

(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2019-508684  
(P2019-508684A)

(43) 公表日 平成31年3月28日(2019.3.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 H O 4 5
C 4 O B 40/10 (2006.01)	C 4 O B 40/10	
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-537822 (P2018-537822)  
 (86) (22) 出願日 平成29年1月18日 (2017.1.18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月19日 (2018.9.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/071462  
 (87) 国際公開番号 WO2017/125007  
 (87) 国際公開日 平成29年7月27日 (2017.7.27)  
 (31) 優先権主張番号 201610034476.6  
 (32) 優先日 平成28年1月20日 (2016.1.20)  
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 510183280  
 シャアメン ユニバーシティ  
 中華人民共和国 361005 フージェン  
 プロヴィンス、シャアメン、スーミン  
 ディストリクト、スーミン ナン  
 ロード ナンバー422  
 (71) 出願人 508198258  
 ベイジン ワンタイ バイオロジカル  
 ファーマシー エンタープライズ カンパ  
 ニー、リミテッド  
 中国、ベイジン 102206、チャ  
 ンピン ディストリクト、ケシュユアン  
 ロード ナンバー31  
 (74) 代理人 110000855  
 特許業務法人浅村特許事務所  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活動性結核の診断のための方法及びキット

(57) 【要約】

対象が活動性結核に罹患しているかどうかを診断するための方法、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定するための方法、活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングするための方法、ならびに特異的刺激薬及びIL-6のレベルを検出するための試薬を含むキットが開示されており、当該方法及びキットは、分子生物学、免疫学及び疾患の診断の分野に属する。

【選択図】なし

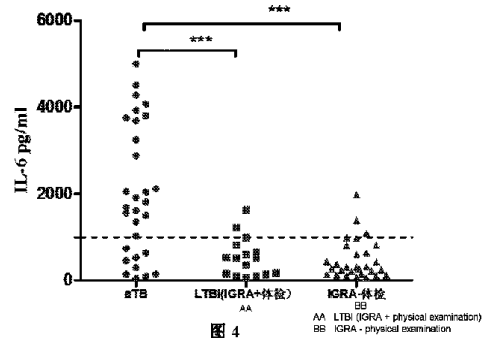


図 4

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

RV0183、P1cD、又はその抗原性フラグメントのうちの1つ又は2つ以上、及びIL-6を検出することのできる試薬を含むキットであって、以下を含むもの；

好ましくは、前記RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は、前記P1cDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記キットは、RV0183及び/又はP1cDを含み、

好ましくは、前記キットは、RV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントを含み、より好ましくは、前記抗原性フラグメントは、配列番号5～25から選択されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記キットは、配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含み、任意に、前記キットは、以下の抗原性フラグメントの組み合わせをさらに含み：

1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、

2) 配列番号7～8及び11～12に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、

3) 配列番号5～7、11～12、22、及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は

4) 配列番号5、8～10、12、15、及び22～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、

好ましくは、前記キットは、配列番号5～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含み、

好ましくは、IL-6を検出することのできる前記試薬は、IL-6へ特異的に結合することのできる物質、例えば、抗体、ターゲティングポリペプチド又はアプタマーであり、任意に、前記試薬はさらに、検出可能な標識を含み、

好ましくは、前記試薬は、免疫学的アッセイによって前記試料におけるIL-6のレベルを測定し、より好ましくは、前記免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択され、

好ましくは、前記試薬は、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、より好ましくは、前記試薬は、IL-6のレベルをELISAによって測定し、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体であり、

好ましくは、前記キットはさらに、1)～5)、すなわち

1) 血液収集装置、例えば、発熱物質非含有真空血液収集管、

2) 抗凝血剤、例えば、ヘパリン、

3) 培養溶液又は培地、

4) 非特異的刺激薬、例えば、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンA、

5) 希釈剤、例えば、リン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液

から選択される1つ又は2つ以上の装置又は試薬を含み、

好ましくは、前記キットは、活動性結核を診断し、かつ活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定し又は活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングするために有用である。

## 【請求項2】

活動性結核を診断するためのキットの製造における特異的刺激薬の使用であって、前記特異的刺激薬は、RV0183、P1cD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択された1つ又は2つ以上であり、以下を含むもの；

好ましくは、前記RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は、前記P1cDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記特異的刺激薬は、RV0183、P1cD、及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、

好ましくは、前記特異的刺激薬は、RV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントを含

10

20

30

40

50

み、より好ましくは、前記抗原性フラグメントは、配列番号5～25から選択されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記特異的刺激薬は、配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含み、任意に、前記特異的刺激薬は、次の抗原性フラグメント、すなわち

- 1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号7～8及び11～12に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号5～7、11～12、22、及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は

4) 配列番号5、8～10、12、15、及び22～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント

の組み合わせをさらに含み、

好ましくは、前記特異的刺激薬は、配列番号5～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含み、

好ましくは、前記キットは、IL-6へ特異的に結合することのできる抗体、ターゲティングポリペプチド又はアプタマーなど、IL-6を検出することのできる試薬を含み、任意に、前記試薬はさらに、検出可能な標識を含み、

好ましくは、前記試薬は、免疫学的アッセイによって前記試料におけるIL-6のレベルを測定し、より好ましくは、前記免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択され、

好ましくは、前記試薬は、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、より好ましくは、前記試薬は、IL-6のレベルをELISAによって測定し、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体であり、

好ましくは、前記キットはさらに、1)～5)、すなわち

- 1) 血液収集装置、例えば、発熱物質非含有真空血液収集管、
- 2) 抗凝血剤、例えば、ヘパリン、
- 3) 培養溶液又は培地、
- 4) 非特異的刺激薬、例えば、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンA、
- 5) 希釈剤、例えば、リン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液

から選択される1つ又は2つ以上の装置又は試薬を含み、

好ましくは、前記キットは、前記対象が活動性結核に罹患しているかどうかを、次のステップ、すなわち、

(1) 前記対象由来の少なくとも1つの試料を特異的刺激薬を用いて刺激しかつ前記少なくとも1つの試料を検査試料として使用すること、及び前記対象由来の非刺激試料を陰性対照試料として使用することであって、前記特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

(2) IL-6を検出することのできる試薬を使用すること、及び検査試料と陰性対照試料の間のIL-6のレベルにおける差異値を算出することによって、ステップ(1)における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、ならびに

(3) 前記差異値を基準値と比較すること、又は前記差異値を統計分析へ供して、統計分析値を得ること、及び前記統計分析値を基準値と比較すること、及び前記対象が活動性結核に罹患しているかどうかを判定すること

を含む方法によって診断し、

前記試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球、又は末梢血パフィーコートを含み、

好ましくは、前記ステップ(3)において、前記差異値の統計分析は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって実施され、より好ましくは、ステップ(3)において、前記差異値の統計

10

20

30

40

50

分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施され、

好ましくは、ステップ(1)において、前記対象由来の1つ又は2つ以上の試料を、少なくとも2つの特異的刺激薬と一緒に又は個別に用いて刺激し、及び前記1つ又は2つ以上の試料を前記検査試料として用い、前記特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択され、より好ましくは、ステップ(1)において、少なくとも2つの試料をRV0183とPlcDとで個別に刺激し、及び前記少なくとも2つの試料を検査試料として使用することであって、前記特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択されること、より好ましくは、ステップ(1)において、少なくとも2つの試料をRV0183及びPlcDを個別に用いて刺激し、前記少なくとも2つの試料を前記検査試料として使用すること、あるいは前記ス

10

ステップ(1)において、少なくとも1つの試料をRV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントと一緒に用いて刺激し、前記少なくとも1つの試料を前記検査試料として使用すること、

