異結晶(1B)を示している。図1Cは、Mtb Blacによるセフォタジム(cefotazime)の触媒作用と、ラクタム環の加水分解によって形成された生成物を例証する。

20

【図2】2A乃至2Cは、 - ラクタマーゼによる加水分解前後の、CC1とCC2(1A)、CHPQ(2B)、および、CR2(2C)の構造を描いている。

【図3】CNIR1、CNIR2、CNIR3、および、CNIR4の構造と、 - ラクタマーゼによるそれらの加水分解を描いている。

【図4A】近赤外線基質CNIR5を調製するための合成計画を描いている。

【図4B】CNIR5の大規模な商業用調製のための代替的な合成計画を描いている。

【図4C】 - ラクタマーゼの存在下および不在下でのCNIR5の蛍光強度対波長を描いている。

30

【図4D】CNIR5 - QSY22の構造を描いている。

【図5A】QSY21の構造を描いている。

【図5B】QSY21二スルホン酸塩の構造を描いている。

【図5C】QSY22二スルホン酸塩の構造を描いている。

【図5D】QSY22二スルホン酸塩の化学合成を描いている。

【図6A】CNIR7の構造を描いている。

【図6B】CNIR7の化学合成を描いている。

【図7A】CNIR9の合成計画を描いている。

【図7B】CNIR10の合成計画を描いている。

【図8A】蛍光発生(fluoreogenic)基質CDC-1-5の合成計画と加水分解動態を描いている。CDC1-4の合成を示している。

40

【図8B】蛍光発生(fluoreogenic)基質CDC-1-5の合成計画と加水分解動態を描いている。TEM-1 Bla、または、Mtb Blaでそれぞれ処置した後の455nmにおける、プローブCDC-1、2、3、4の時間に対する発光(emission)を示している(基質の濃度: 5 mM; TEM-1 Blaの濃度はPBS(pH=7.4)中で2nMである; Mtb Blaの濃度はPBS(pH=7.4)中で10nMである; 400nmで励起)。

【図8C】蛍光発生(fluoreogenic)基質CDC-1-5の合成計画と加水分解動態を描いている。TEM-1 Bla、または、Mtb Blaでそれぞれ処置した後の455nmにおける、プローブCDC-1、2、3、4の時間に対する発光を示している(基質の濃度: 5 mM; TEM-1 Blaの濃度はPBS(pH=7.4))

50

中で2 nMである；M t b B l a Cの濃度はP B S (p H = 7 . 4) 中で1 0 n Mである；4 0 0 n mで励起）。

【図8 D】蛍光発生 (f l u o r e o g e n i c) 基質C D C - 1 - 5の合成計画と加水分解動態を描いている。C D C - 5の合成を示す。

【図8 E】蛍光発生 (f l u o r e o g e n i c) 基質C D C - 1 - 5の合成計画と加水分解動態を描いている。 - ラクタマーゼの処置後の4 5 5 n mでの基質C D C - 1の時間に対する発光を示している (実線：M t b B l a Cで処置された；破線：T E M - 1 B l aで処置された；プローブの濃度：5 m M；T E M - 1 B l aの濃度：P B S (p H = 7 . 4) 中で2 0 n M；4 0 0 n mで励起)

【図8 F】蛍光発生 (f l u o r e o g e n i c) 基質C D C - 1 - 5の合成計画と加水分解動態を描いている。 - ラクタマーゼの処置後の4 5 5 n mでのプローブC D C - 5の時間に対する発光を示す (実線：M t b B l a Cで処置された；破線：T E M - 1 B l aで処置された；プローブの濃度：5 m M；M t b B l a Cの濃度：P B S (p H = 7 . 4) 中で2 0 n M；4 0 0 n mで励起) 。

【図9 A】X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1 X H X 3 - 2 6、および、X H X 3 - 3 2の化学構造を描いている。

【図9 B】X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1 X H X 3 - 2 6、および、X H X 3 - 3 2の化学構造を描いている。

【図9 C】X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1 X H X 3 - 2 6、および、X H X 3 - 3 2の化学構造を描いている。

【図9 D】X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1 X H X 3 - 2 6、および、X H X 3 - 3 2の化学構造を描いている。

【図9 E】X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1 X H X 3 - 2 6、および、X H X 3 - 3 2の化学構造を描いている。

【図9 F】X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 2 6、および、X H X 3 - 3 2を用いて、細菌の数と蛍光シグナル間の相関を実証する。励起：3 6 0 n m (1 x P B S) ；最大放出：4 5 3 n m (1 x P B S) ；X H X - 2 - 8 1 (D M S O中1 0 m M、6 0 m L) ；X H X - 2 - 9 1 (D M S O中1 0 0 m M、1 0 m L) ；X H X - 3 - 2 6 (D M S O中2 0 m M、4 2 m L) ；X H X - 3 - 3 2 (D M S O中1 0 m M、1 0 0 m L) 。

【図1 0 A】B l u c oの化学合成を描いている。

【図1 0 B】 - ラクタマーゼの連続的なレポーター生物発光アッセイ (S R E L) 画像化のためのB l u c oの使用を描いている。

【図1 1 A】C N I RおよびC N I R様のプローブと、その誘導体およびアナログの調製への代替的な化学合成経路を描いている。

【図1 1 B】C N I RおよびC N I R様のプローブと、その誘導体およびアナログの調製への代替的な化学合成経路を描いている。

【図1 1 C】C N I R 5 . 2およびC N I R 8 0 0 . 2のような、そのようにして合成されたプローブの構造を描いている。

【図1 1 D】C N I R 8 0 0 - 3のような、そのようにして合成されたプローブの構造を描いている。

【図1 2】1 2 Aと1 2 Bは、C N I R 5による、大腸菌 (1 2 A) と結核菌 (1 2 B) 内でのB l aの活性の検出を例証する。対照はL B培地および形質変換した大腸菌を含まないC N I R 5を包含している。

【図1 3 A】蛍光発光スペクトルを描いている。C N I R 4の発光スペクトルは、1 0 分間のT E M - 1 B l aによる開裂の前後で示されている。

【図1 3 B】蛍光発光スペクトルを描いている。C N I R 5の発光スペクトルは、1 0 分間のT E M - 1 B l aによる開裂の前後で示されている。

【図1 3 C】蛍光発光スペクトルを描いている。C N I R 9の発光スペクトルは、1 0 分間のT E M - 1 B l aによる開裂の前後で示されている。

10

20

30

40

50

【図13D】蛍光発光スペクトルを描いている。CNIR10の発光スペクトルは、10分間のTEM-1 Blaによる開裂の前後で示されている。

【図13E】蛍光標識取り込みの動態を描いている。CNIR4の野生型MtbおよびMtb BlaC変異体(blaCm)への直接的な蛍光標識取り込みの動態が示される。

【図13F】蛍光標識取り込みの動態を描いている。CNIR5の野生型MtbおよびMtb BlaC変異体(blaCm)への直接的な蛍光標識取り込みの動態が示される。

【図13G】蛍光標識取り込みの動態を描いている。CNIR9の野生型MtbおよびMtb BlaC変異体(blaCm)への直接的な蛍光標識取り込みの動態が示される。

【図13H】蛍光標識取り込みの動態を描いている。CNIR10の野生型MtbおよびMtb BlaC変異体(blaCm)への直接的な蛍光標識取り込みの動態が示される

10

。【図14】14Aと14Bは、CNIR4基質(14A)との、および、CNIR5基質(14B)との、大腸菌TEM-1 -ラクタマーゼおよびヒト結核菌BlaC -ラクタマーゼの動態を描いている。

【図15】CNIR4(15Aと15E)、CNIR5(15Bと15F)、CNIR9(15Cと15G)、および、CNIR10(15Dと15H)を含む培地でのヒト結核菌細菌のみの蛍光取り込み(15A乃至15D)と蛍光取り込みの分布比(15E乃至15H)の動態を描いている。

【図16】CNIR4(16Aと16E)、CNIR5(16Bと16F)、CNIR9(16Cと16G)、および、CNIR10(16Dと16H)を含むヒト結核菌細菌に感染したマクロファージの蛍光取り込み(16A乃至16D)と蛍光取り込みの分布比(16E乃至16H)の動態を描いている。

20

【図17】ヒト結核菌に感染したマクロファージへのCNIR4の細胞内での取り込みを示す共焦点顕微鏡画像を描いている。DAPI染色(青)は感染細胞の核を示し、緑色蛍光はGFP標識された結核菌からのものであり、赤色蛍光は開裂したCNIR4からのものである。

【図18】18A乃至18Eは、 10^8 (各マウスの左下)、 10^7 (左上)、 10^6 (右上)から様々な濃度で、CNIR4(18A)、CNIR5(18B)、CNIR9(18C)、および、CNIR10(18D)の皮内注入によって結核菌に感染したマウスからの蛍光を描いている。18Eは、感染に使用された細菌の各々の濃度で各々の化合物についてシグナル対バックグラウンドを比較している。

30

【図19A】CNIR4に関して測定された蛍光シグナルとエアロゾルによる接種とによって肺内の結核菌に感染したマウスからの蛍光画像である。各々の図19A-19Dでは、各パネル中の左のマウスは感染しておらず、左から2番目のマウスはblaC遺伝子中に変異を有する結核菌に感染しており、各パネル中の右側の2匹のマウスは野生型結核菌に感染している。各パネル中の右側の3匹のマウスには、CNIR4、CNIR5、CNIR9、または、CNIR10が画像化の24時間前に点滴で与えられた。

【図19B】CNIR5に関して測定された蛍光シグナルとエアロゾルによる接種とによって肺内の結核菌に感染したマウスからの蛍光画像である。各々の図19A-19Dでは、各パネル中の左のマウスは感染しておらず、左からの2番目のマウスはblaC遺伝子中に変異を有する結核菌に感染しており、各パネル中の2匹の右側のマウスは野生型結核菌に感染している。各パネル中の3匹の右側のマウスには、CNIR4、CNIR5、CNIR9、または、CNIR10が画像化の24時間前に点滴で与えられた。

40

【図19C】CNIR9に関して測定された蛍光シグナルとエアロゾルによる接種とによって肺内の結核菌に感染したマウスからの蛍光画像である。各々の図19A-19Dでは、各パネル中の左のマウスは感染しておらず、左から2番目のマウスはblaC遺伝子中に変異を有する結核菌に感染しており、各パネル中の右側の2匹のマウスは野生型結核菌に感染している。各パネル中の右側の3匹のマウスには、CNIR4、CNIR5、CNIR9、または、CNIR10が画像化の24時間前に点滴で与えられた。

【図19D】CNIR10に関して測定された蛍光シグナルとエアロゾルによる接種とに

50

よって肺内の結核菌に感染したマウスからの蛍光画像である。各々の図 19 A - 19 D では、各パネル中の左のマウスは感染しておらず、左から 2 番目のマウスは b l a C 遺伝子中に変異を有する結核菌に感染しており、各パネル中の右側の 2 匹のマウスは野生型結核菌に感染している。各パネル中の右側の 3 匹のマウスには、C N I R 4、C N I R 5、C N I R 9、または、C N I R 10 が画像化の 24 時間前に点滴で与えられた。

【図 19 E】背部画像中の肺領域の各々の化合物のシグナル対バックグラウンドのグラフである。

【図 20 A】エアロゾルによって結核菌に感染し、1 時間後、基質 C N I R 5 を用いて画像化されたマウスからの蛍光画像である。背側、腹側、または、右側と左側の図の各々のパネルにおいて、左側のマウスは感染しておらず、右側のマウスは感染している。マウスはすべて、明記された時点での画像化の前に、点滴で C N I R 5 に感染した。

10

【図 20 B】エアロゾルによって結核菌に感染し、18 時間後、基質 C N I R 5 を用いて画像化されたマウスからの蛍光画像である。背側、腹側、または、右側と左側の図の各々のパネルにおいて、左側のマウスは感染しておらず、右側のマウスは感染している。マウスはすべて、明記された時点での画像化の前に、点滴で C N I R 5 に感染した。

【図 20 C】エアロゾルによって結核菌に感染し、24 時間後、基質 C N I R 5 を用いて画像化されたマウスからの蛍光画像である。背側、腹側、または、右側と左側の図の各々のパネルにおいて、左側のマウスは感染しておらず、右側のマウスは感染している。マウスはすべて、明記された時点での画像化の前に、点滴で C N I R 5 に感染した。

【図 20 D】エアロゾルによって結核菌に感染し、48 時間後、基質 C N I R 5 を用いて画像化されたマウスからの蛍光画像である。背側、腹側、または、右側と左側の図の各々のパネルにおいて、左側のマウスは感染しておらず、右側のマウスは感染している。マウスはすべて、明記された時点での画像化の前に、点滴で C N I R 5 に感染した。

20

【図 20 E】エアロゾルによって結核菌に感染し、96 時間後、基質 C N I R 5 を用いて画像化されたマウスからの蛍光画像である。背側、腹側、または、右側と左側の図の各々のパネルにおいて、左側のマウスは感染しておらず、右側のマウスは感染している。マウスはすべて、明記された時点での画像化の前に、点滴で C N I R 5 に感染した。

【図 20 F】図 19 A の上部パネル内で円で囲まれた関心領域から得られた蛍光シグナルの量を定量化するグラフである。

【図 21】21 A と 21 B は、エアロゾルによって結核菌に感染し、バックグラウンドシグナルを減らすために反射率ではなく透視を用いて画像化されたマウス (21 A) と、結核菌に感染しておらず、バックグラウンドシグナルを減らすために反射率ではなく透視を用いて画像化されたマウス (21 B) の蛍光画像化を描いている。

30

【図 22 A】左肩に異種移植した野生型 C 6 腫瘍と、右肩に c m v - b l a を安定的にトランスフェクトした C 6 腫瘍とを含むヌードマウス内での C N I R 5 (7 n m o l) による B l a 発現の画像化を例証している。図 22 A は、示された時点で覆われた蛍光かつ明るい視野の画像を示している。

【図 22 B】左肩に異種移植した野生型 C 6 腫瘍と、右肩に c m v - b l a を安定的にトランスフェクトした C 6 腫瘍とを含むヌードマウス内での C N I R 5 (7 n m o l) による B l a 発現の画像化を例証している。図 22 B は、各々の腫瘍対時間の平均強度のプロットを示す。

40

【図 22 C】左肩に異種移植した野生型 C 6 腫瘍と、右肩に c m v - b l a を安定的にトランスフェクトした C 6 腫瘍とを含むヌードマウス内での C N I R 5 (7 n m o l) による B l a 発現の画像化を例証している。図 22 C は、切除された腫瘍および器官の画像を示す

【図 22 D】左肩に異種移植した野生型 C 6 腫瘍と、右肩に c m v - b l a を安定的にトランスフェクトした C 6 腫瘍とを含むヌードマウス内での C N I R 5 (7 n m o l) による B l a 発現の画像化を例証している。図 22 D は、両方の腫瘍からの抽出物中の B l a の C C 1 アッセイの結果を示す。

【図 23 A】左肩に異種移植した野生型 C 6 腫瘍と、右肩に c m v - b l a を安定的にト

50

ランスフェクトしたC6腫瘍とを含むヌードマウス内でのCNIR6(7nmol)によるB1a発現の画像化を例証している。図23AはCNIR6の化学構造である。

【図23B】左肩に異種移植した野生型C6腫瘍と、右肩にcmv-b1aを安定的にトランスフェクトしたC6腫瘍とを含むヌードマウス内でのCNIR6(7nmol)によるB1a発現の画像化を例証している。図23Bは示された時点で覆われた蛍光かつ明るい視野の画像を示す。

【図23C】左肩に異種移植した野生型C6腫瘍と、右肩にcmv-b1aを安定的にトランスフェクトしたC6腫瘍とを含むヌードマウス内でのCNIR6(7nmol)によるB1a発現の画像化を例証している。図23Cは、各々の腫瘍対時間の平均強度のプロットを示す。

【図24】24Aと24Bは、4時間後(24A)と24時間後(24B)の様々な組織内のCNIR5の7.5nmoleの体内分布を例証する。

【図25】25Aと25Bは、造影剤として静脈内のCNIR5を用いた、結核菌に感染したマウス(25A)と、結核菌に感染していない対照マウス(25B)のインビボ画像である。

【図26A】CNIRプローブを用いて、SRELの検出の閾値を例証する。図26Aは、SREL画像化によって、 α -ラクタマーゼCNIRプローブを用いて、100未満の細菌が検出され得ることを示す棒グラフである。

【図26B】CNIRプローブを用いて、SRELの検出の閾値を例証する。生きている未感染マウスのインビボ画像である。

【図26C】CNIRプローブを用いて、SRELの検出の閾値を例証する。結核菌(図26C)に感染した、生きているマウスのインビボ画像である。

【図27A】臨床サンプル中の結核菌を検出するために、CNIR5の能力を評価した結果を描いている。

【図27B】痰サンプル中の結核菌の検出閾値を測定した結果を描いている。

【図27C】添加された痰サンプル中のシグナル強度と細菌の数の間の相関を描いている。

【図27D】添加された痰サンプルとPBSにおけるシグナル強度と細菌の数の比較を描いている。

【図27E】測定可能なシグナルを得るための時間を含む、マイコバクテリア内のイソニアジド+リファンピン処置の評価を描いている。

【図28】IR色素800シリーズのフルオロフォアの構造を描いている。

【図29】セフォペラゾンと提案されたCNIRプローブの構造を描いている。

【図30】Bluco基質の偏った小規模なライブラリ(biased library)を構築するための計画である。

【図31】3'-位置でアリル結合を含む新しいプローブの構造を表示する。

【図32】3'-位置でカルバミン酸塩結合を含む新しいプローブの構造を描く。

【図33A】ラテックス粒子または微粒子に結合した、複合体(conjugate) / 基質 / 有色色素を用いた診断アッセイのための目に見える検出システムを描いている。

【図33B】ラテックス粒子または微粒子に結合した、複合体 / 基質 / 発色性の化学試薬を用いた診断アッセイのための目に見える検出システムを描いている。

【図33C】ビオチンに結合した、複合体 / 基質 / 有色色素を用いた診断アッセイのための目に見える検出システムを描いている。

【図33D】ビオチンに結合した、複合体 / 基質 / 発色性の化学試薬を用いた診断アッセイのための目に見える検出システムを描いている。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書で使用されるように、1つ(「a」「an」)は1つ以上を意味してもよい。本明細書で使用されるように、請求項では、「含む」と共に使用される際、1つ(「a」「an」)は1つ以上を意味してもよい。本明細書で使用されるように、「別の」または

10

20

30

40

50

「他の」は、少なくとも第2のまたはそれ以上の同じまたは異なる請求項の要素またはその構成要素を意味してもよい。さらに、文脈から特段必要とされない限り、単数形は複数を含むこととし、複数形は単数を含むこととする。

【0020】

本開示は代替物と「および/または」のみを指すという定義を支持しているが、本明細書で使用されているように、請求項の用語「または(or)」は、代替物のみを指すと明確に示唆されていない限り、あるいは、代替物が相互に唯一のものである限り、「および/または」を意味するように用いられる。

【0021】

本明細書で使用されているように、用語「接触させる」は、蛍光発生基質、例えば、蛍光性化合物、蛍光タンパク質、発光タンパク質、または、比色分析タンパク質、あるいは、他の比色分析試薬またはその誘導体、あるいは、PETまたはSPECTイメージングに適切な放射標識された基質を、病原性細菌、例えば、限定されないが、マイコバクテリウムツベルクローシス(Mtb)、マイコバクテリウムボビス(M. bovis)、マイコバクテリウムアビウム(M. avium)、マイコバクテリウムツベルクローシスコンプレックス、または、マイコバクテリウムアビウムコンプレックスと、あるいは、バクテロイド属、クロストリジウム属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、シュードモナス属、ヘモフィルス属、レジオネラ属、マイコバクテリウム属、エシェリキア属、サルモネラ属、シゲラ属、または、リステリア属と、あるいは、生物学的サンプル中のインビボまたはインビトロの病原性細菌に特異的な - ラクタマーゼまたは他の酵素またはタンパク質と接触させる任意の適切な方法を指す。インビボまたはインビトロでは、これは、1つ以上の細菌細胞または - ラクタマーゼ、あるいは、他の酵素またはタンパク質を、適切な培地中の蛍光発生基質または蛍光性化合物、あるいは、蛍光性、発光性、または、発色性のタンパク質、あるいは、他の比色試薬またはその誘導体にさらすことによって達成される。細菌細胞または - ラクタマーゼ、あるいは、他の酵素またはタンパク質は、被験体から得られたサンプル中にある。細菌細胞は生存可能なサンプルを含んでもよく、含まなくてもよい。 - ラクタマーゼ酵素あるいは他の酵素またはタンパク質は、生存可能な細菌細胞内で接触してもよく、知られている標準的な方法によって細菌細胞から抽出されてもよく、または、生物学的サンプル中にそれ自体が存在してもよく、または、知られている標準的な方法によって細菌細胞へとトランスフェクトされた組み換え系を含んでもよい。サンプルは、限定されないが、胸水または痰を含んでもよく、細菌を有しているかもしれない血液、唾液、尿、および、便を含む他の体液を含んでもよい。代替的に、インビトロ接触に関して、生物学的サンプルは、例えば、限定されないが、道具、用具、設備、作業対象表面、衣類、または、ヒトの1つ以上の関心領域のような表面から拭き取ることによって得られてもよい。そのようにして得られたサンプルは、当該技術分野で知られている標準的な方法によって、画像化のための適切な培地に移されてもよい。体内での応用に関して、蛍光発生基質、すなわち、蛍光性化合物、蛍光性、発光性、または、発色性のタンパク質、他の比色試薬またはその誘導体、あるいは、放射標識された基質の任意の既知の投与方法は、本明細書に記載されるように適切である。

【0022】

本明細書で使用されるように、「蛍光発生基質」との用語は、適切な酵素の存在下で、適切な波長による励起後に蛍光性または発光性のシグナルを発するかまたは生成するか、あるいは、発色シグナルをもたらす生成物を生成することもある、化学化合物またはタンパク質またはペプチドあるいは他の生物学的に活性の分子を指す。例えば、制限されることなく、蛍光発生基質は、 - ラクタマーゼ、ルシフェラーゼ、または、 - ガラクトシダーゼ、あるいは、他の酵素の存在下で、蛍光性、発光性、または、発色性の生成物を生成してもよい。

【0023】

本明細書で使用されているように、「放射標識された基質」との用語は、陽電子放出断層撮影法(PET)のための陽電子か、または、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法

10

20

30

40

50

(SPECT)のための線を放出する、短命の放射性同位体につけられた、または、該放射性同位体に結合したそれ以外のものを指す。

【0024】

本明細書で使用されるように、「 β -ラクタマーゼ陽性細菌」の用語は、 β -ラクタマーゼ酵素を自然分泌するか、あるいは、病変形成の間に β -ラクタマーゼを獲得する、病原性細菌を指す。

【0025】

本明細書で使用されるように、用語「被験体」は、処置の任意の標的、または、生物学的サンプルが得られる処置の任意の標的を指す。好ましくは、被験体は哺乳動物であり、より好ましくは、被験体は、ウシまたはヒトのいずれか一方である。

10

【0026】

被験体における病原性細菌を即時に検出する方法が、本発明の1つの実施形態において提供され、該方法は、被験体またはその生物学的サンプルに、病原性細菌の β -ラクタマーゼ用の、蛍光基質、発光基質、または比色基質を導入する工程；被験体またはサンプルを、基質上の β -ラクタマーゼ活性から生じた生成物の励起波長で画像化する工程；および、シグナルを β -ラクタマーゼ生成物から発せられる波長で得る工程；それらにより被験体における病原体細菌を検出する工程を含む。

【0027】

さらにこの実施形態に加えて、方法は、被験体における病原性細菌の位置を決定するために、発せられたシグナルの3D再構成を作成する工程を含む。さらに別の実施形態において、方法は、病原性細菌に関する病態生理学的状态を、測定された対照シグナルよりも大きく発せられたシグナル強度に基づき、リアルタイムで診断する工程を含む。病態生理学的状态の1つの例は、結核である。

20

【0028】

本発明の特定の実施形態において、蛍光基質は、蛍光発生基質であり得る。蛍光発生基質の例は、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、ケージドルシフェリン、比色薬剤、またはそれらの誘導体である。また、すべての実施形態において、画像化波長、または励起波長および発光波長は、独立して約300nm乃至約900nmであり得る。特定の実施形態において、画像化または励起波長は約540nm乃至約730nmであり、ならびに発光シグナルは約650nm乃至約800nmであり得る。特定の実施形態において、比色指標は、色彩変化によりヒトの肉眼で視覚的に確認され得るか、または代入値(assigned numerical value)を測定する装置により測定され得る。さらに、病原性細菌は、バクテロイド属、クロストリジウム属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、シュドモナス属、ヘモフィルス属、レジオネラ属、マイコバクテリウム属、エシェリキア属、サルモネラ属、シゲラ属、またはリステリア属の細菌種を含み得る。特に、病原性細菌は、マイコバクテリウムツベルクローシスコンプレックス、または、マイコバクテリウムアビウムコンプレックスを含み得る。

30

【0029】

病原性細菌を画像化する方法が、本発明の関連の実施形態において提供され、該方法は、病原性細菌の β -ラクタマーゼに関する蛍光発生基質を、被験体に導入し、またはその生体サンプルと接触させ、または表面から得る工程；基質上で、病原性細菌に、 β -ラクタマーゼ活性の生成物の励起波長を送達する工程；生成物から発せられた、蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルを得る工程；および、得られたシグナルを3D再構成を作成し、それにより病原性細菌を画像化する工程を含む。この実施形態の態様において、病原性細菌は、上述の通り、インビボまたはインビトロで上記の蛍光発生基質または発光基質と接触させられる。また、この実施形態の様態において、病原性細菌および励起波長と発光波長は上述の通りである。

40

【0030】

別の関連する実施形態において、本発明は病原性細菌をリアルタイムで検出する方法を

50

提供し、該方法は、被験体またはその生体サンプルに病原性細菌の - ラクタマーゼに関する基質を導入する工程；基質上の - ラクタマーゼ活性から生じる生成物に関して、被験体またはサンプルを画像化する工程；および、 - ラクタマーゼ生成物から発せられた波長でのシグナルを得る工程；それにより被験体における病原性細菌を検出する工程を含む。

【0031】

さらにこの実施形態に加えて、方法は、被験体における病原性細菌の位置を決定するために、発せられたシグナルの3D再構成を作成する工程を含む。さらなる別の実施形態において、方法は、生物学的サンプルにおける感染細胞を定量化し、非感染細胞と識別する工程を含み得る。特に、このさらなる実施形態において、感染細胞の識別化および/または定量化の工程は、血球計算法、共焦点顕微鏡法、または蛍光分光法のうちの1つ以上を利用して行われる。

10

【0032】

両方の実施形態において、基質は蛍光発生基質CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、SNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、HHX2-81、HHX2-91、HHX3-1、HHX3-2、HHX3-26またはHHX3-32、あるいはその誘導体がアナログであり得る。あるいは、基質は有色の色素、または色の变化またはpH変化を誘導するのに効果的な化学試薬を含み得る。さらに、基質は粒子、微粒子、またはビオチンに結合され得る。また、両方の実施形態において、生物学的サンプルは、痰、胸水、尿、血液、唾液、大便、または被験体において関心領域からふき取って得られるサンプルであり得る。得られるシグナルは、蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルであり得る。病原性細菌、画像化(imaging)波長および発光波長は上述の通りである。

20

【0033】

被験体における病原体細菌に関連する病態生理学的状態を診断する方法が、本発明の別の実施形態において提供され、該方法は、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の蛍光基質または発光基質を、被験体に投与する工程；被験体を、基質上の - ラクタマーゼ活性の生成物に関して、励起波長で画像化する工程；および、生成物から発せられる波長にある蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルをリアルタイムで測定する工程を含み、ここで、対照シグナルよりも大きな蛍光シグナル強度、発光シグナル強度、または比色シグナル強度は、病態生理学的状態との相関を示す。

30

【0034】

さらにこの実施形態に加えて、方法は、病原性細菌の位置を決定するために、シグナルの3D再構成を作成する工程を含む。さらに別の実施形態において、方法は、病態生理学的状態を処置するのに効果的な、1つ以上の治療用化合物を被験体に投与する工程を含む。さらなる別の方法は、被験体に蛍光基質または発光基質を再投与する工程；および治療用化合物の効果をモニターするために被験体を再び画像化する工程を含み、ここで、発せられたシグナルが、診断時のシグナルと比べて減少していることは、病態生理学的状態への治療的效果を示す。すべての実施形態において、病理生理学的状態、病原性細菌、蛍光基質、および画像化波長または励起波長および発光波長は上述の通りである。

40

【0035】

被験体における病原性細菌と関連のある病態生理学的状態を診断する方法が、本発明の関連する実施形態において提供され、該方法は、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の基質を被験体に投与し、それ由来の生物学的サンプルと接触させる工程；被験体を、基質上の - ラクタマーゼ活性の生成物に関して、画像化する工程；および、生成物から発せられた波長でのシグナル強度をリアルタイムで測定する工程を含み、ここで、測定された対照シグナルよりも大きなシグナル強度は、病態生理学的状態の診断との相関を示す。さらにこの実施形態に加えて、方法は、3D画像を作成し、診断された病理生態学的状態に適切な治療化合物を投与する工程を含み、基質を再投与する工程は上記の通りである。さらに

50

別の実施形態において、方法は、生物学的サンプルにおける感染細胞を定量化し、非感染細胞から識別化する方法のうちの1つ、またはそれらの両方は、上述の通りである。

【0036】

これらの実施形態において、基質は、上述のように、蛍光発生基質、有色の色素、または化学試薬であり得る。また、病態生理学的状態は結核であり得、生物学的サンプルは、痰、胸水、尿、血液、唾液、大便、または被験体の関心領域からふき取って得られるサンプルであり得る。測定されたシグナルは、蛍光シグナルまたは比色シグナルであり得る。病原性細菌、画像化波長または励起波長、および発光波長は上述の通りである。

【0037】

被験体における病原性細菌に関連のある病態生理学的状態を診断する方法が、本発明の別の関連する実施形態に提供され、該方法は、前記被験体から得たサンプルを、病原性細菌の - ラクタマーゼ用の比色基質と接触させる工程を含み、ここで、基質上の - ラクタマーゼ活性の生成物は、裸眼で認識可能な色の変化を生じ、このように診断が行われる。基質は、ストリップ、綿棒 (q - t i p)、背景、または他の可視指標に配され得る。色の変化は、裸眼で認識可能であり得、任意の装置または外部のエネルギーソースからの刺激がなくても識別可能であり得る。

【0038】

被験体におけるマイコバクテリア感染を検出する診断方法が、本発明のまた別の実施形態において提供され、該方法は、被験体から生物学的サンプルを得る工程；生物学的サンプルを、マイコバクテリアの - ラクタマーゼ酵素の蛍光発生基質と接触させる工程；蛍光発生基質上の - ラクタマーゼ活性の生成物に関して、生物学的サンプルを画像化する工程；および生成物から発せられた波長でのシグナル強度を測定する工程を含み、ここで、測定された対照シグナルよりも大きなシグナル強度は、マイコバクテリア感染の存在を示す。さらにこの実施形態に加えて、方法は、マイコバクテリア感染症を検出した時点で被験体へ施行された処置レジメンの、治療的効果をモニターするために、上記の方法の工程を1回以上繰り返させ、ここで、測定された蛍光シグナルが、制御シグナルと比べて減少していることは、処置レジメンへの陽性反応と相関を示す。さらなる別の実施形態において、方法は、上述のように、生物学的サンプルにおける感染細胞を定量化し、非感染細胞から識別する工程の1つまたは両方を含む。

【0039】

両方の実施形態において、基質は、蛍光発生基質 C D C - 1、C D C - 2、C D C - 3、C D C - 4、C D C - 5、C N I R 5、C N I R 5 . 2、C N I R 5 - Q S Y 2 2、C N I R 7、C N I R 7 - T A T、C N I R 9、C N I R 1 0、C N I R 8 0 0、C N I R 8 0 0 . 2、C N I R 8 0 0 - 3、X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1、X H X 3 - 2、X H X 3 - 2 6、または X H X 3 - 3 2、あるいはその誘導体かアナログであり得る。あるいは、基質は有色の色素または、色の変化またはpH変化に効果的な化学試薬を含み得る。さらに、基質は、粒子、微粒子、またはビオチンに結合され得る。また、生物学的サンプルは、痰、胸水、尿、血液、唾液、大便、または被験体において関心領域からふきとって得られるサンプルであり得る。加えて、マイコバクテリア感染は、結核菌または結核菌複合体またはトリ結核菌またはトリ結核菌複合体により、引き起こされ得る。さらに、測定されたシグナルは、蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルであり得る。画像化波長および励起波長は上述の通りであり得る。

【0040】

被験体における病原性細菌と関連のある病態生理学的状態の処置に効果的な、治療化合物をスクリーニングする方法が、本発明のまた別の実施形態において提供され、該方法は、病原性細菌に対して可能性のある治療化合物を選択する工程；細菌細胞を、蛍光検出剤、発光検出剤、または比色検出剤と接触させる工程；細菌細胞を、可能性のある治療化合物と接触させる工程；および、細菌細胞によりもたらされた蛍光シグナルまたは比色シグナルを、可能性のある治療薬の存在下または不在下で測定する工程を含み、ここで、治療薬の存在下でのシグナルが、治療薬の不在下でのシグナルと比べて減少することは、化合

10

20

30

40

50

物の病原性細菌に対する治療的効果を示す。この実施形態において、病理生理学的状態および病原性細菌は上述の通りである。

【0041】

この実施形態の1つの態様において、病原性細菌は、組み換え型細菌であり得、その際、細菌を蛍光検出剤、発光検出剤、また比色検出剤と接触させる工程は、野生型細菌を、蛍光検出剤、発光検出剤、または比色検出剤を含有する発現ベクターで形質転換させる工程を含む。この態様において、蛍光検出剤、発光検出剤または比色検出剤は、蛍光タンパク質を含み得る。蛍光タンパク質の例は、mP lum、mKe ima、Mcherry、またはtdTomatoであり得る。また、この態様において、発現ベクターは、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含み得、その際、方法は組み換え型細菌を、 β -ガラクトシダーゼ酵素の存在下で蛍光シグナルを発するのに効果的な蛍光団と接触させる工程をさらに含む。蛍光団の例は、CFDG、C12RG、またはDDAOGである。加えて、この態様において、発現ベクターはルシフェラーゼ遺伝子を含み得、その際、方法は、組み換え型細菌をD-ルシフェリンと接触させる工程をさらに含む。ルシフェラーゼの例は、ホタルルシフェラーゼ、click beetle red、またはrLuc8である。

10

【0042】

この実施形態の別の態様において、蛍光検出剤は、病原性 β -ラクタマーゼの蛍光発生基質であり得る。1つの実施例において、病原性細菌はインビボで、蛍光基質CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、ケージドルシフェリン、比色薬剤、またはその誘導体と接触され得る。別の実施例において、病原性細菌は、インビトロで蛍光基質CC1、CC2、CHPQ、CR2、CNIR1、またはCNIR6と接触され得る。

20

【0043】

被験体における病原性細菌に関連する病態生理学的状態を処置するのに効果的な、治療化合物をスクリーニングする方法は、本発明の関連する実施形態にあり、該方法は、病原性細菌に対する可能性のある治療化合物を選択する工程；細菌細胞または同一の細菌細胞を含有する生物学的サンプルを、その病原性 β -ラクタマーゼの基質と接触させる工程；細菌細胞または同一の細菌細胞を含有する生物学的サンプルを、可能性のある治療化合物と接触させる工程；および細菌細胞から生じた蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルを、可能性のある治療化合物の存在下および不在下で測定する工程を含み、ここで、治療化合物の存在下でのシグナルが、治療化合物の不在下でのシグナルと比べて減少することは、治療化合物の病原性細菌に対する治療的効果を示す。

30

【0044】

この実施形態の1つの態様において、基質は、蛍光発生基質CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26、またはXHX3-32、あるいはその誘導体かアナログであり得る。あるいは、基質は有色の色素、あるいは色の变化またはpH変化の導入に効果的な化学試薬を含み得る。さらに、基質は、粒子、微粒子、またはビオチンに結合され得る。また、病原性細菌および病態生理学的状態は上述の通りであり得る。加えて、細菌細胞により生じたシグナルは、約300nm乃至約900nmの波長を有し得る。特に、生じたシグナルは、約650nm乃至約800nmの波長を有し得る。

40

【0045】

検出可能な蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルを、生じさせる細菌性 β -ラクタマーゼ用の基質が、本発明のまた別の実施形態において提供される。この実施形態の態様において、基質は、蛍光発生基質CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、CDC-5、CNIR5、CNIR5.2、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR7-TAT、CNIR9、CNIR10、CNIR800、CNIR800.2、CNIR800-3、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、X

50

H X 3 - 2 6、または X H X 3 - 3 2、あるいはその誘導体かアナログを含み得るか、またはその上の - ラクタマーゼ活性上の、有色の色素または色の変化や p H 変化を生じさせるのに効果的な化学試薬を含み得る。また、基質はさらに、粒子、微粒子、またはそれに結合されるビオチンを含み得る。

【 0 0 4 6 】

被験体における病原性細菌をリアルタイムで検出する方法が、本発明のまた別の実施形態において提供され、該方法は、被験体に、ガンマ放出に関連する同位体で放射標識された基質を導入する工程を含み、ここで、基質は、病原性 - ラクタマーゼに特有の、 - ラクタマーゼ、または他の酵素またはタンパク質用の基質であり；被験体を、放射識別された基質からのガンマ放出に関して、その上の活性の間に、画像化する工程；放出されたガンマ線により発生したシグナルを得る工程；および、ガンマ線が発生させたシグナルの強度に基づいた放射標識の、被験体における濃度を、3 D 再構成を作成する工程を含み；それにより病原性細菌を検出する工程を含む。

10

【 0 0 4 7 】

さらにこの実施形態に加えて、方法は、病原性細菌の検出に基づき、それに関連する病態生理学的状態を、リアルタイムで診断する工程を含む。別のさらなる実施形態において、方法は、病態生理学的状態を処置するのに効果的な1つ以上の治療化合物を投与する工程を含む。また別のさらなる実施形態において、方法は、放射標識された基質を被験体へ再投与する工程；および治療化合物の効果をモニターするために、被験体を再画像化する工程を含み、ここで、診断時のガンマ放出と比較したガンマ放出の減少は、病態生理学的状態への治療的效果を示す。これらのさらなる実施形態において、病態生理学的状態は結核であり得る。

20

【 0 0 4 8 】

すべてのこれらの実施形態の1つの態様において、放射標識はポジトロン放出同位体であり得、画像化はポジトロン断層法 (P E T) を通じてなされ得る。別の態様において、放射標識は、ガンマ線を直接放出する同位体であり得、画像化は単一光子放射断層撮影 (S P E C T) を通じてなされ得る。これらの実施形態のすべての態様において、他の酵素またはタンパク質は、 - ラクタマーゼ様酵素またはペニシリン結合タンパク質であり得る。また、すべての実施形態において、細菌種は上述の通りである。

【 0 0 4 9 】

30

P E T または S P E C T 撮像に適した、放射標識された病原性細菌の基質が、本発明のまた別の実施形態において提供される。この実施形態において、放射標識は、フッ素 - 1 8、窒素 - 1 3、酸素 - 1 8、炭素 - 1 1、テクネチウム - 9 9 m、ヨウ素 - 1 2 3、またはインジウム - 1 1 1 であり得る。

【 0 0 5 0 】

本発明のまた別の実施形態において、生物学的サンプルにおける病原性細菌を明白に検出するためのアッセイ装置が提供され、アッセイ装置は、生物学的サンプルと、病原性細菌に関連する - ラクタマーゼ酵素用の発色基質とを含む培養混合物を収容するための手段、および、収容手段と流体連通する基質における - ラクタマーゼ活性によって生じる有色生成物を捕捉して濃縮するための手段を含む、プラットフォームを含んでいる。

40

【 0 0 5 1 】

さらにこの実施形態に加えて、アッセイ装置は、有色の生成物のみが受取り手段から下流に移動することを可能にするための手段を含み得る。別のさらなる実施形態において、アッセイ装置は、受取り手段から下流に位置する内部対照を含み得る。また別のさらなる実施形態において、アッセイ装置は、受取り手段の顆粒に位置する液体を吸収するための手段を含み得る。

【 0 0 5 2 】

すべての実施形態において、基質は有色の色素または化学試薬を含み得る。また、すべての実施形態において、基質は粒子または微粒子に結合され得る。これらの実施形態の1つの態様において、基質は化学試薬を含み、ならびに、装置は、化学試薬から色を生成す

50

る手段として、第2の試薬をさらに含む。これらの実施形態の別の態様において、基質はビオチンに結合され、ならびに、装置は、ビオチン結合の基質を捕捉するための手段として、アビジンをさらに含む。

【0053】

細菌性疾患および/または感染を光学的に画像化するためのシステムおよび方法が、本明細書に記載される。これらのシステムと方法は、疾患の間、細菌を定量化および局在化するための、および、リアルタイムで抗菌薬活性をインビボで分析するための、感受性の高いツールである。これらのシステムが単離細胞レベルで病原性細菌を検出するのに効果的であることを熟慮されたい。これらの、インビボの画像化(I V I)システムおよび方法は、臨床環境における患者に直接適応され得る。

10

【0054】

本明細書におけるシステムおよび方法は、自然に - ラクタマーゼ活性を保持するか得られる病原性細菌に適応可能である。限定することなく、 - ラクタマーゼ陽性の細菌種の例は、バクテロイド属、クロストリジウム属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、シュードモナス属、レジオネラ属、マイコバクテリウム属、ヘモフィルス属、エシェリヒア属、サルモネラ属、シゲラ属またはリステリア菌の細菌種である。特に、結核菌およびウシ結核菌などのマイコバクテリウム属の診断、局在および定量化を熟慮されたい。本明細書に記載のシステムおよび方法の利点は、利点のために菌株の操作が検出されることを求めないことにあり、検出の感度を改善するために、 - ラクタマーゼの発現、活性、および/または分泌を改善する方法を熟慮されたい。このように、 - ラクタマーゼ細菌種は、 - ラクタマーゼを適応可能な方法により興味のある任意の細菌種または菌株へ導入することにより検出され得、該適応可能な方法は、十分なレベルで - ラクタマーゼを発現および分泌させ、それらの高感度な検出を可能にする。これは、インビトロあるいはインビボで、既知および標準の送達方法を用いて達成され得、哺乳動物への適切な送達媒体(vehicle)であるファージを使用する工程を含む。

20

【0055】

本発明のインビボの撮像システムは、 - ラクタマーゼ活性用の基質として作用する化合物またはレポーターによって生成された、蛍光性、発光性、または、発色性のシグナルを検出し得る。画像化システムは当該技術分野において周知であり、同時に市販で入手可能である。例えば、連続するレポーター酵素蛍光(S R E F)系、連続するリポーター酵素発光(S R E L)系または生物発光系は、 - ラクタマーゼ活性の生成物を検出するために使用され得る。更に、得られたシグナルは、病原性細菌の位置を確認するのに有用な3D表現を再び表示するために使用され得る。これらの系に関して、画像化技術分野における通常の技術のうちの1つは、使用される化合物および/またはレポーターに基づいて、励起波長および発光波長をうまく選択することができる。一般的に、両方の励起波長または画像化波長、および発光波長の両方は、約300nm乃至約900nmであり得る。励起シグナルの一例は、約540nm乃至約730nmの範囲内であり得、発光シグナルは約650nm乃至約800nmの範囲内であり得る。また、本発明のインビボの撮像システムが、放射により生じるような他のシグナル、または適切な基質または他の検出剤上の - ラクタマーゼ活性によって生じた、任意の検知可能か判読可能なシグナルを検出し得る。

30

40

【0056】

本発明の - ラクタマーゼ基質は化学的な基質または量子ドット(quantum dot)基質であり得る。S R E LまたはS R E Fを使用した画像化のための基質は、例えば、蛍光団、ケージドルシフェリンまたは他の蛍光化合物、発光化合物または比色化合物、レポーターまたは適応に最良のシグナルを与える他の検出剤であり得る。基質は、任意の組織への十分な透過、およびノイズ比率に対する高度なシグナルを可能にするレベルでの毒性を、非常に低く示すか、または全く示さない。シグナルは、近赤外線、赤外線または赤色光シグナルであり得、例えば約650nm乃至約800nmであり得る。

【0057】

50

例えば、基質は蛍光基質またはインビトロまたはインビボで、 β -ラクタマーゼによる開裂の際にシグナルを発する量子ドット基質であり得る。蛍光発生基質は、インドシアニン色素（例えば、Cy 5、Cy 5.5、またはCy 7、あるいはIRDye 800）などのFRETドナー、消光グループQSY 21、QSY 21ジスルホン酸塩、QSY 22、QSY 22ジスルホン酸塩、IRDye QC-1などFRET消光剤を含み得る。加えて、蛍光基質は、細胞の浸透性を改善するため、および/または、限定されないがTATなど小さなペプチドに結合され得るために、ペルアセチル化したD-グルコサミンを含み得る。さらに、基質はそのシグナル強度、組織透過能、特異性、またはすべての組織において十分に分布される能力を改善するために変えられ得る。さらに、組織、細胞、またはこれらの基質と組み合わせられている他の化合物を標識する他の方法は、病原性細菌の感知能力と検出を改善するのに有用であることを熟慮されたい。例えば、発光発生基質は、限定されないが、メチル、メトキシ、またはベンジル部分を含み得、および/または、他の脱離基のより大きな放出のために、シスまたはトランス二重結合を含有し得る。

10

【0058】

特に、蛍光発生基質は、細菌細胞培養液または単一の培養された細菌細胞における、 β -ラクタマーゼ活性をインビトロで検出し得る。化学的な蛍光発生基質の例は、CC1、CC2、CHPQ、CR2、CNIR1またはCNIR6である。あるいは、インビボの画像化適用に関しては、蛍光発生基質は、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR5-QSY22、CNIR7、CNIR9、CNIR10、CNIR7-TAT、またはCNIR800、あるいはその誘導体またはアナログ、あるいはCNIR5.2などCNIR5に類似する蛍光発生基質、CNIR800.2またはCNIR800-3などCNIR800に類似する蛍光発生基質であり得る。また、蛍光発生基質CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4、およびCDC-5、またはその誘導体あるいはアナログが、インビトロおよびインビボの画像化のために提供され、これらは、Mtb BlaCまたは、CDC-1、CDC-2、CDC-3、CDC-4およびCDC-5に類似する蛍光発生化合物上に、7-ヒドロキシクマリンを放出する。特にCDC-5は、限定しないが、XHX2-81、XHX2-91、XHX3-1、XHX3-2、XHX3-26またはXHX3-32、あるいはその誘導体かアナログなどである。これらの蛍光発生基質は、連続するレポーター酵素蛍光(SREF)系において有用である。