好ましくは、前記ステップ(1)はさらに、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激すること、及び前記少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することを含み、より好ましくは、前記非特異的刺激薬は、フィトヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含み、

好ましくは、前記ステップ(1)の前に、前記方法はさらに、次のステップ、すなわち(a)血液収集装置を用いることによって、前記対象から前記試料を得ること、(b)前記血液収集装置を又は前記対象由来の前記試料を抗凝血剤を用いて処理すること、(c)前記対象由来の前記試料を培養溶液又は培地を用いて処理すること、及び(d)前記対象由来の前記試料を希釈剤で希釈すること、のうちの1つ又は2つ以上を含む。

20

#### 【請求項3】

活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定するためのキットの製造における特異的刺激薬の使用であって、前記特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であり、以下を含むもの；

好ましくは、前記RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は、前記PlcDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、

30

好ましくは、前記特異的刺激薬は、RV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントを含み、より好ましくは、前記抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記特異的刺激薬は、配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含み、任意に、前記特異的刺激薬は、次の抗原性フラグメント、すなわち

- 1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号7~8及び11~12に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号5~7、11~12、22、及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
- 4) 配列番号5、8~10、12、15、及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント

40

の組み合わせをさらに含み、

好ましくは、前記特異的刺激薬は、配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含み、

好ましくは、前記キットは、IL-6へ特異的に結合することのできる抗体、ターゲティングポリペプチド又はアプタマーなど、IL-6を検出することのできる試薬を含み、任意に、前記試薬はさらに、検出可能な標識を含み、

好ましくは、前記試薬は、免疫学的アッセイによって前記試料におけるIL-6のレベルを測定し、より好ましくは、前記免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、

50

ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択され、

好ましくは、前記試薬は、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、より好ましくは、前記試薬は、IL-6のレベルをELISAによって測定し、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体であり、

好ましくは、前記キットはさらに、1)~5)、すなわち

1) 血液収集装置、例えば、発熱物質非含有真空血液収集管、

2) 抗凝血剤、例えば、ヘパリン、

3) 培養溶液又は培地、

4) 非特異的刺激性薬、例えば、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンA、

5) 希釈剤、例えば、リン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液

10

から選択される1つ又は2つ以上の装置又は試薬を含み、

好ましくは、前記キットは、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を、次のステップ、すなわち、

(1) 前記療法を対象へ投与する前に、前記対象由来の少なくとも2つの試料を療法前試料として得ること、

(2) 前記対象由来の少なくとも1つの療法前試料を、特異的刺激性薬を用いて刺激し、前記少なくとも1つの療法前試料を検査試料として使用すること、及び前記対象由来の少なくとも1つの非刺激性療法前試料を陰性対照試料として使用し、前記特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

20

(3) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、前記検査試料と前記陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第一の差異値として算出することによって、前記ステップ(2)における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、

(4) 前記療法を前記対象へ投与すること、

(5) 前記療法を前記対象へ投与した後、少なくとも2つの試料を前記対象から療法後試料として得ること、

(6) 前記対象由来の少なくとも1つの療法後試料を特異的刺激性薬で刺激すること、ならびに前記少なくとも1つの療法後試料を検査試料として使用すること、ならびに前記対象由来の少なくとも1つの非刺激性療法後試料を陰性対照試料として使用することであって、前記特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

30

(7) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、前記検査試料と前記陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第二の差異値として算出することによって、前記ステップ(6)における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、

(8) 前記第二の差異値を前記第一の差異値と比較すること、又は前記第一の差異値及び前記第二の差異値を統計分析へ個別に供して、前記第一の差異値の統計分析値及び前記第二の差異値の統計分析値を得ること、ならびに前記第二の差異値の前記統計分析値を前記第一の差異値の前記統計分析値と比較して、前記療法が活動性結核の治療において有効であるかどうかを判定すること

40

を含む方法によって活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定し、前記試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球(PBMC)、又は末梢血パフィーコートを含み、

好ましくは、前記ステップ(8)において、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の統計分析は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって実施され、より好ましくは、ステップ(8)において、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施され、

好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)において、前記療法前試料及び前記療法

50

後試料を同じ処理へ供し、好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)において、前記対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激性薬と一緒に又は個別に刺激して、前記1つ又は2つ以上の試料を検査試料として使用することによって、前記特異的刺激性薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択されること、より好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも2つの試料をRV0183及びPlcDで個別に刺激して、前記少なくとも2つの試料を前記検査試料として用いること、あるいは、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも1つの試料をRV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントと一緒に刺激して、前記少なくとも1つの試料を前記検査試料として使用することによって、

好ましくは、前記対象は、ヒトなどの哺乳類であり、

10

好ましくは、前記療法は、イソニアジド、リファンピシン、ストレプトマイシン、ピラジナミド、エタンブトール又はこれらの何らかの組み合わせなどの抗結核薬を前記対象へ投与することを含み、

好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)はさらに、少なくとも1つの試料を非特異的刺激性薬で刺激して、前記少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することを含み、より好ましくは、前記非特異的刺激性薬は、フィトヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含み、

好ましくは、前記ステップ(1)において、前記対象由来の前記療法前試料は、血液収集装置を用いることによって得られ、

好ましくは、前記ステップ(5)において、前記対象由来の前記療法後試料は、血液収集装置を用いることによって得られ、

20

好ましくは、前記ステップ(1)の前に、前記方法はさらに、次のステップ、すなわち(a)前記血液収集装置又は前記対象由来の前記試料を抗凝固剤で処理すること、(b)前記対象由来の試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(c)前記対象由来の前記試料を希釈剤で希釈することのうち1つ又は2つ以上を含み、

好ましくは、前記ステップ(5)の前に、前記方法はさらに、次のステップ、すなわち(a)前記血液収集装置又は前記対象由来の前記試料を抗凝固剤で処理すること、(b)前記対象由来の前記試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(c)前記対象由来の前記試料を希釈剤で希釈すること、を含む。

#### 【請求項4】

30

活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングするためのキットの製造における特異的刺激性薬の使用によって、前記特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であり、以下を含むもの；

好ましくは、前記RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は前記PlcDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの組み合わせからなる群から選択され、

好ましくは、前記特異的刺激性薬は、RV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントからなる群から選択され、より好ましくは、前記抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有し、

40

好ましくは、前記特異的刺激性薬は、配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含み、任意に、前記特異的刺激性薬はさらに、次の抗原性フラグメント、すなわち、

1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、

2) 配列番号7~8及び11~22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、

3) 配列番号5~7、11~12、22及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は

4) 配列番号5、8~10、12、15及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、

の組み合わせを含み、

50

好ましくは、前記特異的刺激薬は、配列番号5～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含み、

好ましくは、前記キットは、IL-6へ特異的に結合できる抗体、ターゲティングポリペプチド又はアプタマーなど、IL-6を検出することのできる試薬を含み、任意に、前記試薬はさらに、検出可能な標識を含み、

好ましくは、前記試薬は、免疫学的アッセイによって前記試料におけるIL-6のレベルを測定し、より好ましくは、前記免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Epispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択され、

好ましくは、前記試薬は、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、より好ましくは、前記試薬は、IL-6のレベルをELISAによって測定し、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体であり、