20

β -ラクタマーゼ基質は、インビトロまたはインビボで、単一の細菌細胞を検出するのに有効であることを熟慮されたい。

30

【0059】

β -ラクタマーゼをインビボで検出するための蛍光発生基質の別の例は、限定しないが、Bluco、Bluco2、またはBluco3などのケージドルシフェリンである。この基質は、ホタルルシフェラーゼ(Fluc)の基質であるD-ルシフェリン、および β -ラクタマーゼの基質である β -ラクタムを含む。酵素による β -ラクタムの開裂は、D-ルシフェリンを放出し、Flucによる酸化に際して発光する。ケージドルシフェリンは、連続するレポーター酵素発光(SREL)系、または他の生物発光画像化系に有用である。

40

【0060】

また、蛍光タンパク質は、病原性細菌をインビトロおよびインビボで検出するのに有用であり得る。mPlum、mKeima、McherryおよびtdTomatoなどの蛍光タンパク質(FP)は、発現ベクターにクローン化される。結核菌などの興味のある病原性細菌は、FPのコンストラクトにより形質転換される。細菌による蛍光タンパク質の発現は、画像化する上で、検出可能なシグナルを結果として生じさせる。他の画像化系は、 β -ガラクトシダーゼなど他の酵素を分泌するために形質転換した、組み換え型の細菌を利用し、蛍光団（例えば、CFDG、C12RG、またはDDAOG）存在下で蛍光シグナルを生じる。また他の画像化システムは、基質（例えばD-ルシフェリン）の存在下でシグナルを発する、click beetle redまたはrLuc8など他のルシフェラーゼを示す、他の組み換え系を利用する。

50

【 0 0 6 1 】

追加の基質は、有色または可視の色素を有し得る。有色または可視の色素は、限定しないが、Texas Red、ローダミン、プロモクレソール色素（多色）、シアニン色素を含み得る。さらに、基質は、pH変化や他の化学的に誘発された色の变化からなどの、ラクタマーゼ活性上の色の变化を生じさせる化学試薬を含み得る。

【 0 0 6 2 】

あるいは、陽電子放射撮影法（PET）または単一電子放射断層撮影（SPECT）画像化システムが使用され得る。プローブは、
- ラクタマーゼ、
- ラクタマーゼ様酵素、
あるいは本明細書に記載される病原性細菌の酵素またはタンパク質に類似する、他の酵素を含み得る。PETおよびSPECT画像化技術は、当該技術分野において公知である。PET画像化に関して、基質プローブは、限定しないが、フッ素 - 18、酸素 - 18、炭素 - 11、または窒素 - 13などの陽電子放射の放射性同位体で標識化され得る。SPECT画像化に関して、基質プローブは、限定されないが、テクネチウム - 99m、ヨウ素 - 123、インジウム - 111などのガンマ放射の放射性同位体で標識化され得る。PETおよびSPECTのプローブは、標準または公知の化学的および放射線化学的な合成技術を使用して、合成または標識化され得る。

【 0 0 6 3 】

プローブのデザインおよび特異性が、
- ラクタマーゼ酵素のポケットをモデル化するために、セフェロペラゾンなど小分子を使用して、最大化され得ることを熟慮されたい。従って、ハイスループットの小分子システムの使用に関して、基質は、診断目的に関して
もっとも感度が高いように設計され、存在する画像化装置で検出可能な深部組織から透過するのに効果的であり、ならびに他の細菌属間での交差反応を防ぐために効果的なシグナルを生じるために適切であり得る。また、そのような高感度なおよび特異的な基質プローブは、単一の細菌のレベルで効果的であり、そこから得られたシグナルの量を、100乃至1000倍の間で増加させ得る。また、
- ラクタマーゼ様酵素およびペニシリン結合タンパク質以外の結核菌属における
- ラクタマーゼが、プローブの特異性を改善するために設計され得ることを熟慮されたい。

【 0 0 6 4 】

本明細書に記載のシステムおよび方法は、病原性細菌の生存率を、リアルタイムで、検出し、その位置を確認し、定量化し、および測定するのに効果的である。画像化は、インビボで細胞培養液または単一の培養細胞で行われ得、または臨床サンプルまたは標本の生体外でSRELまたはSREFを使用して行われ得、またはインビボで、開示された画像化システムのいずれかを使用して被験体で行われ得る。インビトロで使用されるサンプルは、生検に制限されないが、胸水、痰、および病原性細菌を有し得る血液、痰、尿、および大便を含む、他の体液を含み得る。従って、本明細書に記載のシステムおよび方法は、疾患または感染など、病原性細菌に関連のある、病態生理学的状態を診断するのに効果的である。単一の細菌を含む、非常に低いレベルが検出可能であるため、診断は、現在の診断方法よりも、感染のより早い時点で迅速になされ得る。本明細書に記載のシステムおよび方法は、試験のために利用され得、細菌性間性の危険があり得る健康管理者の日常的なスクリーニングであり得る。さらに、これらのシステムおよび方法は、器具、用具、設備、使用済み作業表面、衣服、および、ヒトをスクリーニングし、汚染を検出するために使用され得る。メチシリン耐性ブドウ球菌（MRSA）感染は、健康管理者の最大40%にみられ、感染の主な領域が鼻腔、および過度の洗浄によって生じる手のひび割れであるため、本発明は健康管理センターおよびその作業員における病原性細菌のスクリーニング方法として有用である。これらのシステムおよび方法は、必要時に
- ラクタマーゼを検出するために、農業および動物園での適用において使用され得る。

【 0 0 6 5 】

また、細菌の定量に対するシグナルの強さの相関は、本画像化技術の制限内で十分に相関している。従って、化合物、薬物、医薬品あるいは他の治療薬剤は、リアルタイムでモニターされ得る。本明細書に記載のシステムおよび方法は、抗菌剤をスクリーニングする

ためのハイスループットシステムを提供する。 - ラクタマーゼの検出は、細胞の生存率を必要とするため、1つ以上の治療薬剤の存在下の酵素レベルは、抗菌活性の程度を提供する。特定の細菌に適した基質の使用は、 - ラクタマーゼレベルの変化を迅速に測定することを可能にし、治療剤の効果をほぼ即時に測定することを可能にする。スループットシステムは、マイクロプレートにあるときに、単一のサンプルから無数のサンプルに有用である。

【0066】

より特定的には、本明細書に記載の R E F 系は、感染細胞を、フローサイトメトリー法、共焦点顕微鏡法、または蛍光分光法を使用して、検出および定量化するための、多くの他のインピットの方法に有用である。一度 - ラクタマーゼ基質が細胞の中に入ると、細胞基質内の細菌によって分泌された - ラクタマーゼは、 - ラクタム環を開裂し、結果として感染細胞を、近赤外蛍光色で標識化する。フローサイトメトリー法を使用して、感染細胞および非感染細胞は、識別されおよび定量化され得る。また、異なる色で標識化された細菌、例えば、限定されないが、緑色蛍光タンパク質で標識化された細菌および凍結切片を使用して、感染組織は蛍光共焦点顕微鏡法により視覚化および分析される。特に、非制限的な例において、青色を生成する D A P I が細胞核を染色するために使用される場合、細胞質中に蓄積した緑色の細菌および赤色の開裂された - ラクタマーゼ基質が見られるだろう。加えて、 - ラクタマーゼの基質が感染細胞を標識し得るため、開裂された基質の特異的な励起波長および発光波長を使用して、感染細胞または均質な感染組織は蛍光分光法により定量化される。

10

20

【0067】

つぎの実施例は、本発明の種々の実施形態を例証する目的のために与えられたものであり、いかなる方法においても本発明を限定することを意味していない。

【0068】

実施例 1

< 培養中のヒト型結核菌中の B l a の検出 >

潜在的な蛍光基質化合物および既知の化合物は、ニトロセフィン (C a l b i o c h e m 社)、C E N T A B l a 基質 (C a l b i o c h e m 社)、F l u o r o c i l l i n G r e e n (M o l e c u l a r P r o b e s 社)、C C F 2 - A M (I n v i t r o g e n 社)、および C C F 4 - A M (I n v i t r o g e n 社) を含んでおり、初期の対数的増殖期に成長した全体の細胞および全体の細胞溶解産物を使用して M t b 内の B l a の検出のために比較される。顕著なシグナルを結果として生じる細菌の最小の数又は溶解産物の量を測定するために、希釈がこれらのサンプルのすべてにアッセイされる。タイタ (t i t r e) は、完全な細胞によるアッセイの前後並びに溶解産物の溶解の前に、使用される実際の C F U の数を測定するために実行される。敏感性と再現性の両方は、15 - 120 分から細菌培養媒体中 37 ° C で培養されたプレートを 96 - ウェルを使用して、分光光度法で 4 つ一組に対して評価される。最初に、化合物は、製造業者によって推奨された濃度で、かつ C N I R 5、2 n M に対して使用される (すなわち、インピボの撮像に使用される)。最も敏感で最も再生可能な化合物の異なる濃度が、最大のシグナルに必要とされる最小の濃度を測定するために、培地において評価される。これらの実験のための対照群は、陽性対照マイコバクテリウム スメグマチス および市場で入手し得る B l a (S i g m a 社) を含み、陰性対照群は、B l a (1) を欠く結核菌 b l a C 突然変異体 (ロチェスター大学の M . P a v e l k a 博士によって提供される、P M 6 3 8) である。B C G による B l a の生成も評価される。なぜなら、いくつかの症例において、B C G が B L 2 における I V I に対して使用され、そこで広範囲の撮像装置が容易に利用可能であるからである。

30

40

【0069】

< b l a C 突然変異体および野生型結核菌 ツベルクローシスにおける組み換え型 B l a コンストラクトの評価 >

2 つの多コピー型ベクターと 2 つの単コピー型ベクターが M t b における B l a の発現

50

のために使用される。当該多コピー型ベクターは、中程度レベルに遺伝子を発現することが示された pMV262 から hsp60 プロモータ (Phsp60) を運ぶ pJDC89 に基づく。このベクターは、またヒグロマイシン耐性、Phsp60 のポリリンカー・下流、複製の大腸菌オリジンおよび複製の抗酸菌性 pAL5000 オリジン を運ぶ。このベクターから発現を増加させるために、Phsp60 は L5 プロモータ (PL5) と置換される。当該 L5 プロモータ (PL5) は Phsp60 より 50 ~ 100 倍の高位レベルに遺伝子を発現する。両方のプロモータは比較的構成的であり、ほとんどのインビボの疾病下に発現される。もし他の方法に言及されなければ、大抵のクローニングは、In-Fusion 2.0 PCR クローニングシステム (Clontech 社) を使用して行われ、当該 In-Fusion 2.0 PCR クローニングシステム (Clontech 社) は、関心のある領域の PCR のために使用されるプライマー上での 15 bp 最小相同領域 (homology) を使用して任意の線形化された構造への断片の直接のクローニングを可能にする。

【0070】

構築された 2 つのベクターは、各々のプロモータの下流に、ccdB 遺伝子と、左右の通路組換え配列を下流に含んでいる PCR 断片のクローンを作ることにより、Gateway (登録商標) (Invitrogen 社) ドナー・ベクターに対して修正される。この領域を運ぶベクターは、この領域の維持を可能にする ccdB 生存菌株で維持されなければならない；しかし、他の大腸菌株においては、この領域は致命的であり、クローニングの間に非組み換え型のベクターの維持を防止するために使用される。これらのプロモータおよび関係する Gateway (登録商標) の領域が pYUB412 にクローンが作られ、当該 pYUB412 は、ヒグロマイシン耐性、複製の大腸菌オリジン、L5 ファージ付着部位 (attP) および L5 リコンビナーゼを運び、その結果、抗酸菌性の染色体内の attB 部位で統合し、単コピー型でマイコ細菌によって安定して維持される。Mtb Bla は、Gateway (登録商標) BP 反応 (Invitrogen 社) を介して Gateway (登録商標) 組換え配列を運ぶプライマーを使用して、PCR によってこれらのベクターの各々にクローン化される。これらのベクターは、記載された (2) として電気穿孔法によって Mtb および blaC 突然変異体に形質転換される。結果として生じる Mtb 菌株はインビトロのアッセイを使用して、検出のために評価される。当該アッセイは、陰性対照群としての blaC 突然変異体のアッセイ、および、適切なベクター骨格のみを含む野生型のアッセイと比較される内因性の Bla およびシグナル強度の分析のために記載される。

【0071】

CNIR5 は高度に浸透性を有する膜であるが、シグナル強度は、細菌単独よりレポーターのために大きな表面積を有し、化合物に対するアクセスを改善する宿主細胞膜に対する Bla を標的とすることにより増加され得る。抗酸菌性のファゴソームは静的ではないので、被覆小胞のリサイクルに存在するいくつかのマーカーを有し、経路をリサイクルして、いくつかの脂質および受容体と相互に作用して、適切に標的にされたタンパク質は、抗酸菌性ファゴソームを介して宿主細胞の細胞膜にアクセスするべきである。Mtb Bla は、そのアミノ末端にある TAT シグナルによって細菌から分泌され、このタンパク質を細胞膜に向けるカルボキシの末端タグを理想的にする。マクロファージの表面上にかなり発現される CD14 など、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質は、カルボキシ末端のシグナル配列を通じて細胞膜に局在化する。

【0072】

融合 (Bla::GPI) は、CD14 および Mtb より Bla からカルボキシ末端 24 のアミノ酸 GPI アンカータンパク質のシグナル配列により構築される。その後、この融合タンパク質は、Gateway (登録商標) システムを使用して Mtb のための 4 つの発現システムに位置づけられ、野生型 Mtb および blaC 突然変異体の両方に形質転換される。結果として生じる Bla::GPI を発現する菌株、陰性対照群としての blaC 突然変異体、および、オリジナルの Bla は、細胞内のアッセイを使用して、感染し

10

20

30

40

50

たマクロファージの表面上で、B l a の菌株のレベルで評価される。完全に感染したマクロファージ、および当該マクロファージが 0 . 1 % のトリトンにより溶解したものの両方が検査される。

【 0 0 7 3 】

< 加水分解前後の基質の蛍光のスペクトル >

励起と発光のスペクトルは 1 μ M の濃度における P B S 溶液 1 m L に集められる。この溶液に、精製された B l a の 1 0 n M が加えられ、変化がそれ以上存在しないようになるまで、励起と発光のスペクトルが再び集められる。B l a の加水分解後のプロープの蛍光シグナルの増加は、ピーク放射波長である 6 9 0 n m における発光強度を比較することにより推測される。

10

【 0 0 7 4 】

< B l a 基質としてのプロープのインビトロの酵素の動力学 >

~ 6 9 0 n m での蛍光強度の上昇率 (v) は、探査 (p r o b e) の加水分解の速度の基準として使用される。速度 (v) は、M t b B l a の 1 n M の濃度の異なる濃度 5 、 1 0 、 2 0 、 5 0 、 8 0 μ M において測定される。基質 ($1/v$) に対して基質濃度 ($1/[\text{プロープ}]$) の加水分解速度の二重逆数プロットは、B l a 加水分解のためのプロープの $K_{c a t}$ の値および K_m の値を推測するために使用される。

【 0 0 7 5 】

< 基質のバイオ安定性 >

また生理学的条件の下での基質の自発的な加水分解の速度は、蛍光強度の上昇率から ~ 6 9 0 n m と推定することができる。水溶性のバッファーおよび血清中の基質の安定性は、それゆえ、室温における 1 時間の培養後の蛍光定量化によって容易に評価することができる。

20

【 0 0 7 6 】

< 培養細胞中の B l a 発現の撮像 >

基質は、形質移入された B l a (c m v - b l a) 、野生型ジャーカット、C 6 神経膠腫細胞系、および公開された撮像条件 (3) を使用して、蛍光顕微鏡による撮像によって検査される。

【 0 0 7 7 】

< m R N A レベルと、N I R F シグナルとの間の線形相関 >

野生型細胞および c m v - b l a ジャーカット細胞は、 5×10^5 / m L の細胞密度における種々の比率 (c m v - b l a 細胞の 1 0 % 、 2 0 % 、 4 0 % 、 6 0 % および 8 0 %) で混合される。3 0 分間の細胞の各々の混合物での基質の 5 μ M の培養の後、各サンプルは、冷たい P B S で洗浄され、遠心分離機にかけられ、溶解される。蛍光測定は最終的な上澄みの上で得られる。B l a の m R N A および酵素のレベルはノーザン解析を使用して定量化される。m R N A の濃度対 C y 5 . 5 蛍光強度のプロットは、2 つの間にリニアな関係があるか否かを明らかにする。

30

【 0 0 7 8 】

< 培養中の結核 - ラクタマーゼの局在性および調整 >

B l a の転写は、0 . 0 5 の O . D . において植え付けられた M t b 成長曲線の全体にわたって q R T - P C R によって検査され、安定期 (O . D . = 2) まで成長させた。転写レベルは同じ培養の部分標本から R N A を毎日分離することにより評価され、培養はすべて 3 回繰り返して成長させる。以前に記載されたように、R N A 単離 (4) および q R T - P C R が、S Y B R グリーン (5) を用いて実行される。R N A レベルは、成長曲線で 1 または 2 のキーポイントにおいてノーザン法によって確認される。また、測定はすべて 1 6 S r R N A に対して正規化される。データは、全細菌および全細胞溶解産物を使用して、同一の条件下で、ニトロセフィンにより B l a 活性の測定と比較される。b l a C を誘発する - ・ラクタムの能力が検査される。R N A 転写物は、成長曲線全体に亘ると同じ方法で、- ・ラクタムがある状態およびない状態で分析される。B l a 陰性 M t b を死滅させる、カルベニシリンの 5 0 、 2 5 0 および 5 0 0 μ g / m l が、M t b と共

40

50

に培養される。当該 M t b は、2 時間の間は初期の対数増殖期まで成長し、b l a C 転写のレベルは、全体細胞および全体細胞溶解産物の B l a 活性と共に測定される。B l a のレベルは、市場で入手可能な B l a (シグマ社)を使用して構築される標準曲線を使用して定量化され、同じ方法で成長させた M t b b l a C 突然変異体は、B l a 活性のための陰性対照として含まれる。

【0079】

<マクロファージ中の B l a の検出>

基本的に、J 7 7 4 A . 1 細胞は、9 6 - ウェルの平坦な底部プレートに 1×10^4 で播種され、37 ° C で一晚培養される。初期の対数増殖期に成長させた M t b の単一細胞の懸濁液単個細胞浮遊液が、1 つの細胞当たり 1 0 0 0 から 0 . 0 0 1 の種々の細菌感染多重度で加えられ、30 分間 37 ° C で培養される。ついで、ウェルは P B S により 2 度洗浄され、2 0 0 μ g / m l のアミカシンと共に未使用の媒体が加えられ、37 ° C で 2 時間培養され、細胞外の細菌を死滅させる。その後、ウェルは P B S により洗浄され、分光測定法によるシグナルの測定前に、6 0 ~ 1 8 0 分間、種々の濃度の試験化合物を加えた未使用の培地で培養される。複製のウェルは、得られた測定における宿主細胞透過性の役割を評価するために、化合物を加える前に 0 . 1 % のトリトン X - 1 0 0 によって溶解される。

【0080】

すべての時点において、4 つの未処理のウェルが、細胞に関係づけられる C F U の数を測定するために使用される。シグナルの局在化は、最も有効であることを証明する化合物用蛍光顕微鏡によって確認される。顕微鏡法アッセイは、類似したやり方で実行されるが、シグナルを見つけ、陽性シグナルを測定し、および局在化したシグナルの強度を評価するために、8 - ウェルのチャンパースライドを用いている。

【0081】

<バイオアッセイおよび薬物動態学>

麻酔をかけられたマウス(各々の時点において 3 匹のマウス)は、注射後の異なる時間間隔(30 分、240 分、12 時間、24 時間、48 時間および 72 時間)において頸椎脱臼によって殺される。血液サンプルは、心臓の穿刺によって集められ、組織(腫瘍、心臓、腎臓、肝臓、膀胱、胃、脳、脾臓、小腸および大腸、肺及脾臓)は、蛍光測定器によって近赤外線蛍光を測定するために急速に採取される。データは、組織のグラム当りの蛍光単位(F U)として発現される[F U / (g 組織)]。

【0082】

<-ラクターゼ活性アッセイ>

異種移植された腫瘍中の B l a の酵素レベルは、以下のプロトコルを使用して測定される:すなわち、冷たい P B S と採取された腫瘍を 2 度洗浄する;プロメガ(4 m L / g 組織)から溶解バッファーを加えて、組織溶液を均質化する;ホモジネートを 3 回凍らせて溶かし、遠心分離によって上澄みを集める;蛍光発生基質 C C 1 を使用して、B l a 活性をアッセイする。c m v - b l a 腫瘍中の B l a の m R N A は、Q i a g e n I n c . から R N A 抽出プロトコルに従い、R T - P C R アッセイを実行することにより確認される。これらの測定は、c m v - b l a 導入された腫瘍中に観察された近赤外線シグナルが B l a 活性と関連しているか否かを確認する。

【0083】

<インビボの B l a R N A の測定>

インビボで発現した B l a R N A は、結核(6)用の標準の R N A 抽出プロトコルを使用し、構成的な対照 r R N A 遺伝子に対する q R T - P C R を実行して抽出される。これらの測定は、観察された I V I シグナルのレベルと比較して、すべての組織中の B l a の発現のレベルを評価する手段を提供する。採取された R N A レベルが R T - P C R によって検知可能なレベル未満ならば、まだ量れる C F U、組織の中に存在する相補的 D N A は、高い忠実性で線形的な方法で D N A を増幅する能力を有し、テンプレートポスト増幅のレベルの正確な定量化を可能にする p h i 2 9 ポリメラーゼ(F i d e l i t y S y

s t e m s 社) を使用して R T - P C R に先立って増幅される。

【 0 0 8 4 】

< インビボの B l a 菌株の発現、安定性および毒性 >

4 匹の B a l b / c マウスの 8 つの群は、1 0 0 - 1 0 0 0 c f u / l u n g のエアロゾルによって感染される。細菌菌株は - 8 0 ° C ストックから溶かされ、単一の細胞懸濁液を生成するために 2 7 G 注射器針 2 x を通過させ、エアロゾル感染のために使用される。エアロゾル感染は、肺腔 (7 - 1 0) に飛沫核を直接送達することを設計しているウィスコンシン大学に構築された「M a d i s o n」チャンバーを使用して実行される。M t b による感染は、有毒な結核菌株を処理するように設計された認証された B S L 3 の設備で行なわれる。感染したマウスは、検死までセンター・フォア・コンバラティブ・メデ
10
イシンの A B S L 3 抑制に収容される。C F U、肺および脾臓内での b l a C および B l a 活性のための R N A レベルを測定するために、各々の菌株 (b l a C と W T) につき 4 匹のマウスの 1 つの群は、あらゆる時点 (1、1 4、2 8 および 7 2 日) に検死される。本明細書に記載されているように、ニトロセフィンを使用して、R N A 転写物レベルおよび B l a 活性を測定する。

【 0 0 8 5 】

インビボの組み換え型の B l a 発現の毒性上の安定性および効果は、I V I のための見込みを示す 2 つの組換え型菌株に対して検査される。4 匹の B a l b / c マウスの 1 2 の群が、上述されるように、1 0 0 - 1 0 0 0 c f u / l u n g の間のエアロゾルによって感染される。各々の菌株 (野生型、コンストラクト 1 およびコンストラクト 2) につき 4
20
匹のマウスの 1 つの群は、すべての時点 (1、1 4、2 8 および 7 2 日) で検死されて、C F U を測定し、組織病理学を実行し、肺および脾臓における適切なコンストラクトと B l a 活性の存在を測定するだろう。コンストラクトを運ぶ細菌の個体群のパーセンテージは、C F U 滴定プレートから少なくとも 2 0 の個々のコロニー上で処理された B l a アッセイを使用して測定される。残りの B l a のすべてのレベルを評価するために、B l a 活性アッセイは均質化された組織について処理される。B l a 活性は本明細書に記載されているようにニトロセフィンを使用して評価される。

【 0 0 8 6 】

実施例 2

< 細胞移植モデルを用いるイントラバイタル顕微鏡撮像法 >

ユニバーサル・ドナー T r、C D 8 + T 細胞、単球、マクロファージおよび樹状細胞が、B C G に感染した同一遺伝子型のマウスに移植され、これらの細胞の分布が、インビボの生物発光撮像 (B L I) および画像誘導イントラバイタル顕微鏡法 (I V M) により経時的に撮像される。ルシフェラーゼが - ・アクチン・プロモーターによって生成される、一連の遺伝子導入 (t r a n s g e n i c) マウスが組織と細胞のソースを提供し、当該組織と細胞のソースは遺伝子導入をしない (n o n - t r a n s g e n i c) 動物 (1
30
1 - 1 2) において発光する。この一連のマウス (L 2 G 8 5) は、ホタル・ルシフェラーゼ (F l u c) から、明るい生物発光を示すが、G F P 蛍光が弱いので、リンパ球に強い G F P 発現と蛍光とを示す別々の線を伴う。ユニバーサル・ドナー幹細胞および他の細胞の空間分布は、それらが膨張し、再度分散し、或いは取り除かれると、レシピエント中
40
の B L I が追跡し、検出された細胞は、G F P を利用する I V M によって続いて視覚化され得る。

【 0 0 8 7 】

L 2 G 8 5 マウスは F V B バックグラウンドで構築されると、移植細胞の拒絶を防止する F V B / N J (ジャクソン・ラブ社) 野生型マウスが、L 2 G 8 5 から細胞のためのレシピエントとして使用される。合計 8 0 匹の F V B / N J マウスが、食塩 2 0 μ l 中の B C G 1 0 ⁴ C F U で鼻腔内感染される。感染後の肺の初期 C F U を測定するために、4 匹のマウスが 2 4 時間で殺される。1 4 日目に、感染後の 4 匹の追加のマウスを組織病理学のために殺し、そして肺と脾臓中の C F U を測定する。また、1 4 日目に、残りの 7 2 匹
50
のマウスは、4 つの群に分けられ、尾静脈注射によって、L 2 G 8 5 T r、C D 8 T

細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞または無細胞（対照）が導入された。28日目、42日目および56日目に、4匹のマウス（対照を含む）の6群は、D-ルシフェリンの存在中に記載されているように（12）撮像される。

【0088】

撮像は、光ファイバーの共焦点の蛍光顕微鏡（Cell-vizio, Mauna Kea）を使用するイントラバイタルな顕微鏡法（IVM）によって、明白な病変のより詳細な検査によって追跡される。IVMは、何万もの光ファイバーからなる柔軟なミニプローブを使用する。全身麻酔がかけられ、当該部位は、手術後に動物を殺す必要性を防ぎ、細胞のレベルでの視覚化を可能にして、急速に治癒する、小さな切開口を介して精査される。

10

【0089】

対照マウスは、肺および他の器官内でのCFUを測定するために、撮像後に殺され、ここで、細胞が導入されたマウスでシグナルが観察される。背側、腹側、および2つの横の画像が得られ、フォトン・エミッション（photon emission）の起点をより良好に測定する。組織を解剖し、D-ルシフェリン中の未使用の組織を培養し、重なる組織なしにそれらを撮像することにより、さらなる確認が動物のサブセットで得られる。蛍光顕微鏡が移植細胞を発現するGFPを視覚化し、かつヘマトキシリンおよびエオシン並びに抗酸染色を実行して、組織内の細菌および細胞を特定するために、すべての明らかに感染した組織および抗酸染色について詳細な組織病理学が処理される。

20

【0090】

< 肉芽腫形成中の個々の細菌および免疫細胞のためのインビボの撮像 >

移植モデルを使用して、最も良く肉芽腫形成の視覚化を可能にする、2つの移植された細胞型が、生きているマウスで細菌と宿主細胞の両方を一緒に視覚化すべく使用するために選択される。病変が丁度視認できるようになり、十分に形成され、最も遅い時点で移植された細胞からシグナルが観察され得る、3つの時点が選択される。合計32匹のFVB/NJマウスが、食塩20μl中のIVIレポーター（例えば、tdTomato）を発現する 10^4 CFUのBCGにより鼻腔内に感染する。4匹の対照マウスの追加の群は感染していない。4匹のマウスが、肺の感染後における初期CFUを測定するために、24時間目に殺される。14日目に、感染後の4匹の追加の実験マウスは組織病理学のために殺され、肺と脾臓中のCFUを測定する。また14日目に、残りの24匹のマウスは、4つの群に分けられ、かつL2G85細胞を有しており、これが対照として細胞を有していない12匹のマウスと共に12匹のマウスへの尾静脈注射によって導入された肉芽腫形成の視覚化を可能にする。3つの時点で、4匹のマウスの2つの群（細胞を有するもの、対、細胞を有していないもの）は、D-ルシフェリンの存在下で記載されているように撮像される（12）。

30

【0091】

画像化は、光ファイバーの共焦点の蛍光顕微鏡（Cell-vizio, Mauna Kea）を使用して、イントラバイタルな顕微鏡法（IVM）によって明白な病変のより詳細な検査によって追跡される。全身麻酔がかけられ、当該領域は小さな切開口を介して精査される。対照マウスは撮像後に殺され、肺および他の器官内でのCFUを測定し、ここで、細胞が導入されたマウスにおいてシグナルが観察される。背側、腹側、また、2つの横の画像が得られ、フォトン・エミッションの起点をより良好に測定する。動物のサブセットにおいて、さらなる確認は、組織を解剖し、D-ルシフェリン中の未使用の組織を培養し、重なる組織なしに、それらを撮像することにより得られる。フィルター・セットは、切り分けられた組織で移植細胞と、細菌のレポーターシグナルの両方のために使用される。蛍光顕微鏡が移植細胞を発現するGFPを視覚化し、かつ、ヘマトキシリンおよびエオシン並びに抗酸染色を実行して、組織内の細菌および細胞を特定するために、すべての明らかに感染した組織および抗酸染色について詳細な組織病理学が処理される。

40

【0092】

< 画像化分析 >

50

収集された画像は、Xenogen Inc. から、市場で入手可能なソフトウェアである、Living Imagesを使用して、PCコンピュータ上で処理される。関心領域 (ROI) は、全身の蛍光画像上の腫瘍に描かれる。IVIS 画像システムの重要な特徴の1つは、National Institute of Standards and Technology (NIST) に由来するスペクトル放射ソースに対抗してそれが較正されるということである。この較正は、光学および開口 ($f / stop$) を介する損失を考慮し、撮像時間およびビニングの原因となることで、CCDカメラのカウントの被験体表面上の放射への変換を提供する。ゆえに、結果として生じる画像は、表面の放射 (光子 / 秒 / cm^2 / sr) の物理ユニットにおいて示される。感染したマウス、対照マウスおよび正常な組織からのROI (光子 / 秒の単位で) から統合シグナルは、異なるマウス (感染したマウス : 対照マウス : 正常組織比率) を介して比較される。統計分析は、GraphPad Prism 3.0 ($P < 0.05$ 、GraphPad Software、カリフォルニア州、サンディエゴ) を使用して実行される。

10

20

30

40

50

【0093】

実施例 3

< 結核菌 BlaC および BlaC 突然変異体酵素の結晶化 >

BlaC の非常に良い結晶が、結晶化の数か月の後に得られた。ペニシリンとの共結晶化は、0.1 M のトリス - HCl、pH 8.0、20. M の $NH_4H_2PO_4$ の結晶化条件を使用して生成された。これらの結晶は、完全なタンパク質活性部位と中間体の視覚化を可能にしたが、初期の結合基質は結晶自体中のターンオーバーにより目に見えなかった。この障害を克服するために、Mtb BlaC 突然変異体酵素は加水分解 (E166A) に関係する Glu 残留物中の突然変異により構築され、当該加水分解は、酵素上のアシル - 中間体のトラッピングと、触媒に必要な特異的な相互作用を可能にする。この突然変異体は、ここで、Mtb BlaC 突然変異体の、基質 (図 1 A) に浸漬される準備がされた高品質結晶をもたらす急速 (すなわち、約 2 週間) 結晶化プロセスで結晶化された。基質は、一晩直接浸漬によって Mtb BlaC 突然変異体結晶中に取り込まれ得ることが証明される。未使用の溶液に除去後、図 1 B において CNIR4 のために示されるように、結晶は基質を保持する。直接の浸漬は、複数の基質のより速い分析を提供する。結晶化した BlaC 突然変異体酵素は、鉛化合物セフォタキシム (図 1 C) の加水分解された中間体の構造の第 1 の識別を可能にした。これは、基質化合物の設計を改善するために BlaC 触媒の機序を解明するために役立つ。

【0094】

実施例 4

< - ラクタマーゼ検出のための蛍光発生基質 : CC1、CC2、CHPQ 及び CR2 >

蛍光発生化合物 CC1、CC2、CHPQ 及び CR2 は、インビトロ及び単一の培養細胞での Bla 活性を検出するのに効果的である。これらプローブは、Bla による加水分解の前は蛍光性でなく、Bla 反応の後に蛍光性になる (図 2 A - 2 C)。蛍光放射の範囲は、Bla を検出するのに必要とされるように選択され得る : 青である CC1 及び CC2 から、緑である CHPQ、赤である CR2 までの範囲内。これら新しい蛍光発生基質は、CCF2 より小さく、作るのが容易であり、使用しやすく、Bla 活性の検出に関して高感度であり、多様な生体サンプルにおける Bla 活性の検出を促進する。

【0095】

ラクタムの 3' 炭素と脱離基の間のオレフィン基の挿入は、Bla による加水分解の動態の効果の改善を助ける。例えば、CC1 について、 k_{cat} の値は $174 s^{-1}$ であるが、挿入された二重結合の無いそのアナログの k_{cat} の値は、ちょうど $35 s^{-1}$ である。触媒の効果において約 5 倍の増加が存在する。全体の動物蛍光画像化のための近赤外線基質を含む、Bla のための種々様々な蛍光発生基質を引き起こすために、この設計は、一般的な方策として機能し得ることを考慮する。

【0096】

また、プローブが新しい消光剤 QC-1 及び近赤外線蛍光色素分子 IRDye 800

CWにより改善され得ることも考慮する。加えて、IRDyeに基づくプローブは、スルホナート基の追加によって変更され得る。

【0097】

<CNIR1、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR9及びCNIR10>

全身の蛍光画像化により生きている動物におけるBla発現を画像化するため、赤外線／近赤外線が、より優れた組織浸透及び可視光より少ない光散乱を有し、且つヘモグロビン(13)によってあまり吸収されないため、近赤外線／赤外線の蛍光発生基質は有益である。化合物CNIR1、CNIR2、CNIR3、CNIR4、CNIR5、CNIR9、及びCNIR10は、培養細胞のBla発現を画像化するための、一連の近赤外線蛍光発生基質である(図3、6A-6B)。これら化合物は、Blaに関する細胞透過性の近赤外線蛍光発生基質を構築するための枠組みとして役立ち、細胞内又は動物内において、細菌に対するプローブの利用可能性(availability)に対する負荷の効果を検査するために使用することができる。

10

【0098】

Bla活性の報告は、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)に基づく。プローブは、FRETドナー及びFRET消光剤を包含する。インビボでの画像化のために、蛍光色素分子は、理想的には650nm以上での発光及び低毒性を有するべきである。インドシアニン色素(Cy5、Cy5.5及びCy7)は、650から800nmまでの発光を有し、わずかに報告された副作用を有する何万もの患者に使用された。それ故、Cy5はFRETドナーとして選ばれる。消光基、QSY21は、660nmにてピークに達する、540から730nmまでの広い吸収スペクトルによりそれ自体蛍光ではなく、Cy5の発光のための効果的な消光剤であることが実証された。

20

【0099】

CNIR1は本質的に非蛍光であるが、非常に蛍光な生成物を生成し、Bla(14)による処置にて660nmの波長での放射強度において57倍増加する。しかしながら、CNIR1自体は細胞透過性が無く、したがって、インビボでのBlaを画像化することができない。CNIR1の膜透過性を改善するために、CNIR1は、ペルアセチル化した(peracetylated)D-グルコサミン(CNIR3)と結合し、優れた細胞透過性を有し、単一の生細胞におけるBla発現を画像化することができる。溶解度を改善するためにQSY21に2つのスルホン酸基を加えることにより、CNIR4をもたらす。

30

【0100】

<CNIR5とCNIR6>

CNIR4に対するCNIR1は、すべてCy5に基づく。インビボでの動物画像化に関して、Cy5.5は、そのより長い発光波長のため、より好ましい。したがって、Cy5は、Cy5.5により置換され、CNIR5が合成された(図4A)。最終生産物は、HPLCによって精製され、質量分析計によって特徴付けられた($C_{122}H_{123}N_1O_{39}S_{10}$ に関して計算された質量: 2687.98; MALDI-MSで観察された(observed) $[M+H]^+$: 2687.68)。CNIR5自体は、励起されたときに690nmの弱い蛍光を発するが、Blaの処置に際して、強度は9倍以上増加する(図4D)。Blaによるその加水分解動態は、pH7.1のリン酸緩衝食塩水(PBS)において測定された: 触媒定数 $k_{cat} = 0.62 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ 、及びミカエリス定数 $K_m = 4.6 \pm 1.2 \mu\text{M}$ (値は、加水分解率対基質濃度の二重逆数プロットの加重最小自乗近似から得られた)。その触媒の効果(k_{cat}/K_m)は、 $1.36 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。CNIR5は、 $1.75 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ の自発性の加水分解率によりPBSにおいて、同様にマウス血清において非常に安定していた。すなわち、蛍光増加は、12時間のインキュベーションの後でさえ、ほとんど観察されなかった。また、CNIR5は、QSY22によりQSY21を置換することにより合成され得る(図4B)。この合成は、CNIR5のものに非常に類似しており、問題ではない。QSY

40

50

22の合成は以下に考察される。CNI R 6は、ペルアセチル化したD - グルコサミンの無いCNI R 5のアナログであり、対照として役立つ。

【0101】

CNI R 5はまた、大規模な商業用の使用のために合成され得る。図4Aで描かれた合成の模式図は、主として基礎的な状態の下のプロープの不安定性のため、大規模な合成に適していない。N, N - ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)、消光剤及び近赤外線Cy 5 . 5の両方がラクタムに結合するのに必要とされる有機塩基は、一般に、CNI R 5の異性体をもたらす - ラクタム環上の炭素 - 炭素二重結合の移動を加速する。このことは、精製プロセスの難しさを著しく増加させる。異性化を回避するために、初期段階でラクタム化合物の6員環の上のスルフィドを酸化してスルホキシドにし、合成の後期段階にてスルフィドにまでスルホキシドを減少させる(図4C)。異性化は、スルフィドの酸化及び消光剤と色素の結合中に検出されない。

10

【0102】

<CNI R 7>

CNI R 7は、Blaのインビボでの画像化に対するその感受性を改善する、CNI R 5の変形である。CNI R 5において使用される消光基QSY 2 1ジスルフォナートは、675nmの最大吸収を有するが、Cy 5 . 5は、690nmにて最大に発光する。それ故、CNI R 5のように、クエンチング効果はちょうど90%であり、それは観察された背景蛍光に大きく寄与する。QSY 2 1及びCy 5 (CNI R 1)のFRETペア(FRET pair)において、QSY 2 1とCy 5の間のより良いスペクトルの重複のため、消光効果は98%以上であった。したがって、690nmにて吸収できる消光基は、Cy 5 . 5をより良く消光し、バックグラウンドシグナルを減少させる。QSY 2 1に関して、インドリンがテトラヒドロキノリンによって置換されたとき、吸収極大が14nmずつ赤色移動(red - shift)することが報告された。

20

【0103】

したがって、新しい構造QSY 2 2ジスルフォナート(図5A - 5D)は、QSY 2 1におけるインドリン基を、テトラヒドロキノリンにより置換することによって合成され、それは同様に、最大吸収において14nmずつ赤色移動する。2つの間の唯一の構造の差は、QSY 2 2が6員の縮合環を含むテトラヒドロキノリンを使用し、QSY 2 1が5員のインドリンを使用するということであるため、スルホン化の化学が使用され、ベンゼン環上の同じスルホン化の立場(para)が期待されるだろう。QSY 2 2ジスルフォナートは、それ故、Cy 5 . 5をより効率的に消光すべきであり、より低いバックグラウンドシグナルを引き起こす。

30

【0104】

次に、CNI R 5に関する k_{cat} の値は、約 0.6 s^{-1} であり、それはCC 1とCCF 2よりはるかに小さい。二重結合は消光剤とCy 5 . 5の間に挿入され、それは同様に k_{cat} の増加を引き起こすべきである。第3に、FRETドナー、Cy 5 . 5及び消光剤、QSY 2 2ジスルフォナートの間の距離は、エネルギー伝達効果を改善するために減少する。CNI R 5は、輸送体の取り込みのためのシステインを含む、長いリンカー群を有する。新しいCNI R 7において、輸送体は、Cy 5 . 5の上の他の結合部位に結合され、それ故、もはや長いリンカーを含む必要はない。更に、2 - アミノチオフェノールは、CNI R 5内で4 - アミノチオフェノールを置換し、Cy 5 . 5と消光剤の間の距離をさらに短くする。NIR基質の最終設計、CNI R 7、及びその化学合成は、図6A - 6Bで示される。その合成は、さらに短いルートで達成されることができ、CNI R 5より容易である。

40

【0105】

CNI R 7はまた、アセチル化したD - グルコサミンを置換するTAT配列などの、短いカチオンのペプチドを含み得る。D - アミノ酸は、ペプチダーゼ加水分解を回避するためにLアミノ酸の代わりに使用される。アンテナペディア(15 - 16)のホメオドメインの第3のヘリックスなどの短いカチオンのペプチド、HIV - 1 Revタンパク質及

50

びH T L V - 1 R e xタンパク質塩基性ドメイン、及びH I V - 1 T a t タンパク質塩基性ドメインは、細胞の細胞膜に浸透できることが実証された。

【0106】

< C N I R 9 と C N I R 1 0 >

図5Dで合成された消光剤Q S Y 2 2は、図7Aで示される合成の模式図において描かれるように、ラクタム環に付けられてC N I R 9を生成する。C N I R 9は、開裂の際に非常に高い蛍光を示すが、B l aによる開裂が無い場合は非常に低い蛍光を示す。類似の化合物、C N I R 1 0は、図7Bで示される合成の模式図で描かれるように、より短い架橋基とより少数の硫酸塩により合成された。

【0107】

< C N I R 8 0 0 及び誘導体 >

C N I R 8 0 0は、R E F画像化の感受性を改善するために、800nmのより長い波長にて蛍光を発する、新しい蛍光色素分子、I R D y e 8 0 0により設計された。大半の組織において、組織自己蛍光が700nm未満の波長にあるため、C N I R 8 0 0のより長い波長は、C N I R 5のC y 5 . 5蛍光団よりも良く組織に浸透し、自己蛍光によりバックグラウンドを減少させる。C N I R 8 0 0は、B l a Cによる開裂の後に、非常に低いバックグラウンド蛍光と大きな差異(25倍)を示す。C N I R 8 0 0 . 2 (図11C)は、実施例5に記載の代替方法によって合成された異なるリンカーを備えたC N I R 8 0 0プローブであり、C N I R 8 0 0 - 3 (図11D)は、ラクタム環上のR 2位置に対するメトキシの置換を有するC N I R 8 0 0誘導体である。加えて、C N I R 8 0 0誘導体は、R 2位置に対するメチル置換又はR 1位置上の7 - アミンに付けられたベンジル基を含み得る。

【0108】

< C D C 1 - 5 基質 >

M t b B l a CがT E M - 1 B l aより大きな活性部位を有するため、ラクタム環の上のより大きな置換基が、T E M - 1 B l a上のM t b B l a Cのための蛍光基質の特異性を改善するのを支援し得ることを述べておく。ラクタム環のアミンに対する置換基の効果は、最初に評価された。合成を単純化し、スクリーニングプロセスを速めるため、蛍光基質は、蛍光団として7 - ヒドロキシクマリンを発光する、アミンにより置換されたラクタム環を含む。T E M - 1 B l a又はM t b B l a Cの処置に際して、7 - ヒドロキシクマリが発光され、蛍光シグナルが発生する。それ故、蛍光色素分子の発光の際に基質の蛍光強度を単に監視することにより、T E M - 1 B l a及びM t b B l a Cの加水分解動態を得ることができる(表1)。

【0109】

新しい図8Aで描かれるように、蛍光発生プローブC D C - 1及びC D C - 2が合成され、C D C - 2はC D C - 1のスルホキシド相当物である。同様に、ラクタム環のアミン基に付けられるより大きな置換基を有する、プローブC D C - 3及びC D C - 4も調製された。プローブC D C - 1が、T E M - 1 B l aに好ましいプローブであり、M t b B l a Cよりはるかに速い加水分解動態を与えることが示された。C D C - 3は、より大きな置換基により、M t b B l a Cに対する特異性を改善できることが考慮される。

【0110】

プローブの加水分解動態は、T E M - 1 B l a及びM t b B l a Cがそれぞれ存在する状態で、異なる時点で蛍光強度を測定することによって、蛍光測定器により測定された。驚くことに、図8Bで示されるように、基質C D C - 3は、2nMのT E M - 1 B l aの存在下で、C D C - 1、T E M - 1 B l aに好ましい基質よりもさらに速い加水分解動態を示した。蛍光強度が、同じ酵素濃度(P B S中で2nM)での同じ時間量の間、M t B l aによる処置の後ではるかに低いため、これらの4つのプローブはすべて、明白であり、T E M - 1に好ましい。2nMのM t b B l a Cの存在下での蛍光強度の増強は、正確な測定が難しくなるほど非常に低い。その後、10nMのM t b B l a Cが、M t b B l a Cの加水分解動態の測定に使用された(図8C)。あいにく、小さな

10

20

30

40

50

プローブCDC-1は、より大きなサイズのプローブCDC-3よりもさらに速い、Mtb BlaCによる加水分解動態を与え、アミン上の置換基の大きさがBlaC特異性に関して重大ではないことを示した。スルホキシドプローブCDC-2及びCDC-4は全て、特異性における任意の著しい改善なしで、それらのスルフィド相当物CDC-1及びCDC-3よりも、それぞれ、はるかに遅いTEM-1 Bla及びMtb BlaCの両方による加水分解動態を示した。

【0111】

プローブのラクタム環の上に直接置換された基の効果が調査された。図8Dで描かれるように、ラクタム環の7-位置の上にメトキシ基を有する基質CDC-5が合成された。

CDC-5の加水分解動態は、上述のものに類似したアッセイにより測定され、CDC-1は対照として使用された。

CDC-5は、CDC-1(図8E)と異なり、高いMtb BlaC優先度(preference)を明確に示す(図8F)。

プローブCDC-5の蛍光強度は、15分間、PBS中の20nMのTEM-1 Blaにより処置された後にわずかに増加するだけである一方で、30倍以上の蛍光増加は、Mtb BlaCの同じ濃度により検出することができ、ラクタム環に対する重大な置換された効果を示す。

15分間、Mtb BlaCにより処置されたCDC-5の蛍光強度は、TEM-1 Blaによるものより10倍以上強力である。CDC-5は、観察された最初のMtb BlaCに好ましい蛍光発生プローブであると判明した。そのような置換された構造は、CNIR5様(CNIR5-like)あるいはCNIR800又はCNIR800様(CNIR8-like)、近赤外線プローブ合成において容易に適合され得る。