好ましくは、前記キットは、1)～5)、すなわち

1) 血液収集装置、例えば、発熱物質非含有真空血液収集管、

2) 抗凝血剤、例えば、ヘパリン、

3) 培養溶液又は培地、

4) 非特異的刺激薬、例えば、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンA、

5) 希釈剤、例えば、リン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液

から選択される1つ又は2つ以上の装置又は試薬をさらに含み、

好ましくは、前記キットは、次のステップ、すなわち

(1) 前記候補薬をモデル動物へ投与する前に、前記動物由来の少なくとも2つの試料を療法前試料として得ること、

(2) 前記動物由来の少なくとも1つの療法前試料を、特異的刺激薬を用いて刺激し、前記少なくとも1つの療法前試料を検査試料として使用すること、及び前記動物由来の少なくとも1つの非刺激療法前試料を陰性対照試料として使用し、前記特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

(3) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、前記検査試料と前記陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第一の差異値として算出することによって、前記ステップ(2)における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、

(4) 前記候補薬を前記動物へ投与すること、

(5) 前記候補薬を前記動物へ投与した後、少なくとも2つの試料を前記動物から療法後試料として得ること、

(6) 前記動物由来の少なくとも1つの療法後試料を特異的刺激薬で刺激すること、ならびに前記少なくとも1つの療法後試料を検査試料として使用すること、ならびに前記対象由来の少なくとも1つの非刺激療法後試料を陰性対照試料として使用することであって、前記特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

(7) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、前記検査試料と前記陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第二の差異値として算出することによって、前記ステップ(6)における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、

(8) 前記第二の差異値を前記第一の差異値と比較すること、又は前記第一の差異値及び前記第二の差異値を統計分析へ個別に供して、前記第一の差異値の統計分析値及び前記第二の差異値の統計分析値を得ること、ならびに前記第二の差異値の前記統計分析値を前記第一の差異値の前記統計分析値と比較して、前記療法が活動性結核の治療において有効であるかどうかを判定すること、

を含む方法によって活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングし、

前記試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球(PBMC)、又は末梢血パフィーコートを含み、

好ましくは、前記ステップ(8)において、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の

10

20

30

40

50

統計分析は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析（LDA）モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析（PAM）からなる群から選択される統計モデルを用いることによって実施され、より好ましくは、ステップ（8）において、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施され、

好ましくは、ステップ（2）及びステップ（6）において、前記療法前試料及び前記療法後試料を同じ処理へ供し、好ましくは、ステップ（2）及びステップ（6）において、前記対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激薬と一緒に又は個別に刺激して、前記1つ又は2つ以上の試料を検査試料として使用することであって、前記特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択されること、より好ましくは、ステップ（2）及びステップ（6）において、少なくとも2つの試料をRV0183及びPlcDで個別に刺激して、前記少なくとも2つの試料を前記検査試料として用いること、あるいは、ステップ（2）及びステップ（6）において、少なくとも1つの試料をRV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントと一緒に刺激して、前記少なくとも1つの試料を前記検査試料として使用することであって、

好ましくは、前記対象は、非ヒト哺乳類、例えば、マウス、モルモット、ウサギ、又は非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル又はアカゲザル）であり、

好ましくは、前記対象は、ヒトなどの哺乳類であり、

好ましくは、ステップ（2）及びステップ（6）はさらに、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激して、前記少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することを含み、より好ましくは、前記非特異的刺激薬は、フィトヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含み、

好ましくは、前記ステップ（1）において、前記対象由来の前記療法前試料は、血液収集装置を用いることによって得られ、

好ましくは、前記ステップ（5）において、前記対象由来の前記療法後試料は、血液収集装置を用いることによって得られ、

好ましくは、前記ステップ（1）の前に、前記方法はさらに、次のステップ、すなわち（a）前記血液収集装置又は前記対象由来の前記試料を抗凝血剤で処理すること、（b）前記対象由来の試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び（c）前記対象由来の前記試料を希釈剤で希釈することのうちの1つ又は2つ以上を含み、

好ましくは、前記ステップ（5）の前に、前記方法はさらに、次のステップ、すなわち、（a）前記血液収集装置又は前記対象由来の前記試料を抗凝血剤で処理すること、（b）前記対象由来の前記試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び（c）前記対象由来の前記試料を希釈剤で希釈すること、のうちの1つ又は2つ以上を含む。

#### 【請求項5】

以下のステップを含む、対象が活動性結核に罹患しているかどうかを診断するための方法：

（1）前記対象由来の少なくとも2つの試料を提供すること、

（2）前記対象由来の少なくとも1つの試料を特異的刺激薬で刺激して、前記少なくとも1つの試料を検査試料として用いること、ならびに非刺激試料を陰性対照試料として使用し、前記特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

（3）前記ステップ（2）における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定し、前記検査試料と前記陰性対照試料の間のIL-6のレベルにおける差異値を算出すること、ならびに

（4）前記差異値を基準値と比較すること、又は前記差異値を統計分析へ供して統計分析値を得ること、ならびに前記統計分析値を基準値と比較すること、ならびに前記対象が活動性結核に罹患しているかどうかを判定すること、であって、以下を含むもの；

好ましくは、前記対象は、ヒトなどの哺乳類であり、

好ましくは、ステップ（2）及びステップ（6）はさらに、少なくとも1つの試料を非特

10

20

30

40

50

異的刺激薬で刺激して、前記少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することを  
 含み、より好ましくは、前記非特異的刺激薬は、フィトヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含み、

好ましくは、前記ステップ(1)において、前記対象由来の前記療法前試料は、血液収  
 集装置を用いることによって得られ、

好ましくは、前記ステップ(5)において、前記対象由来の前記療法後試料は、血液収  
 集装置を用いることによって得られ、

好ましくは、前記ステップ(1)の前に、前記方法はさらに、以下のステップのうちの1  
 つまたは2つ以上を含む：(a)前記血液収集装置又は前記対象由来の前記試料を抗凝血剤  
 で処理すること、(b)前記対象由来の試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(c)  
 )前記対象由来の前記試料を希釈剤で希釈することのうちの1つ又は2つ以上を含み、

好ましくは、前記ステップ(5)の前に、前記方法はさらに、次のステップ、すなわち  
 、(a)前記血液収集装置又は前記対象由来の前記試料を抗凝血剤で処理すること、(b)  
 前記対象由来の前記試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(c)前記対象由来の  
 前記試料を希釈剤で希釈すること。

#### 【請求項6】

以下のステップを含む、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定するための方法：

(1)前記療法を対象へ投与する前に、少なくとも2つの試料を前記対象から療法前試料  
 として得ること、

(2)前記対象由来の少なくとも1つの療法前試料を特異的刺激薬で刺激し、前記少なく  
 とも1つの療法前試料を検査試料として用いること、及び前記対象由来の少なくとも1つの  
 非刺激療法前試料を陰性対照試料として使用し、前記特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及  
 びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

(3)前記ステップ(2)における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること  
 、及び前記検査試料と前記陰性対照試料の間のIL-6の前記レベルにおける差異値を第一の  
 差異値として算出すること、

(4)前記療法を前記対象へ投与すること、

(5)前記療法を前記対象へ投与した後、前記対象由来の少なくとも2つの試料を療法後  
 試料として得ること、

(6)前記対象由来の少なくとも1つの療法後試料を特異的刺激薬で刺激し、前記少なく  
 とも1つの療法後試料を検査試料として使用すること、及び前記対象由来の少なくとも1つ  
 の非刺激療法後試料を陰性対照試料として用い、前記特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及  
 びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

(7)IL-6を検出することのできる試薬を用いて、前記検査試料と前記陰性対照試料の  
 間のIL-6レベルの差異値を第二の差異値として算出することによって、前記ステップ(6  
 )における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、ならびに