【0112】

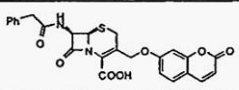
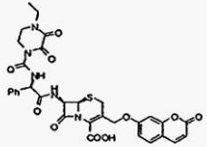
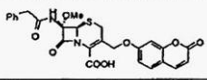
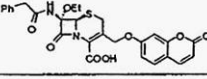
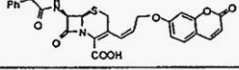
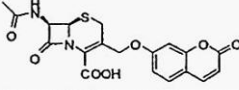
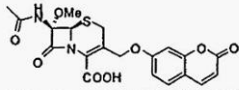
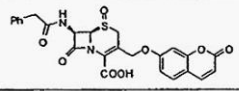
10

20

【表 1】

表 1

クマリンベースのラクタムプロープの動態パラメーター

名称	構造	<i>blaC</i>			TEM-1 <i>bla</i>		
		K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat} / K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat} / K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)
CDC-1		63	13	2.1×10^5	135	48	3.6×10^5
CDC-3		69	6	8.7×10^4	59	77	1.3×10^6
CDC-OMe		47	1	2.1×10^4	50	7.6×10^4	15.2
CDC-OEt		131	2.6×10^{-2}	1.9×10^2	ND	ND	ND
CC1		37	6	1.6×10^5	60	137	2.3×10^6
4-65		148	10	6.8×10^4	133	10	7.5×10^4
4-64		139	0.52	3.7×10^3	ND	ND	ND
CDC-2		136	0.51	3.8×10^3	454	7	1.5×10^4

【0113】

一般に、表 1 は、ラクタム基質が B l a C より優れた、T E M - 1 B l a に対する加水分解動態を示すことを実証する；しかしながら、メトキシ基又はエトキシ基がラクタム環の 7 - 位置の炭素（新しい図 5 において R 2 ）に導入されるとき、この傾向が逆転される。例えば、b l a C に関するプロープ CDC - OMe の k_{cat} / K_m の値は、T E M - 1 b l a に関するものよりも 1 , 4 0 0 倍大きい。T E M - 1 b l a による CDC - OEt 及び 4 - 6 4 の加水分解は、測定できないほどに遅い。わずかに大きな基によるプロトンの置換は、T E M - 1 B l a 上での B l a C に関する選択性に対して深遠な効果がある。スルフィド酸化は、T E M - 1 B l a 及び B l a C の両方に関する動態の効果を著しく減少させる。エトキシ置換が、メトキシの置換と比較して動態をかなり減少させたため、メトキシ基は、より大きなエトキシ基よりも更に好ましい。T E M - 1 B l a は、R 1 の上での大きな置換を表わし、R 1 の大きさが減少すると同じぐらいに、 k_{cat} / K_m の値が減少する（CDC - 3 > CDC - 1 > 4 - 6 5 ）。しかしながら、CDC - 1 は、B l a C に関する k_{cat} / K_m の最大の値を示す。

【0114】

<他の基質>

X H X 2 - 8 1、X H X 2 - 9 1、X H X 3 - 1、X H X 3 - 2、X H X 3 - 2 6、及び X H X 3 - 3 2 は、T E M - 1 の上のミコバクテリウムの B l a C のための選択性を示

す、C N I R 8 0 0 基質の誘導体又はアナログである (図 9 A - 9 E) 。化合物 X H X 3 - 3 2 は、構造において C D C - 5 に類似し、1 0 0 未満の細菌の検出の閾値を実証し、1 0 の細菌と同じくらい低い (図 9 F) 。X H X 3 - 1 は、マウス中の M t b のより急速な組織分布及びより敏感な検出を付与する C N I R 8 0 0 を合成するために使用される、ラクタム骨格に付けられる I R D y e 8 0 0 蛍光色素分子及び I R D y e Q C - 1 消光剤を含む。しかしながら、これは、検出用の C y 5 . 5 に基づいた蛍光色素分子システムを使用して排除しない。X H X 3 - 2 は、フェノール基の放出動態を増加させるために、改善された脱離基及び二重結合の取り込みを有している。二重結合の配置は、より大きなアリル基ため、以前の c i s 配置の代わりに、t r a n s である。

【 0 1 1 5 】

< 結核症における B l a を画像化するためケージに入れられた B l a 基質 >

B l a (B l u c o) のためケージに入れられた基質の構造 (図 1 0 A) は、D - ルシフェリン、ホタルルシフェラーゼ (F l u c) の基質、及び - ラクタム、B l a の基質を含む。D - ルシフェリンのフェノール基は、F l u c によるその酸化に対して重大な意味を持つ。このフェノール基が、エーテル結合を介してセファロsporin の 3 ' 位置に直接連結されると、結果として生じる共役は、F l u c に関して乏しい基質になるが、B l a に関する基質のまま残る。B l a による - ラクタム環の開閉は、自発性の断片化を誘発し、3 ' 位置にエーテル結合の開裂を引き起こし、及び光線を発生する反応において F l u c により酸化され得る遊離 D - ルシフェリンを発光する。共役の安定性を改善するために、セファロsporin 上のスルフィドは、酸化されてスルホキシドになり、最終の構造 B l u c o をもたらした。B l u c o の調製は、複数の工程の有機合成によって達成される (図 1 0 B) 。B l u c o の大きさが C N I R 系列プローブ (C N I R s e r i e s p r o b e) よりはるかに小さいため、それは、結核菌の細胞膜により良く浸透し得る。7 つのアミノの位置で同定された置換は、T B における B l a の S R E L 画像化のため T B に特異的なケージに入れられた発光基質を設計するために、単に本明細書において利用され得る。B l u c o はまた、二重結合 (B l u c o 2) の挿入によって、及びカルバマート連鎖 (B l u c o 3) の使用により、改善された K c a t を有するために合成され得る。

【 0 1 1 6 】

実施例 5

< C N I R 蛍光発生基質の代替の合成 >

代替の合成の模式図において、C N I R プローブは、ユニットに基づいた手法を利用して合成することができる (図 1 1 A) 。ユニット 1 及びユニット 2 は、以前の化学作用を大量に使用して調製することができる。塩基に触媒された共役を使用する代わりに、軽度の化学連結は、ラクタムユニット 2 に導入された、遊離したシステインとチオールエステルの間で実施される。この条件下では、異性化は期待されない。生成物 3 は、大量に高純度において分離することができる。3 の上の遊離アミノ基は、C y 5 . 5 と N I R 8 0 0 などの N I R 色素に容易に結合される。標準の N H S エステルに媒介された結合によって、チオール基は、消光剤上のマレイミド基を介して結合される。両方の共役が直交性であるため、それらは、ワンポット合成で実行され得、最終生産物は H P L C によって精製される。異性化の主な源である、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (D I P E A) などの有機塩基の使用が排除された。加えて、脱保護化学は、消光剤 Q C - 1 がトリフルオロ酢酸を媒介とした脱保護条件における分解によって観察されてから収量を改善する、消光剤が導入された後に必要とされない。重要なことに、単に 1 つの最終の H P L C 精製が必要とされる。

【 0 1 1 7 】

別の代替の合成模式図 (図 1 1 B) において、前駆体 1 . 1 は C N I R 5 の合成のための中間体である。中間体 1 . 1 上の遊離アミノ基は、C y 5 . 5 と N I R 8 0 0 などの N I R 色素、及び P B S 内での消光剤に同様に反応できる。N , N - ジイソプロピルエチルアミン (D I P E A) 、異性化の主な源などの、有機塩基の使用が回避されるため、反応

10

20

30

40

50

は、HPLCの必要性なしでクリーン(clean)である。ラクタム上の保護基の脱保護が実行され、7-位置上のアミノ基は、PBSにおいて、NIR色素(例えば、CY5・5、NIR 800)に結合される。最終的な反応生成物はHPLC精製にさらされる。図11Aで示される模式図と比較して、有機塩基は、色素及び消光剤結合において使用されず、従って最終生産物中の異性化は期待されない。図11Aにおける化学合成模式図のように、1つのHPLC精製だけが要求され、従ってプローブの大きな産出を可能にする。

【0118】

これら化学合成スキーマは、CNIR5・2及びCNIR800・2などのCNIRプローブを生成することができる(図11C)。CNIR800・2とCNIR5・2は消光剤に対してわずかに異なる結合基を有するが、プローブの特性は変更されることを考慮する。限定されないが、CNIR800-3、XHX3-1、及びXHX3-2等のCNIR800誘導体又はアナログプローブはまた、この化学を使用して大規模に合成され得る。

【0119】

実施例6

<CNIR4、CNIR5、CNIR9、及びCNIR10のためのFRET並びに蛍光取り込み動態(fluorescence incorporation kinetics)>

<インビトロのFRET: CNIR5による大腸菌及び結核菌におけるBla活性の検出>

CNIR5は、生細菌のBla活性を検出するその能力のために検出された(detected)。大腸菌はアンピシリン抵抗性のプラスミドにより形質転換され、30で一晚成長させた。細胞を集め、500nM CNIR5の追加の前にLB媒体により2回洗浄した。蛍光スペクトルは、間隔を置いて得られ(Ex: 640nm)、データは図12Aで示された。測定(t=160min)の終わりに、精製されたBlaの溶液は、CNIR5の完全加水分解を確認するために加えられた。結果は、CNIR5が大腸菌のBlaを検出することができることを示す。比較すると、Invitrogen Inc.からの蛍光発生基質CCF2/AMが同じ条件下で使用された時、LB媒体中の生きた大腸菌中のBlaは検出されなかった。図12Bは、CNIR5が、細菌の数の存在と蛍光のシグナルの間の優れた相関性により、100-1000Mtbの間の細菌を検知し得ることを実証する。

【0120】

<FRETスペクトル>

図13A-13Dは、10分間のBlaによる開裂の前後での、プローブCNIR4、CNIR5、CNIR9及びCNIR10の各々に関する、FRET発光スペクトルである。4つのすべてのプローブは、-ラクタマーゼ開裂、及び開裂後の8.5倍(660nm、CNIR4)、24倍(690nm、CNIR5)、9.5倍(690nm、CNIR9)及び10倍(690nm、CNIR10)までの最大の発光の増加の前に、わずかな蛍光を示す。図13E-13Hに描かれるように、Mtbによるこれらプローブの各々の共インキュベーションが、18時間の共培養後のCNIR4に関して2倍、CNIR5に関して3倍、CNIR9に関して1.5倍、及びCNIR10に関して2倍の蛍光の増加により、細菌の直接の標識化をもたらす。

【0121】

<CNIR4とCNIR5の基質を有する大腸菌TEM-1及び結核菌Bla-Cの動態>

表2は、基質としてCNIR4とCNIR5を有する、大腸菌TEM-1と結核菌Bla-C -ラクタマーゼ酵素の動態を比較する(図14A-14B)。

【0122】

これらCNIRプローブを使用する、結核菌への蛍光取り込みの動態が、測定された。

C N I R 4 と C N I R 5 プローブの取り込み及び分布は、媒体（図 1 5 A - 1 5 H）中の結核菌のみにおいて、及びマクロファージ（図 1 6 A - 1 6 H）により感染した結核菌において、基質として使用された。

【 0 1 2 3 】

【 表 2 】

表 2

	TEM-1 CNIR4	TEM-1 CNIR5	Bla-C CNIR4	Bla-C CNIR5
Km (μM)	2.677950938	1.868473092	13.3235901	5.897114178
Vmax (μM/S)	0.028860029	0.016342807	0.00573132	0.003584872
Kcat (1/S)	0.577200577	0.326856134	0.11462632	0.071697437

10

【 0 1 2 4 】

< 結核菌への C N I R 4 の取り込み >

蛍光の共焦点の顕微鏡法は、C N I R 4 が、結核菌により感染したマクロファージへと細胞内に取り込まれることを実証する（図 1 7）。D A P I 染色（青）は、感染細胞の核を示し、緑の蛍光は、G F P 標識化結核菌からのものであり、赤い蛍光は、開列された C N I R 4 からのものである。C N I R 4 からの蛍光は、感染細胞内に蓄積するが、非感染細胞は蛍光を示さないことに注意する。

20

【 0 1 2 5 】

< インビボでの C N I R プローブの蛍光シグナルの検出 >

マウスは、様々な濃度の結核菌に皮内に感染する。下部の左の四分円は 10^8 の細菌を受け、上部の左の四分円は 10^7 の細菌を受け、上部の右の四分円は 10^6 の細菌を受けた。蛍光は、C N I R 4、C N I R 5、C N I R 9 及び C N I R 10 プローブの各々の存在下で測定される（図 1 8 A - 1 8 E）。C N I R 5 は、最も大きな蛍光シグナルのシグナルを示し、接種物の濃度が C N I R 10 と C N I R 9 の後に増加するにつれて、その中で増加した。C N I R 4 は、蛍光の増加を実証しなかった。また、C N I R 4、C N I R 5、C N I R 9 及び C N I R 10 プローブからの蛍光は、野生型の結核菌に、又はエアロゾル接種によって肺の b l a C 遺伝子における突然変異を有する結核菌に感染したマウスにおいて測定される（図 1 9 A - 1 9 D）。C N I R 10 は、C N I R 9、C N I R 5 及び C N I R 4 の後に最も高い合計の蛍光を示した（図 1 9 E）。

30

【 0 1 2 6 】

C N I R 5 は、蛍光取り込みを画像化し、対照のマウスとエアロゾルにより結核菌に感染したマウスにおける経時的なその動態を図示するための基質として使用され、基質 C N I R 5 を使用して画像化された。対照及び感染したマウスからの画像は、1、18、24、48、及び96時間に得られた（図 2 0 A - 2 0 E）。C N I R 5 のピーク取り込みが、エアロゾル感染の48時間後に生じた（図 2 0 F）。図 2 1 A - 2 1 B は、未感染のマウス又はエアロゾルによって結核菌に感染したマウスのそれぞれの蛍光画像を描き、バックグラウンドシグナルを減少させるため、反射率よりも徹照法を使用して画像化される。

40

【 0 1 2 7 】

実施例 7

< C N I R 5 によるインビボでの画像化：マウス腫瘍モデル中の C N I R 5 >

約 1×10^6 の C 6 ラット神経膠腫細胞は、ヌードマウスの左肩に注入され、c m v - b l a により安定して形質移入された同数の C 6 ラット神経膠腫細胞は、同じヌードマウスの右肩に注入された。腫瘍の大きさが約 6 mm に達した時、 7.0 nmol の C N I R 5 が、麻酔をかけたマウスに尾静脈を介して注入された。マウスは、C y 5 . 5 フィルターセット（励起：615 - 665 nm；発光：695 - 770 nm）及び異なるポスト注入時間（p o s t i n j e c t i o n t i m e）での1秒の収集時間により、I V I S 200 イメージャーにおいてスキャンされた。

50

【 0 1 2 8 】

図 2 2 A は、注入の前、及び注入の 2、4、12、24、48、及び 72 時間後に得られた、一連の代表的な画像である。早くとも注入の 2 時間後に、c m v - b l a 腫瘍は、野生型 (w t) C 6 腫瘍よりも高度な蛍光強度を示した。対照は、24 時間にて 1 . 6 の最高値に達し、その後、48 時間及び 72 時間にて約 1 . 3 まで減少し始めた (図 2 2 B)。画像化の終わりに、マウスは、画像化データを確証するエキソピボ画像化及び生物分布研究用の器官及び腫瘍を集めるために殺した。図 2 2 C は、C N I R 5 の注入の 24 時間後に殺したマウスから集められた腫瘍と器官の蛍光画像であり、それは、w t C 6 腫瘍よりも高い、c m v - b l a 腫瘍からの C y 5 . 5 発光を実証する、インピボでの画像化データに一致する。c m v - b l a 腫瘍中の B l a の発現を確認するために、C N I R 5 (図 2 2 D) を注入されたマウスから切除された腫瘍の C C 1 アッセイが実行された；結果は、c m v - b l a 腫瘍が、高レベルの酵素発現を有し、一方で野生型腫瘍がわずかな B l a 活性しか持たなかったことを示した。

10

【 0 1 2 9 】

観察された対照が、腫瘍内で発現した B l a による C N I R 5 の活性化によるものであることをさらに立証するため、C N I R 6、ペルアセチル化された D - グルコサミンのない C N I R 5 のアナログは、対照として調製された (図 2 3 A)。C N I R 6 は、C N I R 5 と同じくらい効率的に、B l a によってインピトロで加水分解され得るが、細胞透過性が無く、したがって、C N I R 6 はインピボでの B l a を画像化することができない。図 2 3 B - 2 3 C において、全体の画像化期間を通じて、c m v - b l a 腫瘍及び対照腫瘍の間に、任意の著しい対比はなかった。これは、C N I R 5 が標的細胞へ入り、B l a によって活性化されたことを明らかに示した。この結果はまた、インピボの B l a を画像化するための C N I R 5 に関する D - グルコサミン基の重要性を実証した。

20

【 0 1 3 0 】

< 静脈注入後のマウスにおける C N I R 5 の生物分布及び薬物動態学 >

C N I R 5 は B a l b / c マウスへ静脈注入された。マウスのグループは、器官収集及び処理のために犠牲にされる。C N I R 5 の存在は、各々の器官中の蛍光強度によって経時的に評価される。図 2 4 A - 2 4 B は、4 時間と 24 時間後の注入での、それぞれの C N I R 5 シグナルを示す。安定したシグナルは、24 時間にわたり、C N I R 5 が全身性であり、この時間にわたって著しく分解されないことを示唆する、すべての組織で観察される。

30

【 0 1 3 1 】

< B l a によるマウスの結核菌感染を位置付けるためのインピボの画像化 >

4 つの B a l b / c マウスの 6 つのグループの各々は、実施例 1 に記載されているような 100 - 1000 c f u / 肺の間で、エアロゾルによって感染する。4 つのマウスの 1 つのグループは、全ての時点での画像化のために使用され、各々の時点で、4 つのマウスのグループは、組織病理学のため、及び肺と脾臓における c f u を測定するために殺し、検死される。24 時間、7、14、28、及び 72 日目に、画像化は、X e n o g e n I V I S 200 画像化ステーション (X e n o g e n I V I S 200 i m a g i n g s t a t i o n) を使用して、同じ A B S L 3 の組で実行される。4 つの動物の対照グループは、細菌に感染していないものを画像化するために使用されるが、未開裂の化合物からの背景蛍光を制御するために検出試薬を注入される。動物は、明るい窮屈なチャンバにおいてイソフルオランで麻酔をかけられ、640 nm の励起、及び 690 nm で捕捉された画像により画像化される。I V I に十分であると示された 5 n m o l の C N I R 5 は、尾静脈を使用して静脈内に注入される。画像は、化合物の注入、及び 1、2 及び 4 時間後の注入の前に得られる。シグナルがこれらの時点のうちの何かにて観察される場合、動物は、シグナルの散逸に従うため、24、48 及び 72 時間後に引き続き画像化される。

40

【 0 1 3 2 】

野生型結核菌に感染したマウス (図 2 5 A) と対照マウス (図 2 5 B) のインピボの画像が示される。両方のマウスは、画像化前に C N I R 5 を静脈注入された。この画像は、

50

感染したマウスが肺から来るシグナルを有することを示す。シグナルの3D再構築は、平均のシグナル位置が肺の間にあることを実証する。シグナルが平均化され、マウスには2つの肺があるため、この位置が最も大きな点源であることが予期される。したがって、化合物CNI R 5は、生きた哺乳動物の結核菌の位置を測定するために使用することができる。Xenogen / キャリパー I V I S スペクトル画像化システムは、この画像を捕捉するために使用された。

【0133】

< B l a を有するマウス中の結核菌検出の閾値の測定 >

- ラクタマーゼCNI R プローブは、100 Mの結核細菌を検出することができ、あるいは実時間でマウスのSREL画像化によってはあまり検出されない(図26A)。SREL画像化は、対照として未感染の生きたマウス(図26B)上で、又は結核菌に感染したマウス(図26C)上で実行された。カラーバーは、620 nmでの励起の後の、680 nmでの発光のレベルを示す。カラーは、Mtbに感染した肺から生じる強力なシグナルの存在を示し、感染の具体的な局在化を実証する。シュドモナス、スタヒロコッカス及びレジオネラのための検出の閾値も、測定され得る。

10

【0134】

< B l a を有するモルモットの結核菌感染のインビボでの画像化 >

4つのモルモットの6つのグループは感染し、以下の例外を除いて、マウスに関して記載される同じ方法で画像化される。最初に、モルモットが後の時点にて著しい死亡率を示し始めると予測されるため、28日までの感染後の時点のみが試験される。次に、20倍以上(CNI R 5に関して~100 nmol)の検出試薬が、マウスに必要とされるのと同じ血中濃度を達成するためにモルモットに必要とされ、化合物が外側の中足骨の静脈に投与される。モルモットは、ABSL3設備中のエアロゾルによって感染し、画像化まで封じ込めて維持される。画像化は、感染後24時間、7、14及び28日目に、I V I S 200画像化ステーションを使用して、ABSL3の組で実行される。4つの動物の対照グループは、細菌に感染していないものを画像化するために使用されるが、未開裂の化合物からの背景蛍光を制御するために検出試薬を注入される。

20

【0135】

画像化前に、I V I に十分であることを示された100 nmolのCNI R 5は、尾静脈を使用して静脈内に注入される。画像は、化合物の注入の前、及び注入後1、2及び4時間後に得られる。シグナルがこれらの時点のうちの何かにて観察される場合、動物は、シグナルの散逸に従うため、24、48及び72時間後に引き続き画像化される。

30

【0136】

実施例 8

< CNI R 5 による臨床サンプル中の結核の検出 >

30の臨床分離株を、直接、臨床検査室から得、これらは、標準の臨床的な実験室試験によって測定されるように、およそ半分が結核に対して陽性であり、残り半分が陰性である(抗酸性の直接的に濃縮塗抹標本(concentrated smear)、抗酸性の培養およびミコール酸HPLC)。これらの臨床サンプルは主に痰(26のサンプル)であったが、4回の気管支洗浄検査を行った。痰サンプルは、誘発されないもの(24のサンプル)もあれば、誘発されたもの(2つのサンプル)もあった。陽性サンプル内に4つのマイコバクテリウムアビウムコンプレックス(MAC)のサンプルがあった。これらのサンプルの各々を、試験の特異性(>94%)および感受性(>86%)に関して比較可能な結果を得た、2つの独立した試験において盲目的な方法で試験した。

40

【0137】

臨床サンプルを、CNI R 5 基質を使用して評価した(図27a)。偽陽性が1つだけ得られたが(sa6)、この患者は臨床疾患を示し、標準の培養および痰検査によって陰性であった。偽陰性が1つだけ得られたが(sa29)、この患者は培養によって陰性であった。サンプル、sa18、sa20およびsa24は、マイコバクテリウムアビウムであった。陰性の痰サンプルをまた、検出の閾値(~100 - 1000 CFU)を決定

50

する、および予めアッセイ条件を最適化する、添加実験 (spiking experiments) に用いた (図 27B)。

【0138】

3 回を超える独立した実験において、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中の結核で得られた検出閾値と同様の検出閾値が臨床サンプルを用いて直接得られた。既知数の結核菌が加えられた痰において、存在する細菌数に対して、生成されたシグナル強度の非常に好適な相関性 ($R^2 = 0.9$) があった (図 27C)。感受性は、100 の細菌の検出が実証されるような感受性であって、これは、培養と比較可能な診断テストをもたらすのに必要とされる感受性の範囲内にある。興味深いことに、研究室のリン酸緩衝食塩水 (PBS) を使用しようが痰を使用しようが、信頼度と定量的性質の間ではこの系を使用する違いはほとんどなく、このことは、系が極めて強固なものであることを示唆している (図 27D)。

10

【0139】

さらに、病原菌とシグナル強度との間の相関性を示す能力は、4 ~ 12 時間でイソニアジドおよびリファンピシンの耐性を確認するために使用される薬物感受性プロトコルに対する基準を提供する。この潜在性は、基質 CNIR5 を使用する抗結核治療の分析によって有効になり、これは、24 時間未満の後の処置において、処置された群と処置されていない群との間の明確な差を示す (図 27E)。これらのデータは、耐性菌に対して感受性のある菌が、本明細書に提供される基質を使用して、24 時間以内に識別され得ることを示す。これらの基質の最適化した変化が診断アッセイを改善し、検出の閾値を低下させることが予想される。

20

【0140】

実施例 9

< CNIR7 によるインビボ撮像：マウス組織中の CNIR7 の生体内分布 >

マウス組織中の CNIR7 の生体内分布を、インビボ撮像前に評価する。CNIR7 を、(100 μ L の緩衝食塩水中の 10 nmol の投与量で) 3 匹のマウスに静脈注射する。麻酔をかけたマウスを、注射後の異なる時間間隔 (30 分、240 分、12 時間、24 時間、48 時間、および 72 時間) で、頸椎脱臼によって殺す (各時点で 3 匹のマウス)。血液サンプルを、心臓穿刺によって集め、組織 (心臓、腎臓、肝臓、膀胱、胃、脳、脾臓、小腸および大腸、肺、および脾臓) を、迅速に採取し、蛍光測定器によって近赤外線蛍光を測定する。データは、1 グラムの組織あたりの蛍光ユニット (FU) [FU / (g 組織)] として表され、これらの組織器官中の加水分解した CNIR7 の生成物の量を示す。

30

【0141】

< マウスモデルにおける CNIR7 によるインビボ撮像 >

C6 の腫瘍の腫瘍異種移植片を、CNIR7 を撮像するために、ヌードマウスにおいて使用した。1 L / 分の低速度で 100 % の酸素中の 2 % のイソフルランの吸入によって、マウスに麻酔をかける。外側の尾静脈に、100 μ L の PBS の緩衝液中の 10 nmol の CNIR7 を注入する。3 匹のマウスを、IVIS200 Optical CCD システム (Xenogen Inc) を使用して、小動物のインビボの蛍光撮像系によって撮像する。このシステムは、生物発光と蛍光のインビボ撮像の両方に適しており、小齧歯類を単回の投影に対して迅速に、すなわち、蛍光撮像に対して 1 秒もの短い時間でスキャンすることができる。視覚化のための完全なソフトウェアツールが、このシステムとともに利用可能である。Cy5.5 による NIRF 撮像に関して、励起フィルター (640 \pm 25 nm) および発光フィルター (695 - 770 nm) を有するフィルターセットを使用する。蛍光画像を、C マウントレンズを装備した赤色光に高感度な白黒の CCD カメラによって収集する。マウスを、生体内分布の研究のために殺す。腫瘍組織のサンプルの一部を、Bla 活性の評価のために使用する。

40

【0142】

実施例 10

< 静脈内注入後のマウスにおける CNIR800 の生体内分布および薬物動態 >

50

マウスは、10、20および40 μM の2.5 $\mu\text{l/g}$ の3回の異なる投与のCNIR 800で接種を受ける。1、3、5、10、24、48時間後の投与とは異なる時間間隔で接種を受ける。麻酔をかけたマウスを、頸椎脱臼によって殺す（各時点で3匹のマウス）。血液サンプルを、心臓穿刺によって集め、組織（腫瘍、心臓、腎臓、肝臓、膀胱、胃、脳、脾臓、小腸および大腸、肺、および、脾臓）を、迅速に採取し、蛍光測定器によって近赤外線蛍光を測定する。これらのサンプルを、蛍光測定のための活性化されていないプローブをすべて加水分解するための水酸化ナトリウムの付加によって処理する。したがって、活性化された及び活性化されていないプローブの生体内分布を得ることができ、データを、1グラムの組織あたりの蛍光ユニット（FU） $[\text{FU}/(\text{g 組織})]$ として表す。したがって、組織中の基質の最適な濃度が決定される。

10

【0143】

< Blaを有するマウスにおける結核菌検出の閾値の決定 >

5 - 7週齢の、1匹の感染していない対照を有する1群当たり5匹の雌のBalb/cマウスは、肺ルートによって感染する。50、500、5000、50,000および500,000のcfu/肺の接種量を用いる。マウスの2つの群が各接種量で感染する。1つの群は撮像せずに1日目に殺し、接種量を確認するために、肺をcfuのために蒔く。マウスの他の群において、CNIR 800の適量を静脈内で与え、マウスを、その後すぐに、および基質送達の1、3、5、10、24、および72時間後に撮像する。

【0144】

基質の濃度の最適化は、基質の2分の1の濃度と2倍の濃度とにおける、検出の決定された閾値の2倍の接種量と該閾値の2分の1の接種量とを、合計4つの追加の条件に使用して、撮像実験により達成される。シグナル対雑音比の改善を示す接種量と基質の濃度を、検出の最適化した閾値を再び測定するために使用することができる。

20

【0145】

< 感染の間のcfuとのCNIR 800 REFの撮像の相関性 >

マウスは、自己蛍光を減らすための低クロロフィル食料（chow）と水で維持される、雌の5 - 7週齢のBalb/cである。1つの群当たり5匹の動物を感染していない対照に用い、4匹の動物を感染した対照に用いる。撮像前に2.5 $\mu\text{l/g}$ の20 μM のCNIR 800で送達された基質を動物に与える。1) 100 cfu \times 3、2) 1000 cfu \times 1、3) 10,000 cfu \times 6、4) 100,000 cfu \times 1、および、5) 10^6 cfu \times 1に対応する投与量（群# \times 5の群の数）は肺に残る。群1からのマウスを、7日目で最初に撮像する。シグナルが観察されると、動物を殺し、cfuを決める。シグナルが観察されなければ、シグナルが観察されるまで、動物を毎日撮像し、その日付を記入して、cfuを決める。これは、生理学的に関連する感染がREFによって目に見えるようになる時点、および、治療が始まり得る最初の時点である。他の2つの群1の数組の動物を、感染の28日後と60日後に撮像する。群2を4日目に撮像し、シグナルを観察し、cfuが決まるまで、群1と同じ方法で処理する。群3において、1組の動物を感染の1、3、5、7、14、28日後に撮像し、cfuを決定する。群4と5において、動物を1日目に撮像し、cfuを決定する。

30

【0146】

静脈内注入に関して、投与量は、1) 10^4 cfu \times 1、2) 10^5 cfu \times 2、3) 10^6 cfu \times 1、4) 10^7 cfu \times 1に相当する。これらの群をすべて、同じ方法で処理し、1、2、3、4、5および7日目に撮像する。一旦シグナルが観察されると、第2の群の動物であった場合を除いてその群を殺す。第2の群の動物は7日目まで各時点で撮像され、この最後の日に殺す。感染の部位での蛍光の取り込みを、全ての動物および切除した器官のレベルでIVIS撮像システムを使用して視覚化し、蛍光測定器での組織ホモジェネートにおいて及び組織の凍結切片および蛍光共焦点顕微鏡を使用して確認する。

40

【0147】

< CNIR 800 REF撮像による治療上のスクリーニング >

50

雌の5 - 7週齢のB a l b / cマウスを、処置の4日前にM a d i s o nチャンバーを使用して、100 - 1000 c f u / 肺で感染させる。1つの群当たり10匹の動物を、撮像のための対照として感染されてない2匹の動物とともに用い、1つの群当たり5匹の動物を、従来のc f u研究のために用いる。1つの群の動物を処置し、第2の群をすべての実験で処置しない。すべての動物を、ベースラインを得るために3日目の処置前に撮像し、治療上の処置を4日目に開始し、感染の5、6、7、14および28日後に撮像を行う。それと平行して、標準の治療上の評価のために、5匹の動物の1つの群を感染の4、7、14および28日後に殺す。また、尾静脈による 10^6 c f uの静脈内注入のモデルにおいて、I N H、R I FおよびM O Xに関する5、10、25および50 m g / k gで毎日処置を行う。25 m g / k gのI N Hでの処置を用い、従来の撮像と治療上の技術に対して比較を行う。

10

【0148】

実施例11

< 蛍光タンパク質：I V Iのための蛍光タンパク質の可能性の評価 >

蛍光タンパク質 (F P) m P l u mは、649 n mの最長の波長と非常に好ましい59 n mのストークスシフトを有し、これは、蛍光タンパク質が非常によく組織を透過し、好ましいシグナル対雑音比を有することを意味する。これは、E G F Pほど明るくないが、類似した光安定性を有し、その波長およびストークスシフトは、I V Iの間のこの差を十二分に補うべきであるが、これはインビトロでは同じように作用しないこともある。長波長 (620 n m) を有する第2 F Pは、m K e i m aであり、これは、背景が励起波長で重なるという懸念がほとんどない180 n mで、m P l u mよりもさらに優れたストークスシフトを有する。しかしながら、m K e i m aは、m P l u mと類似した明るさを有し、これによって、どのF PがI V Iの間に、よりよく作用するかを分かりにくくしている。m P l u mまたはm K e i m aのいずれかよりも4倍明るい比較的長い波長 (610 n m) を備える別のF Pは、m C h e r r yである。m C h e r r yのためのストークスシフトはわずか23 n mであり、そのため、シグナル対雑音比は、より明るいにもかかわらず依然として問題となり得る。F P t d T o m a t oは、最短の波長 (581 n m) を有するが、最も明るく、m P l u mおよびm K e i m aよりも20倍明るい。

20

【0149】

4つのF P、m P l u m、m K e i m a、m C h e r r yおよびt d T o m a t oは、G a t e w a y P C Rクローニングを使用して、発現ベクターへとクローン化される。これらのコンストラクトの各々は、M t bに形質転換され、96ウェルのプレートアッセイを使用して、インビトロで評価される。それらは、標準の成長条件下で、および、細胞内の成育アッセイによって培地中で評価される。コンストラクトはすべて、分光測光法で、および、8ウェルのチェンバースライドを使用して、顕微鏡法によって評価される。分光測光法による研究は、各コンストラクトに対する最適な発光波長と最適な励起波長を評価する。E G F Pが、長波長およびベクターのみでの発光のための陰性対照として使用され、細菌およびマクロファージ自体からの自己蛍光の効果を評価する。顕微鏡法は、細菌の個体群における蛍光の割合の計算を介して、培地の成長後にシグナル強度の任意の変動性および様々なベクターの安定性の評価を可能にする。

30

40

【0150】

< F Pのためのインビトロの評価パネル >

F Pコンストラクトは、培養中の安定性、転写および翻訳の有効性、検出限界およびイソニアジドによる処置の間 / 後のシグナルに関して評価される。シグナル強度およびコンストラクトの安定性のばらつきが、個々のF P形質転換体において以前に観察されているので、まず、各F Pコンストラクトでの少なくとも2つの形質転換体が、評価のために選択される。その後、各F Pに対する単一の最適な菌株がインビボの研究で選択される。

【0151】

培養中の安定性は、30日の成長後に蛍光のままである細菌の割合の選択と測定の有無における各菌株の成長によって評価される。これは、適切な抗生物質の存在下と不在下で

50

希釈液を蒔くことによって確認され、プラスミドから選択可能なマーカーを保持する培養中の細菌の割合を評価する。転写および翻訳の効率研究は、プロモーターが各コンストラクトにおいて適切に機能しているか否か、および、コドン使用頻度がシグナル強度に影響を及ぼし得るまで翻訳に影響を与えるか否かについての見識を与える。これは、各 F P コンストラクトを保持する M t b からの R T - P C R によって評価され、この誘発を相互に関連付ける異なるプロモーターおよび単コピー型または多コピー型ベクターを用いる発光量を、他のレポーターを発現するコンストラクトと比較する。これらの比率は、発現されるレポーターにかかわらず、比較可能でなければならない。

【 0 1 5 2 】

蛍光強度およびタンパク質レベルを、吸光度測定法およびウエスタン分析を使用して、各菌株に関して測定し比較する。タンパク質対 R N A 対蛍光シグナルの比率は、発現されるレポーターまたは発現される R N A 転写物のレベルにかかわらず、比較可能であるべきである。幾つかのレポーターが非効率的に翻訳されると、タンパク質の R N A 転写物に対するそれらの比率は、R N A 発現のレベルが増加するにつれて減少する傾向にある。このような観察は、翻訳の効率を改善するその F P のための、コドン使用頻度を修正する必要があると解釈される。しかしながら、これが、過剰発現による封入体におけるタンパク質の不安定性または隔離の結果である可能性もある。

【 0 1 5 3 】

検出限界を、平行して調製される培養からの限界希釈の蛍光を評価することによって決定する。これらのデータを、蛍光によって得られた数が、直接、生菌と相互に関連することを確認するために、C F U に関連して、および蛍光顕微鏡の定量化によって評価する。1 μ g / m l のイソニアジドを、96 ウェルのフォーマットアッセイにおいて C F U および蛍光のために既に評価された培養に加えることによって、イソニアジド (I N H) 処置の効果を評価する。37 に設定された培養チャンバーと分光光度計を用いて、および、I N H の付加後すぐと I N H の付加 48 時間後までの様々な時点で、C F U のために培養されるアリコートを採用することによって、C F U と蛍光をリアルタイムで追跡する。これによって、各コンストラクトに関する抗生物質による処置後に、シグナル強度、安定性およびシグナルの持続時間に対する知見が得られる。

【 0 1 5 4 】

< 選択的な組換え F P の毒性に対する安定性および効果 >

毒性研究において、菌株をすべて、平行して野生型と比較する。4 匹の B a l b / c マウスの 20 の群を、実施例 1 に記載されるような 100 - 1000 の間の c f u / 肺で、エアロゾルによって感染させる。各菌株に対する 4 匹のマウス (野生型、F P 1、F P 2、F P 3、F P 4) の 1 つの群を、すべての時点 (1、14、28 および 72 日) で検死し、C F U を決定し、組織検査を行い、適切なコンストラクトの存在および肺および脾臓内の蛍光のレベルを決定する。コンストラクトを保持する細菌の個体群の割合を、C F U のタイタプレートから少なくとも 20 の個別のコロニーで処理される蛍光顕微鏡法によって決定する。蛍光レベルは、残りの F P の全体のレベルを評価するための、測定された均質化された組織である。

< エアロゾルによって感染したマウスにおける蛍光タンパク質 >

4 匹の B a l b / c マウスの 6 つの群を、各々、m P l u m、m K e i m a、m C h e r r y および t d T o m a t o のコンストラクト、および、ベクター骨格のみを保持する、100 - 1000 の間の c f u / 肺の各菌株とともにエアロゾルによって感染させる (合計 30 の群)。菌株を、実施例 1 に記載されるように、エアロゾル感染のために溶かす。1 つは各 F P を有し、1 つはベクターを単独で有する、4 匹のマウスの 5 つの群を、すべての時点で撮像するために使用し、各時点で 4 匹のマウスの別の 5 つの群を組織検査のために殺し、検死し、肺および脾臓内の c f u を決定する。24 時間、7、14、28 および 72 日目で、撮像を、X e n o g e n I V I S 200 撮像ステーションを使用して、および各 F P のための最適な励起および発光のフィルターを使用して、同じ A B S L 3 s u i t e において実行する。F P が、I V I S において異なるセットのフィルターの使

用を必要とするとき、ベクターはまた、自己蛍光のために制御する同じフィルターセットを使用して、各動物群において単独で撮像される。したがって、細菌重量 (bacterial load) が、感染後の後の時点で非常に低い (100 cfu / 肺) 実験から非常に高い (> 105 cfu / 肺) 実験の全体にわたって変化するため、IVIのための各FPを、この系の感受性と同様に有効にする。ベクター単独の使用によって、自己蛍光、およびFPの存在によってもたらされる毒性の潜在的な差の両方が制御される。

【0155】

実施例 12

< 培地中の結核の検出に関する Click beetle red (CBR) >

CBR 遺伝子を、既に導入された Gateway 組換え部位を使用して、Bla に関して記載される4つのコンストラクトのすべてへクローン化する。これらのプラスミドによって、L5 および hsp60 プロモーターの両方からの発現が可能となる。発光検知能力を有するマルチモードのマイクロプレートリーダーにおける96ウェルのプレート、および持続的なシグナルの分解速度と同様に、D-ルシフェリンを加える間のフラッシュ発光の測定を可能にするインジェクターを使用して、成育培地で各菌株のD-ルシフェリンの存在下で光を生成する能力を比較する。アッセイをすべて、細菌の限界希釈法およびCFUの測定とともに4回繰り返して行い、生菌数と生成されるシグナルを相関させることができる。コンストラクトの安定性を、7日間、選択がない状態での成長によって評価し、その後、分光測光法および蛍光の顕微鏡検査によって評価する。シグナル / 生存可能な病原菌を測定するために、これらのデータをCFUと相互に関連させ、陽性シグナルを生成する細菌の割合を計算するために、顕微鏡法を用いる。コンストラクトの細菌の生存率に対する効果を、ベクターのみの細菌と比較して、このコンストラクトを保持する細菌の成長を図示することによって、これらのアッセイにおいて評価する。

10

20

【0156】

< マウスにおける CBR の発現、安定性、および、毒性の評価 >

組換え CBR の毒性に対する安定性および効果を、IVI の保証 (promise) を示す2つの菌株に関して試験する。毒性研究において、菌株をすべて、平行して野生型と比較する。4匹のBalb/cマウスの12の群を、実施例1に記載されているように、100 - 1000 の間の cfu / 肺でエアロゾルによって感染させる。

30

【0157】

各菌株に対する4匹のマウス (野生型、CBR1 および CBR2) の1つの群を、すべての時点 (1、14、28 および 72 日) で検死し、CFUを決定し、組織検査を行い、適切なコンストラクトの存在および肺および脾臓内の蛍光のレベルを決定する。コンストラクトを保持する細菌の個体群の割合を、CFUのタイタプレートから少なくとも20の個別のコロニーで処理される蛍光顕微鏡法によって決定する。発光レベルを、残りのCBRの全体のレベルを評価するために、均質化された組織において測定する。

40

【0158】

< マウス中の CBR を発現する結核および BCG の菌株の撮像 >

本実施例1に記載されるように、4匹のBalb/cマウスの6つの群を、各々、RLuc8とベクター骨格のみを保持する、100 - 1000 の間の cfu / 肺の各菌株を用いて、エアロゾルによって感染させる (合計12の群)。1つがRLuc8を有し、1つがベクターのみを有する、4匹のマウスの2つの群を、すべての時点で撮像するために使用し、各時点で、4匹のマウスの別の2つの群を、殺し、検死し、肺および脾臓内の cfu を決定する。24時間、7、14、28 および 72 日目、撮像を、Xenogen IVIS 200 撮像ステーションを使用して、同じ ABSL3 suite で行う。撮像前に、IVIに十分であると示された1 - 5 μmol のD-ルシフェリンを、尾静脈を用いて静脈内に注入する。

40

【0159】

画像を、化合物の注入前に、および注射の1、2および4時間後に得る。シグナルがこれらの時点のいずれかで観察されると、24、48 および 72 時間後に連続して動物を撮

50

像し、その後、シグナルは消散する。遮光チャンバー中でマトリックスシステム (Xenogen) を使用して、100%の酸素中の2%のイソフルランで、イソフルラン麻酔によって動物に麻酔をかけ、10ピクセルビンニング (pixel binning) で3~5分までの積分時間を使用して撮像する。これによって、細菌重量が、感染後の後の時点で非常に低い (100cfu/肺) 実験から非常に高い (>105cfu/肺) 実験の全体にわたって変化するため、このシステムの感受性と同様にIVIのためのCBRが有効となる。ベクターのみを用いることで、自己蛍光、および、CBR遺伝子の存在によってもたらされる毒性の潜在的な差の両方が制御される。

【0160】

実施例13

10

<IVIのためのルシフェラーゼ系の潜在性の評価>

RLuc8ルシフェラーゼを、Gateway PCRクローニングを使用して、記載されるマイコバクテリアの発現系へクローン化する。コンストラクトをMtbへ導入し、細胞全体を使用して、細菌培養培地中で、それらの光生成のために試験する。万一、インタクトな細菌がCBRに対して比較可能な光を生成すれば、細胞内の細菌系は、マウスにおけるCBRと比較することができる。グラム陽性とグラム陰性菌のルシフェラーゼ系は両方とも、基質を生成するという利点を有する。両方のオペロンを、制限消化を使用して、発現系へクローン化することで、それらを、現在のベクターから取り除き、その後、GatewayアダプターおよびGateway組換えクローニングにライゲーションする。コンストラクトを、細菌培地中でMtbからの光生成のために試験する。光生成が分光光度計のための発光設定で測定されることを除いて、生物発光のためのすべてのアッセイを、Bla系に関して記載されるように、96ウェルのプレートにおいて実行する。光生成をCFUに関連して計算することができるように、すべてのサンプル上で平行して実行される限界希釈およびCFUの決定によって感受性を評価する。

20

【0161】

<ルシフェラーゼを使用するマクロファージの結核の検出>

分泌と膜を標的とすることの、マクロファージ中のルシフェラーゼ活性に対する効果を試験する。マイコバクテリアからの分泌は、アミノ末端TATシグナルを、Mtb BlaC (BlaSS) からのシグナル配列に付加し、この融合を、Mtb内でCBRを最適に発現する同じコンストラクトに置くことによって、達成される。分泌は、CBR、BlaSS::CBRおよびベクターのみを発現する初期の対数期まで成長したMtb菌株からの培養濾液と細胞全体をアッセイすることによって、確認される。この菌株からの培養濾液は、CBRを発現する菌株よりはるかに高い光生成を有していなければならない。BlaSS::CBRからの細胞全体は、CBR Mtbと同じか又はより少ない光生成を有していなければならない。Blaのために使用されるCD14からのカルボキシ末端GPIアンカーを、BlaSS::CBRに付加し、融合タンパク質BlaSS::CBR::GPIを生成する。

30

【0162】

BlaSS::CBR::GPIを発現するMtbを、CBRとBlaSS::RLuc8を発現する菌株と比較して、細胞内のマクロファージアッセイを使用して、光生成に関して評価する。細菌の滴定および化合物の様々な濃度が試験できるように、J774A.1マクロファージを、96ウェルのプレートにおいて使用する。アッセイをすべて、Blaに関して記載されるのと同じ方法で4回繰り返して実行する。得られた測定における宿主細胞透過性の役割を評価するために、D-ルシフェリンを加える前に、二連のウェルを、0.1%のトリトンX-100によって溶解する。すべての時点で、4つの未処置のウェルを、細胞に係するCFUの数を測定するために使用する。細胞内でのCBRの検出は、D-ルシフェリンに関する、真核細胞およびマイコバクテリアの液胞の透過性による影響を受け得、そのため、マクロファージ内の細菌に対するその感受性の評価は、非常に重要になる。しかしながら、細菌のルシフェラーゼ系は、細胞内での細菌の成長による著しい影響を受けることが少ない傾向にある。

40

50

【0163】

細菌のルシフェラーゼ系および R L u c 8 の各々における光生成を、細胞内アッセイを使用して確認する。R L u c 8 に関して得られた測定における宿主細胞透過性の役割を評価するために、セレンテラジンを加える前に、二連のウェルを、0.1%のトリトン X-100 によって溶解する。シグナルの局在化を、最も有効であると示すこれらのコンストラクトについて確認する。これらのアッセイを、類似した方法ではあるが、8 ウェルのチャンバースライドを使用して実行する。顕微鏡法は、局在化、陽性シグナルを有する細菌の割合の決定、および局在化されたシグナルの強度の評価を可能にする。