(8)前記第二の差異値を前記第一の差異値と比較すること、又は前記第一の差異値及  
 び前記第二の差異値を統計分析へ個別に供して、前記第一の差異値の統計分析値及び前記  
 第二の差異値の統計分析値を得ること、ならびに前記第二の差異値の前記統計分析値を前  
 記第一の差異値の前記統計分析値と比較して、前記療法が活動性結核の治療において有効  
 であるかどうかを判定すること；であって、以下を含む；

前記試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)  
 、末梢血単核球(PBMC)、又は末梢血パフィーコートを含み、

好ましくは、前記ステップ(8)において、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の  
 統計分析は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分  
 析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選  
 択される統計モデルを用いることによって実施され、より好ましくは、ステップ(8)に  
 おいて、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モ  
 デルを用いることによって実施され、

好ましくは、前記RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、及び/又は前

10

20

30

40

50

記P1cDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記抗原性フラグメントは、RV0183の抗原性フラグメントであり、より好ましくは、前記抗原性フラグメントは、配列番号5～25から選択されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記対象は、ヒトなどの哺乳類であり、

好ましくは、前記療法は、イソニアジド、リファンピシン、ストレプトマイシン、ピラジナミド、エタンブール又はこれらの何らかの組み合わせなどの抗結核薬を前記対象へ投与することを含み、

好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)において、前記療法前試料及び前記療法後試料を同じ処理へ供し、好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)において、前記対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激性薬と一緒に又は個別に刺激して、前記1つ又は2つ以上の試料を検査試料として使用することであって、前記特異的刺激性薬は各々独立して、RV0183、P1cD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択されることであって、

好ましくは、前記ステップ(2)及び前記ステップ(6)において、少なくとも2つの試料をRV0183及びP1cDで個別に刺激して、前記少なくとも2つの試料を前記検査試料として用いること、あるいは、前記ステップ(2)及び前記ステップ(6)において、少なくとも1つの試料を前記抗原性フラグメントと一緒に刺激して、前記少なくとも1つの試料を前記検査試料として使用すること、より好ましくは、前記ステップ(2)及び前記ステップ(6)において、少なくとも1つの試料を以下の抗原性フラグメントの組み合わせで刺激すること：

- 1) 配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
  - 2) 配列番号5、11、13～14、19及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
  - 3) 配列番号7～8及び11～14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
  - 4) 配列番号5～7、11～14、19、22、及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
  - 5) 配列番号5、8～10、12、15、及び22～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
  - 6) 配列番号5～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- の組み合わせで刺激して、前記少なくとも1つの試料を検査試料として使用すること；であって、以下を含む；

好ましくは、前記ステップ(3)において、前記試料におけるIL-6のレベルは、免疫学的アッセイによって測定され、より好ましくは、前記免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択され、

好ましくは、前記ステップ(3)において、前記IL-6のレベルは、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを使用することによって、例えば、ELISAによって測定され、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体であり、

好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)はさらに、少なくとも1つの試料を非特異的刺激性薬で刺激して、前記少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することを含み、より好ましくは、前記非特異的刺激性薬は、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含み、

好ましくは、前記ステップ(1)の前に、前記方法は、以下のステップのうちの1つ又は2つ以上をさらに含む：(a)ヘパリンなどの抗凝血剤を前記療法前試料へと添加すること、(b)前記療法前試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(c)培養溶液又は培地を前記療法前試料へと添加すること、及び(d)前記療法前試料を希釈すること、のうちの1つ又は2つ以上を含む、

10

20

30

40

50

好ましくは、前記ステップ(5)の前に、前記方法は、以下のステップのうちの1つ又は2つ以上をさらに含む：(a)ヘパリンなどの抗凝血剤を前記療法後試料へ添加すること、(b)前記療法後試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(c)培養溶液又は培地を前記療法後試料へ添加すること、及び(d)前記療法後試料を希釈すること。

【請求項7】

以下のステップを含む、活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングするための方法：

(1)前記候補薬をモデル動物へ投与する前に、前記動物由来の少なくとも2つの試料を療法前試料として得ること、

(2)前記動物由来の少なくとも1つの療法前試料を、特異的刺激性薬を用いて刺激し、前記少なくとも1つの療法前試料を検査試料として使用すること、及び前記動物由来の少なくとも1つの非刺激性療法前試料を陰性対照試料として使用し、前記特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

(3)前記ステップ(2)における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定し、前記検査試料と前記陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第一の差異値として算出すること、

(4)前記候補薬を前記動物へ投与すること、

(5)前記候補薬を前記動物へ投与した後、少なくとも2つの試料を前記動物から療法後試料として得ること、

(6)前記動物由来の少なくとも1つの療法後試料を特異的刺激性薬で刺激し、前記少なくとも1つの療法後試料を検査試料として使用すること、ならびに前記動物由来の少なくとも1つの非刺激性療法後試料を陰性対照試料として使用し、前記特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

(7)IL-6を検出することのできる試薬を用いて、前記検査試料と前記陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第二の差異値として算出することによって、前記ステップ(6)における前記試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、ならびに

(8)前記第二の差異値を前記第一の差異値と比較すること、又は前記第一の差異値及び前記第二の差異値を統計分析へ個別に供して、前記第一の差異値の統計分析値及び前記第二の差異値の統計分析値を得ること、ならびに前記第二の差異値の前記統計分析値を前記第一の差異値の前記統計分析値と比較して、前記療法が活動性結核の治療において有効であるかどうかを判定すること；であって、以下を含む；

前記試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球(PBMC)、又は末梢血パフィーコートを含み、

好ましくは、前記ステップ(8)において、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の統計分析は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって実施され、より好ましくは、ステップ(8)において、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施され、

好ましくは、前記RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は前記PlcDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記抗原性フラグメントは、RV0183の抗原性フラグメントであり、より好ましくは、前記抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有し、

好ましくは、前記モデル動物は、非ヒト哺乳類、例えば、マウス、モルモット、ウサギ、又は非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル又はアカゲザル)であり、

好ましくは、前記対象は、ヒトなどの哺乳類であり、

10

20

30

40

50

好ましくは、前記ステップ(2)及び前記ステップ(6)において、前記療法前試料及び前記療法後試料を同じ処理へ供し、好ましくは、前記ステップ(2)及び前記ステップ(6)において、前記対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激薬と一緒に又は個別に刺激して、前記1つ又は2つ以上の試料を検査試料として使用し、前記特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択されること、

好ましくは、前記ステップ(2)及び前記ステップ(6)において、少なくとも2つの試料をRV0183及びPlcDで個別に刺激して、前記少なくとも2つの試料を前記検査試料として用いること、あるいは、前記ステップ(2)及び前記ステップ(6)において、少なくとも1つの試料をRV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントと一緒に刺激して、前記少なくとも1つの試料を前記検査試料として使用すること、より好ましくは、前記ステップ(2)及び前記ステップ(6)において、少なくとも1つの試料を以下の抗原性フラグメントの組み合わせと一緒に刺激して、前記少なくとも1つの試料を前記検査試料として使用すること：

1) 配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、  
2) 配列番号5、11、13~14、19及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、

3) 配列番号7~8、11~14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント

4) 配列番号5~7、11~14、19、22及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、

5) 配列を5、8~10、12~15、19及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は

6) 配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント；であって、以下を含む；

好ましくは、前記ステップ(3)において、前記試料におけるIL-6のレベルは、免疫学的アッセイによって測定され、より好ましくは、前記免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択され、

好ましくは、前記ステップ(3)において、前記IL-6のレベルは、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを使用することによって、例えば、ELISAによって測定され、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり、

好ましくは、前記抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体であり、

好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)はさらに、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激して、前記少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することを含み、より好ましくは、前記非特異的刺激薬は、フィトヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含み、

好ましくは、前記ステップ(1)の前に、前記方法は、以下のステップのうちの1つ又は2つ以上をさらに含み：(a)ヘパリンなどの抗凝血剤を前記療法前試料へと添加すること、(b)前記療法前試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(c)培養溶液又は培地を前記療法前試料へと添加すること、及び(d)前記療法前試料を希釈すること、ならびに

好ましくは、前記ステップ(5)の前に、前記方法は、以下のステップのうちの1つ又は2つ以上をさらに含む：(a)ヘパリンなどの抗凝血剤を前記療法後試料へと添加すること、(b)前記療法後試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(c)培養溶液又は培地を前記療法後試料へと添加すること、及び(d)前記療法後試料を希釈すること。

#### 【請求項8】

以下を含む、ポリペプチドライブラリ：

配列番号13に示されるアミノ酸配列を有する第一のペプチド、

10

20

30

40

50

配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する第二のペプチド、及び  
配列番号19に示されるアミノ酸配列を有する第三のペプチド、  
であって、任意に、前記ポリペプチドライブラリは、以下のポリペプチドの組み合わせを  
さらに含み：

- 1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- 2) 配列番号7～8及び11～12に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- 3) 配列番号5～7、11～12、22及び24に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、  
又は
- 4) 配列番号5、8～10、12、15及び22～25に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチ  
ド；以下を含む；

10

好ましくは、前記ポリペプチドライブラリは、配列番号5～25に示されるアミノ酸配列  
を有する抗原性フラグメントを含み、

好ましくは、前記ポリペプチドライブラリは、試料におけるIL-6の発生を誘導すること  
ができ、前記試料は、末梢血単核球（PBMC）、例えば、全血（例えば、凝固防止処理した  
全血）、末梢血単核球（PBMC）、又は末梢血パフィーコートを含み、

好ましくは、前記ポリペプチドライブラリは、活動性結核を診断するために、活動性結  
核に及ぼす療法の治療効果を判定するために、又は活動性結核を治療することのできる候  
補薬をスクリーニングするために有用である。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

#### 技術分野

本発明は、分子生物学、免疫学及び疾患の診断の分野に属する。特に、本発明は、対象  
が活動性結核に罹患しているかどうかを診断するための方法、活動性結核に及ぼす療法の  
治療効果を判定するための方法、及び活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリ  
ーニングするための方法に関する。本発明はさらに、特異的刺激性薬及びIL-6のレベルを検  
出するための試薬を含むキットに関する。

【0002】

#### 背景技術

マイコバクテリウム・ツベルクローシス（*Mycobacterium tuberculosis*（*M. tuberculo*  
*sis*））によって発症する慢性感染性疾患である結核（TB）は、世界中で非常に重症な健  
康問題である。世界中で毎年約900万人の新たなTB患者があり、最多170万人の人々が結核  
で死亡した。さらに、世界人口の約1/3が、潜伏活動性結核（aTB）患者の源である*M. tub*  
*erculosis*に潜在的に感染している。

30

【0003】

結核を制御するために主要なことは、感染性結核患者を発見及び治療させることである  
。そのことは、X線を臨床検査において適用した後、TB患者を発見するための単純で、簡  
便で、迅速で、高感度な方法を提供する。しかしながら、X線検出は、装置の必要性が高  
いこと、特異性が低いこと、及び過剰診断の割合の高いことなどの不利な点を有する。さ  
らに、X線検出は、肺における疑わしい影を検出することしかできないが、感染性患者を  
検出する目的を達成することはできない。それゆえ、集団における胸部X線検査による患  
者の積極的な発見が実行不可能であり、先進国だけでなく、発展途上国においても廃止さ  
れなければならないというWHO結核専門委員会の第9次報告書（1974）において明白に指摘  
されている

40

【0004】

喀痰スミア試験は、感染性TB患者を検出することができ、高い特異性、単純な装置、低  
コスト、及び低い技術的要求などの利点を有する。しかしながら、喀痰収集が難しいこと  
に関する問題もあり、例えば、多くの患者は、喀痰なしの乾燥した咳に苦しんでおり、又  
は喀痰に分泌される微量の細菌は検出されるのが容易ではない。広範に使用される喀痰ス  
ミア試験の感度は、34%～80%である。喀痰培養検査は、喀痰スミア試験よりも高感度で

50

あるが、長時間を要し、診断用実験室の必要性が高い。多数の結核患者を持つ多くの国々では、当該方法に必要とされる実験条件を満たすことができない。免疫アッセイ技術は、特に迅速な診断及びベッドサイドでの診断の実現後に、結核の診断において大いなる応用価値を有し得る。

【0005】

IFN- 放出アッセイ (IGRA) は、TBのために広範に使用されている免疫診断法である。M. tuberculosis感染の検出において適用する価値があることが立証されており、TST (ツベルクリン皮膚検査) よりも有意に優れている。しかしながら、IGRAもTSTも潜伏結核感染 (LTBI) を活動性結核と区別することはできない。多数の結核患者を持つ国々において、IGRAの適用は、潜在的に感染した人々の比率が高いことにより、制限されており、IGRAは、補助的な診断ツールとして使用されることができに過ぎない。診療所において通常使用される結核診断は今なお、臨床的症状、画像診断及び病因学的診断に主として依存している。結核が早期に正確かつ迅速に診断することができる場合、TB患者の害の減少及びTB感染の制御に対する大いなる価値があろう。

10

【0006】

それゆえ、活動性結核を単純に、簡便にかつ迅速に診断するための、高い正確性及び特異性を持つ方法を開発することは、当該分野における必要性である。

【0007】

本発明の内容

本発明において、別段の具体的な指定がない限り、本明細書で使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって概して理解されるような意味を有する。その上、本明細書で使用される細胞培養、生化学、核酸化学及び免疫学の実験操作は、対応する分野において広く使用されている常用操作である。その一方で、本発明をより良好に理解するために、関連用語の定義及び説明は、以下のように提供される。

20

【0008】

本明細書で使用する場合、「RV0183」又は「RV0183タンパク質」という用語は、モノアシルグリセロールリパーゼ (MAGL) 又はリゾホスホリパーゼに属するM. tuberculosisにおいて天然に生じるタンパク質を指す。RV0183タンパク質の配列は、当該技術分野で周知であり、種々の公共データベース (例えば、NCVIデータベースにおける受託番号CP009480.1、AIR12906.1、CCP42909.1、NP\_214697.2、又はWP\_003401112.1) において認めることができる。

30

【0009】

本発明において、RV0183のアミノ酸配列が記載されている場合、配列番号1に示されるアミノ酸配列に対する参照によって説明される。しかしながら、当業者は、M. tuberculosisが標準株H37Rvだけでなく、種々の単離株も含み、種々の単離株においてRV0183タンパク質のアミノ酸配列に差があり得ることを理解している。さらに、当業者は、配列に差があり得るものの、M. tuberculosisの異なる単離株由来のRV0183タンパク質がアミノ酸配列において非常に高い同一性を有し、かつ実質的に同じ生物学的機能を有することを理解している。加えて、当業者は、RV0183タンパク質のアミノ酸配列において、変異又は変化 (置換、欠失及び/又は付加を含むがこれらに限定しない) が、これらの生物学的機能に影響することなく、天然に生じ得又は人工的に導入され得ることを理解している。それゆえ、本発明において、「RV0183」という用語は、配列番号1に示されるタンパク質だけでなく、M. tuberculosisの種々の単離株由来のRV0183タンパク質 (例えば、BAL64025.1、A0E34503.1、EGE52872.1、又はCDM08372.1に示されるRV0183タンパク質)、及びこれらの天然の又は人工のパリアントも含む。その上、RV0183タンパク質の配列フラグメントを説明する場合、当該フラグメントは、配列番号1の配列フラグメントだけでなく、M. tuberculosisの種々の単離株由来のRV0183タンパク質の対応する配列フラグメント、及び配列番号1の天然の又は人工のパリアントの対応する配列フラグメントも含む。それゆえ、「RV0183タンパク質の位置1~20のアミノ酸残基」という表現は、配列番号1の位置1~20のアミノ酸残基、M. tuberculosisの種々の単離株由来のRV0183タンパク質の対応するフラグメ