【0164】

実施例 14

< I V I のための化合物による B g a l の検出 >

以前に記載された (17) プロモーターのない B g a l 遺伝子を、制限酵素消化および Gateway アダプターへのライゲーションによって、マイコバクテリアの発現ベクターへクローン化する。これらのベクターを、以前に記載されたような (18) 96 ウェルのプレートにおいて、マイコバクテリアの透過性の蛍光試薬、5 - アセチルアミノ - フルオレセイン (f l u o r e x c i n e) ジ - ベータ - D - ガラクトピラノシド (C 2 F D G) を使用して、細菌培養培地中の評価のために M t b に移す。この化合物は、B g a l によって開裂されるまで、蛍光ではなく、460 nm で励起され、520 nm で発光する。最も強力な蛍光シグナルを生成するベクターを、B g a l の分泌および宿主細胞の局在化を可能にする追加の融合を構築するために使用する。

【0165】

B g a l の分泌は、マイコバクテリアの透過性が、B g a l を検出するという異なる化合物の能力で役割を果たすかどうかを決定するのに助けるために重要である。B g a l を分泌するために、M t b B l a C (B l a S S) からのアミノ末端 T A T シグナル配列を付加し、この融合を、M t b 内で B g a l を最適に発現する同じコンストラクトに配する。分泌は、C B R、B l a S S : : C B R およびベクターのみを発現する初期の対数期まで成長した M t b 菌株からの培養濾液と細胞全体をアッセイすることによって、確認される。B l a のために使用される C D 14 からの同じカルボキシ末端 G P I アンカーを、B l a S S : : B g a l に付加し、融合タンパク質 B l a S S : : B g a l : : G P I を生成する。

【0166】

B g a l コンストラクトをすべて、C 2 F D G、5 - ドデカノイルアミノレソルフィン (d o d e c a n o y l a m i n o r e s o r u f i n) ジ - ベータ - D - ガラクトピラノシド (C 12 R G) および 9 H - (1, 3 - ジクロロ - 9, 9 - ジメチルアクリジン - 2 - オン - 7 - イル) ベータ - D - ガラクトピラノシド (D D A O G) による蛍光検出の感受性のために評価する。化合物はすべて、M o l e c u l a r P r o b e s、I n v i t r o g e n の一部から市販で入手可能である。C 2 F D G が、効率的に M t b において B g a l に入り、検出すると知られているため、この化合物は陽性対照を提供するが、発光のその波長は、I V I に関して利点を有していない。C 12 R G は、真核細胞を巧みに通り、より長い放出波長 (590 nm) を有するが、類似した化合物 C 12 F D G は、M t b において B g a l をさほど検出せず、これは、化合物 C 12 F D G が細菌膜をさほど通らないことを示唆している。

【0167】

生成されたシグナルに対する透過性と局在化の効果を確認するために、B g a l 活性を、すべての菌株および化合物に関する生菌および細胞全体の溶菌液中で測定する。化合物 D D A O G は、真核膜を巧みに通り、B g a l (660 nm) による開裂後に最長の発光波長を有しているため、I V I に関してうまく働くと示された。D D A O G は、B g a l 活性を十分に検出する場合、さらなる研究のための最良の化合物になると考えられる。

【0168】

< マウスにおける B g a l の発現、安定性および毒性 >

組換え B g a l の安定性および毒性に対する効果を、I V I の保証を示す 2 つの菌株に関して試験する。毒性研究において、菌株をすべて、平行して野生型と比較する。4 匹の B a l b / c マウスの 12 の群を、実施例 1 に記載されるように、100 - 1000 の間の c f u / 肺でエアロゾルによって感染させる。各菌株に対する 4 匹のマウス（野生型、B g a l 1 および B g a l 2）の 1 つの群を、すべての時点（1、14、28 および 72 日）で検死し、C F U を決定し、組織検査を行い、適切なコンストラクトの存在および C 2 F D G を有する肺および脾臓内のレベルを決定する。コンストラクトを保持する細菌の個体群の割合を、C F U のタイタプレートから少なくとも 20 の個別のコロニーで処理された C 2 F D G を使用する B g a l アッセイによって決定する。B g a l レベルを、各時点で残る B g a l の全体のレベルを評価するために、均質化された組織において測定する。

10

【0169】

< マウスにおける B g a l を発現する結核菌株の撮像 >

L 2 G 8 5 マウスからの細胞がすべて、A C T B プロモーターから F l u c を発現するため、L 2 G 8 5 マウスからの骨髓由来のマクロファージを、M t b 菌株を発現する B g a l によって感染させ、ベクターのみを保持する同じ菌株と比較する。マクロファージ感染を、感染した L 2 G 8 5 マウスからの骨髓由来のマクロファージによって、J 7 7 4 A . 1 マクロファージ中の他の細胞内の成育アッセイのための方法と同じ方法で実行する。得られた測定値における宿主細胞透過性の役割を評価するために、L u g a l を加える前に、二連のウェルを、0 . 1 % のトリトン X - 100 によって溶解する。すべての時点で、4 つの未処置のウェルを、細胞に関係する C F U の数を測定するために使用する。シグナルの局在化を、最も有効であると示すこれらのコンストラクトのために顕微鏡法によって確認する。これらのアッセイを、類似した方法ではあるが、8 ウェルのチャンバースライドを使用して実行する。顕微鏡法は、局在化、陽性シグナルを有する細菌の割合の決定、および局在化されたシグナルの強度の評価を可能にする。L u g a l が検出のためのルシフェリンの代わりに使用されることを除いて、C B R のために記載されるのと同じプロトコルを使用して、I V I 研究をマウスで行う。

20

【0170】

実施例 15

< ラクタマーゼおよび他のタンパク質の結晶構造モデルに基づいた基質プローブ設計 : B l a C 酵素ポケットのモデル化 >

30

結核菌 ラクタマーゼ (B l a C) 酵素ポケットを、プローブの設計および特異性を改善するために小分子を使用してモデル化する。小分子ライブラリでのように、小分子のハイスループットスクリーニングを、B l a C の活性部位溝に結合する化合物を確認するために使用して、結晶構造をそこから得た。候補のプローブはインビトロで合成及び試験した。

【0171】

< ラクタマーゼ様酵素及びペニシリン結合タンパク質 >

結核菌内の二つの主要な ラクタマーゼ様タンパク質 (B l a X) および二つの主要なペニシリン結合タンパク質 (P B P) をクローン化し、過剰発現させ、精製した。B l a X と P B P の K m 及び結合定数はセフォペラゾン (c e f e r o p e r a z o n e) 、ペニシリンおよびシプロフロキサシンにより決定した。候補タンパク質の結晶構造を明らかにし、これを改善されたプローブ活性を持つ特定のプローブを設計するために使用した。

40

【0172】

< M t b 酵素および大腸菌 ラクタマーゼ T E M - 1 間の構造活性の関係性 >

セフォペラゾンを有する、B l a C および T E M - 1 の結晶構造を解明する。セフォペラゾン (c e f e r p e r a z o n e) に基づいたプローブをモデル化し、設計し、合成する。候補プローブは B l a C および T E M - 1 の K m を決定するために使用する。

【0173】

50

実施例 16

<新規消光剤及び色素を利用した R E F 感受性の改善>

R E F 画像化に使用した前記基質で、マウスの肺結核感染の画像化に成功したことから、この方策が非常に有望であることを示唆している。しかしながら、肺内での検出の閾値が $> 10,000$ 細菌数であるので、R E F プローブの感受性を高めることによって検出を改善することは有益である。最近、前記化合物の改善を約束するような、新しい色素および消光剤が、 800 nm の範囲で働く L i C o r を用いて開発された。I R D y e 800 C W と名づけられたこの新しい色素は C y 5 . 5 より約 10 倍明るく、その長波長により C y 5 . 5 よりはるかに良く哺乳類組織の中を通過するはずである。この色素に基づく化合物およびそれによく適合した Q C - 1 と名づけた消光剤に基づく化合物を設計する。この色素と消光剤に基づいた化合物は、現在の R E F 系の劇的な改善を可能にした。また、2つの I R D y e 800 色素である、I R D y e 800 R S および I R D y e 800 C W (図 27) をインビボ画像化の用途のための F R E T ドナーとして検証した。両方とも 780 nm での励起及び 820 nm での発光と同じ蛍光スペクトルを有しているが、それらは I R D y e 800 C W が I R D y e 800 R S より多くのスルホン酸塩群を持つ点で異なる。この差は異なる生体内の生物分散につながる可能性があるため、その両方を検討した。I R D y e 800 の高い消光効率を有した、対応する色素である I R D y e Q C - 1 を、蛍光性プローブの中で F R E T アクセプターとして使用した (図 28)。上記のように、プローブへのこれらの分子の取り込みは、N H S エステルおよびアミンの間の共役化学作用であり、C N I R 5 を調製したのと同じ合成手順である。まず、I R D y e 800 色素から作られたこれら C N I R プローブの加水分解動態は、T E M - 1 B l a および M t b B l a C の両方によって特徴づけられ、また前記プローブを、皮下及び肺の感染での M t b のインビボ画像化のために評価する。

【0174】

I R D y e 800 C W に基づいた化合物を最初インビトロで試験し、その次に皮下及び肺の感染に対して有効であることを確認するために、細胞内の研究および動物モデルでの研究を行った。感染部位への蛍光の取り込みは、動物全体のレベルでは、I V I S 画像化システムを使用して可視化され、細胞レベルでは、組織の一部、共焦点蛍光顕微鏡検査及び感染した組織の生体顕微鏡検査を用いて蛍光測定器で、蛍光の取り込みを組織ホモジネート内で確認した。

これらの技術の組み合わせは、感染した組織の標識化特性および感染した宿主細胞内のプローブの取り込みについての詳細な特徴づけを可能にするために、感染したマウスモデルで試験されたすべてのプローブに適用される。

【0175】

<基質の構造的変化を利用した S R E L および R E F 感受性の改善>

現在の基質プローブは M t b B l a C 活性を検出し画像化できる一方、その M t b B l a C に対する活性は最適ではない。M t b B l a C への酵素反応を改善したプローブは、検出と画像化の両方に、より高い感受性を与える。M t b B l a C の結晶構造は、M t b B l a C はより大きな活性部位ポケットを有するという、他のクラス A の - ラクタマーゼとの大きな違いを示す。この構造の差は、M t b B l a C のために改善された動態を備えたプローブを設計できる可能性を示唆する。主要な 3 つのアプローチが、セフォペラゾンに基づいた B l a C プローブの構造の改善、化合物の限定されたライブラリーからのスクリーニングおよび脱離基の修飾のために利用される。確認された適切な化合物を、M t b、細胞内の細菌、皮下及び肺の経路によるマウスへの感染を利用した生体外アッセイを使用して、さらに特徴づける。

【0176】

セフォペラゾンの構造に基づいた合理的なアプローチ。

T E M - 1 B l a および M t b B l a C による C N I R 5 の動態：

T E M - 1 B l a、 $k_{cat} = 0.33\text{ s}^{-1}$ 、 $K_M = 1.9\text{ }\mu\text{M}$ 、 $k_{cat}/K_M = 1.74 \times 10^5\text{ s}^{-1}\text{ M}^{-1}$ ；

10

20

30

40

50

$Mtb \text{ BlaC}$ 、 $k_{cat} = 0.07 \text{ s}^{-1}$ 、 $KM = 5.9 \mu M$ 、 $k_{cat} / KM = 1.2 \times 10^4 \text{ s}^{-1} M^{-1}$ 。

【0177】

この動態のデータは、 $CNIR5$ が $TEM-1 \text{ Bla}$ に対して好ましい基質であるが、 $CNIR5$ が $Mtb \text{ BlaC}$ に対して好ましい基質ではないことを示す。 $Mtb \text{ BlaC}$ への特異的な活性に必要な構造の要素を確認するために、多くのセファロsporinラクタム抗生物質（セフォペラゾン、セファロチン、セファゾリン、セフトジジム、セホキシチン、セファマンドール、セフォタキシムおよびセファレキシム）の動態を、 $TEM-1 \text{ Bla}$ および $Mtb \text{ BlaC}$ とともに測定した。その結果は、 $TEM-1 \text{ Bla}$ と比較して、セフォペラゾン（図28）が $Mtb \text{ BlaC}$ に対して好ましい基質であることを示した。

10

【0178】

$TEM-1$ は Bla 、 $k_{cat} = 0.26 \text{ s}^{-1}$ 、 $KM = 262 \mu M$ 、 $k_{cat} / KM = 1 \times 10^3 \text{ s}^{-1} M^{-1}$ ；

$Mtb \text{ BlaC}$ は、 $k_{cat} = 2.01 \text{ s}^{-1}$ 、 $KM = 76 \mu M$ 、 $k_{cat} / KM = 2.6 \times 10^4 \text{ s}^{-1} M^{-1}$ 。

【0179】

$Mtb \text{ BlaC}$ の k_{cat} / KM 値（ $2.6 \times 10^4 \text{ s}^{-1} M^{-1}$ ）は $CNIR5$ のその値（ $1.2 \times 10^4 \text{ s}^{-1} M^{-1}$ ）より良いが、 $TEM-1 \text{ Bla}$ の k_{cat} / KM 値（ $1 \times 10^3 \text{ s}^{-1} M^{-1}$ ）は $CNIR5$ のその値（ $1.74 \times 10^5 \text{ s}^{-1} M^{-1}$ ）より100倍小さい。セフォペラゾン中の位置7のアミンにつながった大きな基から、この選択性の原因である主要な構造グループが生じていると仮定され、それは $Mtb \text{ BlaC}$ のX線構造からの発見（ $BlaC$ は位置7に大きな基質結合ポケットを有している）によって支持されると思われる。

20

【0180】

したがって、セフォペラゾンの位置7の基は $CNIR5$ に取り込まれ、改善された動態を示す $Mtb \text{ BlaC}$ プローブを作製する（図29）。まず1）バッファー及びマウス血清中のその安定性、2）精製された Mtb 及び細胞内 Mtb の存在下での動態、そして3）精製された $TEM-1 \text{ Bla}$ 存在下での動態についてインビトロでこのプローブを試験する。それが同等あるいは改善された膜輸送を示しているかどうか、及び以前のプローブによって示された特性を保持しているかどうかを評価するために、その膜透過性特性をその後 $CNIR5$ と比較した。その後、皮下およびエアロゾル感染を通じた動物実験を行い、その後の Mtb による画像化を行う。

30

【0181】

よりよくセフォペラゾン $CNIR$ プローブの構造および活性関係性（SAR）を理解するために、 $BlaC$ に対するその結合のコンピュータモデリングを行った。それと並行して、複合体の構造を解明するために、プローブは $BlaC$ とともに共結晶化した。結果として生じた構造についての情報を、改善されたプローブを合理的に設計するために適用した。

40

【0182】

<改善された感受性を持つプローブを同定するための迅速で限定された構造ライブラリー分析>

セフォペラゾン $CNIR$ プローブを合成し試験した後に、ライブラリー・アプローチを、X線の構造の研究によるSARの改良と平行して、選択性を改善するために試みた。

【0183】

$CNIR$ プローブより $Bluco$ を調製する方がはるかに容易なので、 $Bluco$ に基づいた基質を、酵素反応を単純に迅速に読み出すために利用した。セフォペラゾンアナログの偏った小規模なライブラリを構築するために、 $Bluco$ をテンプレートとして利用した。このライブラリを構築し、かつ多様性を作り出すために、位置8をピペラジン2, 3ジオンで置換したもの（A）とともに位置6をフェニルグリシルメチルエステルで置

50

換したもの (B) を利用した。これらのすべては市販で入手可能である。これは 48 のメンバーの生成につながった。

【0184】

その後、Bluco の最終的な 48 のアナログを生成するために、Bluco 前駆体 (C) によりライブラリを反応させた。ライブラリを D ルシフェリンのカルボキシラト基を介した固い支持体 (solid support) の上で調整した。ライブラリー調製にこれらの化合物をすべて含む前に、各々のメンバーに関するコンピューター・モデリング研究を、すべてが Blac の活性部位ポケットに潜在的に適合することを確認するために、Blac の利用可能な X 線構造に基づいて行った。

【0185】

ライブラリのスクリーニングを発光マイクロプレート・リーダーを使用した、ハイスループットアッセイにより行った。動態のスクリーニングの前に、第 1 の工程がバッファー中の化合物の安定性をふるいにかけることであった。動態を、共培養の初期の時点で陽性対照として、もとの Bluco 基質およびルシフェリンの発光レベルと比較することにより評価した。有益な動態を有する化合物は、ルシフェリンの急速な加水分解および放出が、基質を加えた後数分以内の高レベルの発光を結果として生じさせることを示した；一方でもとの Bluco 分子は数時間の共培養の後に最大レベルの発光を示す。これらの研究は、光学式画像化に対する高い感受性と Blac に対する改善された動態を示す CNIR 及び Bluco の基質の基礎として使用することができる、新しい化合物を提供する。

【0186】

< 改善された動態のための修飾された脱離基：3' - 位置でのアリル結合 (linkage) >

フェノール類のエーテル間での二重結合の挿入がフェノール基の放出動態を大幅に増加させることは以前に示されている [JACS、2003、125、11146 - 11147]。例えば、k_{cat} はフェノール類の脱離基に関して 5 倍から 54 s⁻¹ に増加した。この所見に基づいて、二重結合を CNIR プローブに導入した。例えば、図 28 に示される構造について、対応するプローブを図 31 に示した。以前の実施例において、二重結合はシス型配置を有するが、その配置はここではるかに大きなアリル基によってトランス型になることが期待される。同様に、Bluco への二重結合の導入は、Bluco よりも優れた反応速度を有することが期待される Bluco 2 をもたらす (図 30)。

【0187】

< 3' - 位置でのカルバマート結合 >

3' - 位置での結合の第二のタイプは、加水分解後のより速い分解をもたらし、したがってよりよい感受性をもたらす。この設計はカルバマート結合、D ルシフェリンおよびアミノ D ルシフェリンのアミノアナログを利用する。カルバマート結合は、優れた脱離基としてプロドラッグ設計の中で広く使用されてきた。Blac 開裂は、カルバマートを放出し、そのカルバマートはその後二酸化炭素およびルシフェラーゼ用の基質である遊離したアミノ D ルシフェリン (図 32) へと分解される。同様に、この結合は、CNIR プローブにも適用される (図 32)。

【0188】

< 組織分布の評価による SREL および REF 感受性の改善 >

組織分布研究はその存在濃度を測定するために CNIR 基質の蛍光を使用して行った。開裂によって蛍光は増加するので、非開裂基質の分布は Blac 存在下で培養され、蛍光を測定することで決定し、開裂基質濃度は直接の蛍光測定によって決定した。この方法によって組織中の基質の存在を見積もることができるが、組織試料内の自己蛍光、潜在的な阻害剤の存在および基質の自発的な加水分解が、得られたデータに影響を与えるので、それは決定的ではない。より多くの詳細な組織分布データが、放射性標識したプローブの分布による試験を通じて得られる。容易にインビボのプローブの分布を追跡できるように、CNIR 5 を I - 125 など放射性ヨウ素により標識化した。CNIR 5 内の芳香族基を、タンパク質中のチロシンを標識化するプロトコルを使用して、同様にヨウ素化した。標

10

20

30

40

50

識化されたプローブを、マウスに注入し、動的なSPECTイメージングを行った。異なる期間で、放射能測定用に器官を集めるためにマウスを殺した。並行して、プローブの遊離した画分を、解剖検査の後で得られた可溶性画分を使用して、HPLCで直接評価した。(全体の及び可溶性の)組織ホモジェネートをコールドプローブを使用して蛍光によって評価し、HPLCによって可溶化し、その後ホットプローブのための画分をシンチレーション検出した。新しいMtbに特異的なプローブが開発され、組織分布を改善できる潜在性という観点を提供するために有効になる時、同じ実験をそのプローブを使って行う。

【0189】

<ガラクトシダーゼを使用したSRELとREFの感受性の改善>

より良い酵素反応あるいは使用可能な基質に起因して、異なるSREL/REF酵素系はBlacと比べて重要な利点を有する可能性があるので、SREL/REFをMtbについてガラクトシダーゼ(lacZ)に蛍光を付加したもの(DDAOG)あるいは発光性基質(Lugal)を用いた。DDAOGとLugalの両方は、インビトロ画像化のために、およびLugalはマウス中の皮下感染を画像化するための利用に成功した。DDAOGはインビトロで期待できる結果を示したが、これをインビボでは評価していない。発光性基質の利用は、発光基質とともにルシフェラーゼが輸送される必要がある発光性基質を超えるいくつかの利点を持っているので、我々にとってDDAOGが生体内でもLugalと同様に感受性があるかどうか確認することが重要になってくる。この系はBlucoが抱えているのと類似の問題を抱えている。DDAOGまたはDDAOGに基づいて改善された修飾した化合物は、最も感受性が高い系のうちの1つであると最終的に証明するかもしれない。また、すでに多くの研究者が使用している比色分析レポーター系は多数存在し、生きている動物中の結核感染の画像化に成功すれば、これらの系は即座に結核研究分野のコミュニティーの中で有益なものとなる。

【0190】

実施例17

<大きなラクタムを用いたSRELとREFプローブの特異性の改善>

改善された感受性を備えたプローブを開発するために使用されるのに類似した戦略を、他の細菌の種類の中にあるラクタマーゼ上のMtb Blacに選択的なプローブを開発するために使用した。これらのラクタマーゼ酵素の中で最もよく特徴づけられているのは、大腸菌TEM-1であり、それは多くの動態アッセイに使用されており、また真核生物の系の中で有益なレポーターとして使用されている。感受性を改善するためのそれと比較して、使用されるアプローチの主な違いは、動態の中でMtb Blacと大腸菌TEM-1の間の最も大きな差異を有している化合物に焦点をあてることである。ほとんどのベータラクタムはTEM-1酵素でより優れた動態を示すが、TEM-1よりMtb Blacでより優れた動態を示す3つのベータラクタムが確認されている。それらはセフォペラゾン、セフォタキシムおよびセホキシチンである。これらの化合物は、それらの動態において大きく異なるが、セフォペラゾンは、TEM-1酵素に比べてMtb酵素と10-100倍速い動態を見せるため、この酵素に特異的なプローブの開発のためのよい候補であることを示唆する。CNI R化合物をセフォペラゾンに基づいて構築し、その特異性は、精製されたBlacおよびTEM-1を蛍光を含む96ウェルフォーマットの中でリードアウト(readout)して使用し、その酵素反応パラメーターを測定して評価される。

【0191】

<限定された構造ライブラリを使用したSRELおよびREFプローブ特異性の改善>

実施例16において開発した化合物のライブラリーもSRELとREFプローブの特異性を改善するために使用することができる。しかし、酵素反応ではなく特異性に注目する修正されたハイスループットスクリーンが使用される。基本的に、化合物はそれぞれ上記のようにBlucoに基づいた基質として合成する。また、化合物は、ハイスループット発光アッセイ中の精製されたBlacおよびTEM-1が存在する状態で評価する。化合物はすべて、ヒットを確認するためにBlacで探索し、また他の酵素に乏しい基質を確

認するために、TEM-1 Blaにより探索した。加えて、安定した化合物のみが得たことを確認するために、化合物をすべて、37°Cの水の中での安定性によって予めふるいにかけた。複数のアッセイは並行して進め、全ての結果をTEM-1発光に対するBlaCの比率として表した。最初に、閾値は、30分間の反応の後に、BlaCとともに10倍以上速い動態を示す分子で設定された。固体構造活性相関(SAR)を構築するために、化合物をそれぞれ、BlaCおよびTEM-1酵素の結晶構造に対してコンピュータモデル化した。これらの結果をREFのために使用するCNIR基質に変換することができるという想定が、CNIR及びBlucoに基づくセフォペラゾンプロープ活性の比較により、先ず確認された。

【0192】

手持ちのこれらのデータにより、優れた特異性と同定されたラクタムを、REFプローブへとさらに開発し、またマクロファージの細胞内で成長するとき、また皮下とエアロゾル移植の後のマウス内での感染中に、生体外でMt b全細胞を検出するそれらの能力を評価した。

【0193】

実施例 18

<生きたマウス内を画像化するためのCBRの評価>

初期の研究では、click beetle red (CBR) ルシフェラーゼが、生体外および培養細胞中でMt bのレポーターとして良く機能することが発見された。CBRは生成されたシグナル及び生体外での検出の閾値の観点から、ホタル・ルシフェラーゼ(FFlux)に匹敵すると見出された。しかしながら、マウスの皮下及び肺の感染中に、CBRの検出の閾値はFFluxより著しくよかった。この予備的な観察は、生体内での細菌の代謝に対する、あるいは発光の動態に対して効果を表す、接種材料の違いによるものかもしれない。これらのパラメータの各々は肺及び皮下の感染中にMt bの存在率を示すレポーターとしてCBRの有用性を注意深く分析することで評価する。原因であるレポーターを明らかにするために、発光の動態は、同じ動物内で異なる部位に皮下移植することと、生物発光シグナルのスペクトル unmixingの使用とを組み合わせることによって、直接FFluxを評価し、比較した。肺の感染は、同等の病原菌に感染した二匹のマウスを並行して、別々に評価した。低酸素性疾病下の生体外シグナル強度の効果を評価することにより、低酸素性の病変内のCBRの潜在的な感受性への見識が得られた。生体内で遭遇するかもしれない他のストレス、例えば低pH、およびROSとRNSの存在、を試験した。

【0194】

<治療上の評価のためのCBR画像化分析>

CBRルシフェラーゼシグナルはATPの存在に依存するので、この画像化システムは迅速に細菌の生存に対する治療上の効果を評価する、独自の機会を提供する。このシステムに関する主な疑問のうちのいくつかは、シグナルの測定可能な違いがどれくらい迅速に得られるか、また、それを、MICを決定するためにどれくらいな正確さで用いることができるかということである。このアッセイではイソニアジドとリファンピシンを使用するので、Mt bのためのMICを決定できる。実験で決定されたMICを、OD及びCFUに基づくアッセイにより得られたそれと比較した。シグナルロスの動態を、全体のMt b及び細胞内でマクロファージを使用したアッセイを用いて、0.5x、1xおよび5x MICの抗生物質存在下で評価した。一度動態がインビトロで測定され、及びCFUによって生存率の違いを比較し、処置後に細菌を生育させる能力およびCFUと発光の間の優れた相関性が残るかを評価した。一旦CFUと発光の間の相関が生育した細菌の生体外で測定されると、マウス中の皮下及び肺への感染の間の処置の発光に対する効果の動態を試験した。肺および皮下の環境間で細菌へのアクセスのしやすさに差があると思われ、それによりシグナルロスの動態がまた異なる傾向があるので、両方の接種ルートを使用した。これらの研究は、マウスでの治療の迅速な評価のためのCBRの有用性に対する見識を提供する。これらの実験は結果を迅速に得られることを可能にするために、感染の急性期に注

10

20

30

40

50

目する。しかし、この系が細菌が高い確率で複製していない可能性があるときに、治療上評価するのに役立つかどうか確認するために、後でこの実験は、マウスで感染の慢性期の間に行う必要がある。

【0195】

<デュアルCBR-REF光学式画像化システムの開発>

細菌の生存率について迅速な読み出しが可能であるはずなので、CBR系は有利である。しかし、いくつかの場合においては、このタイプの系が最適ではないかもしれない。細菌の代謝率が最大の光生成を可能にするには十分でない状況では、ルシフェラーゼに基づいた系は最適な代謝条件下ほど敏感ではないかもしれない。CBRを使用して、治療への効果を評価した。異なる組織中の病原菌の量を測定し、また、REFを使用して、それらの細胞の位置を決定した。異なる環境中の細菌数を評価するための、これら2つの系の潜在的な有用性に対する知見を得るために、CBRおよびREFシグナルロスの両方の動態を、肺及び皮下感染の後にマウスで試験した。発光は、抗生物質の送達ですぐに減少した。また、REFシグナルはシグナルロスを観察するために24時間を要した。代謝活性に対する、CBRおよびREF間の感受性の差異は、代謝期と共同でリアルタイムの細菌数を評価する潜在的な能力を提供する。これは、Mtb感染中に動物内のすべての細菌の代謝期がどうなっているのか不明瞭なままであるので、発展させるべき重要な系である。この画像化システムは、リアルタイムでの各シグナルがある状態またはない状態で、生きている動物内の異なる環境への移動を直接観察することができる最初の手段を提供する。この能力は、治療を評価することにあたって特に重要であると分かるだろう。というのも、治療が他の環境でそうでない中、それはいくつかの環境下で殺菌性でありうるからであり、このことが前臨床研究の継続に対する重大な考慮となる。

10

20

【0196】

実施例19

<比色分析および化学画像化システム>

<比色分析アッセイ>

可視的なアッセイ系では、蛍光色素分子の直接の代替として有色色素を利用することができる。可視の色素としては、Texas Red、ローダミン、プロモクレゾール色素(多色)、シアニン染料などが挙げられる。蛍光系と異なり、基質に付加したままの間は、これらのタイプの色素は目に見え、検知可能である。それ故、結合の分離と色素の遊離が必要である。遊離した色素は下流の、後に続く可視化される検出領域へ移動する。これらの色素は非常に小分子であり、それ故に遊離した色素は目で確認できる必要な分の感受性を得るためには、下流で濃縮する必要はある場合がある。

30

【0197】

<化学試薬アッセイ>

可視の化学試薬フォーマットは、可視の検出体でも利用することができる。色素の代わりに、pH変化を誘発するものなど特定の化学物質または他の化学的に色の変化を誘発するものを置換する。化学物質は結合した複合体から分離され、他の試薬との化学的な相互作用によって結果として検出可能な可視のシグナルが得られる、下流の別の検出領域へ移動する。このフォーマットは濃縮方法が必要でないかもしれないことにおいて、可視の色素フォーマットと異なる。増幅のある基準は、pH変化など変色反応の性質によって達成される。二次的な化学反応が、ラクタマーゼ反応の下流で起こり、例えば、乾燥した二次的な試薬を含んでいるセルロース・パッド内で分離することができる。

40

【0198】

<比色分析及び化学試薬可視化アッセイでの下流の検出>

可視の系は、例えば複合体をラテックス粒子またはビオチンに結合させるように、基質(検出分子から遊離した)及び/又は複合体全体(結合検出分子を含んで)を保持するように設計している。複合体をラテックス粒子に結合させることによって、粒子はろ過膜によって保持されるので、遊離した色素のみが検出領域へ移動することが可能になる。もう一つの方法として、複合体に対するビオチンの結合によって、すなわち、色素または化学試

50

薬を伴う基質、遊離及び結合物質は、固定されたアビジンが基質と複合体に結合する、第2の領域に移動する。遊離した色素のみが検出領域へ移動する。

【0199】

これら可視の診断アッセイでは、ラテックス粒子は、他のリガンドに結合して固定する固相として利用することができる。また、それらは有色色素の使用を通じて検出可能な粒子になりうる。タンパク質または他の分子は、一般的に行われる化学作用によって活性化された微粒子の表面へ常に付加することができる。例えば、診断アッセイでは、複合体は、適切な大きさに合わせたラテックス微粒子に直接結合するかもしれない。その後、この試薬は、消毒した痰サンプルと直接混合する。適切な培養期間の後、混合物を装置に加えた。ラテックス粒子は、統合グラスファイバーフィルターによって閉じ込められ、遊離した色素（図33A）または他の化学物質（図33B）のみが、検出領域に向かって下流に移動することを可能にする。液体の移動のメカニズムはニトロセルロースなど吸水性に優れた膜の毛細管作用による。色素は抗体または他の相補的な結合リガンドによって捕捉される。

10

【0200】

診断上のアビジン・ビオチン可視の検出系では、ビオチン化された基質の100%を捕らえるために下流の膜の上でアビジンを固定する。その後、遊離した色素または化学物質のみが、検出領域に向かってストリップに沿いながらさらに流れる。検出領域は、上に提示された系と本質的に同一である。色素は可視化のための線で捕捉される。あるいは、化学反応が吸収性シンク（absorbent sink）内の下流で起こるだろう。色素（図33C）または化学試薬（図33D）の系のいずれかでは、エンドユーザーが試験の結果を解釈する間にそれらを見ることができないように、基質/複合体アビジン捕捉線を視界から隠すことができる。内部対照線は、有効な痰サンプルが得られ、試験が正確に行なわれたことを使用者に示す。すべてのヒトの痰に共通する標的として、いくつかの選択肢がある。

20

【0201】

以下の参考文献が本明細書にて引用された：

1. Flores et al. 2005, J Bacteriol, 187: 1892 - 1900.
2. Jacobs et al. 1991, Methods Enzymol, 204: 537 - 555.
3. Gao et al. 2003, J. Am. Chem. Soc. 125: 11146 - 11147.
4. Cirillo et al. 1994, Molec. Microbiol., 11: 629 - 639.
5. Lyons et al. 2004, Tuberculosis (Edinb), 84: 283 - 292.
6. Fontan et al. 2008, Infect. Immun. 76: 717 - 725.
7. McMurray, D.N. 2001, Trends Molec. Med., 7: 135 - 137.
8. McMurray, D.N. 1994, Guinea pig model of tuberculosis, p. 135 - 147. In B. R. Bloom (ed.), Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control. American Society for Microbiology, Washington, DC
9. Smith, D.W. and Harding, G.E. 1977, Am. J. Pathol. 89: 273 - 276.
10. Weigeshaus et al. 1970, Am. Rev. Respir. Dis., 102: 422 - 429.

30

40

50

11. Cao et al. 2005, Transplantation, 80:134-139.
12. Cao et al. 2004, Proc Natl Acad Sci USA, 101:221-226.
13. Weissleder, R. 2001, nat Biotechnol, 19:316:317.
14. Xing et al. 2005, J Am Chem Soc, 127:4158-4159.
15. Derossi et al. 1996, J Biol Chem, 271:18188-18193.
16. Derossi et al. 1996, J Biol Chem, 269:10444-10450.
17. Cirillo et al. 1991, J. Bacteriol., 173:7772-7780.
18. Rowland et al. 1999, FEMS Microbiol Lett, 179:317-325.

10

20

【0202】

この明細書で言及した任意の特許または出版物は、本発明に係る当業者のレベルを示す。これらの特許と出版物は、あたかも個々の刊行物が参照によって特別かつ個別に組み込まれるかのように、同程度に、参照によって本明細書に組み入れられる。

【0203】

本発明は、上に述べられるような、及び本明細書固有の目的を実行し、結果と効果を得るのに、本発明が非常に適していることを容易に理解するだろう。本発明の精神と範囲から逸脱することなく本発明を実施するにあたり、様々な修正および変更がなされることは、当業者に明らかである。請求項の範囲によって定義されるような本発明の精神の範囲に含まれる本明細書の変更とその他の用途は、当業者はすぐに思い浮かぶであろう。

【図 4 C】

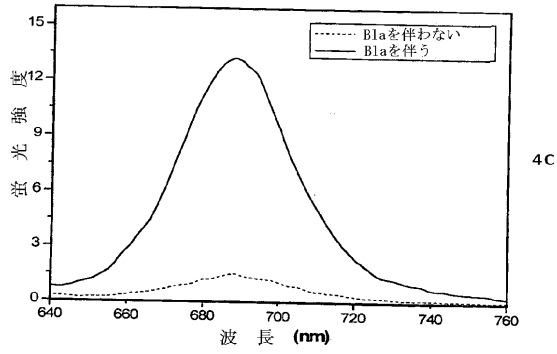


FIG. 1B

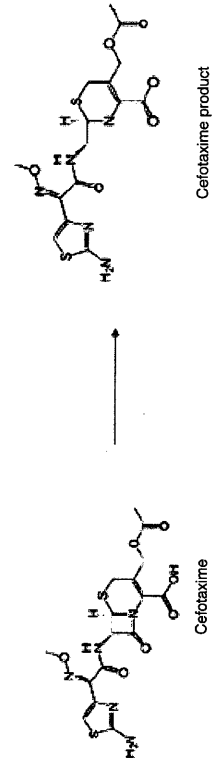


FIG. 1B

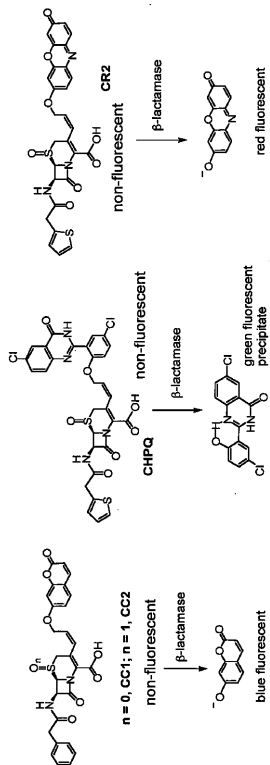


FIG. 2A

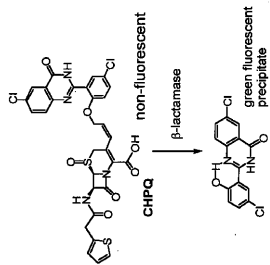


FIG. 2B

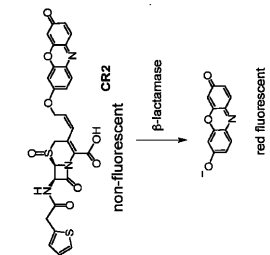


FIG. 2C

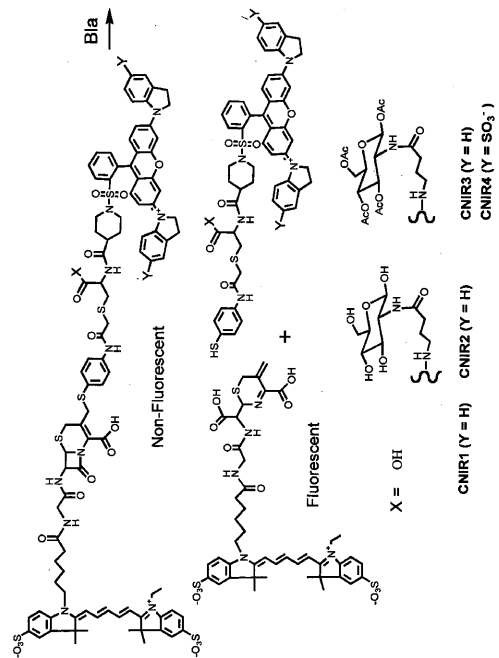
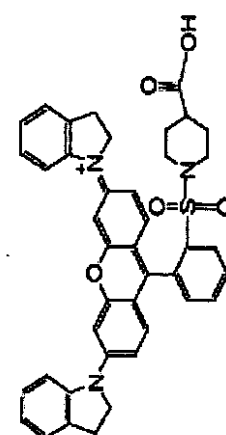
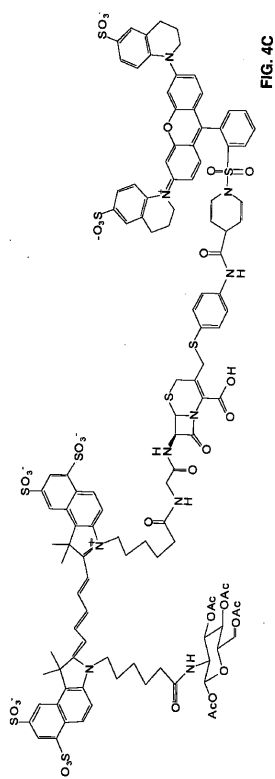
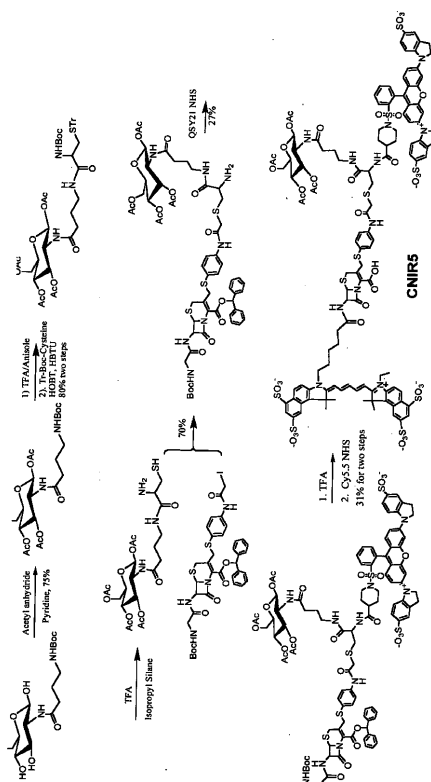
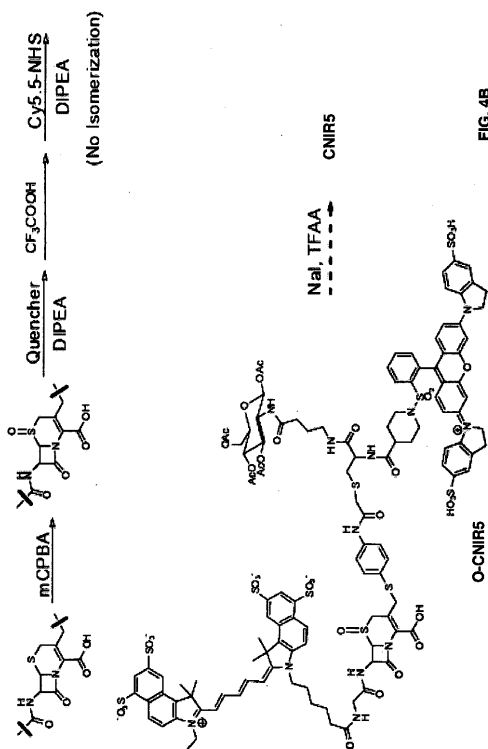
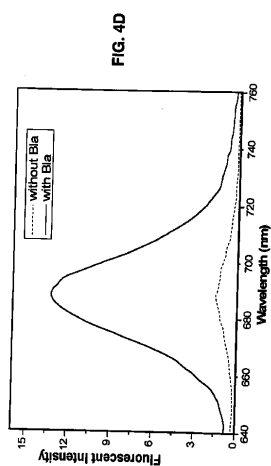