40

50

ント、及びRV0183タンパク質の天然の又は人工のバリエーションの対応するフラグメントを含む。本発明において、「対応するフラグメント」という表現は、配列が最適化された整列へ供される場合、すなわち、配列が最高百分率の同一性を得るために整列させられる場合、当該配列の等価の位置にあるフラグメントを指す。

【0010】

本発明において、「RV0183」又は「RV0183タンパク質」という用語は、タンパク質合成のためのいかなる特定の方法によっても制限されることはなく、当業者によって公知の従来技術、例えば、組換えDNA技術又は化学合成技術によって生じることができる。

【0011】

本明細書で使用する場合、「PlcD」又は「PlcDタンパク質」という用語は、ホスホリパーゼCファミリーに属する*M. tuberculosis*において天然に生じるタンパク質を指す。PlcDタンパク質の配列は、当該技術において周知であり、例えば、Andersen STら, *Nature*, 1998, 393(6685): 537~544 (参照により本明細書に組み込まれる)、及びNCBIデータベースにおける受託番号CCP44521.1を参照されたい。

10

【0012】

本発明において、PlcDのアミノ酸配列が記載されている場合、配列番号3に示されるアミノ酸配列に対する参照によって説明される。しかしながら、当業者は、*M. tuberculosis*が標準株H37Rvだけでなく、種々の単離株も含み、種々の単離株においてRV0183タンパク質のアミノ酸配列に差があり得ることを理解している。さらに、当業者は、配列に差があり得るものの、*M. tuberculosis*の異なる単離株由来のPlcDタンパク質がアミノ酸配列において非常に高い同一性を有し、かつ実質的に同じ生物学的機能を有することを理解している。加えて、当業者は、PlcDタンパク質のアミノ酸配列において、変異又は変化（置換、欠失及び/又は付加を含むがこれらに限定しない）が、これらの生物学的機能に影響することなく、天然に生じ得又は人工的に導入され得ることを理解している。それゆえ、本発明において、「PlcD」という用語は、配列番号3に示されるタンパク質だけでなく、*M. tuberculosis*の種々の単離株由来のPlcDタンパク質、及びこれらの天然の又は人工のバリエーションも含む。その上、PlcDタンパク質の配列フラグメントを説明する場合、当該フラグメントは、配列番号3の配列フラグメントだけでなく、*M. tuberculosis*の種々の単離株由来のPlcDタンパク質の対応する配列フラグメント、及び配列番号3の天然の又は人工のバリエーションの対応する配列フラグメントも含む。本発明において、「対応するフラグメント」という表現は、配列が最適化された整列へ供される場合、すなわち、配列が最高百分率の同一性を得るために整列する場合、当該配列の等価の位置にあるフラグメントを指す。

20

30

【0013】

本発明において、「PlcD」又は「PlcDタンパク質」という用語は、タンパク質合成のためのいかなる特定の方法によっても制限されることはなく、当業者によって公知の従来技術、例えば、組換えDNA技術又は化学合成技術によって生じることができる。

【0014】

本明細書で使用する場合、「RV0183又はPlcDの抗原性フラグメント」という表現は、RV0183タンパク質又はPlcDタンパク質の切り詰めによって得られたアミノ酸配列フラグメント（すなわち、ポリペプチド）であって、対応する全長タンパク質と同じ生物活性、すなわち、aTB患者由来の末梢血を刺激して、IL-6を生じることにより、aTB集団を非aTB集団（例えば、潜伏結核感染に罹患している個体、慢性結核に罹患している患者又は結核感染に罹患していない個体）と識別するという能力を有する、アミノ酸配列フラグメント（すなわち、ポリペプチド）を指す。例えば、本発明において、配列番号5~25に示されるアミノ酸配列フラグメントは、RV0183の抗原性フラグメントである。本発明において、抗原性フラグメントは、ポリペプチドの合成のためのいかなる特定の方法によっても制限されることはなく、当業者によって公知の従来技術、例えば、組換えDNA技術又は化学合成技術によって生じることができる。

40

【0015】

本発明において、RV0183、PlcD、又はこれらの抗原性フラグメント（すなわち、ポリペ

50

プチド)は、組換えDNA技術によって得ることができ、例えば、これらのタンパク質又はポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから、無細胞発現系(無細胞発現系は、例えば、網膜球溶解液を基にした発現系、コムギ胚芽抽出物を基にした発現系、及びE. coli抽出物を基にした発現系を含む)を用いることによって得ることができ、又はこれらのタンパク質もしくはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドから、インビボ発現系(例えば、E. coli原核生物発現系、酵母真核生物発現系)を用いることによって得ることができる。代替例として、RV0183、PlcD、又はこれらの抗原性フラグメント(すなわち、ポリペプチド)は、化学合成によって生成することができる。タンパク質又はポリペプチドの化学的な合成全体については、当該技術分野で周知であり(例えば、参照により本明細書に組み込まれるRaibaut Lら, Top Curr Chem. 2015; 363: 103~154、Thapa Pら, Molecules. 2014; 19(9):14461~14483、Dawson PEら, Science, 1994; 266(5186): 776~779、及びWang Pら, Tetrahedron Lett, 1998, 39(47): 88711~88714)を参照されたい)、固相ペプチド合成(SPPS)又は液相セグメント連結反応合成(例えば、ネイティブ化学連結反応(NCL)、アジ化物法、移動性エステル縮合(Transfer Active Ester Condensation)(TAEC))を含むが、これらに限定されない。

10

## 【0016】

本明細書で使用する場合、「配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント」は、配列番号13に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、及び配列番号19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントの組み合わせを指す。他の類似の表現は、類似の意味を有する。

20

## 【0017】

本明細書で使用する場合、「IL-6を検出することのできる試薬」という用語は、IL-6へ特異的に結合することのできる物質を指す。このような物質は、当該技術分野で周知であり、又は当該技術分野で周知の方法によって調製されることができ、例えば、抗体、ターゲットポリペプチド又はアプタマーなどである。概して、このような試薬が免疫学的アッセイによって試料におけるIL-6のレベルを測定することができることは特に好ましい。免疫学的アッセイの使用は、抗原と抗体の間の特異的相互作用/結合親和性を利用するので、特に有利である。それゆえ、試薬がIL-6へ特異的に結合する反応性を保有する限り、当該試薬は、免疫学的アッセイによって試料におけるIL-6のレベルを測定することができる(すなわち、当該試薬は、IL-6を検出することのできる試薬として使用することができる)。IL-6へ特異的に結合する反応性を保有する種々の試薬は、当業者によって容易に想像することができ、簡単に得ることができ、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、IgG抗体又はIgM抗体など、IL-6に対するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を含むが、これらに限定されない。代替例として、IL-6を検出することのできる試薬は、参照により本明細書に組み込まれるPCT国際出願WO2014159669及び「Gupta Sら, J Biol Chem. 2014; 289(12): 8706~8719」において説明されるアプタマーを含むがこれらに限定されない、IL-6へ結合するアプタマーでもあり得る。