FIG. 3



Abs
QSY21
660 nm

FIG. 5A



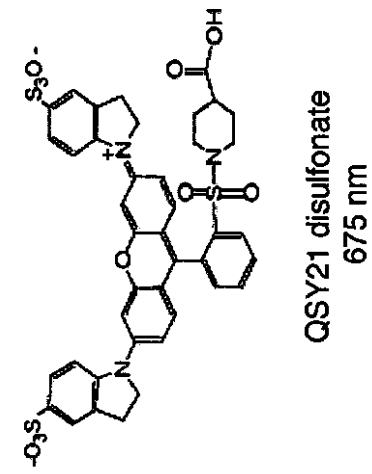


FIG. 5B

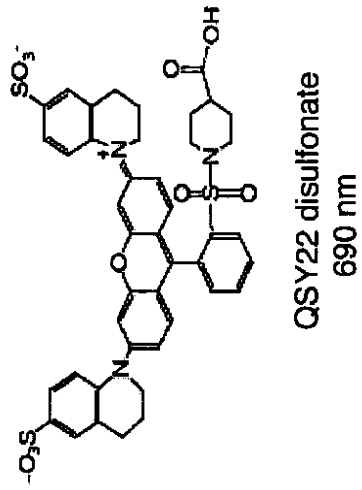


FIG. 5C

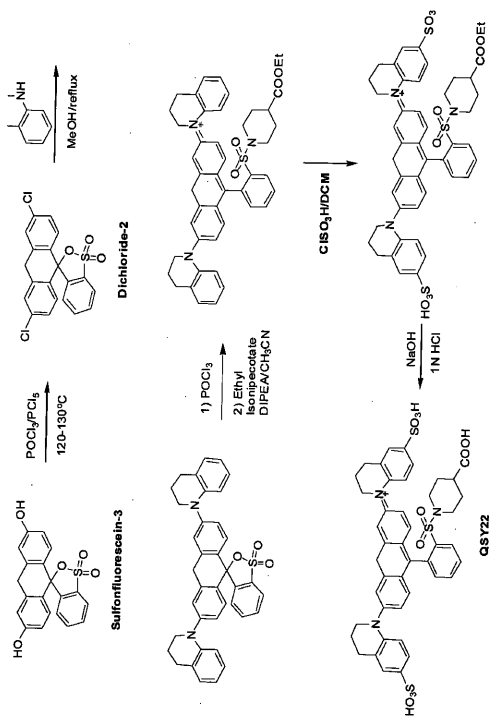


FIG. 5D

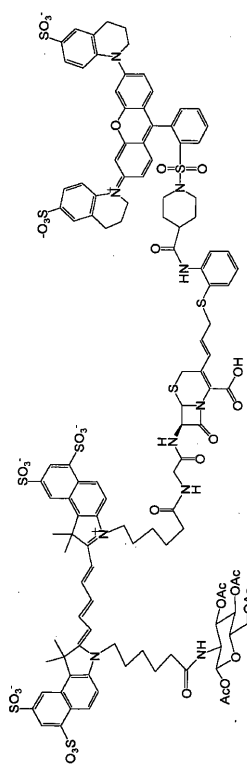


FIG. 6A

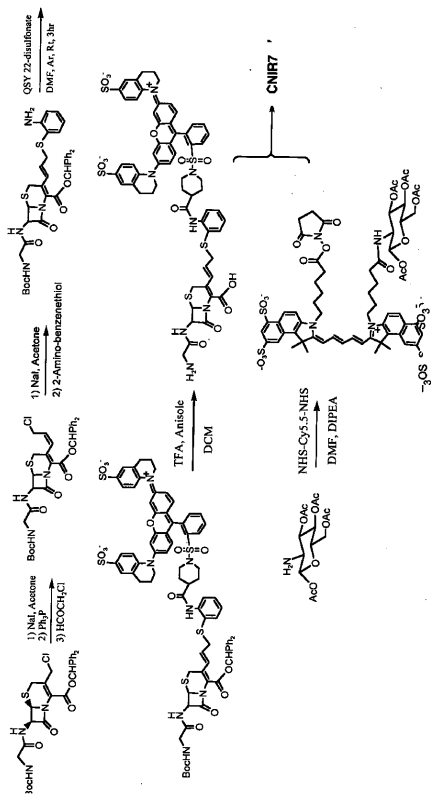


FIG. 6B

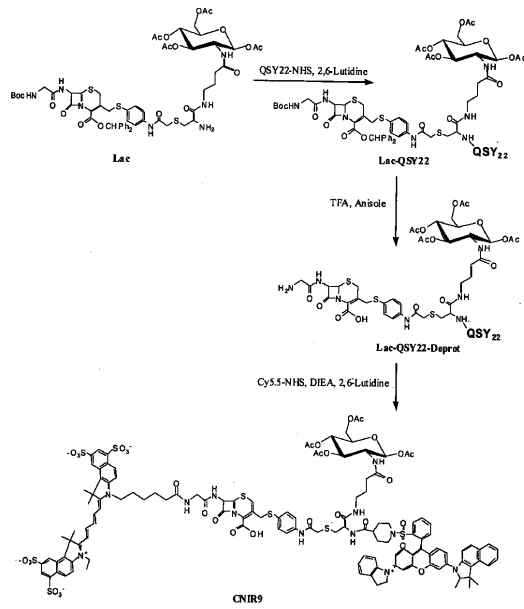


FIG. 7A

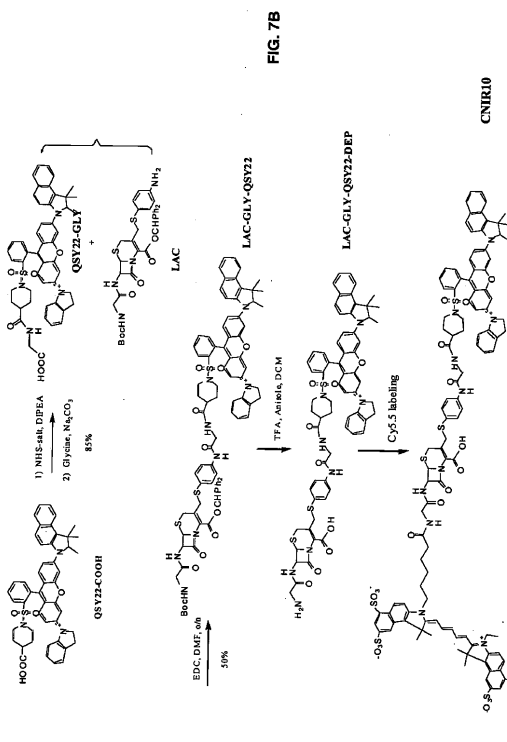


FIG. 7B

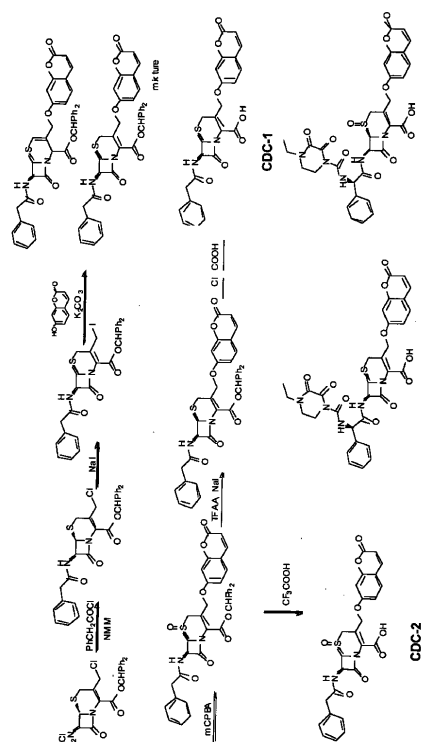


FIG. 8A

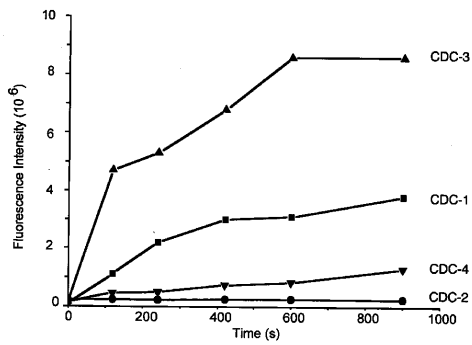


FIG. 8B

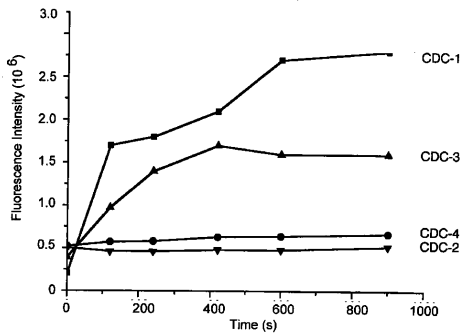


FIG. 8C

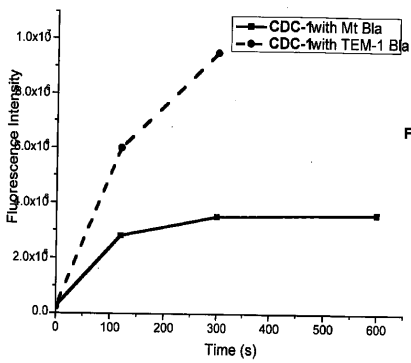


FIG. 8E

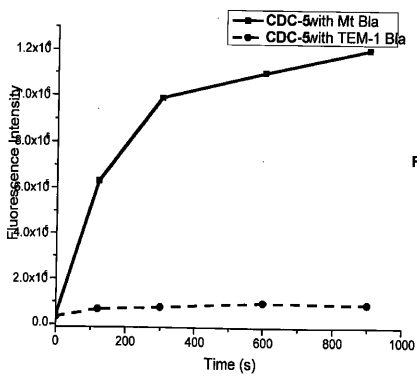


FIG. 8F

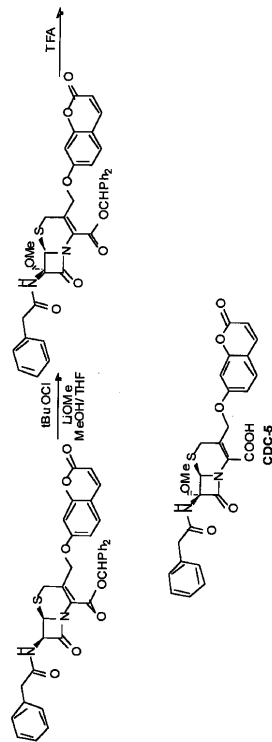


FIG. 8D

FIG. 9A

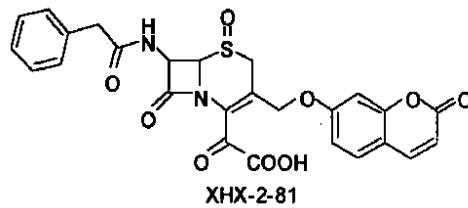
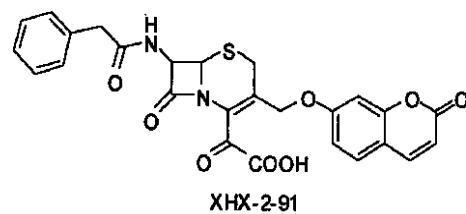


FIG. 9B



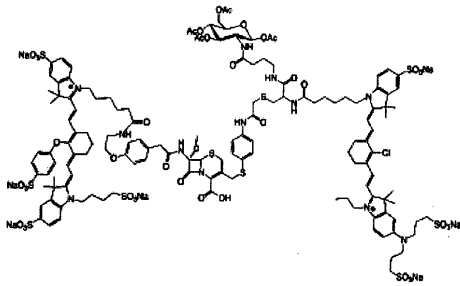


FIG. 9C

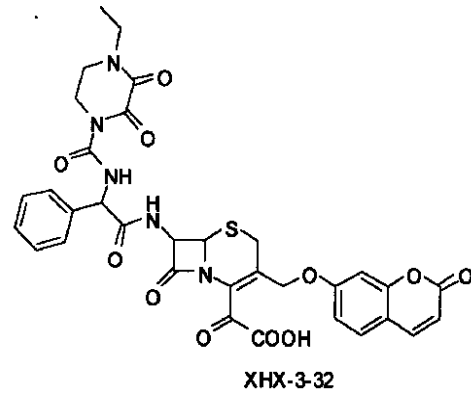


FIG. 9E

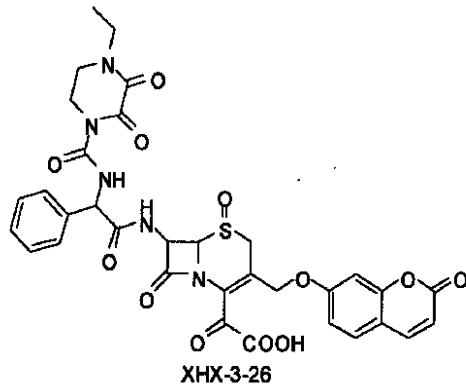


FIG. 9D

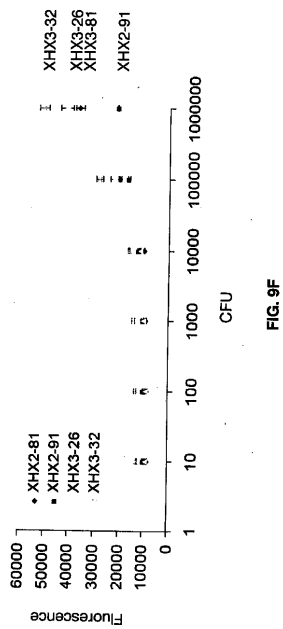


FIG. 9F

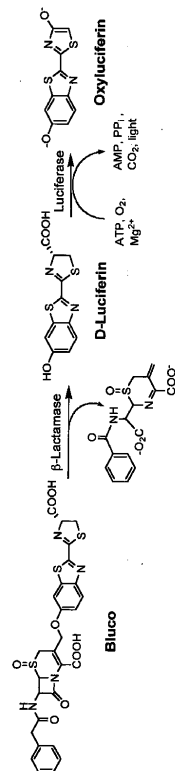


FIG. 10A

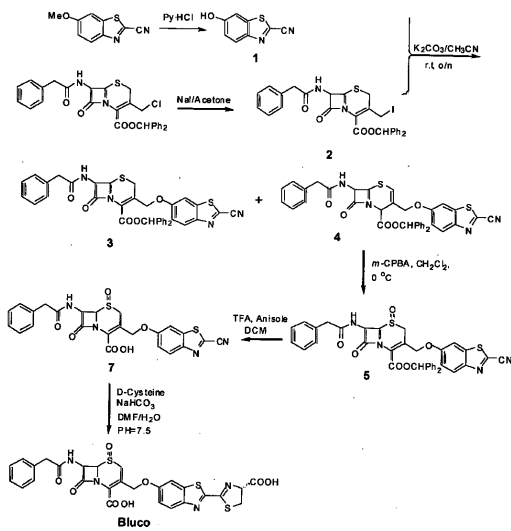


FIG. 10B

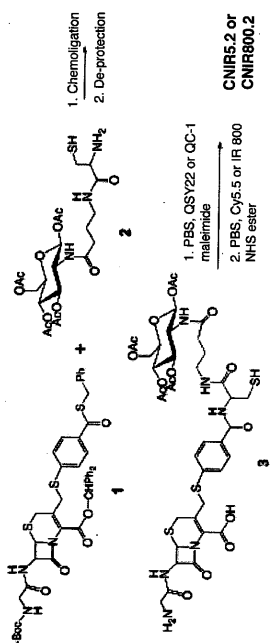


FIG. 11B

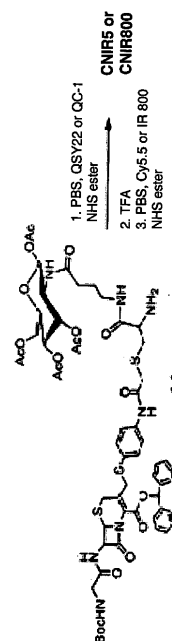


FIG. 11C

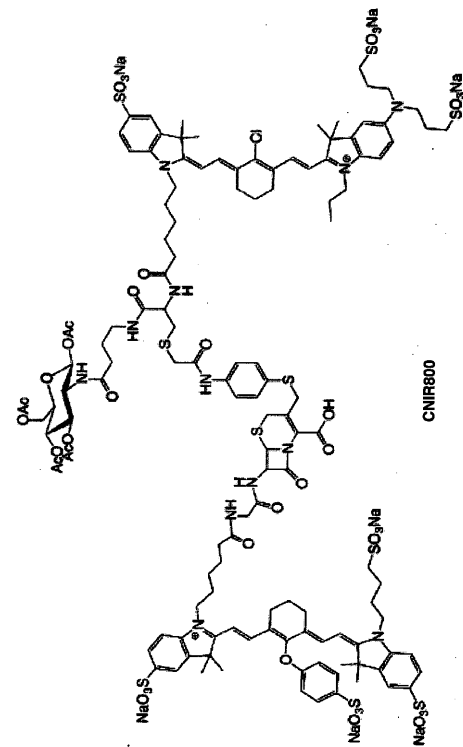
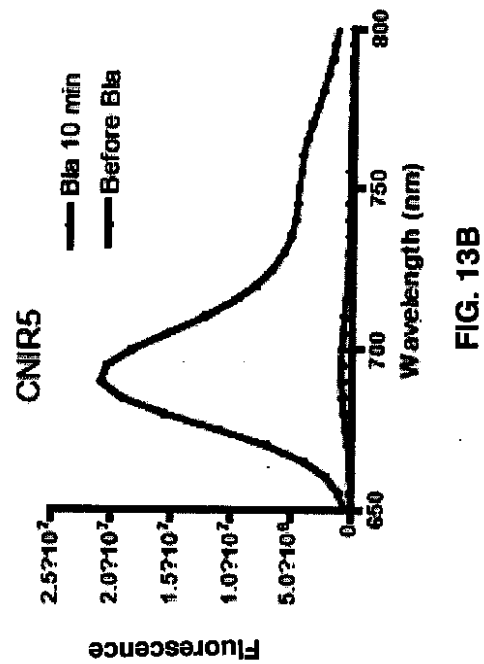
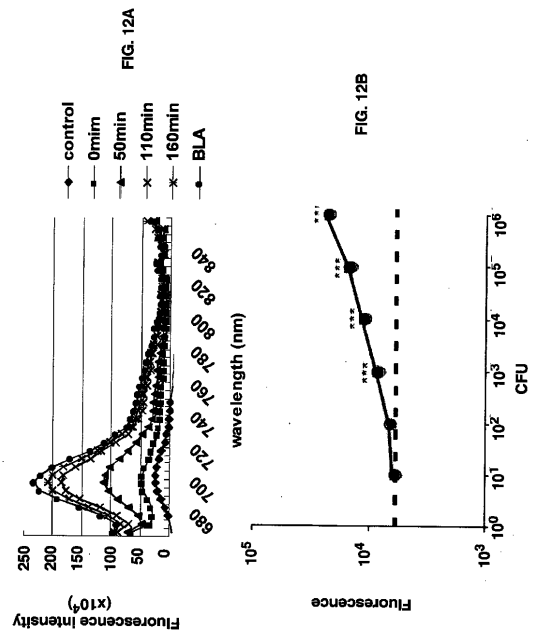
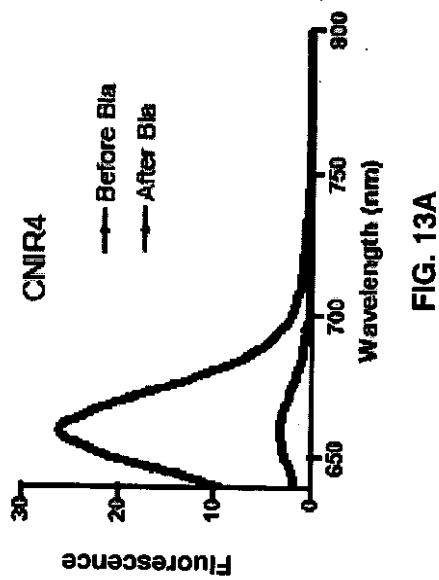
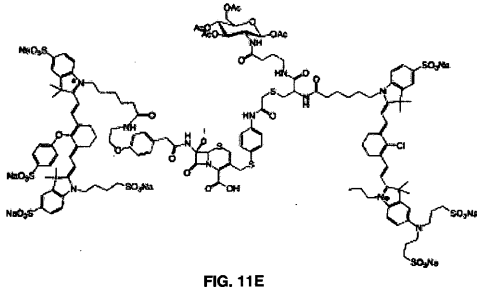
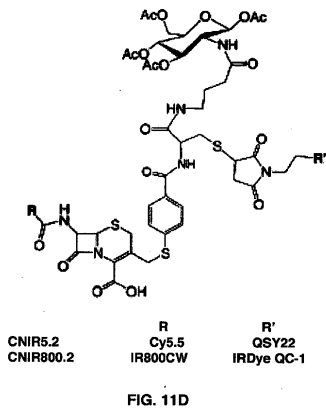
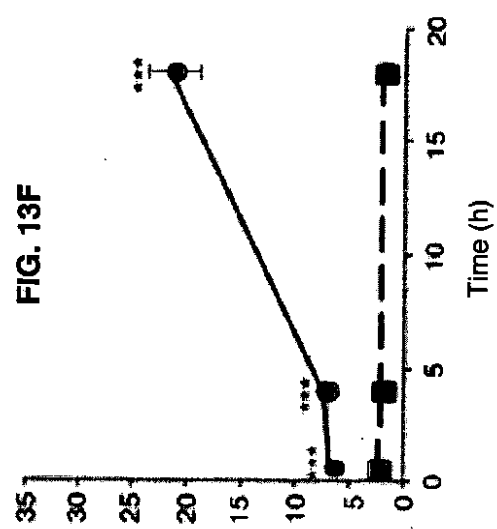
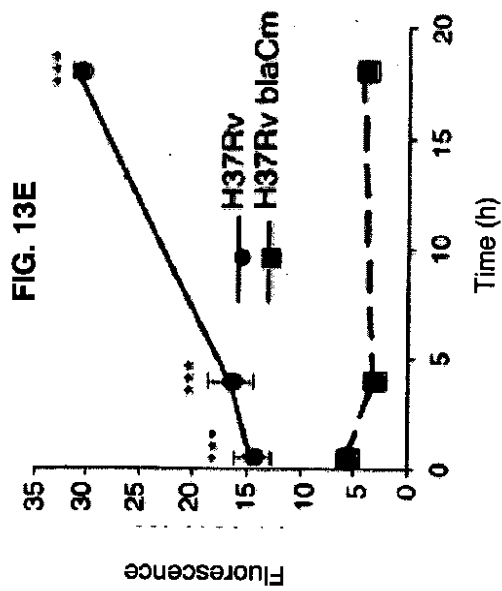
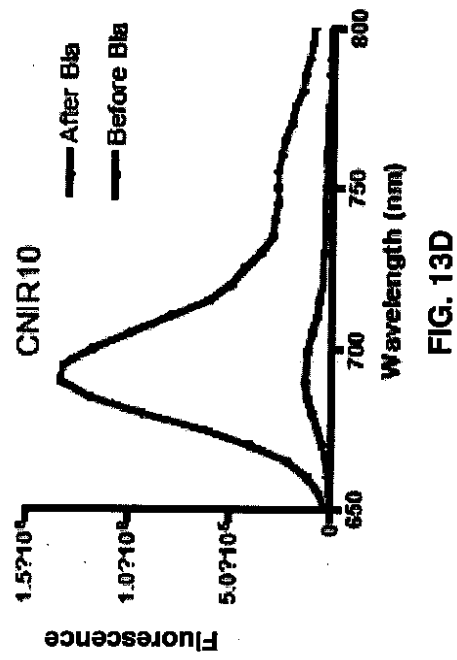
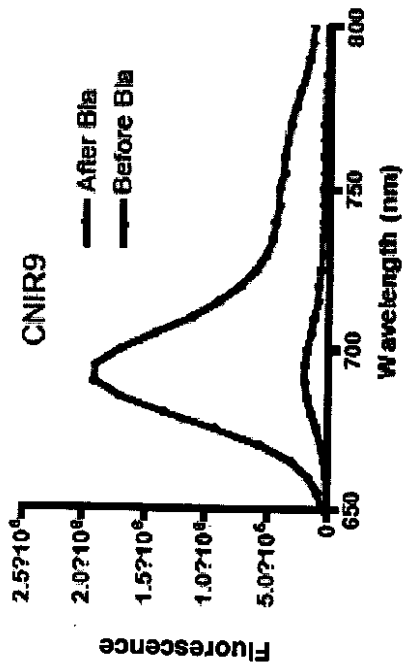
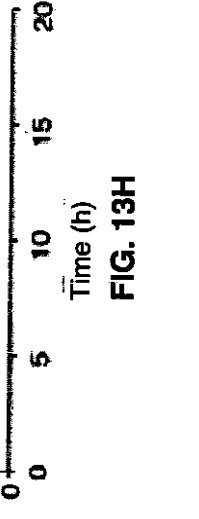
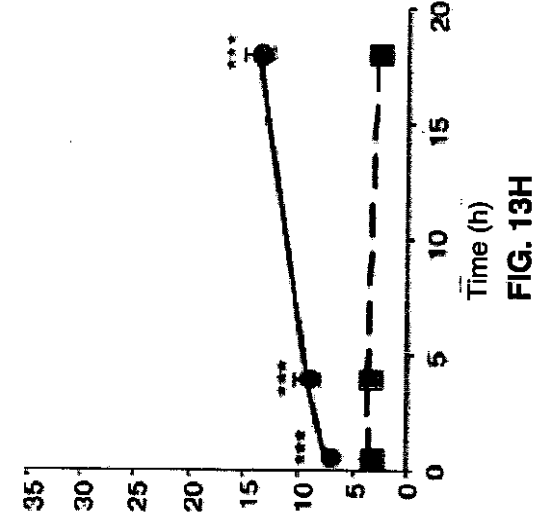
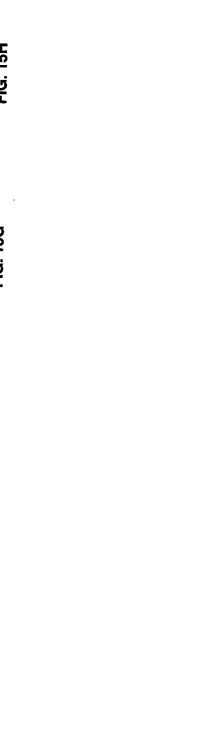
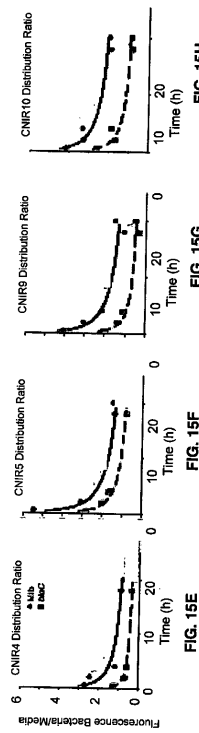
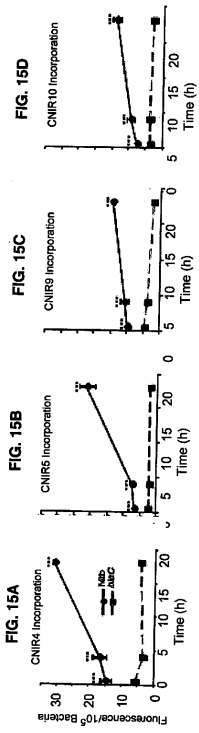
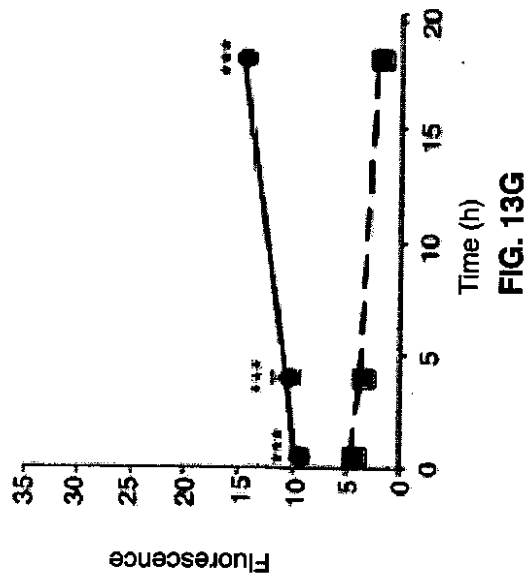
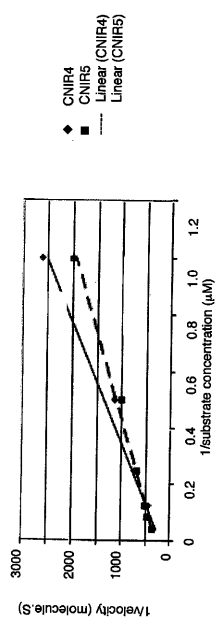
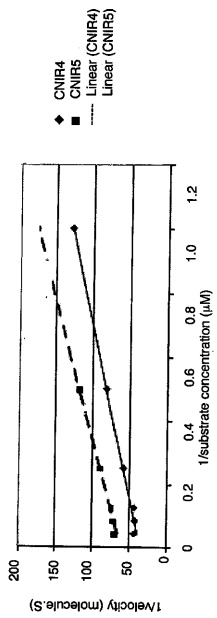


FIG. 11A







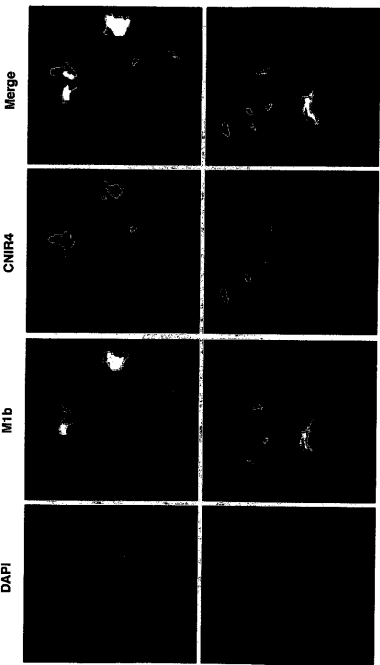
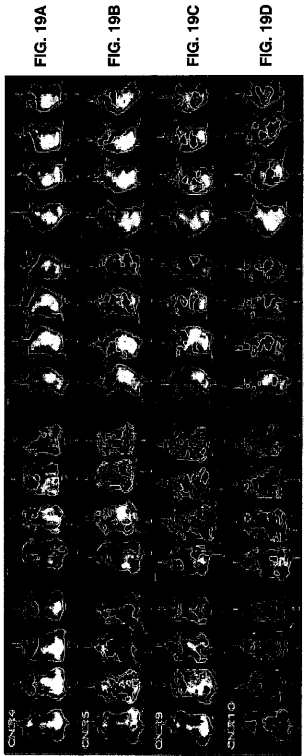
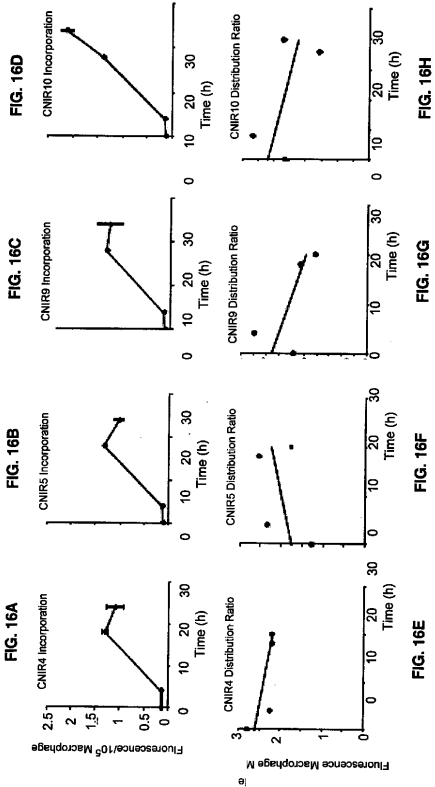


FIG. 17

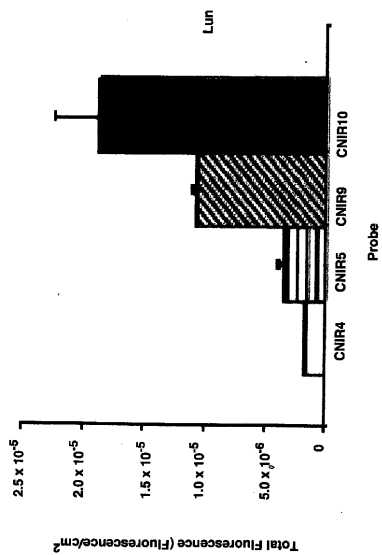


FIG. 19E

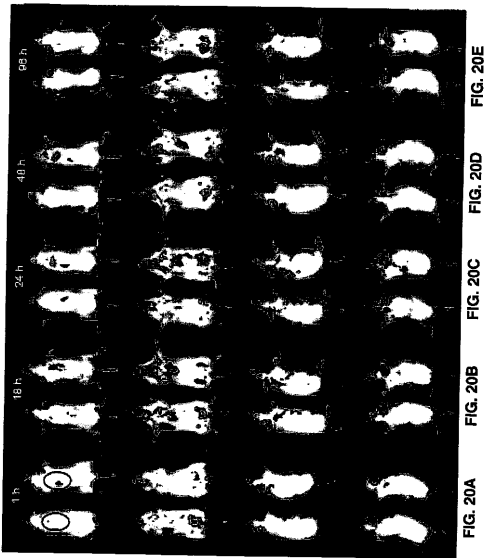


FIG. 20A FIG. 20B FIG. 20C FIG. 20D FIG. 20E

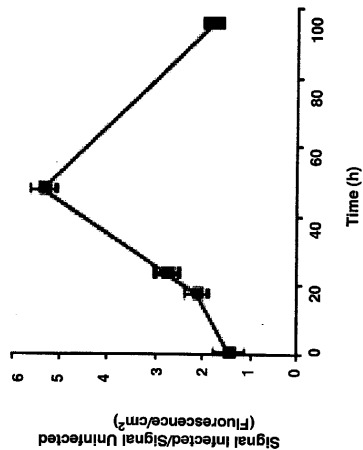


FIG. 20F

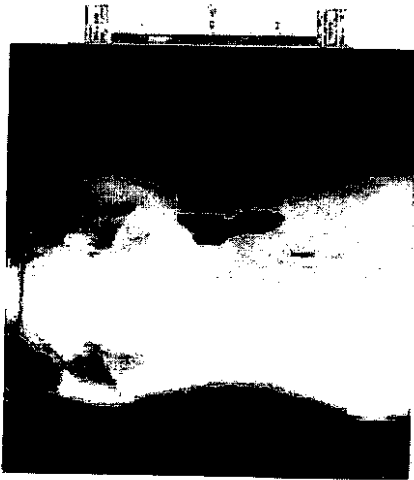


FIG. 21A

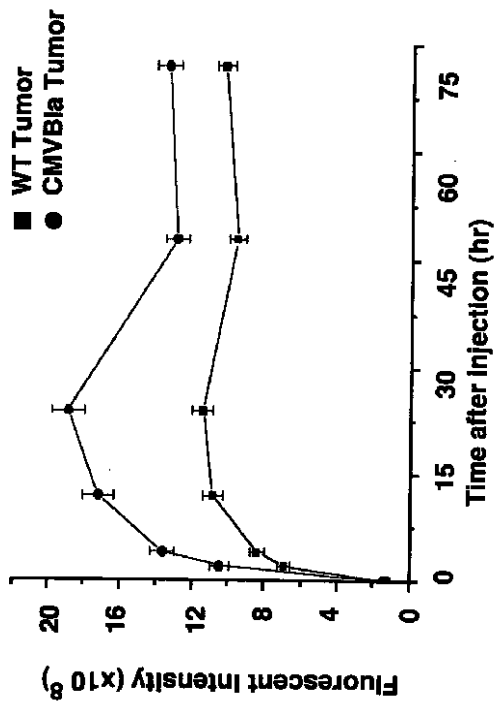


FIG. 22B

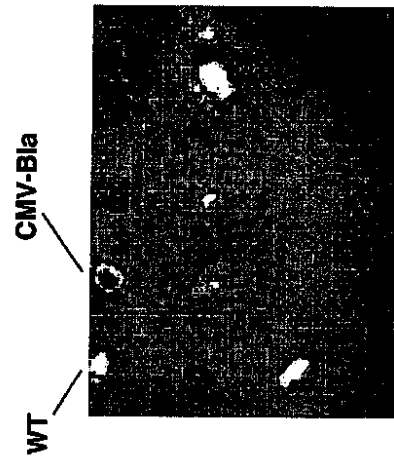
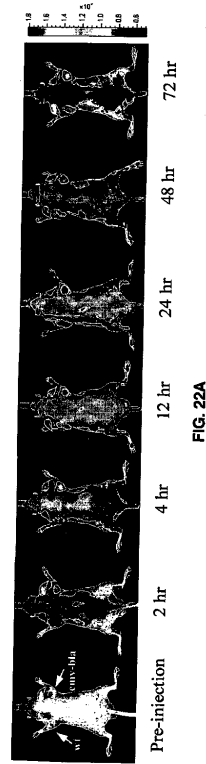


FIG. 22C



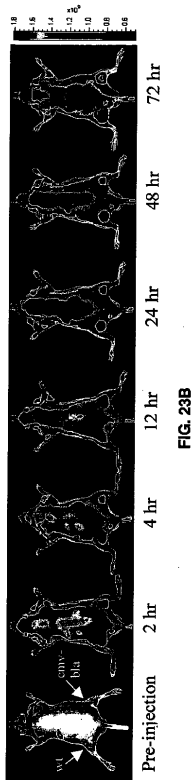


FIG. 23B

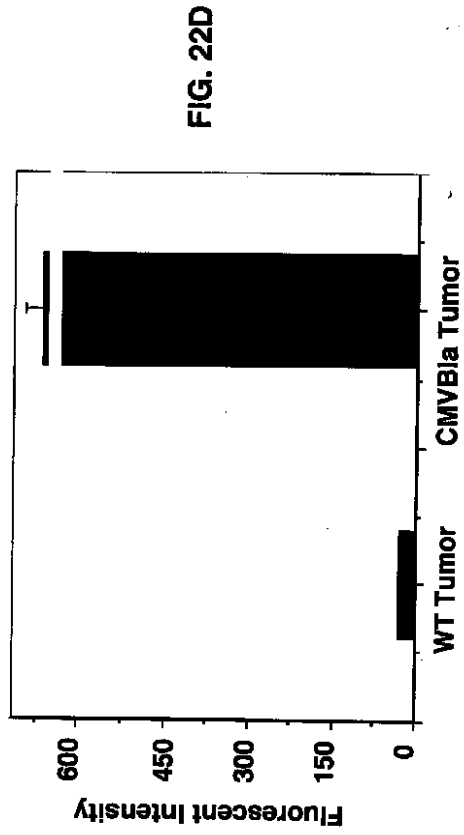


FIG. 22D

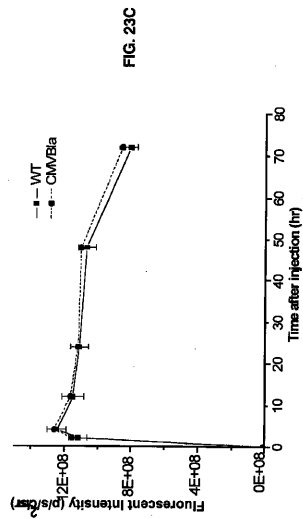


FIG. 23C

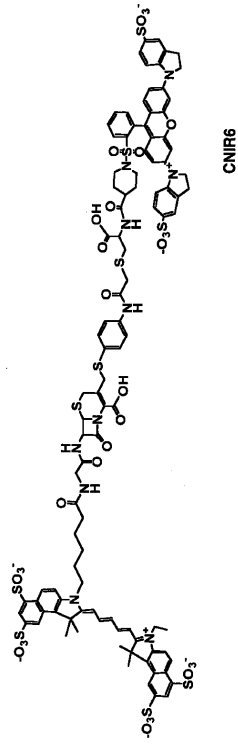
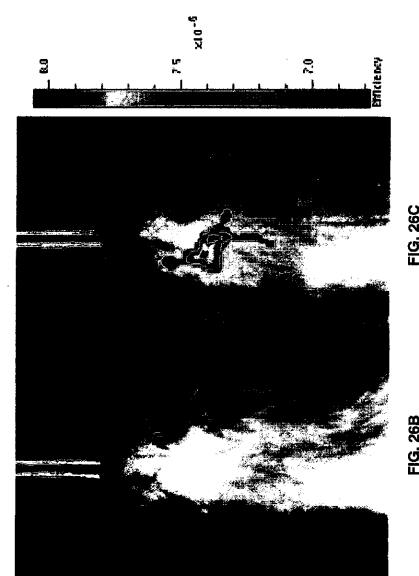
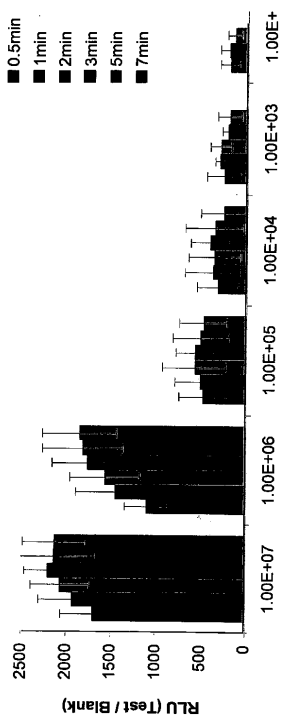
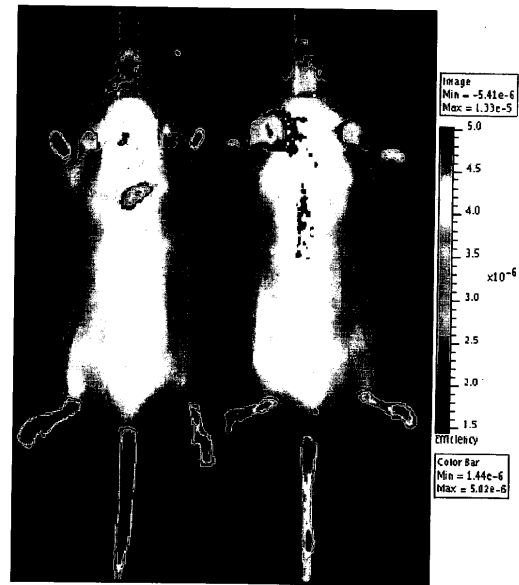
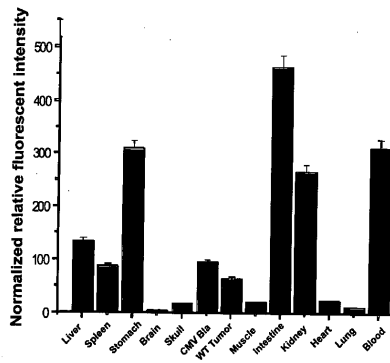
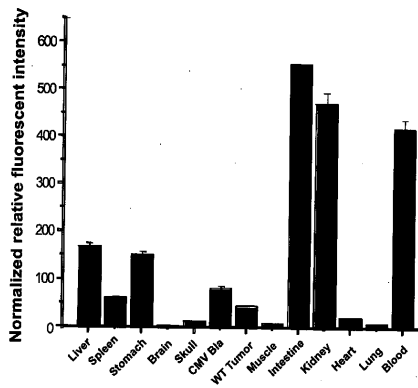