30

## 【0018】

本明細書で使用する場合、「特異的結合/特異的に結合する」という用語は、2つの分子(すなわち、結合分子及び標的分子)の間の非無作為的結合反応、例えば、抗体と、当該抗体が向かう抗原の間の反応を指す。2つの分子間の結合親和性は、 $K_D$ 値によって説明することができ、 $K_D$ 値は、 $k_d$ (特異的結合分子と標的分子との相互反応の解離速度であり、 $k_{off}$ とも呼ぶ)と $k_a$ (特異的結合分子と標的分子との相互作用の会合速度であり、 $k_{on}$ とも呼ぶ)の比である解離定数を指し、又はモル濃度(M)として表される $k_d/k_a$ を指す。 $K_D$ 値が低ければ低いほど、当該2つの分子の結合はより密接であり、親和性はより高い。いくつかの実施形態において、ある特定の抗原へ特異的に結合する抗体(又はある特定の抗原に特異的な抗体)は、当該抗体が約 $10^{-5}$ M未満の、例えば、約 $10^{-6}$ M未満、 $10^{-7}$ M未満、 $10^{-8}$ M未満、 $10^{-9}$ M未満もしくは $10^{-10}$ M未満又はこれらに満たない親和性( $K_D$ )で抗原へ結合することを意味する。 $K_D$ 値は、当該技術分野で周知の方法によって、例えば、BIACOR

40

50

E機における表面プラズモン共鳴 (SPR) によって測定することができる。

【 0 0 1 9 】

本明細書で使用する場合、「免疫学的アッセイ」という用語は、試料における特異的な抗原又は抗体の存在又はレベルを判定するために概して使用される、抗原と抗体の間の特異的相互作用 / 結合親和性を利用するアッセイを指す。このような免疫学的アッセイは、当業者に周知であり、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、表面プラズモン共鳴、及びこれらに類するものを含むが、それらに限定されない。免疫学的アッセイの詳細な説明は、例えば、Fundamental Immunology, 第7章 Paul, W. 編, 第2版, Raven Press, N.Y. (1989)において認めることができる。

【 0 0 2 0 】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は概して、2対のポリペプチド鎖 (各々軽 (L) 鎖及び重 (H) 鎖を有する) からなる免疫グロブリン分子を指す。抗体の軽鎖は、軽鎖及び 軽鎖へと分類され得る。重鎖は、それぞれIgM、IgD、IgG、IgA及びIgEとして抗体のアイソタイプを規定する  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$  及び  $\epsilon$  へと分類され得る。軽鎖及び重鎖において、可変部は、約12個又は13個以上のアミノ酸からなる「J」部を介して定常部へ連結され、重鎖は、約3個又は4個以上のアミノ酸からなる「D」部をさらに含む。各重鎖は、重鎖可変部 (VH) 及び重鎖定常部 (CH) からなる。重鎖定常部は、3つのドメイン (CH1、CH2及びCH3) からなる。各軽鎖は、軽鎖可変部 (VL) 及び軽鎖定常部 (CL) からなる。軽鎖定常部は、ドメインCLからなる。抗体の定常部は、免疫系の種々の細胞 (例えば、エフェクター細胞) 及び従来の補体系の第一の成分 (C1q) を含む宿主組織又は宿主因子への免疫グロブリンの結合を仲介することができる。VH部及びVL部は、比較的保存された領域 (フレームワーク領域 (FR) と呼ばれる) によって間を置かれた超可変部 (相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる) へと分割することもできる。各VH及びVLは、次の順序、すなわち、N末端からC末端へとFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4において3つのCDR及び4つのFRからなる。各重鎖 / 軽鎖対の可変部 (VH及びVL) はそれぞれ、抗原結合部位を形成する。各部又は各ドメインにおけるアミノ酸の分布は、免疫学的関心対象のタンパク質に関するKabat配列における定義 (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987及び1991))、又はChothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917、Chothia et al. (1989) Nature342:878-883に従っている。「抗体」という用語は、抗体を産生するためのいかなる特定の方法によっても制限されるものではない。例えば、抗体は、特に、組換え抗体、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を含む。抗体は、異なる抗体アイソタイプ、例えば、IgG抗体 (例えば、IgG1サブタイプ、IgG2サブタイプ、IgG3サブタイプ又はIgG4サブタイプ)、IgA1抗体、IgA2抗体、IgD抗体、IgE抗体又はIgM抗体であり得る。

【 0 0 2 1 】

本明細書で使用する場合、抗体の「抗原結合フラグメント」は、全長の抗体が抗原に対して特異的に結合するための全長の抗体へ結合して、これと競合する同じ抗原 (例えば、IL-6) へ結合する能力を保有する全長の抗体の1つ又は2つ以上の部分に関する。概して、すべての目的のために参照により本明細書に組み込まれるFundamental Immunology, 第7章 (Paul, W. 編, 第2版, Raven Press, N.Y. (1989)を参照されたい。抗原結合フラグメントは、組換えDNA技術によって又は未処置の抗体の酵素によるもしくは化学的な切断によって生成され得る。いくつかの条件下で、抗原結合フラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、dAbフラグメント及び相補性決定領域 (CDR) フラグメント、一本鎖抗体 (例えば、scFv)、キメラ抗体、二重特異性抗体、及びこのようなポリペプチドに及ぼす特異的抗原結合能を与えるのに十分な抗体の少なくとも一部分を含む当該ポリペプチドを含む。

【 0 0 2 2 】

本明細書で使用する場合、「アプタマー」という用語は、高い親和性及び高い特異性を有する標的タンパク質又は他の生物学的標的分子へ結合することのできる、かつステム・ループ、ヘアピン、シュードノット又はGテトラマーなどの熱力学的に安定した3次元構造

10

20

30

40

50

へと折りたためる、かつ相補性構造、塩基スタッキング力、ファンデルワールス力、水素結合又は静電相互作用を介して、標的タンパク質又は他の生物学的標的分子へ特異的に結合する、一本鎖オリゴヌクレオチドを指す。アプタマーは、DNA又はRNAであり得、核酸類似体（例えば、ロックされた核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、グリコール核酸（GNA）又はトレース核酸（TNA））を含み得る。特異的標的タンパク質へ結合するアプタマーを得るための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、SELEX（指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化）スクリーニング技術である。

#### 【0023】

本明細書で使用する場合、「ターゲティングポリペプチド」という用語は、標的タンパク質へ特異的に結合することのできるポリペプチド分子を指す。本発明において、ターゲティングポリペプチドは、天然アミノ酸、合成アミノ酸、又は天然アミノ酸が作用すると類似の様式で作用するアミノ酸模倣薬を含み得る。天然アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされかつ後に修飾されたアミノ酸であり、例えば、ヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -ヒドロキシグルタミン酸、O-ホスホセリン、ホスホトレオニン又はホスホチロシンである。本発明において、ターゲティングポリペプチドとその標的タンパク質の間の「特異性」は、親和性を基にして決定することができ、親和性は、ターゲティングポリペプチドとそこへ結合する標的タンパク質の間の解離平衡定数（すなわち、 $K_D$ 値）によって説明することができる。 $K_D$ 値が低ければ低いほど、ターゲティングポリペプチドとそこへ結合する標的タンパク質の間の結合はより密接である。約 $10^{-3}M$ を上回る $K_D$ 値は概して、結合がないこと又は非特異的結合とみなされることは、当該技術分野で周知である。特定の標的タンパク質を基に、標的タンパク質へ特異的に結合するターゲティングポリペプチドは、当業者に公知の方法、例えば、ファージディスプレイ技術又はタンパク質マイクロアレイ技術によるスクリーニングによって得ることができる。