FIG. 23A

CNIR6



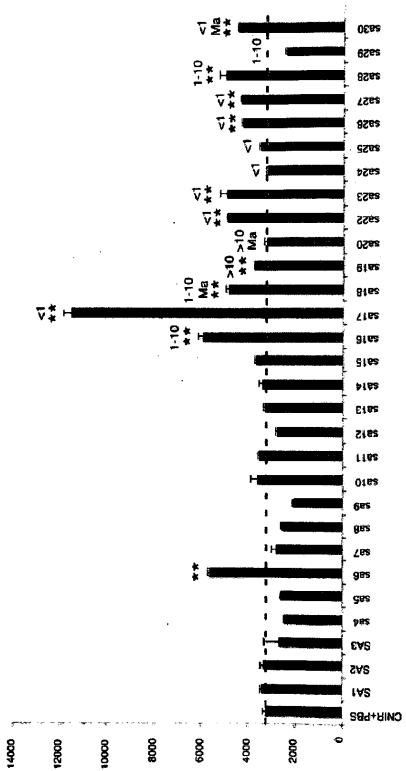


FIG. 27A

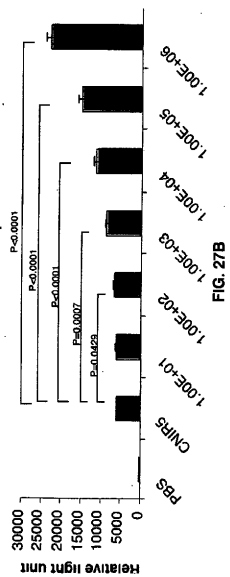


FIG. 27B

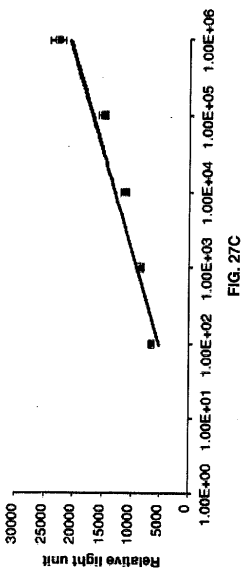


FIG. 27C

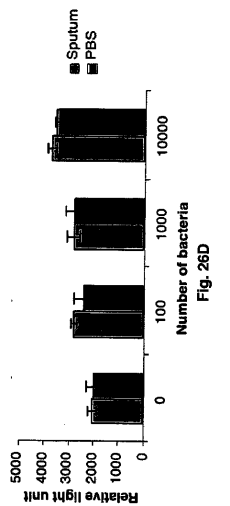


Fig. 26D

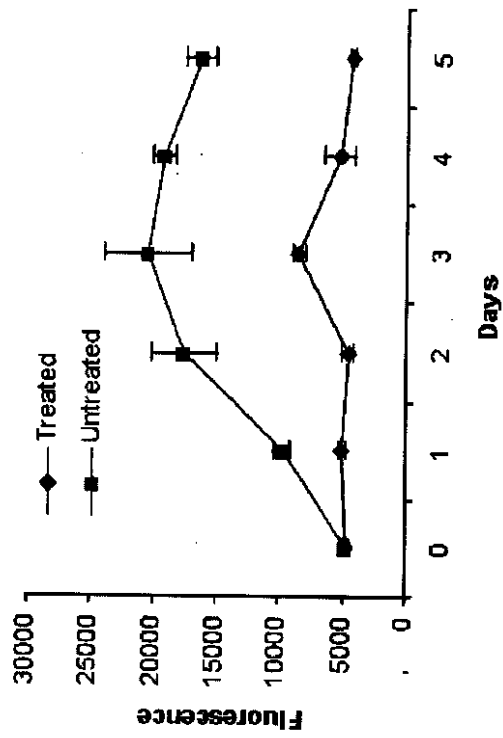


FIG. 27E

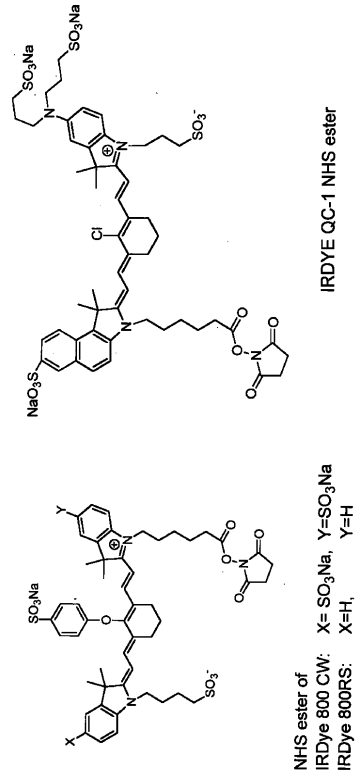


FIG. 28

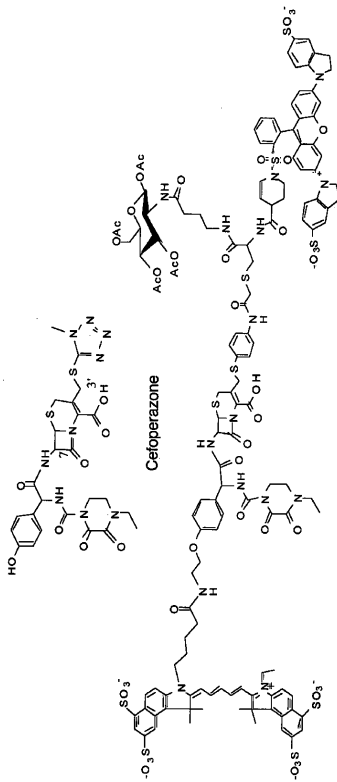


FIG. 29

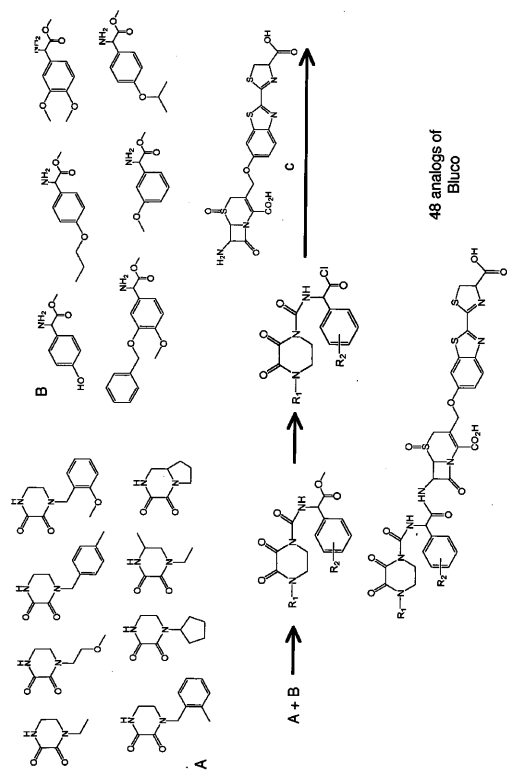


FIG. 30

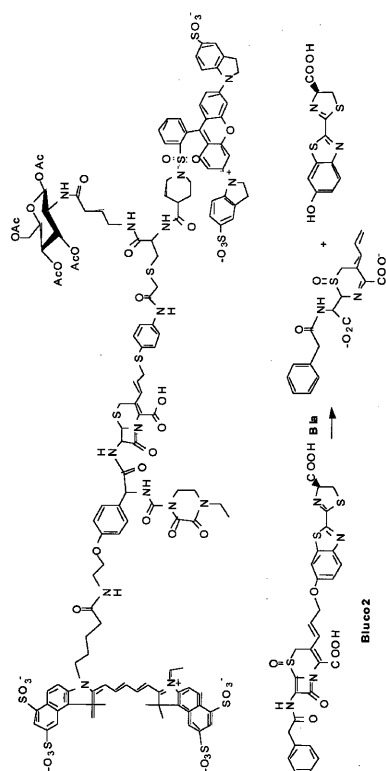


FIG. 31

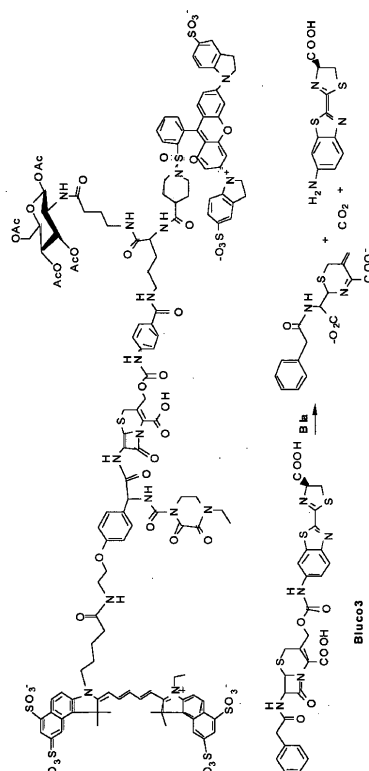


FIG. 32

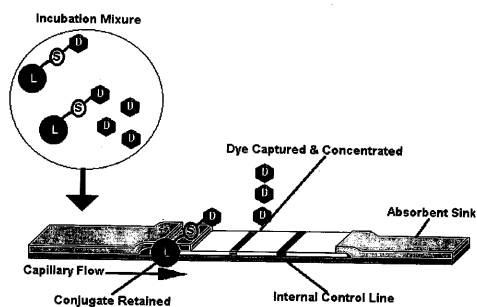


FIG. 33A

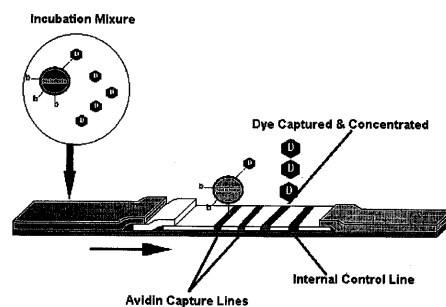


FIG. 33C

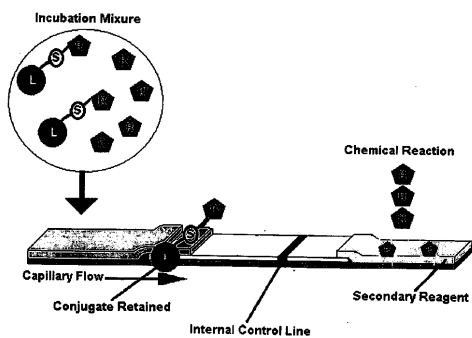


FIG. 33B

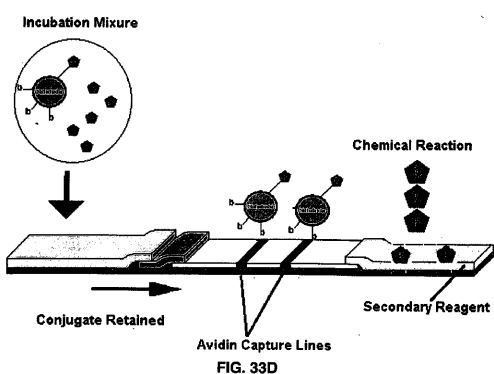
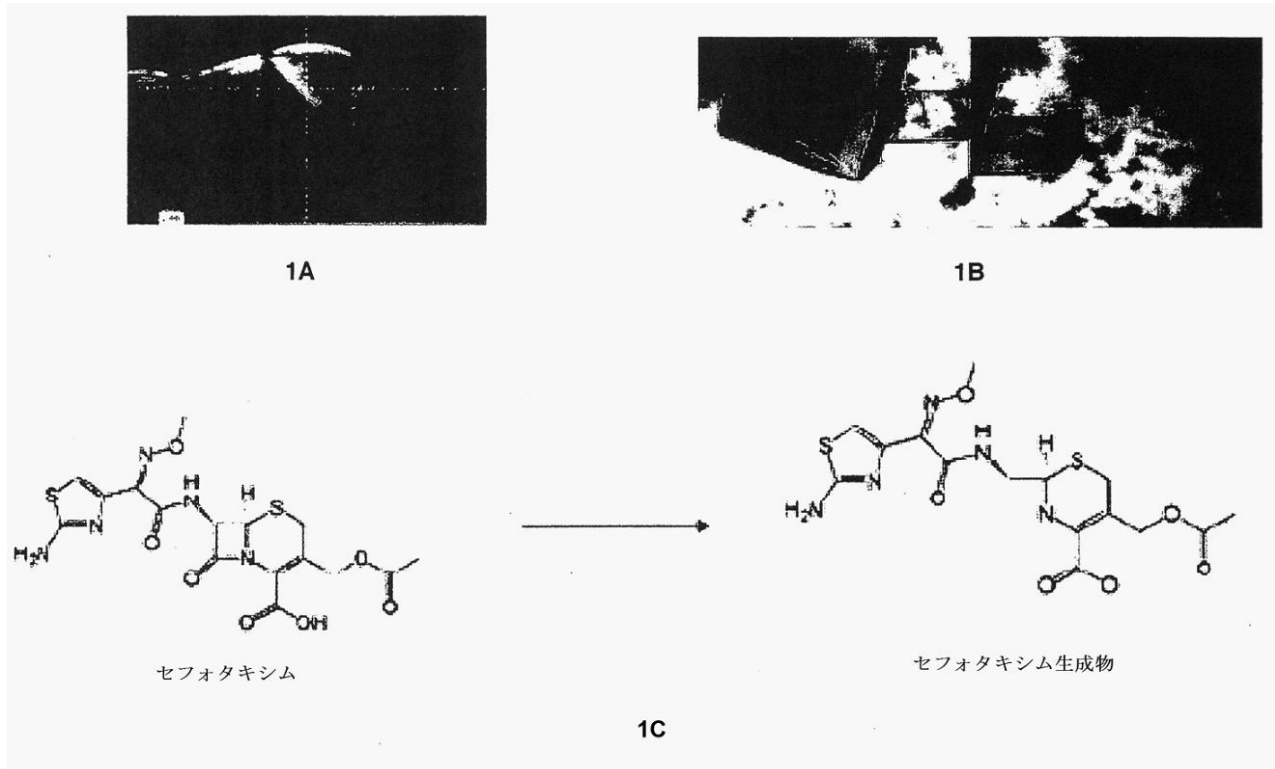
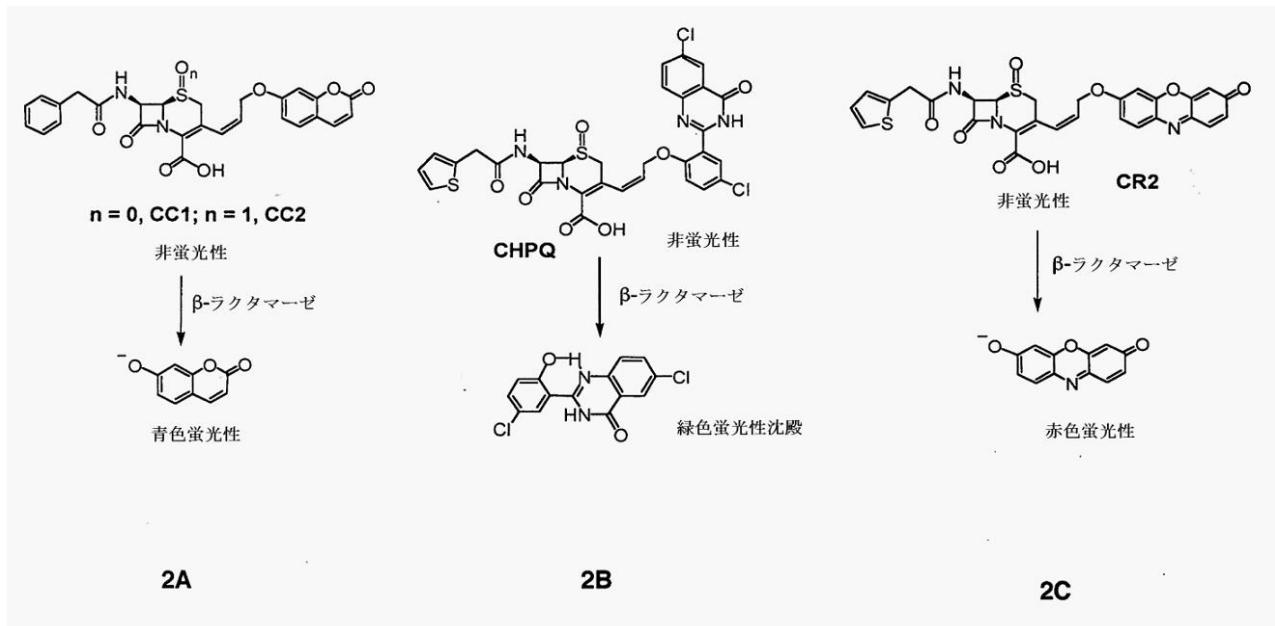


FIG. 33D

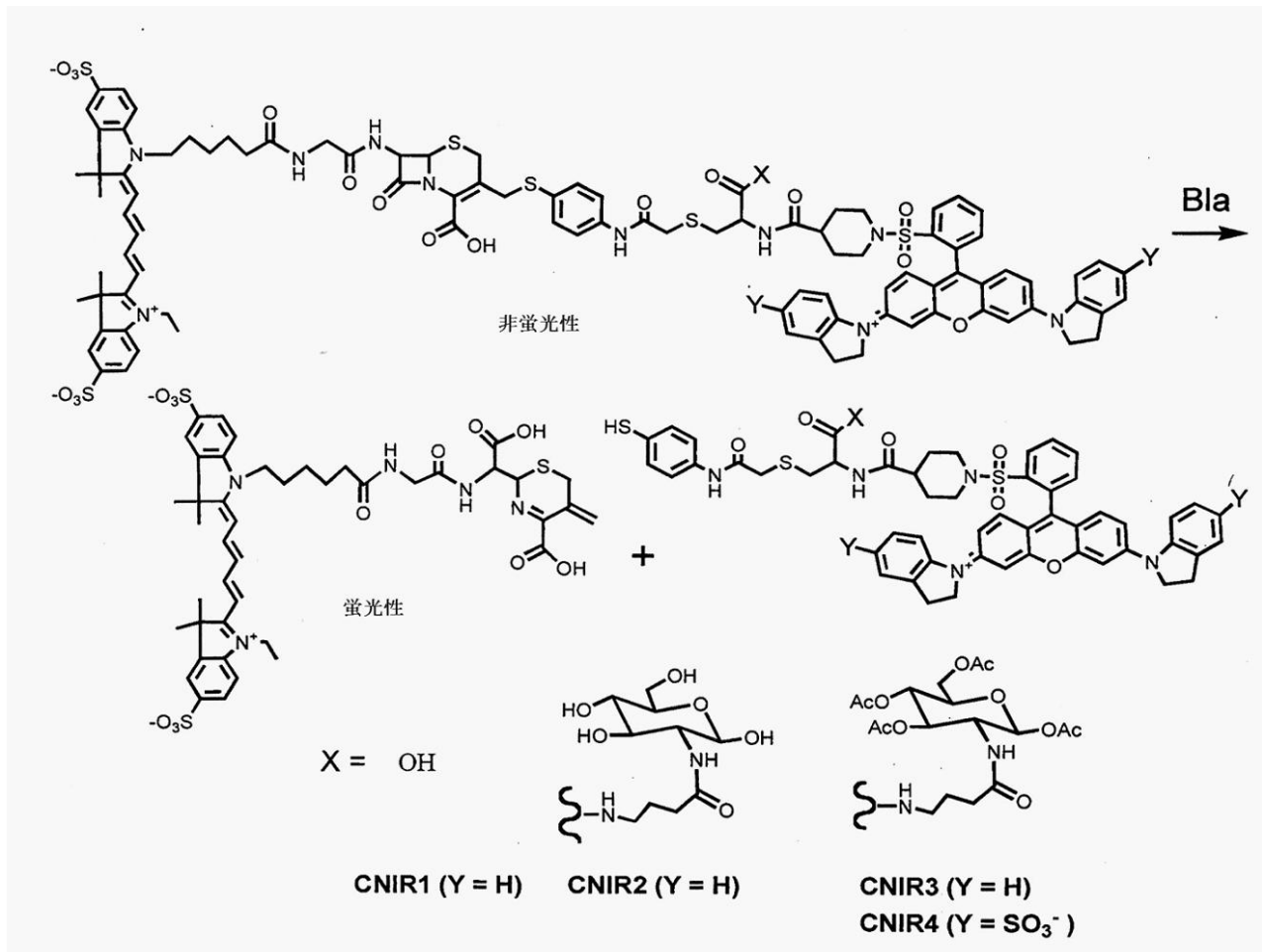
【 図 1 】



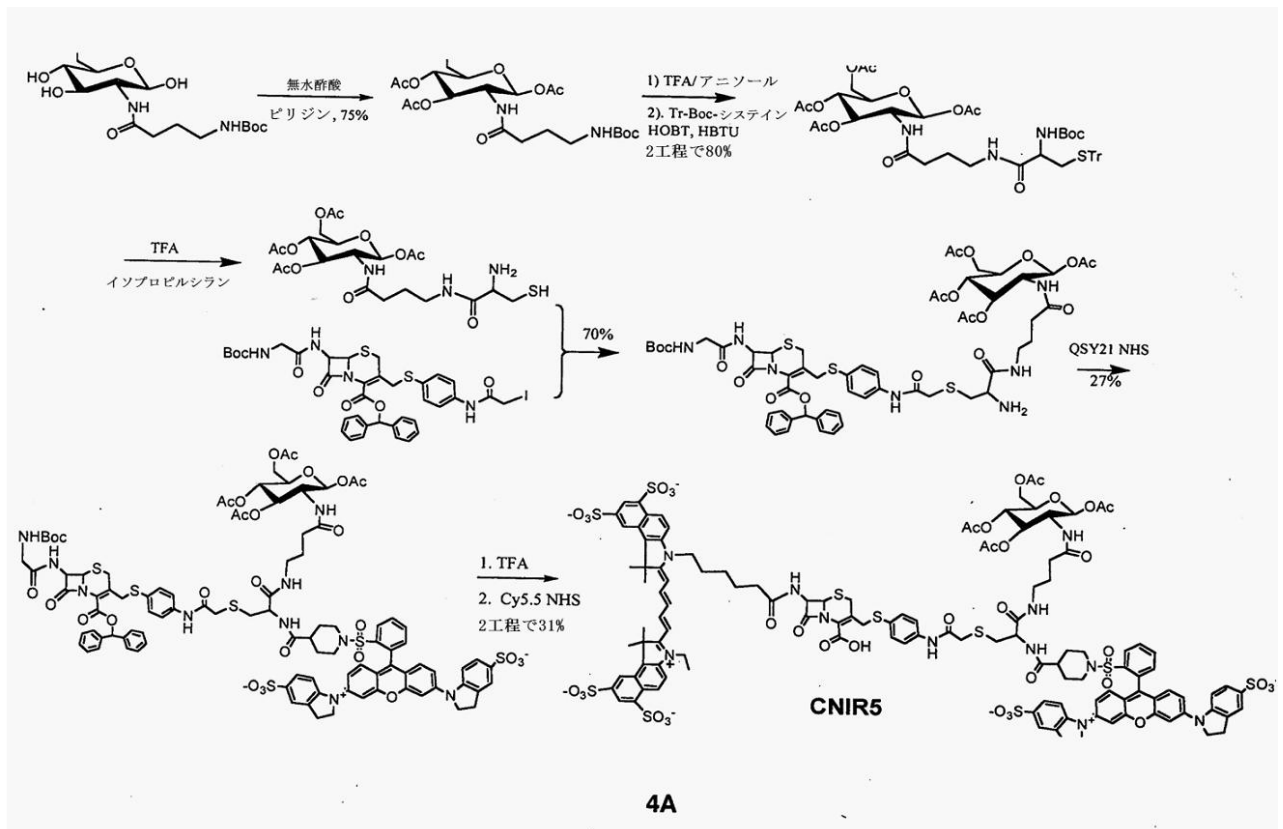
【 図 2 】



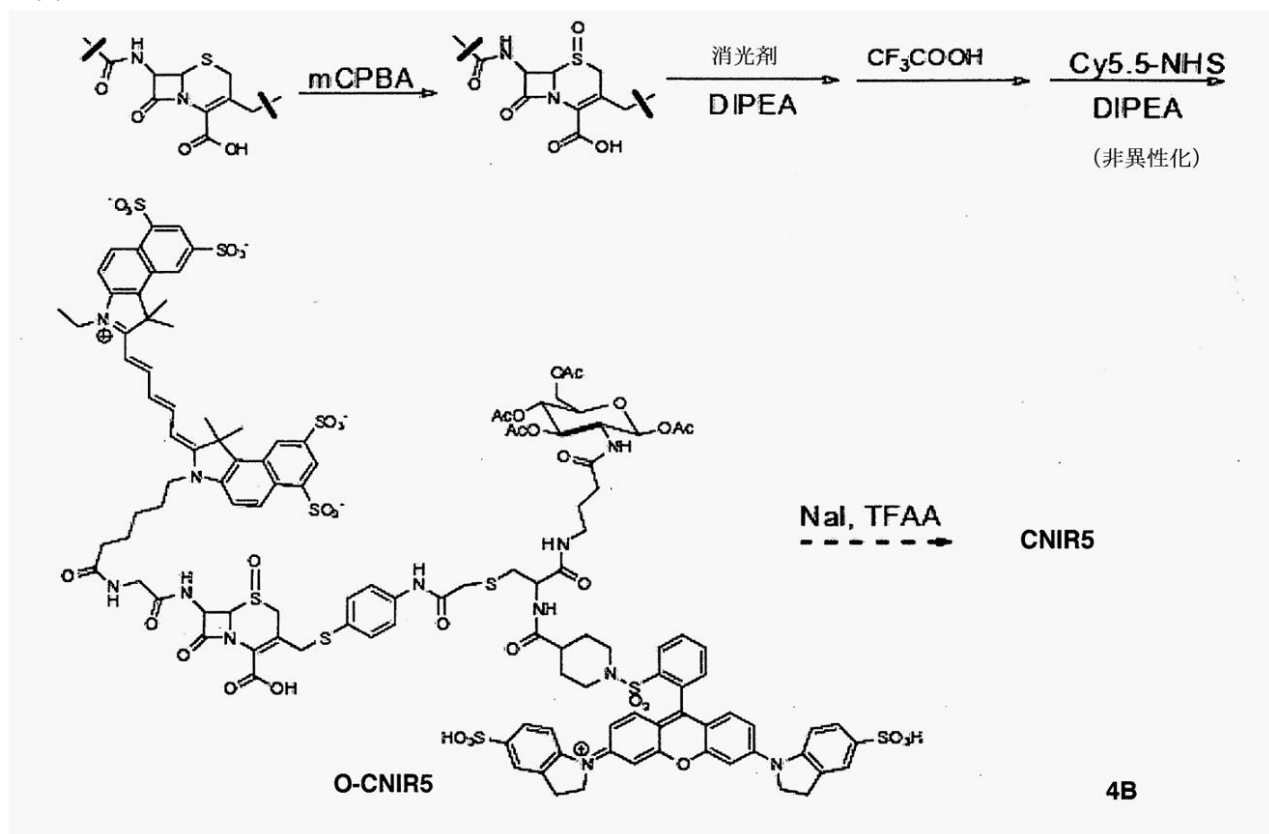
【図3】



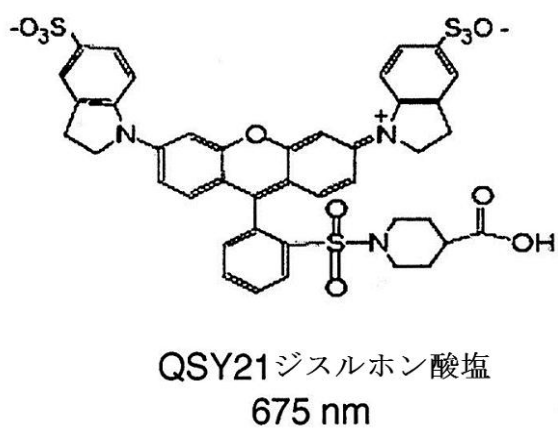
【図4A】



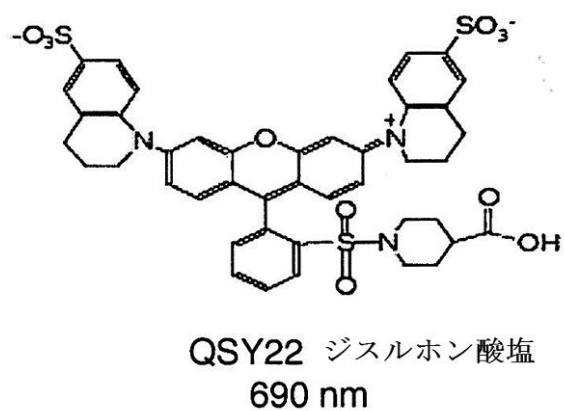
【図 4 B】



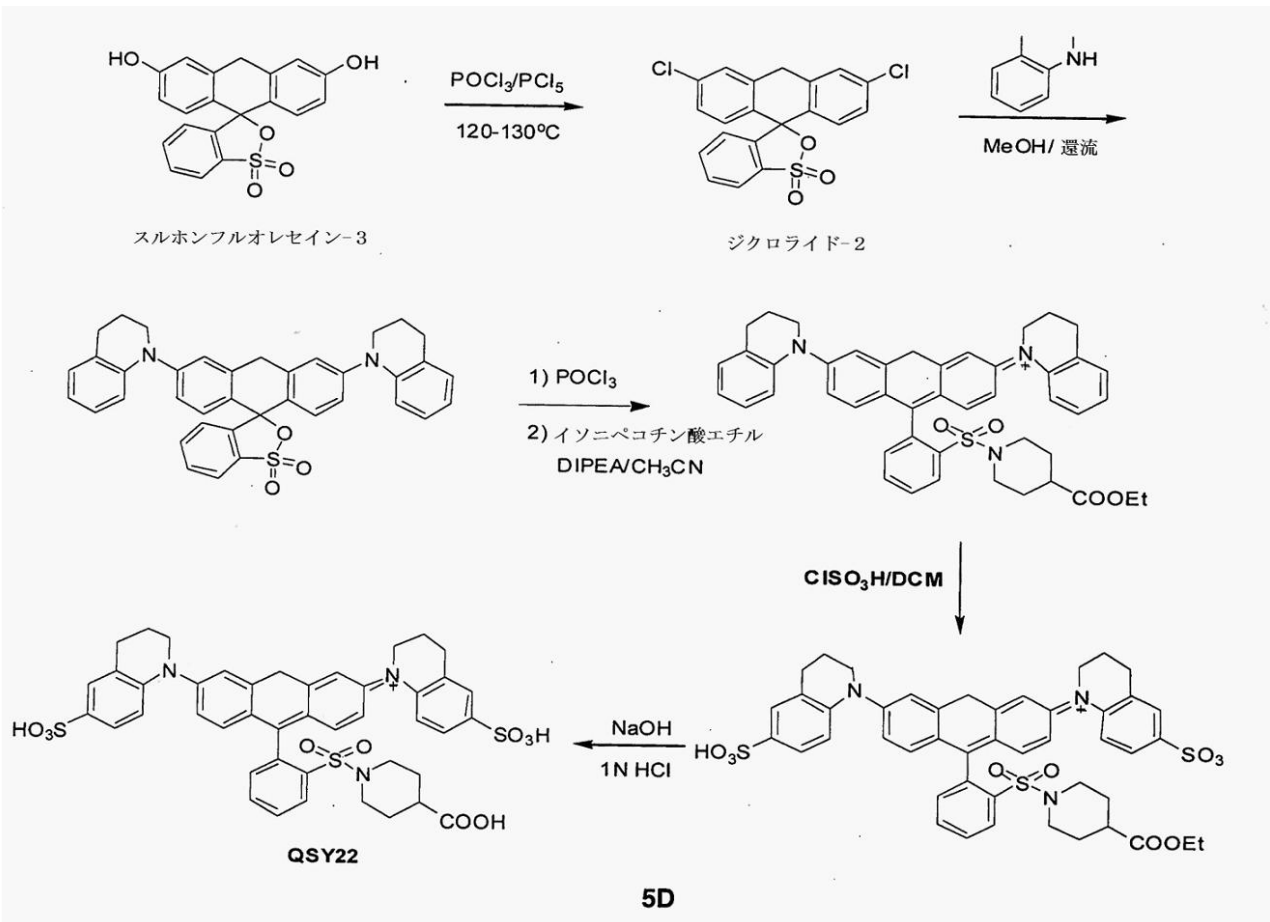
【図 5 B】



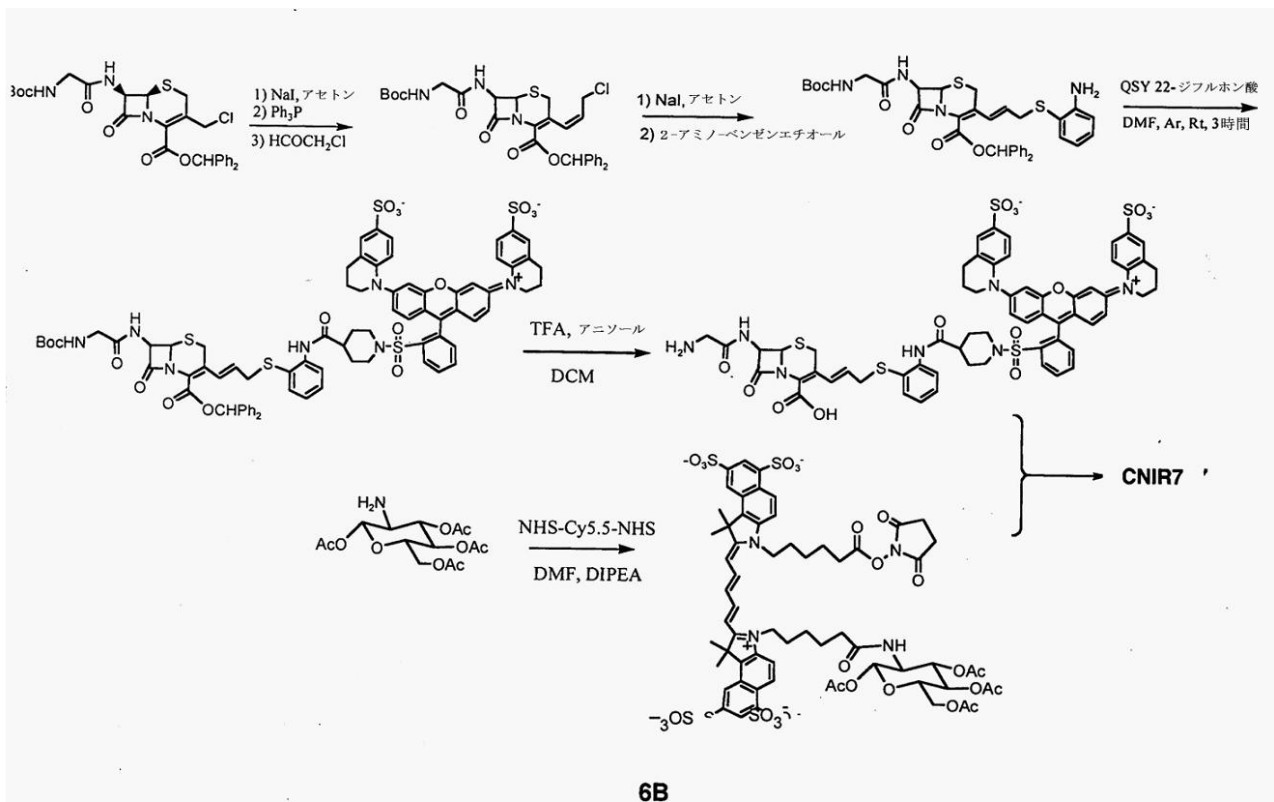
【図 5 C】



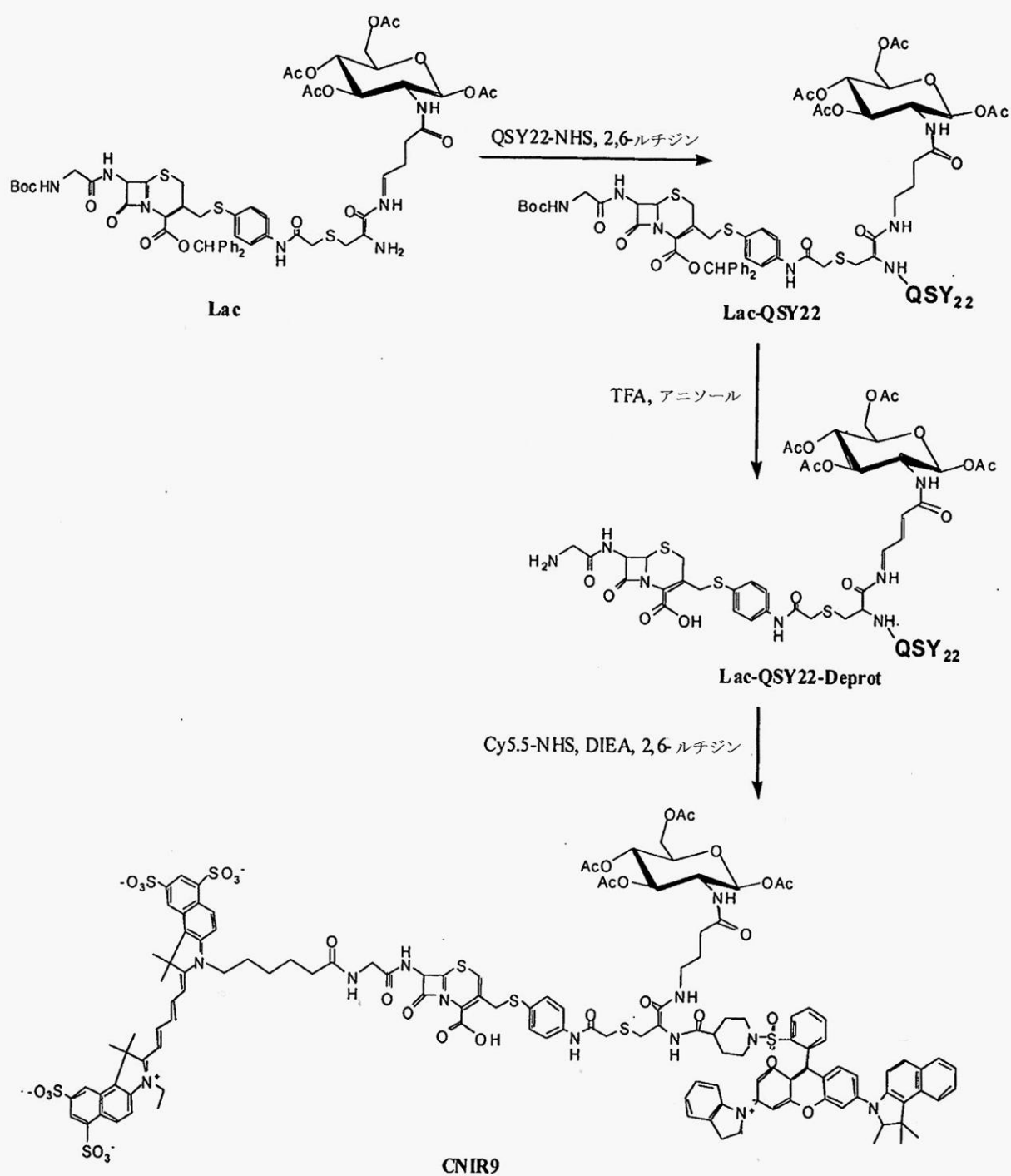
【 図 5 D 】



【 図 6 B 】

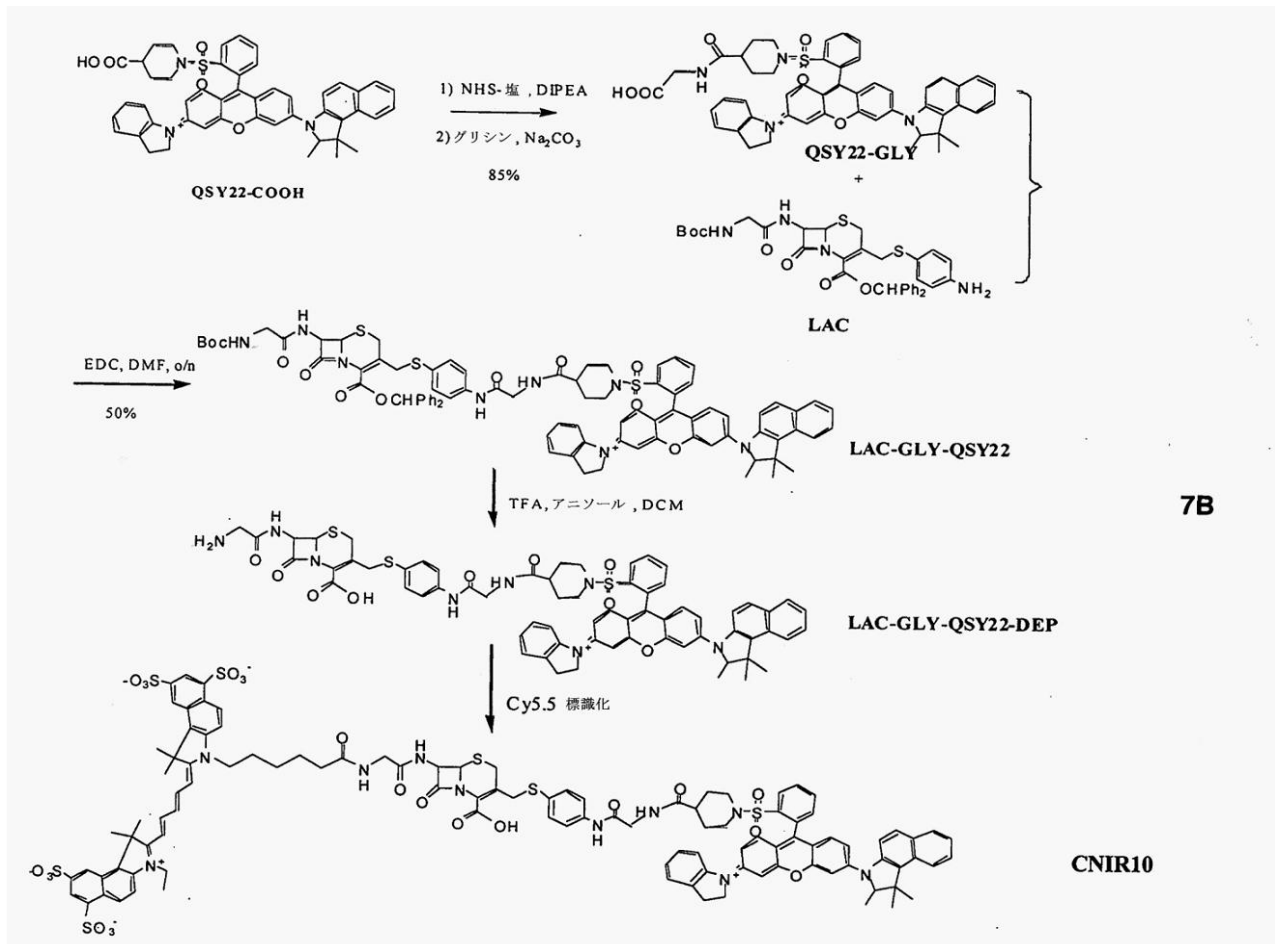


【 図 7 A 】

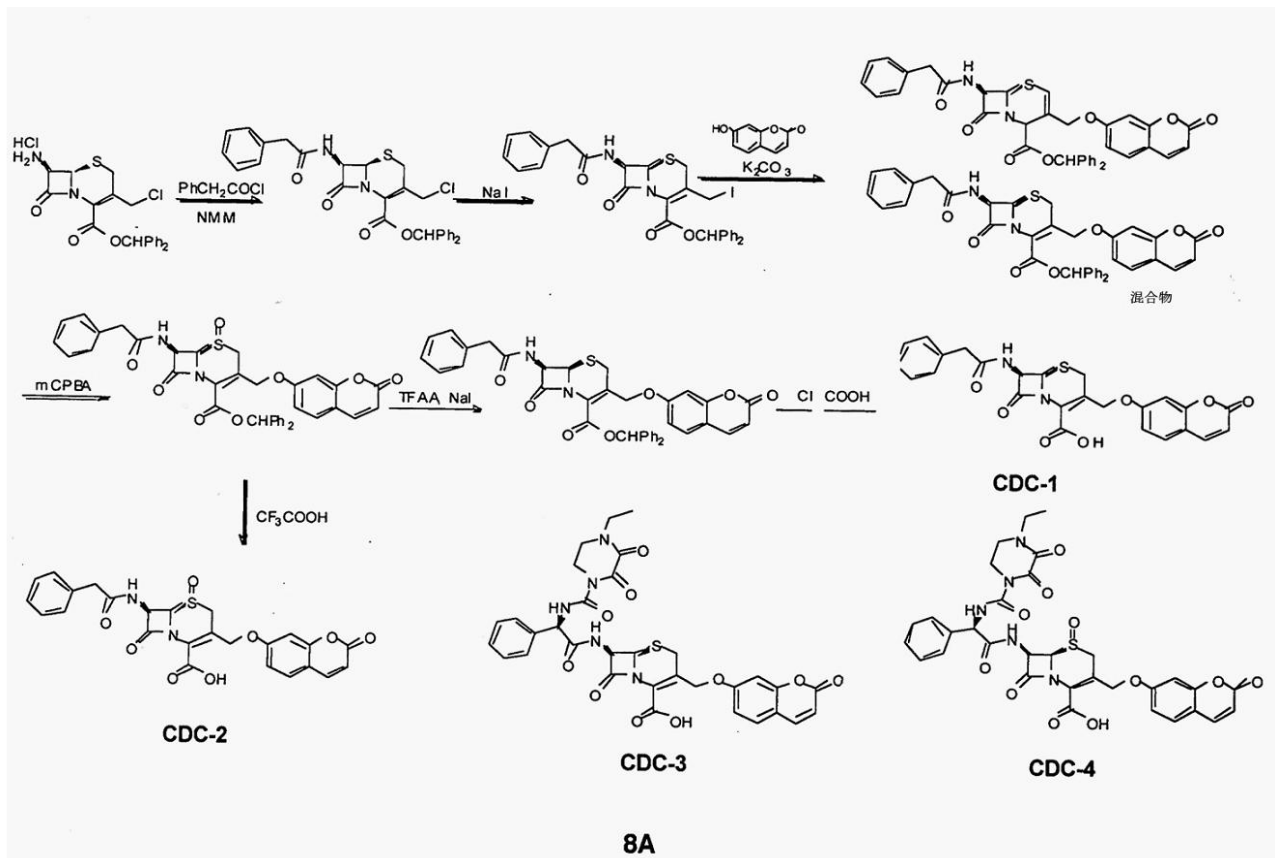


7A

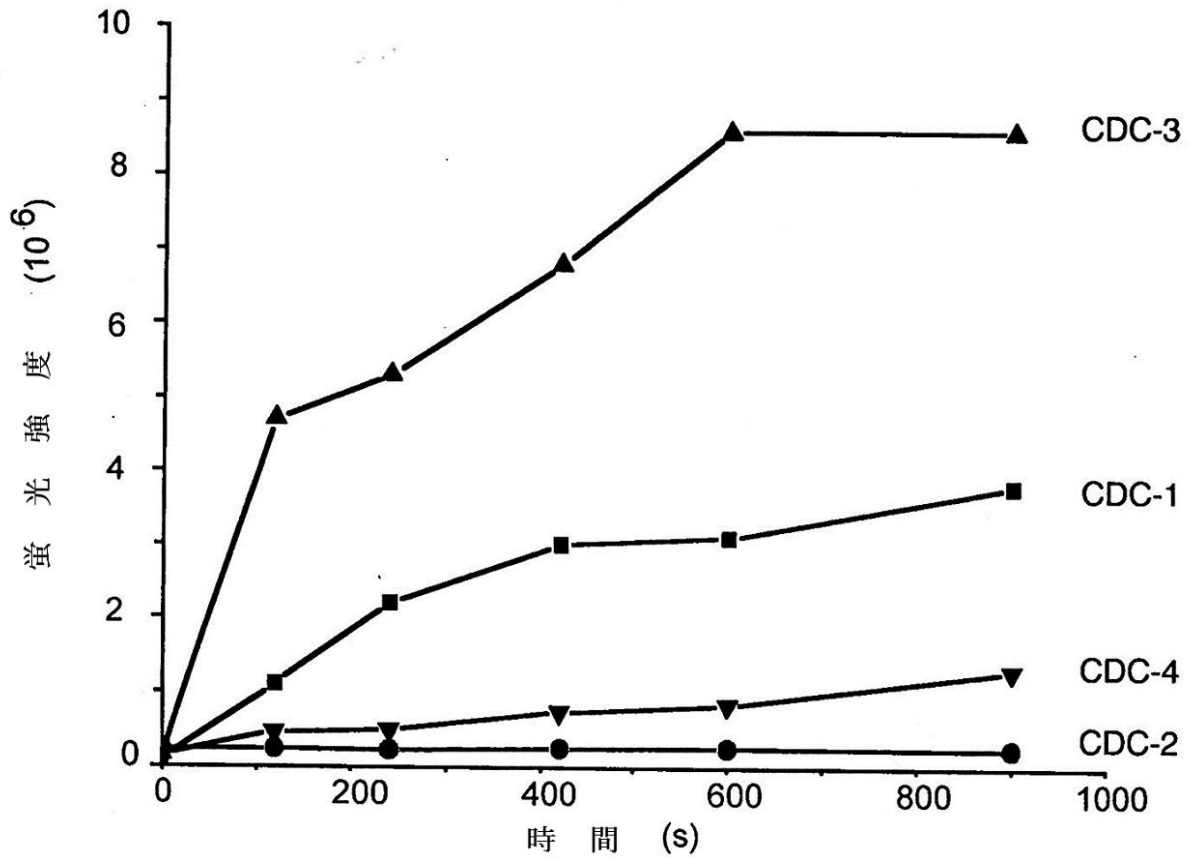
【図 7 B】



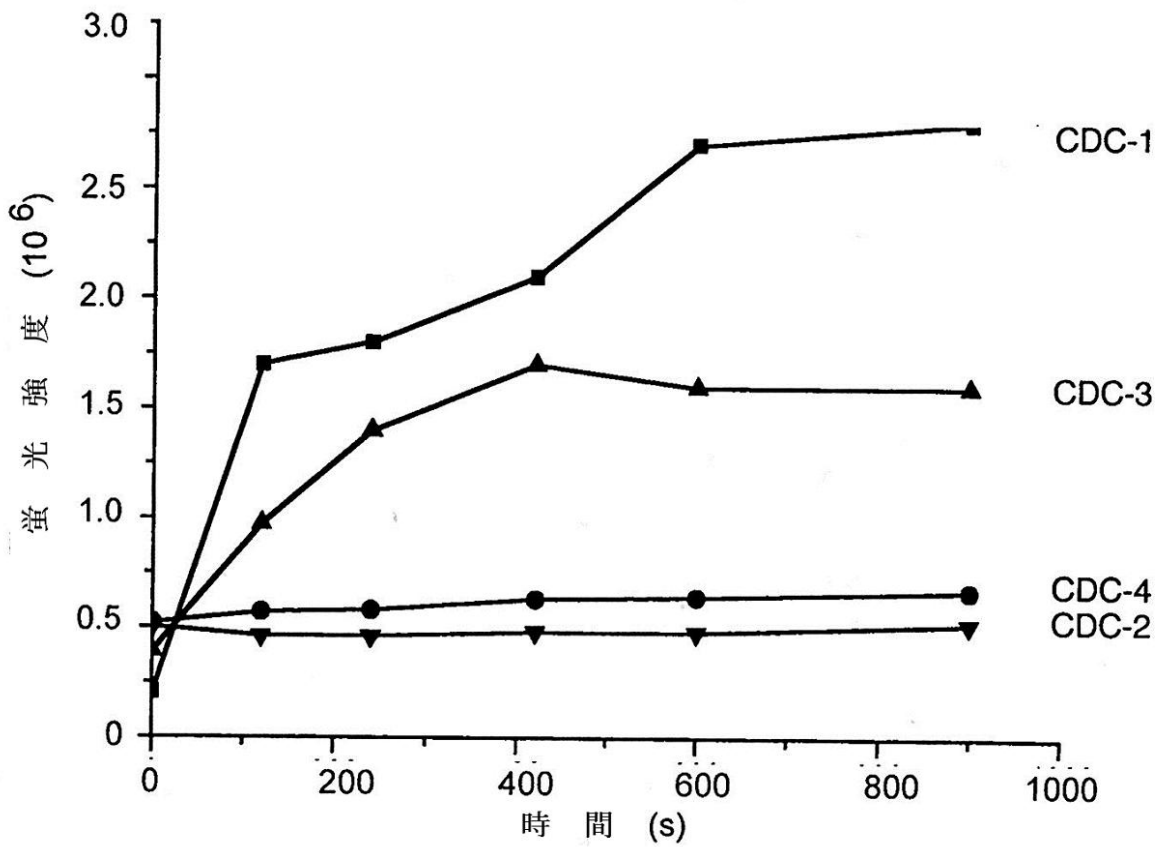
【図 8 A】



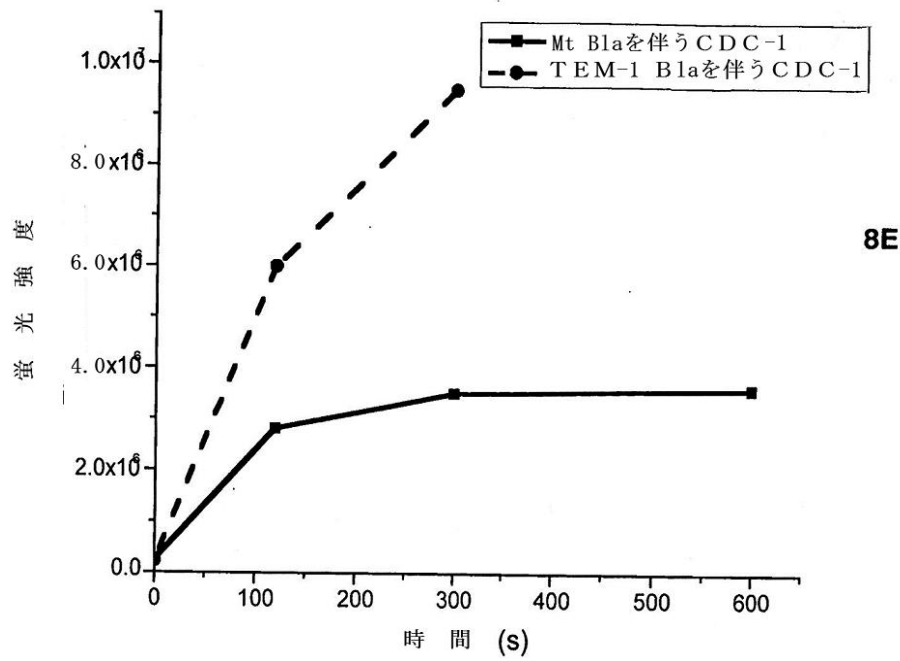
【図 8 B】



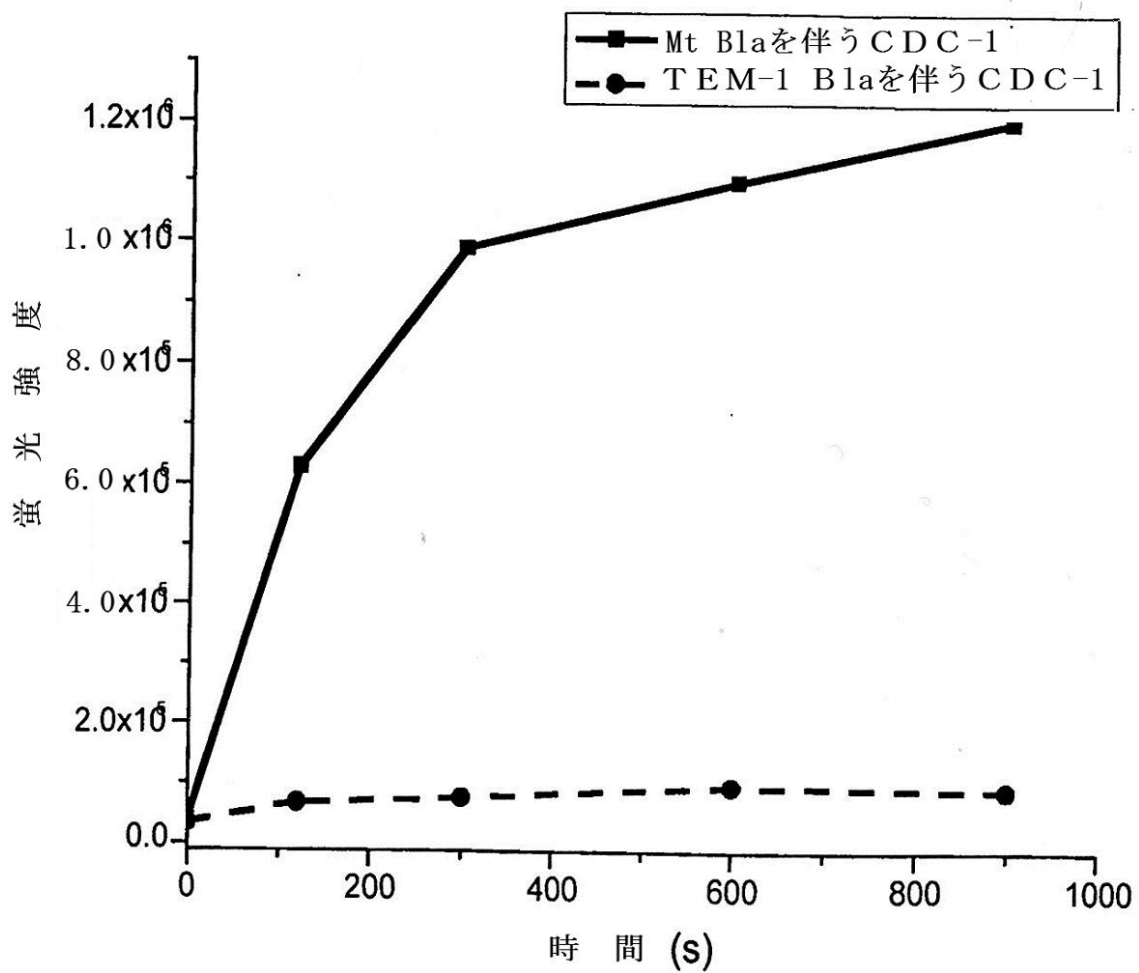
【図 8 C】



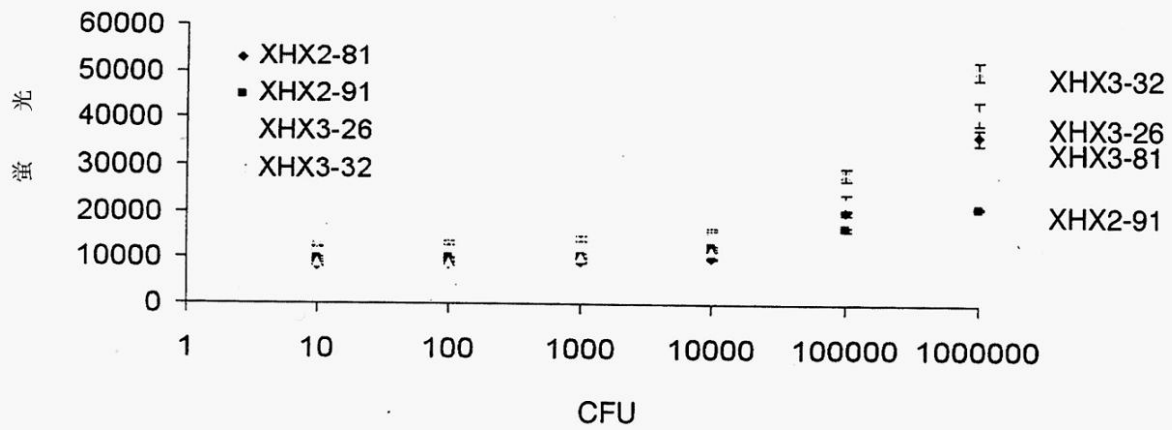
【図 8 E】



【図 8 F】

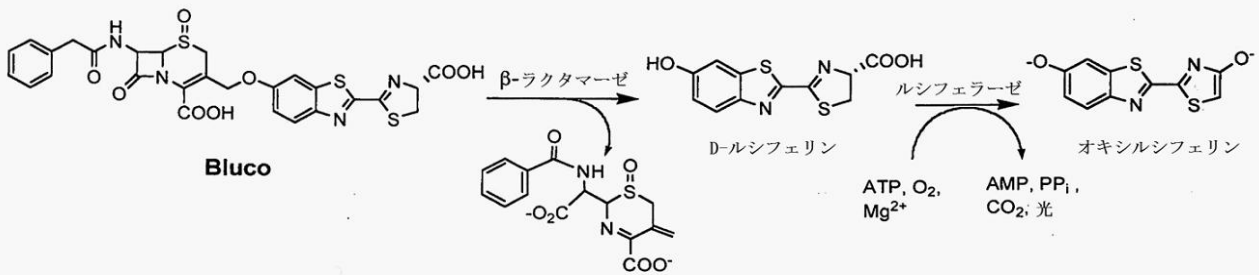


【図 9 F】



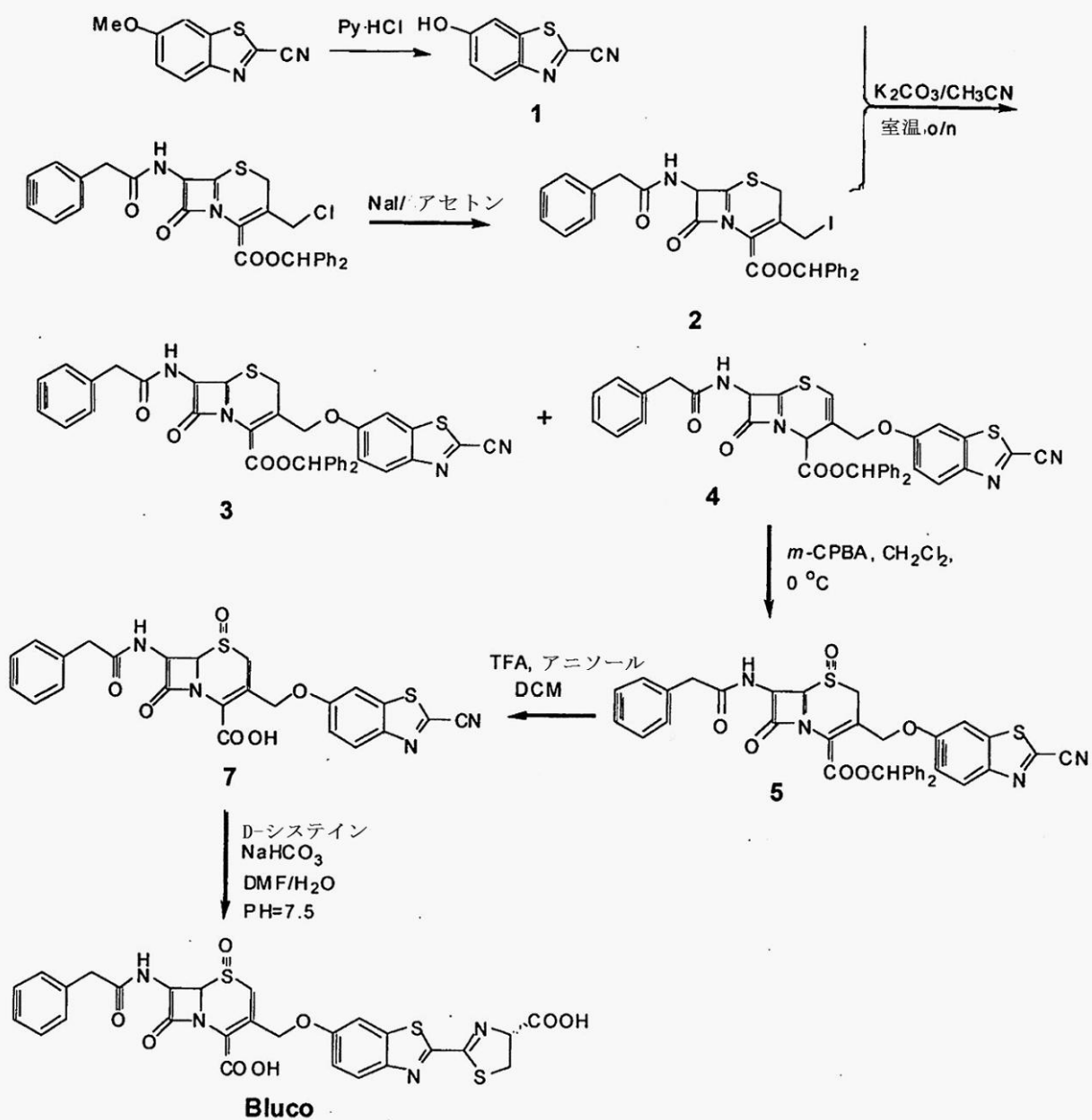
9F

【図 10 A】



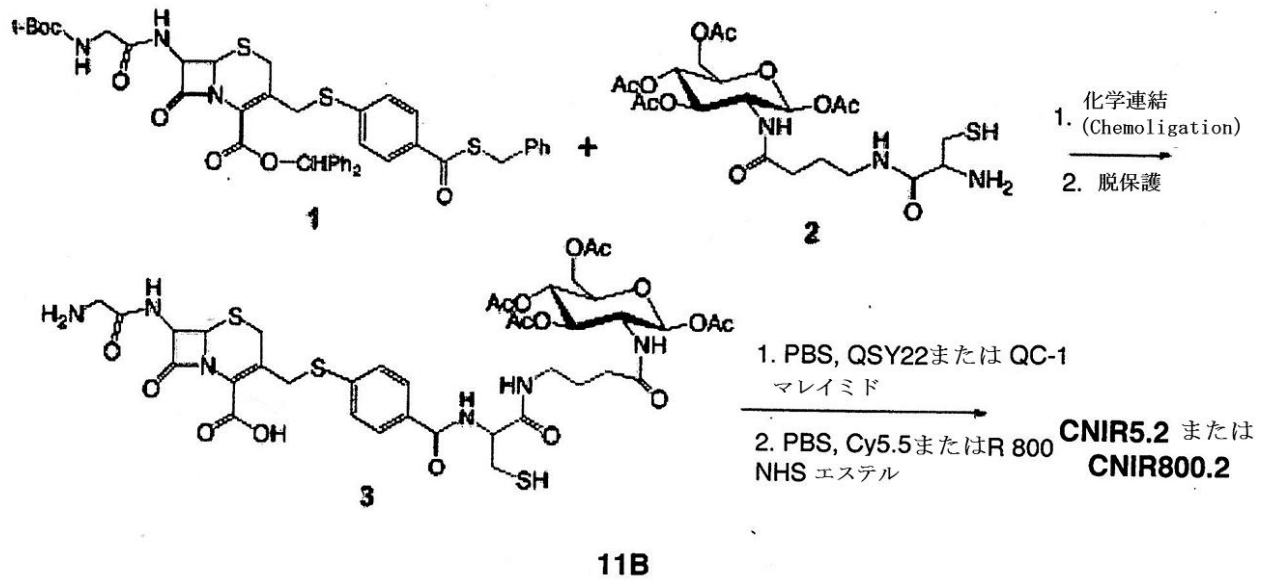
10A

【図 10B】

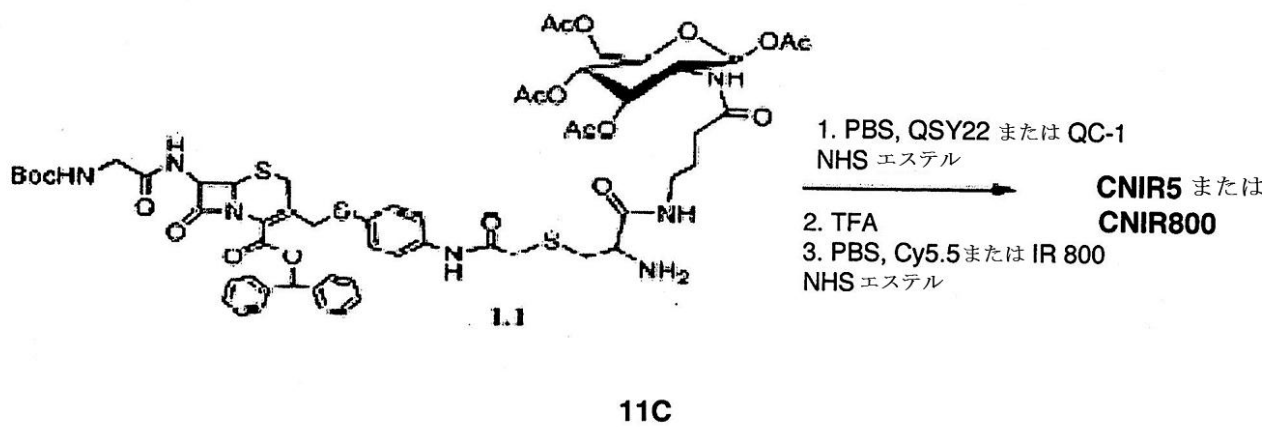


10B

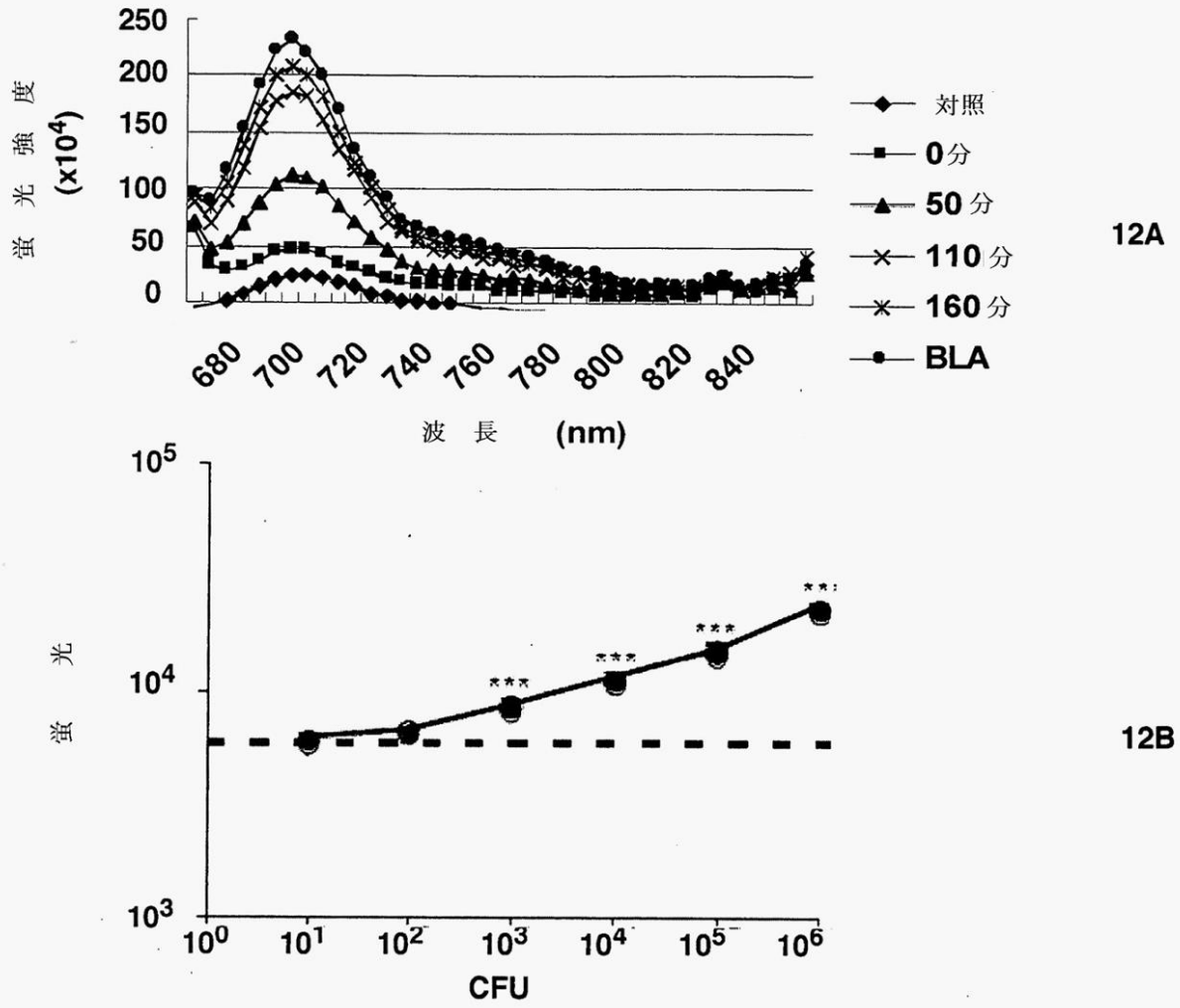
【図 11B】



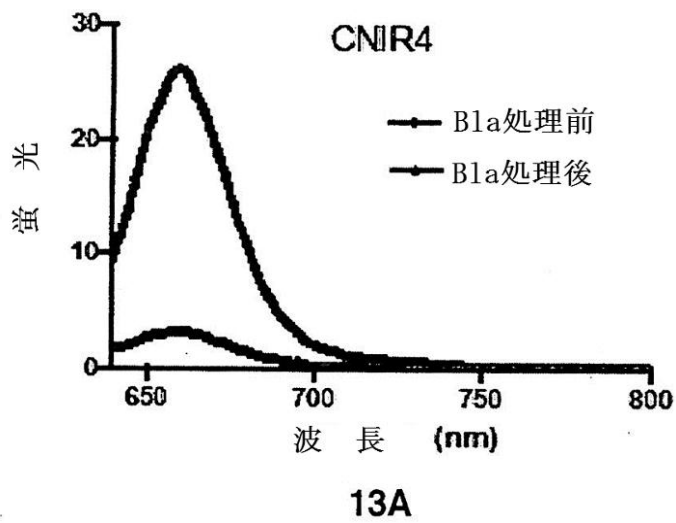
【図 11C】



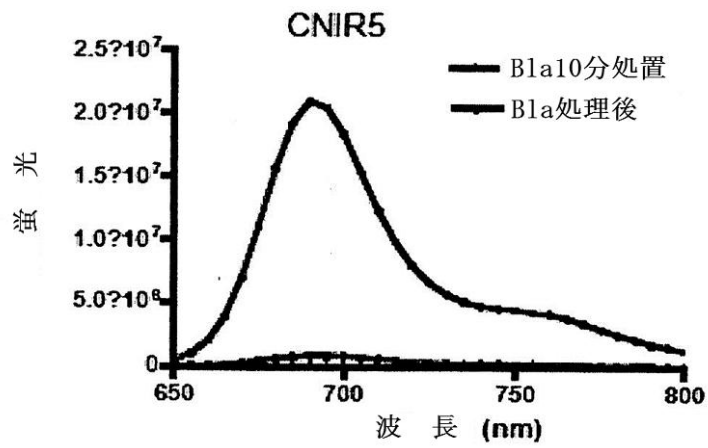
【 図 1 2 】



【 図 1 3 A 】

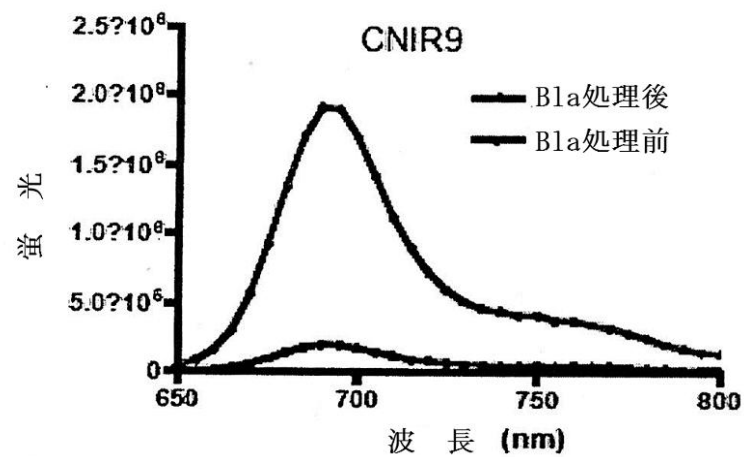


【図 1 3 B】



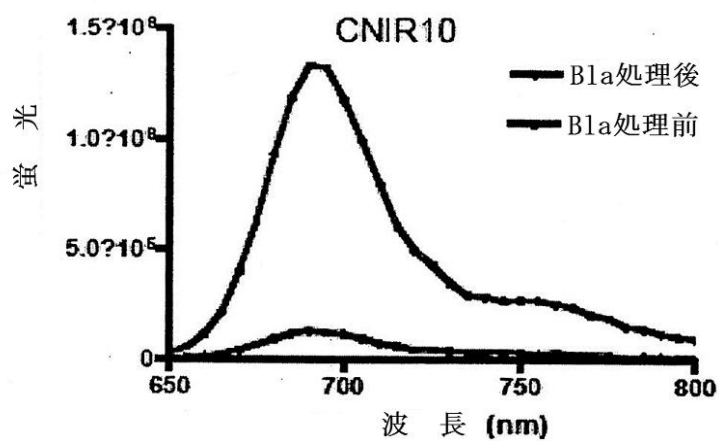
13B

【図 1 3 C】



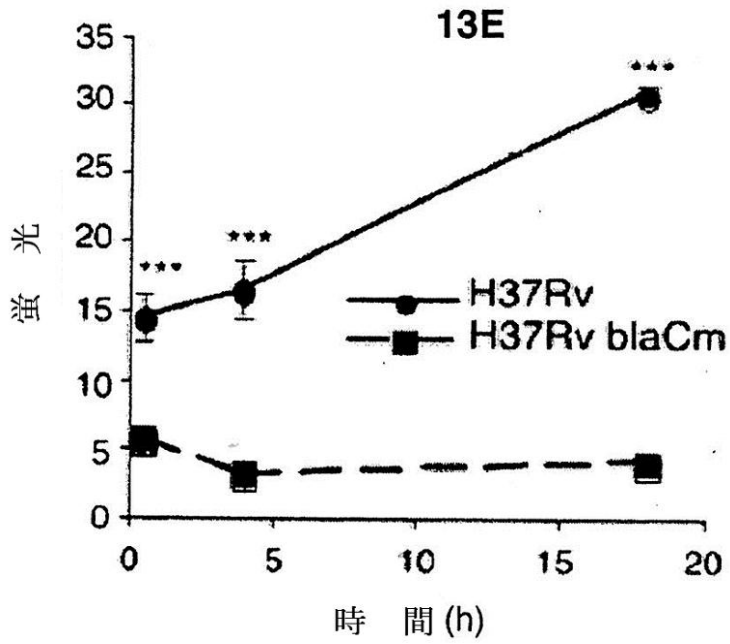
13C

【図 1 3 D】

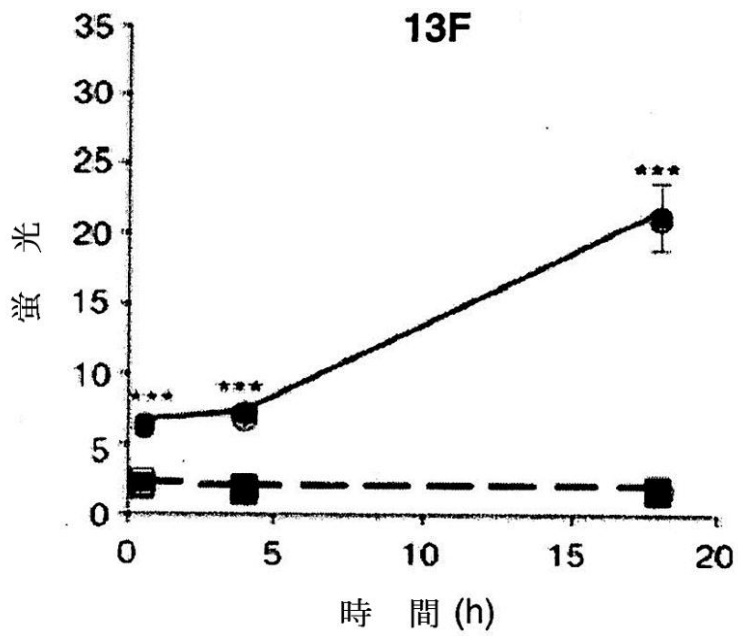


13D

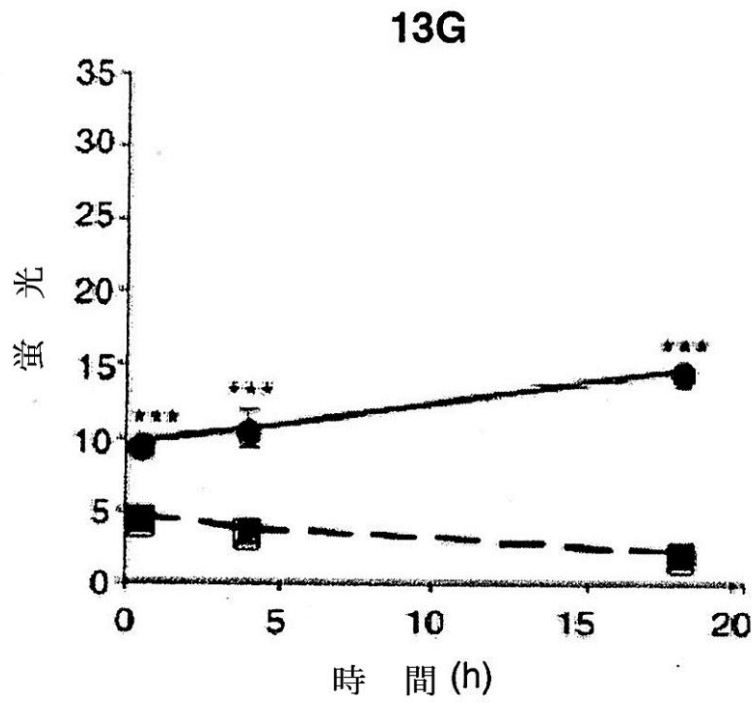
【図 13 E】



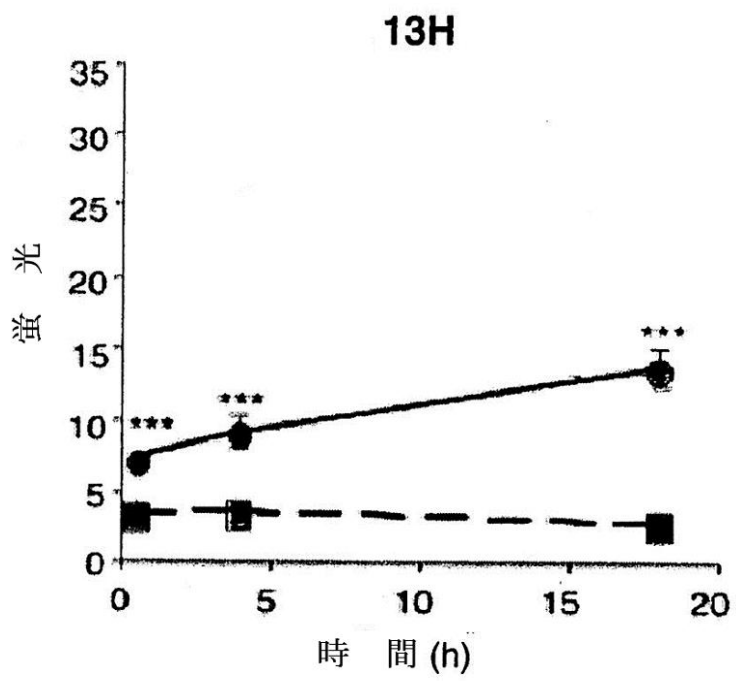
【図 13 F】



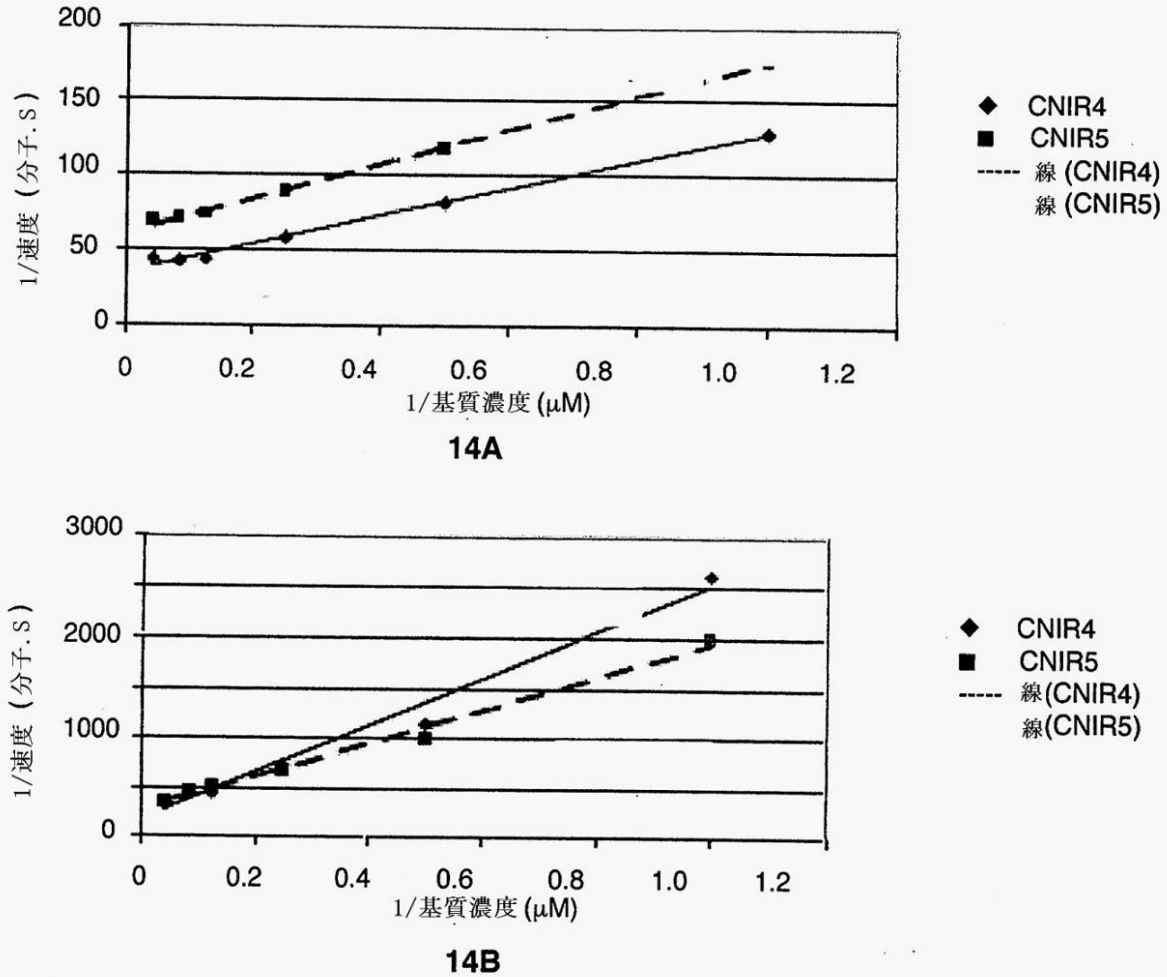
【図 13 G】



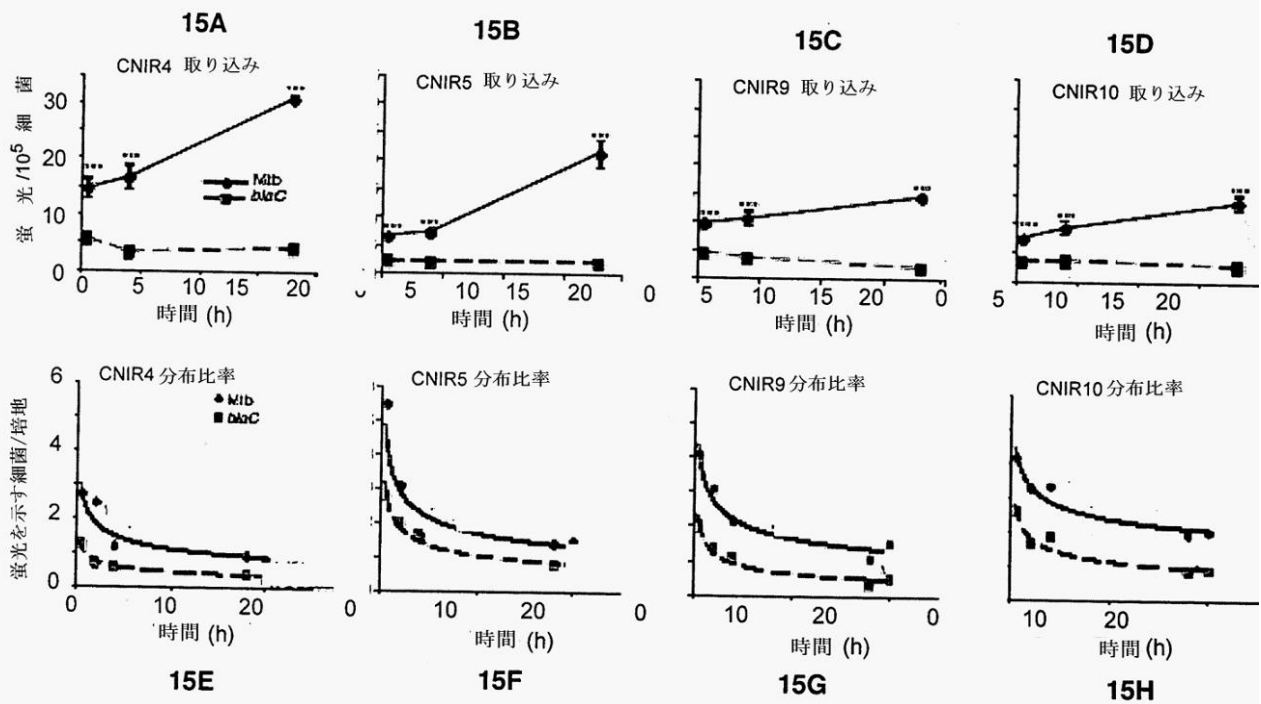
【図 13 H】



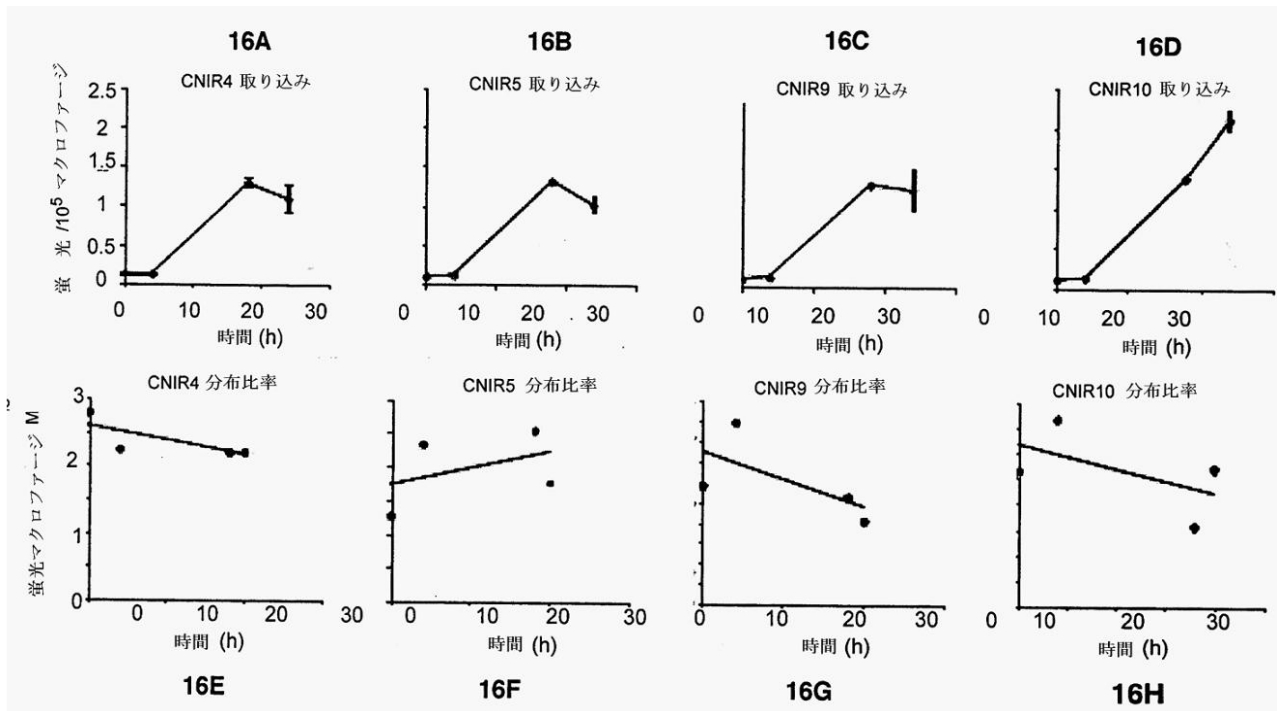
【図 14】



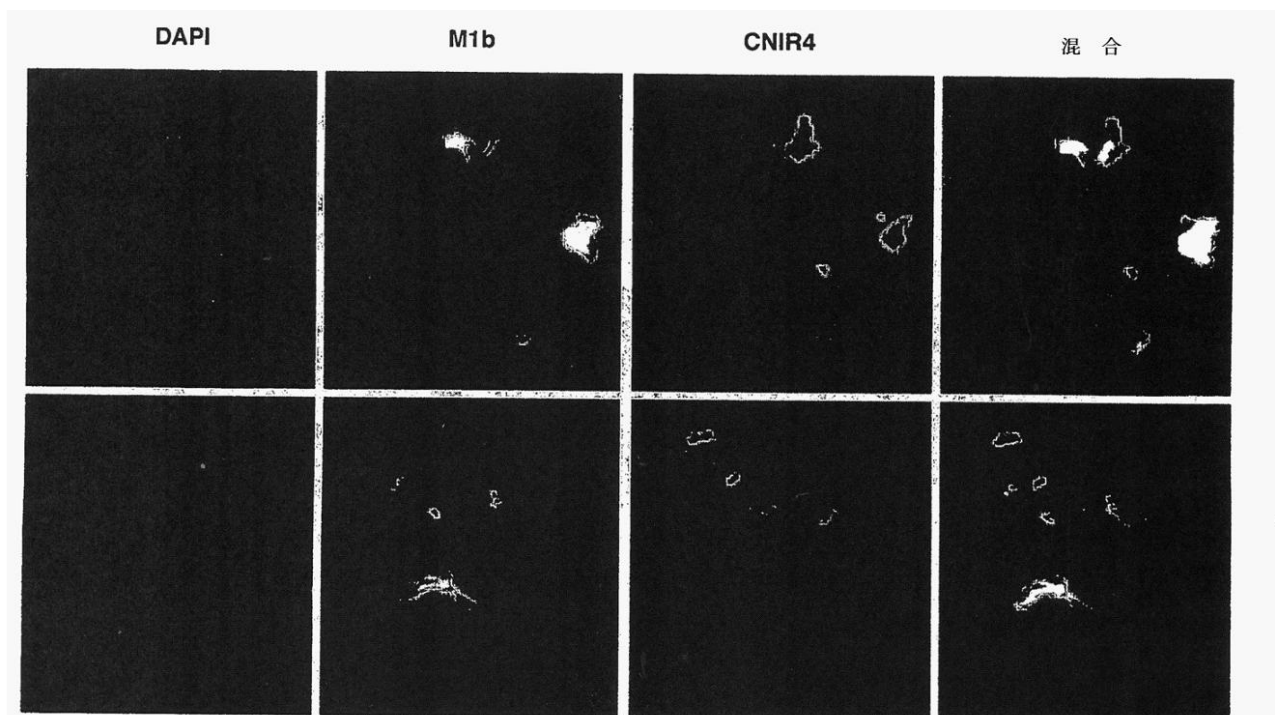
【図 15】



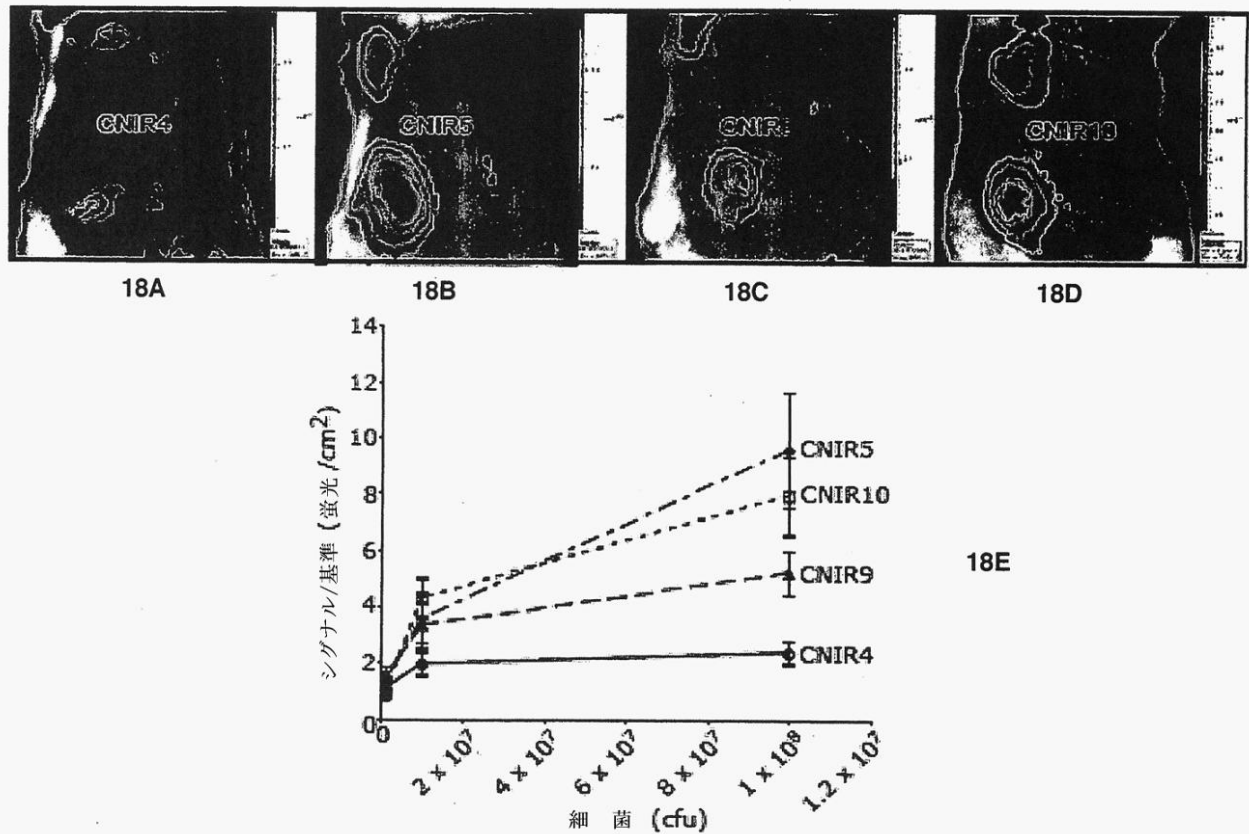
【図 16】



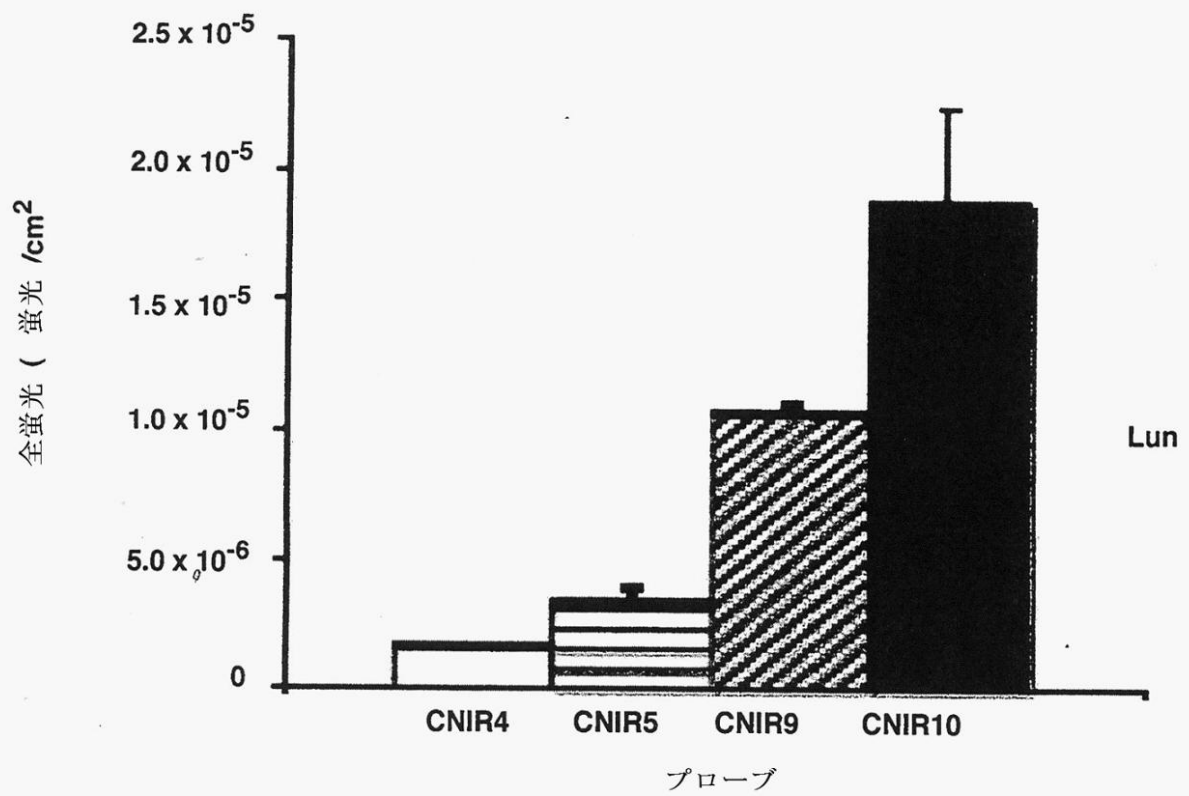
【図 17】



【図 18】

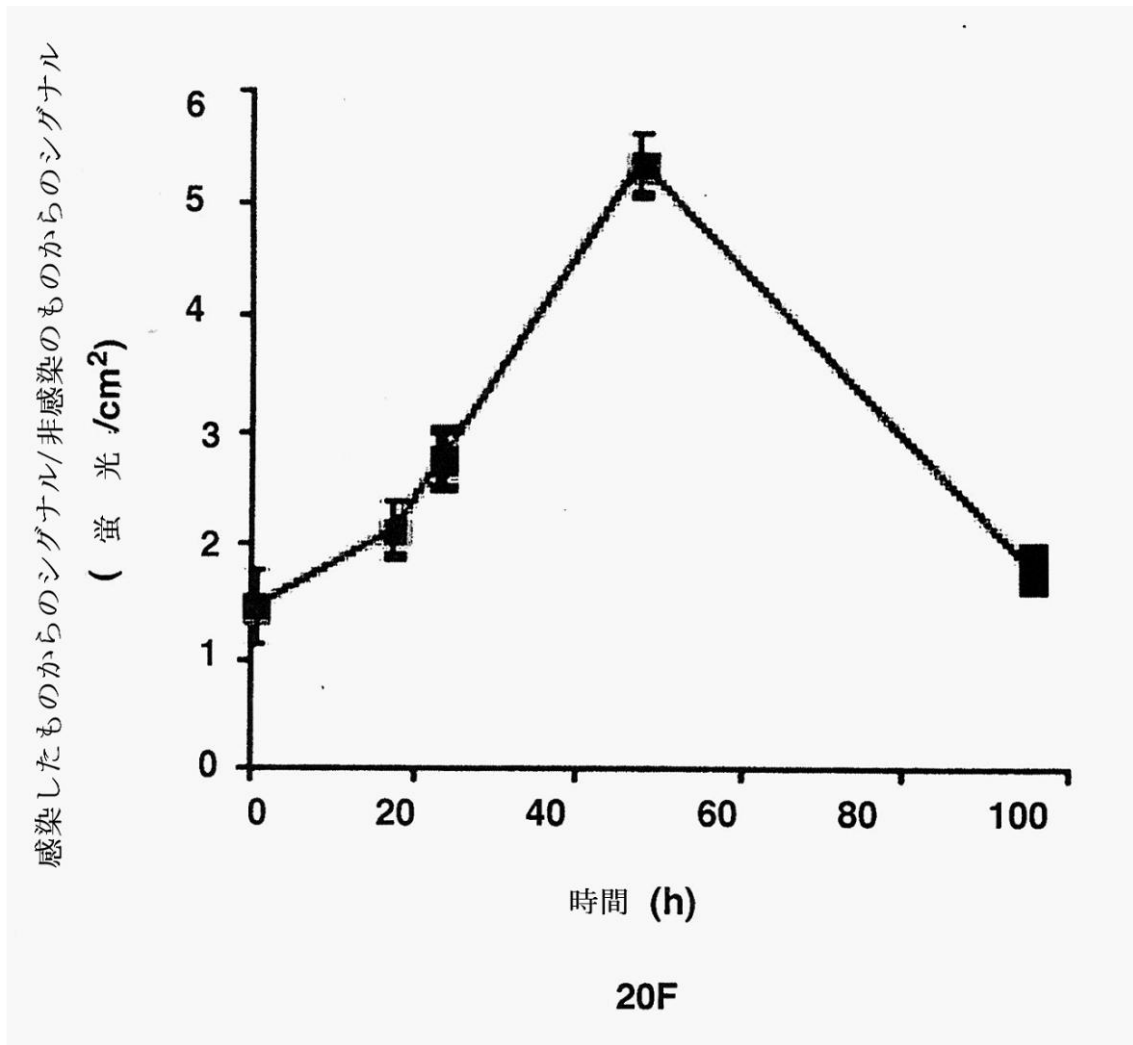


【図 19 E】

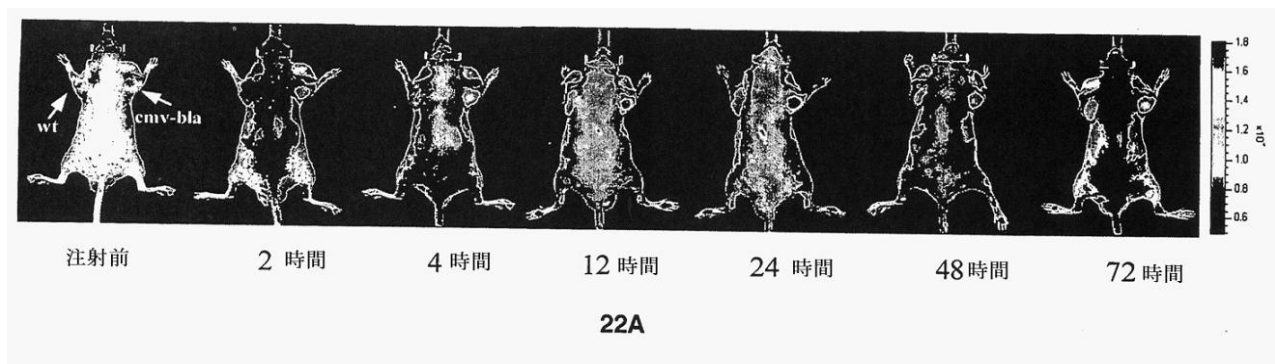


19E

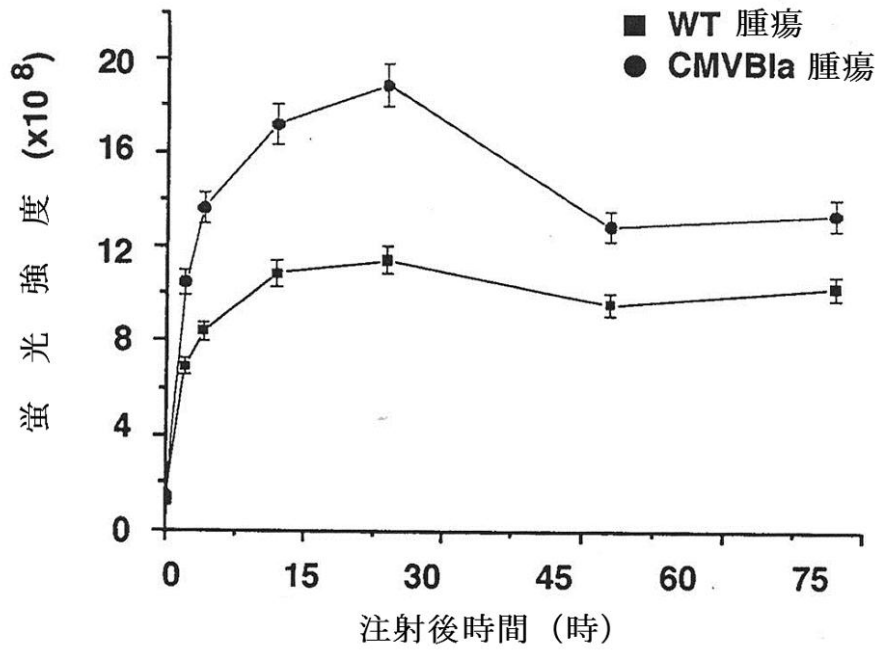
【図 20 F】



【図 22 A】

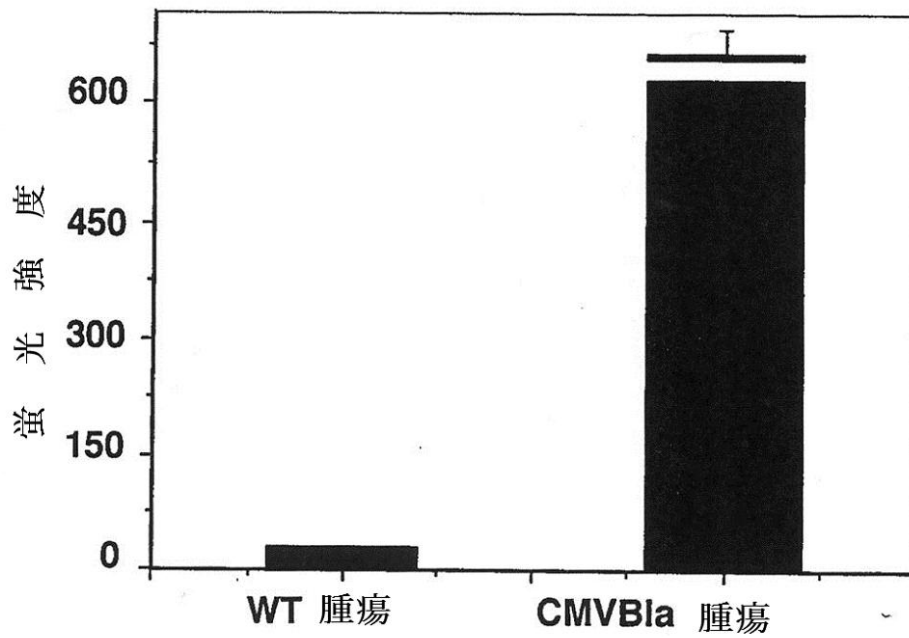


【図 2 2 B】



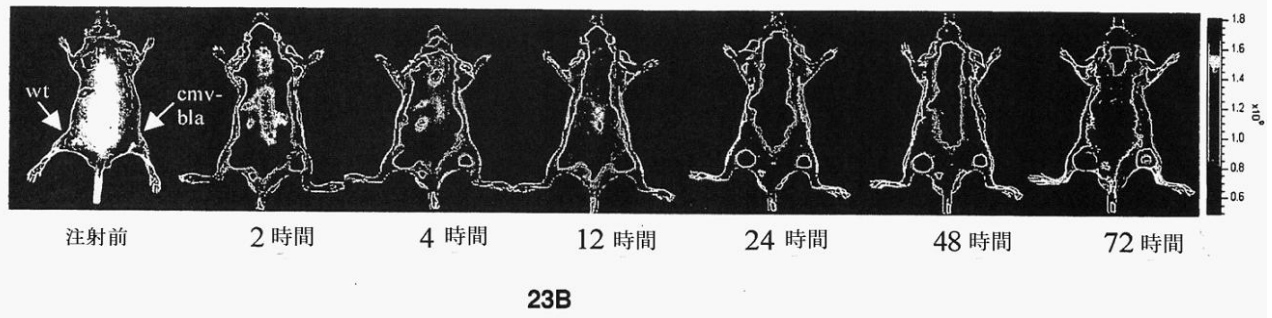
22B

【図 2 2 D】

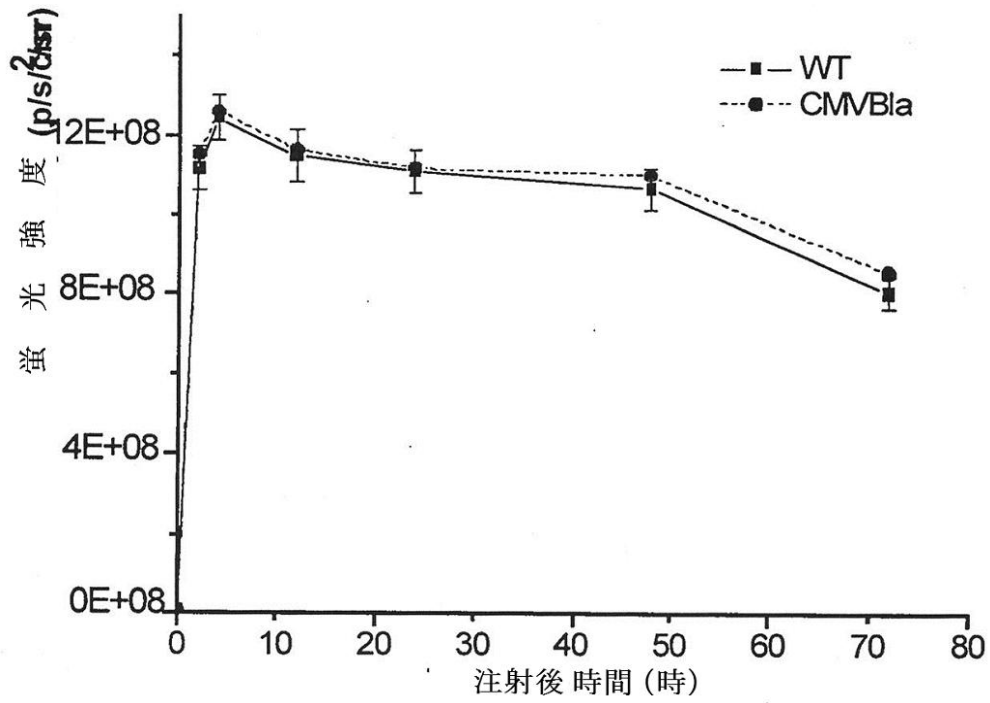


22D

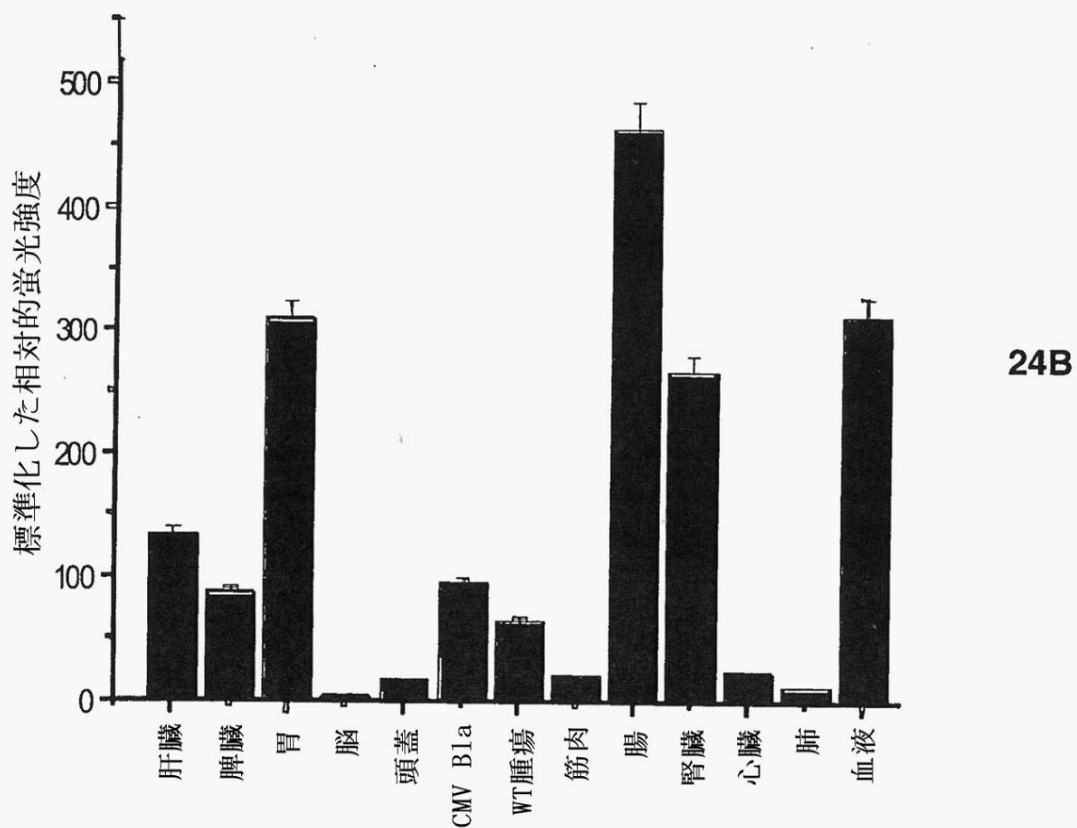
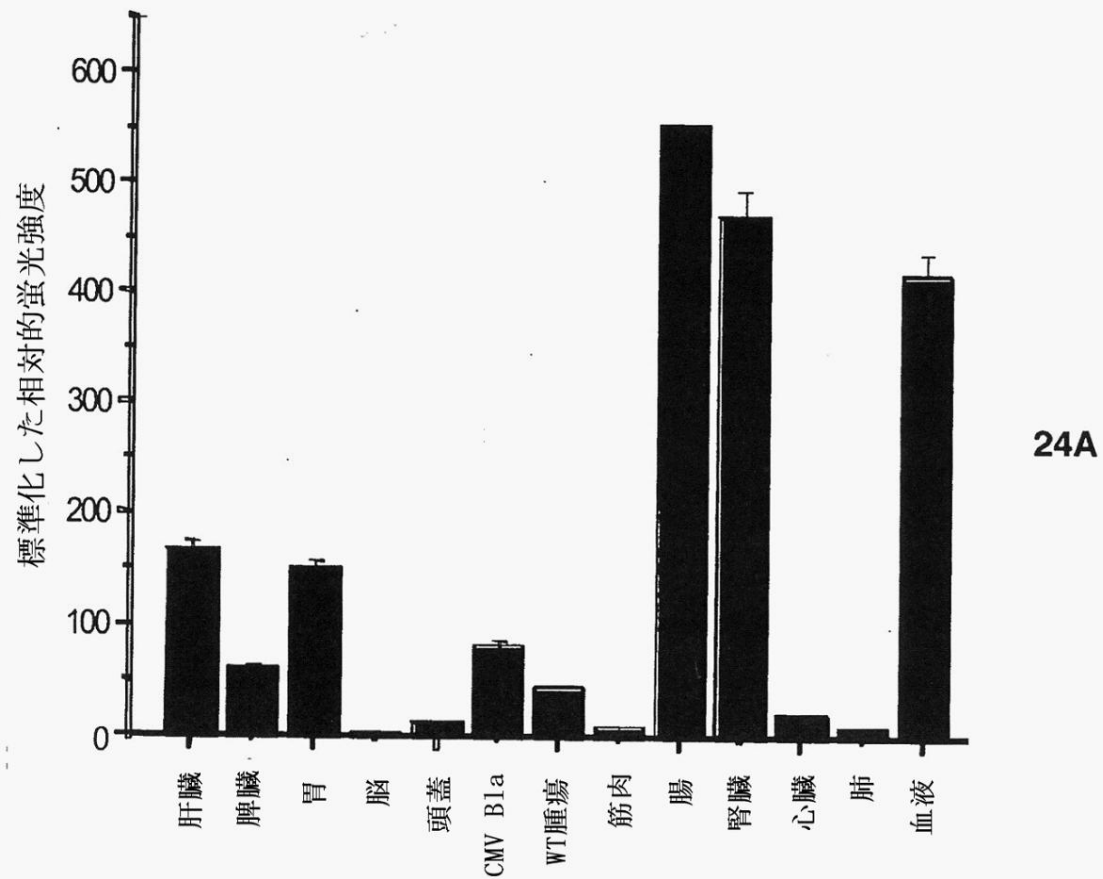
【 図 2 3 B 】



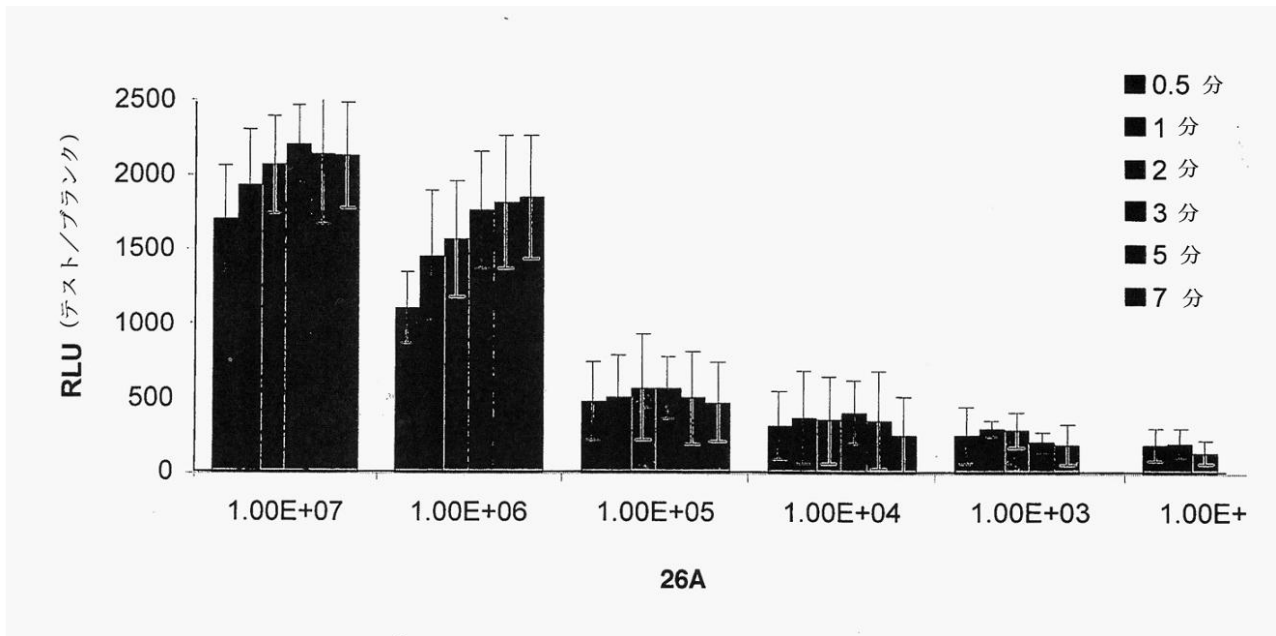
【 図 2 3 C 】



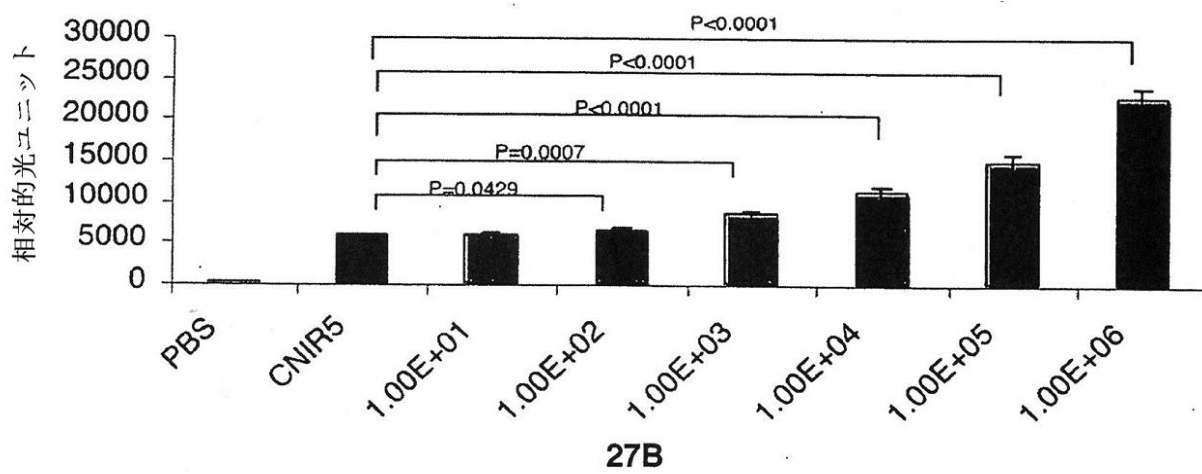
【 図 2 4 】



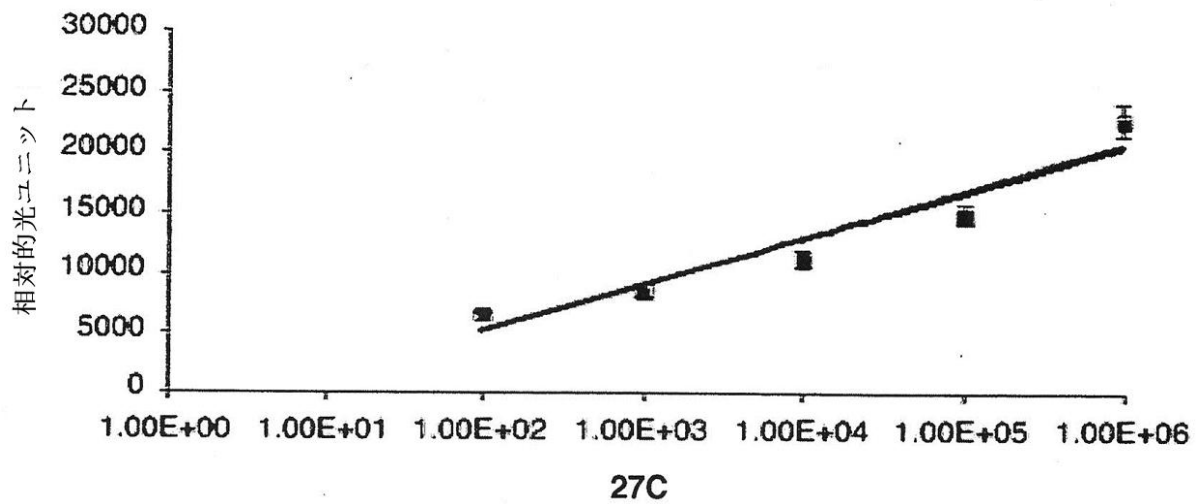
【図 26 A】



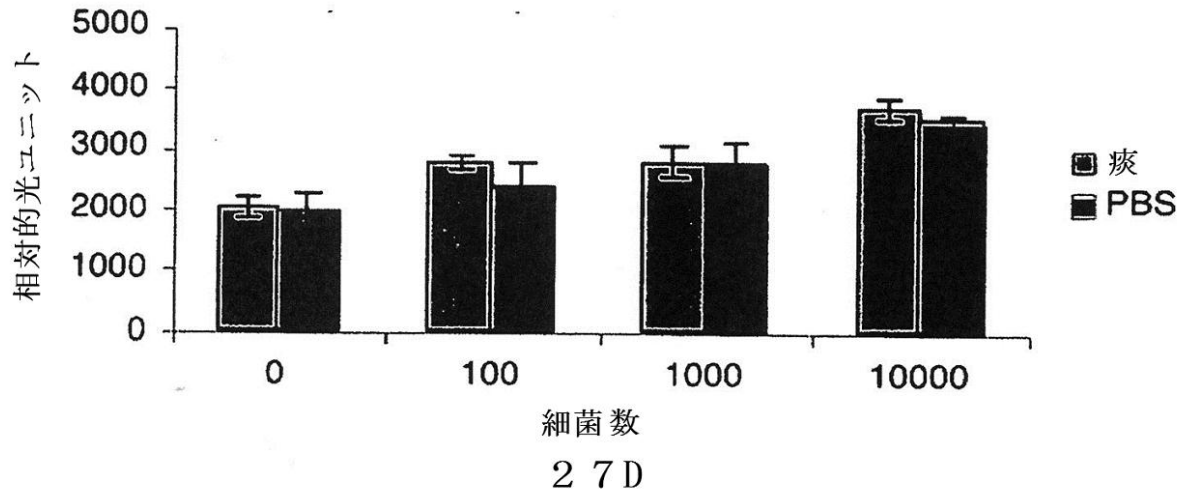
【図 27 B】



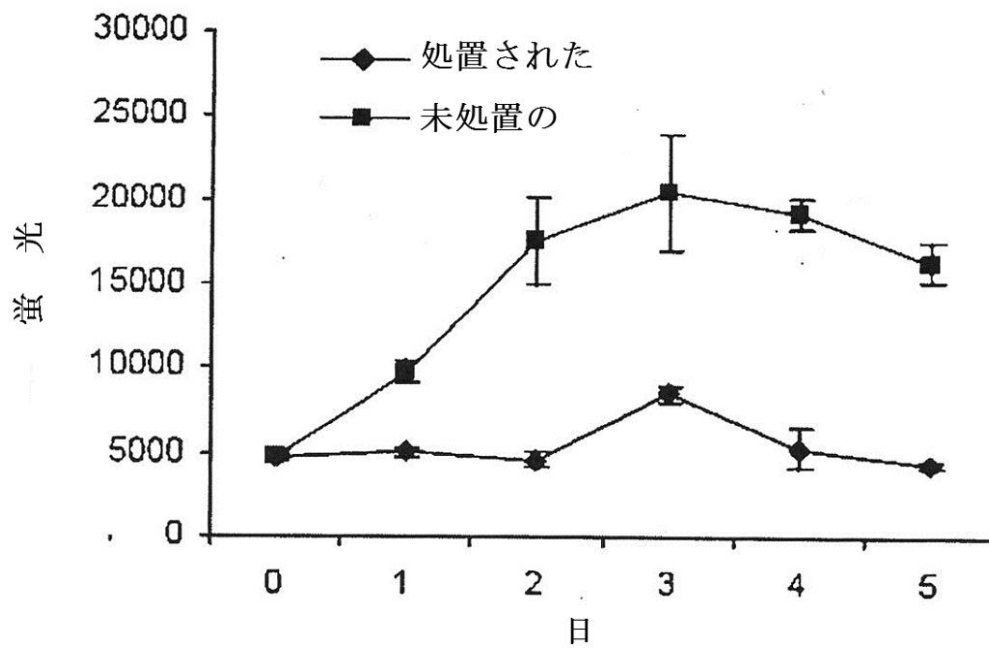
【図 27 C】



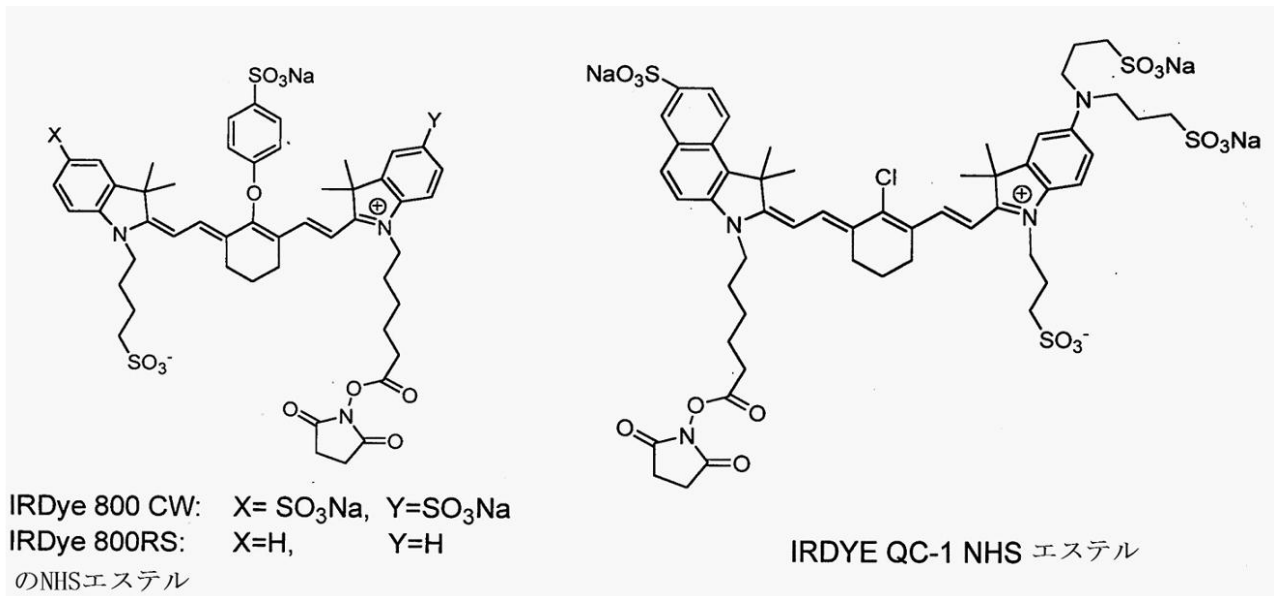
【図 27D】



【図 27E】

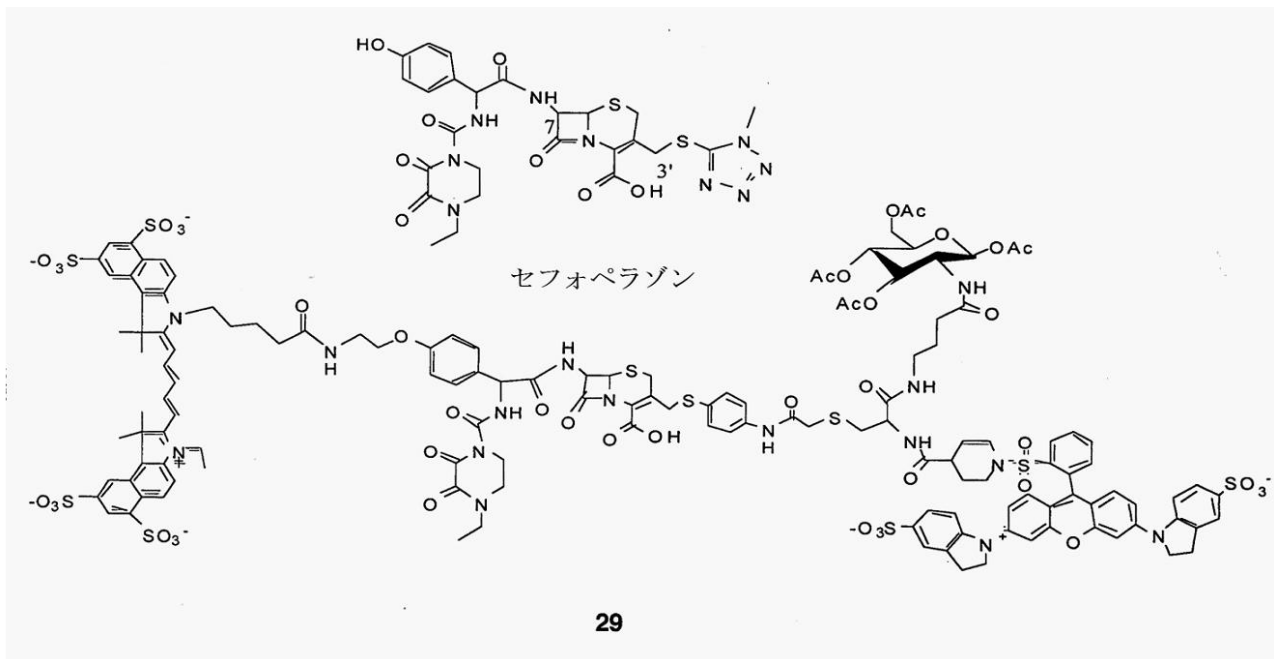


【図 28】



28

【図 29】



29

A

B

C

A + B

30

Blucoの48 アナログ

培養混合物

色素の捕捉及び濃縮

吸収剤の沈殿

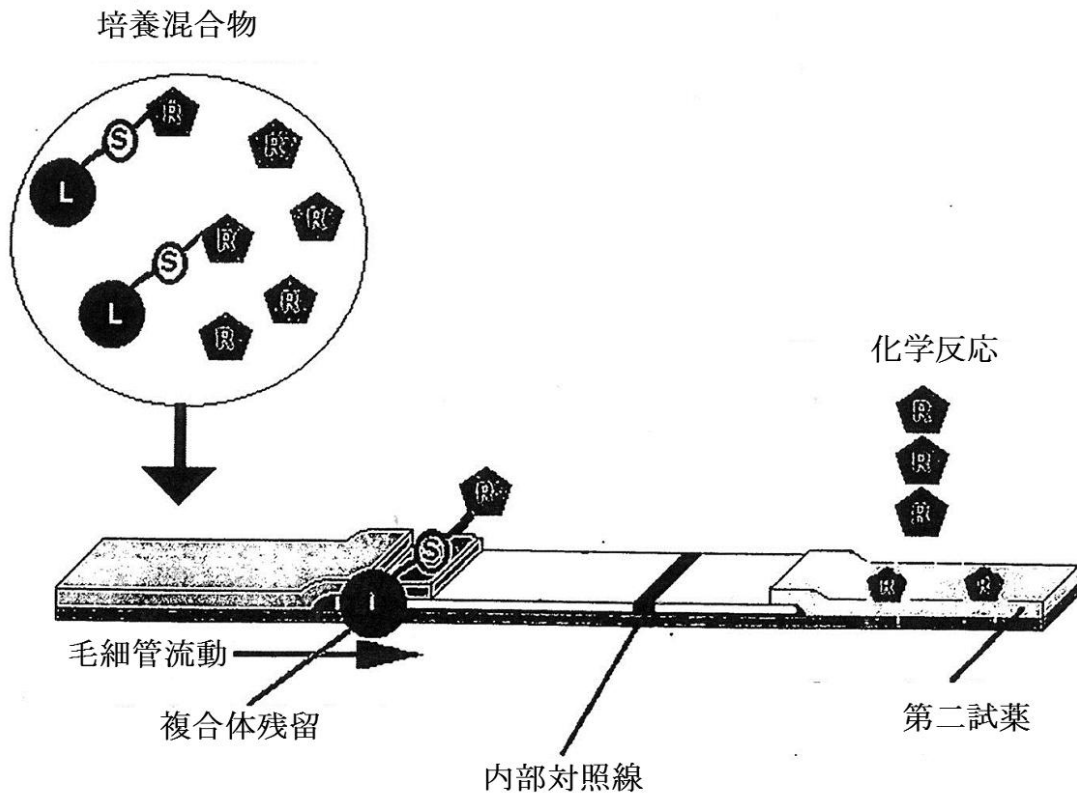
毛細管流動

複合体残留

内部対照線

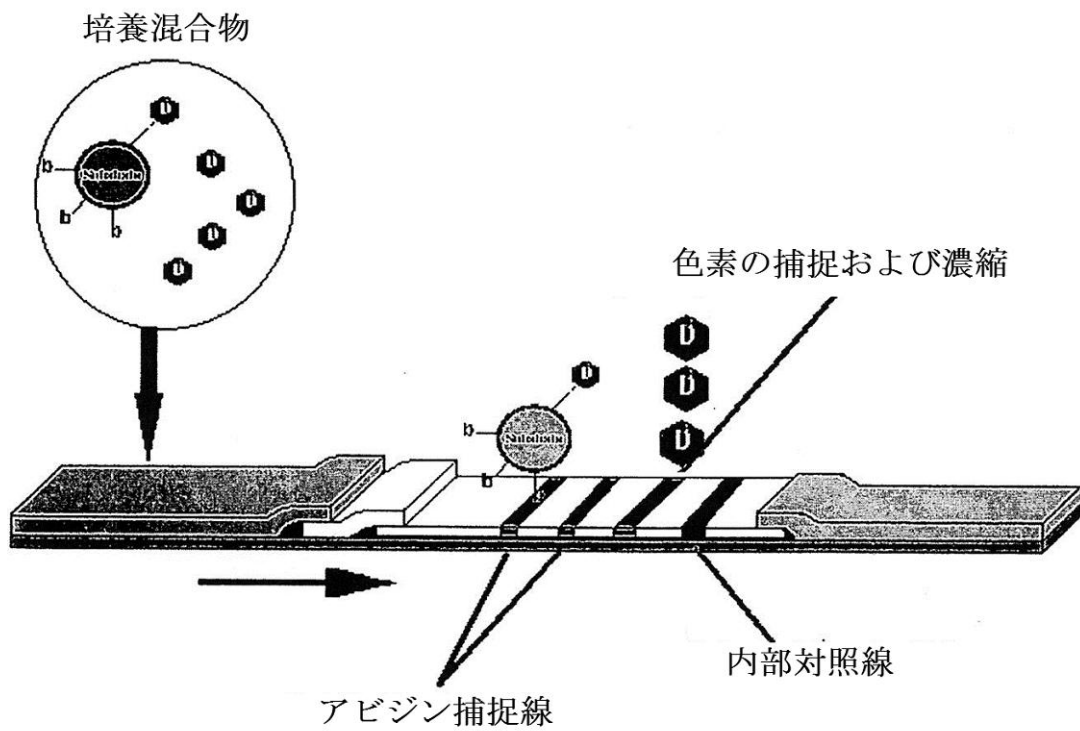
33A

【図 3 3 B】



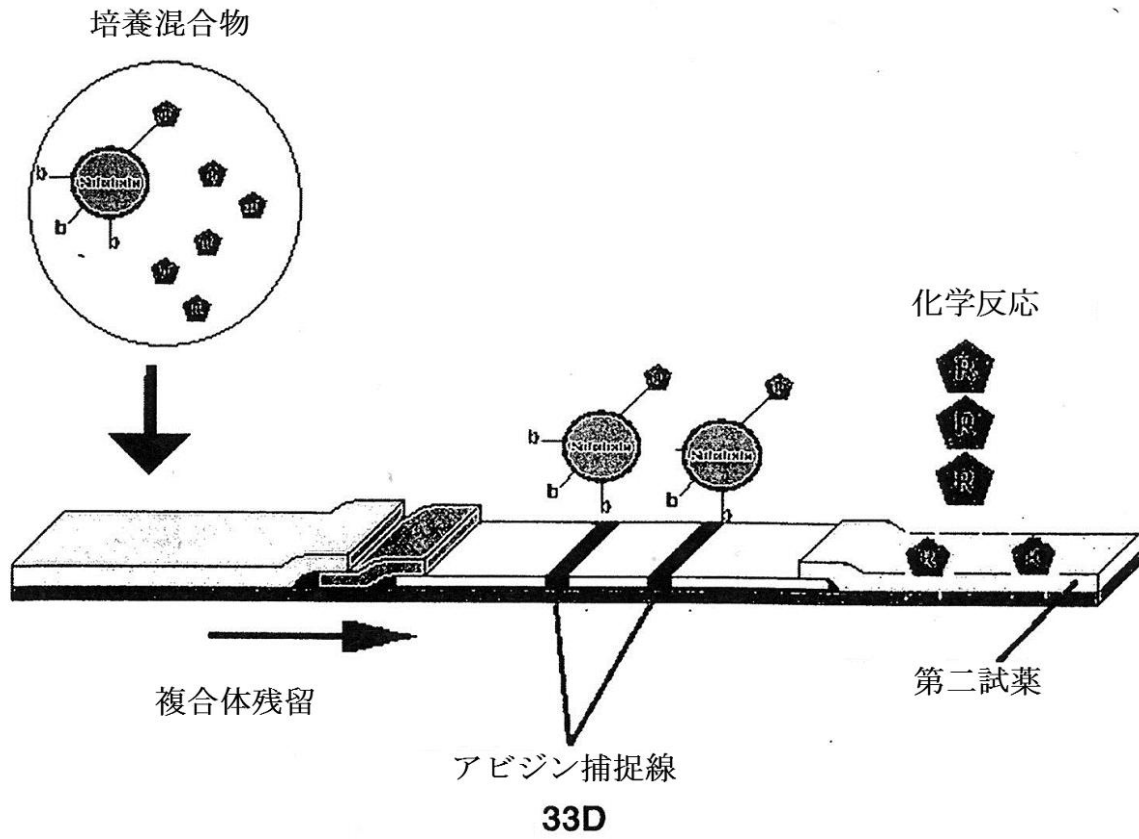
33B

【図 3 3 C】





33C

【図 3 3 D】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/001018
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12Q 1/34(2006.01)i, C12Q 1/04(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i, C12R 1/32(2006.01)n</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/34; A61K 49/00; C12Q 1/44; C07D 501/34; G01N 33/573; C07D 501/24		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) NCBI PubMed, eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: beta-lactamase, fluorogenic substrate, pathogenic bacteria, colorimetric signal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010-0047172 A1 (CIRILLO, J. D. et al.) 25 February 2010 See the whole document, especially Abstract; Claims 1-49.	42-62
A	YAO, H. et al. "A Bioluminogenic Substrate for in Vivo Imaging of Beta-Lactamase Activity" Angew. Chem. Int. Ed., 03 August 2007, Vol. 46, pp. 7031-7034 See the whole document, especially Abstract.	42-62
A	XING, B. et al. "Cell-Permeable Near-Infrared Fluorogenic Substrates for imaging Beta-Lactamase Activity" J. AM. CHEM. SOC., 03 March 2005, Vol. 127, No. 12, pp. 4158-4159 See the whole document, especially Abstract, Figure 1.	42-62
A	US 7427680 B2 (TSIEN, R. Y. et al.) 23 September 2008 See the whole document, especially Abstract.	42-62
A	WO 2005-040412 A1 (AFFIBODY, AB.) 06 May 2005 See the whole document, especially Abstract; Claims 1-8.	42-62
A	US 05514561 A (QUANTE, J. M. et al.) 07 May 1996 See the whole document, especially Abstract; Claims 1-5.	42-62
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 FEBRUARY 2012 (09.02.2012)		Date of mailing of the international search report 10 FEBRUARY 2012 (10.02.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer NOH, Eun Joo Telephone No. 82-42-481-8368 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/001018**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☒ Claims Nos.: 1-41
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-41 pertain to a method for detecting a pathogenic bacteria in a subject, a method for diagnosing a pathophysiological condition in a subject or a diagnostic method for detecting a mycobacterial infection in a subject. The said methods are thus considered diagnostic methods falling into the category of methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods [Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv)].
2. ☐ 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:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/001018

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0047172 A1	25.02.2010	AU 2009-280078 A1 CA 2732748 A1 EP 2318834 A2 IL 211063D0 KR 10-2011-0081147 A MX 2011001423 A US 2011-0020240 A1 WO 2010-016911 A2 WO 2010-016911 A3 WO 2011-152883 A2	11.02.2010 11.02.2010 11.05.2011 28.04.2011 13.07.2011 27.04.2011 27.01.2011 11.02.2010 24.06.2010 08.12.2011
US 7427680 B2	23.09.2008	AU 1996-55266 B2 CA 2215310 C CN 1066731 C CN 1184479 A CN 1184479 G0 CN 1296078 A0 CN 1296078 G0 EP 0817785 A2 EP 0817785 A2 EP 0817785 B1 EP 0982398 A1 EP 0982398 B1 EP 1405922 A2 EP 1405922 A3 EP 1405922 B1 JP 03-633940 B2 JP 03-856807 B2 JP 11-502714 A JP 2005-021172 A US 05741657A A US 05955604A A US 2003-0003526 A1 US 2003-0119085 A1 US 2005-0118669 A1 US 2005-0181469 A1 US 2007-0020715 A1 US 2007-0184513 A1 US 6291162 B1 US 6472205 B1 US 7157575 B2 US 7396926 B2 US 8071761 B2 WO 2006-085978 A2 WO 2006-085978 A3 WO 96-30540 A3	17.08.2000 21.05.2002 06.06.2001 10.06.1998 10.06.1998 23.05.2001 03.08.2005 14.01.1998 08.03.2000 04.04.2001 01.03.2000 05.11.2003 07.04.2004 29.09.2004 24.08.2011 30.03.2005 13.12.2006 09.03.1999 27.01.2005 21.04.1998 21.09.1999 02.01.2003 26.06.2003 02.06.2005 18.08.2005 25.01.2007 09.08.2007 18.09.2001 29.10.2002 02.01.2007 08.07.2008 06.12.2011 17.08.2006 17.08.2006 03.10.1996
WO 2005-040412 A1	06.05.2005	SE030284000	29.10.2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/US2011/001018

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 05514561A A	07.05.1996	CA 2087694 C	04.04.2000
		EP 0553741 A2	04.08.1993
		EP 0553741 A3	18.11.1993
		EP 0553741 B1	23.08.2000
		US 05338843A A	16.08.1994
		US 05514561A A	07.05.1996
		US 05516902A A	14.05.1996
		US 05583217A A	10.12.1996

フロントページの続き

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

(72)発明者 シリーロ, ジェフリー, ディー.

アメリカ合衆国 77845 テキサス州 カレッジ・ステーション ロングソープ・コート 4
407

(72)発明者 サチェッティニ, ジェームス, シー.

アメリカ合衆国 77845 テキサス州 カレッジ・ステーション ブルー・リッジ・ドライブ
5720

(72)発明者 ラオ, ジャンホン

アメリカ合衆国 94087 カリフォルニア州 サニーベール ホレンベック・アベニュー 1
017

(72)発明者 シエ, ヘキシン

アメリカ合衆国 94043 カリフォルニア州 マウンテン・ビュー アプト. 14 コロニー
・ストリート 2005

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB02 CC01 FA01

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ06 QQ30 QR58 QS26 QS36 QS39 QX02