#### 【0024】

本明細書で使用する場合、「検出可能な標識」という用語は、蛍光手段、分光手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫学的手段、電気的手段、光学的手段又は化学的手段によって検出することのできる何らかの組成物を指す。本発明において、このような標識が免疫学的アッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着検定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学発光イムノアッセイなど）へ適用することができることは特に好ましい。このような標識は、当該技術分野で周知であり、酵素（例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼなど）、放射性核種（例えば、 $^3H$ 、 $^{125}I$ 、 $^{35}S$ 、 $^{14}C$ 又は $^{32}P$ ）、蛍光色素（例えば、フルオレセインイソチオシアナート（FITC）、フルオレセイン、テトラメチルローダミンイソチオシアナート（TRITC）、フィコエリトリン（PE）、テキサスレッド、ローダミン、量子ドット又はシアニン色素誘導體（例えば、Cy7、アレクサ750））、アクリジニウムエステル化合物、磁気ビーズ（例えば、Dynabeads（登録商標））、コロイド金などの熱量測定標識、又は有色のガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）のビーズ、及び当該標識が修飾されるアビジン（例えば、ストレプトアビジン）への結合のためのビオチンを含むがこれらに限定されない。標識の使用を教示する特許は、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、及び第4,366,241号を含むがこれらに限定されない（それらはすべて、参照により本明細書に組み込まれる）。本発明において網羅される標識は、当該技術分野で公知の方法によって検出することができる。例えば、放射性標識は、写真用フィルム又はシンチレーションカウンタを用いて検出することができ、蛍光標識は、光検出器を用いて発光を測定することによって検出することができる。酵素標識は概して、酵素のための基質を提供して、当該酵素と当該基質の間の反応から結果的に生じる反応産物を検出することによって検出され、熱量測定標識は、染色した標識の単純な可視化によって検出される。

#### 【0025】

本明細書で使用する場合、「特異的刺激薬」という用語は、aTB患者由来のPBMCを刺激

することのみでIL-6を生じるが、非aTB集団（例えば、潜伏結核感染（LTBI）に罹患している個体、慢性結核に罹患している患者又は結核感染に罹患していない個体（IGRAにおいて陰性と検査された））由来のPBMCを刺激してIL-6を生じることのできない物質を指し、あるいはaTB患者由来のPBMCを刺激して、非aTB集団（例えば、潜伏結核感染（LTBI）に罹患している個体、慢性結核に罹患している患者又は結核感染に罹患していない個体（IGRAにおいて陰性と検査された））由来のPBMCよりも有意に多量にIL-6を生じるこのような物質を指す。本発明による特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、又はこれらの抗原性フラグメントを含む。本発明の好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、内毒素をまったく又はほぼまったく含有しない。内毒素を当該特異的刺激薬から除去するための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー又は抽出である。

10

#### 【0026】

本明細書で使用する場合、「非特異的刺激薬」という用語は、リンパ球のほとんど又は全部を刺激することのできる物質を指し、TCR又はBCRの特異性によって制限されることはない。活性化型リンパ球は、多くのサイトカイン（例えば、IL-6）を分泌することができる。非特異的刺激薬として使用することのできる物質は、当該技術分野で周知であり、有糸分裂促進因子、フィットヘマグルチニン（PHA）、コンカナバリンA（ConA）、アメリカヤマゴボウ有糸分裂促進因子（PWM）、リポ多糖（LPS）、又はスタフィロコッカスプロテインA（SPA）を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、非特異的刺激薬は、培地（例えば、RPMI-1640培地及びDMEM培地などの細胞培地）中に含まれ得る。

20

#### 【0027】

本明細書で使用する場合、「統計分析値」という用語は、種々の検出方法によって得られた結果の統計分析によって得られた値を指す。種々の統計分析方法は、当該技術分野で周知であり（例えば、PCT国際出願WO2009064901を参照されたい）、検出結果の線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析（LDA）モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析（PAM）を含むが、これらに限定されない。概して、統計分析値が、ロジスティック回帰モデルを用いた統計分析によって得られた値であることが特に好ましい。ロジスティック回帰モデルは、例えば、「Hu Chunyan. Serum level of four tumor markers in women with ovarian cancer [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2008: 1~39」において詳細に説明されている。

30

#### 【0028】

本明細書で使用する場合、「基準値」（至適診断臨界値とも呼ばれる）という用語は、非aTB集団の状態を反映することのできる値を指す。本発明において、基準値は、例えば、特異的刺激薬による刺激の前後の非aTB集団（例えば、潜伏結核感染に罹患している個体、慢性結核に罹患している患者又は結核感染に罹患していない個体（IGRAにおいて陰性と検査された））とは異なる、IL-6レベルにおける値、及び非aTB集団の試料から得られた判定された値（例えば、先に説明したIL-6レベルにおける差異値）の統計分析によって得られた値（統計分析値）に応じて判定された正常値又は正常範囲を含む。至適診断臨界値を判定するための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、「Habibzadeh Fら, Biochem Med (Zagreb). 2016; 26(3):297~307」及び「Chen Weizhongら, Selection of optimal operating point for ROC curve [J]. Chinese Journal of Health Statistics, 2006, 23:157~158」において詳細に説明されている受信者動作特性（ROC）曲線分析を含むが、これに限定されない。

40

#### 【0029】

本明細書で使用する場合、「末梢血単核球（PBMC）」という用語は、リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）及び単球又は樹状細胞を含むがこれらに限定されない末梢血における単一の核を有する細胞についての一般名である。末梢血からPBMCを得るための方法は、当該技術分野で周知であり、Ficoll法又はPercoll法を含むが、これらに限定されない。

#### 【0030】

50

本明細書で使用する場合、「末梢血パフィーコート」という用語は、凝固防止処理した末梢血の自然沈降、遠心分離又は密度勾配遠心分離後に形成され、かつ白血球（末梢血単核球を含む）及び血小板から主としてなる成分を指す。凝固防止処理した血液の遠心分離後、血漿の上部層、赤血球の底部層、及びこれらの中にあり、全血の1体積%を占める白色薄層（パフィーコートと呼ばれる）がある。

【0031】

本明細書で使用する場合、「対象（又は被験者）」という用語は、種々の動物、特に哺乳類、例えばヒトを含むがこれらに限定されない。

【0032】

本明細書で使用する場合、「抗凝血剤」という用語は、凝血を防止することのできる薬剤又は物質を指す。このような物質は、当該技術分野で周知であり、ヘパリン、EDTA、シュウ酸塩（例えば、シュウ酸ナトリウム、シュウ酸カリウム、シュウ酸アンモニウム）、及びクエン酸ナトリウムを含むがこれらに限定されない。

10

【0033】

本発明において、「希釈剤」という用語は好ましくは、細胞浸透圧を保有することのできる、かつ必要な場合、生理学的pH値を保有するよう作用することのできる、電解質溶液である。このような溶液は、当該技術分野で周知であり、Alsever溶液、Earle平衡塩溶液（EBSS）、Gey平衡塩溶液（GBSS）、Hanks平衡塩溶液（HBSS）、リン酸緩衝塩類溶液（PBS）、Dulbeccoリン酸緩衝塩類溶液（DPBS）、Puck平衡塩溶液、Ringer平衡塩溶液（RBSS）、Simm平衡塩溶液（SBSS）、TRIS緩衝塩類溶液（TBS）、Tyrode平衡塩溶液（TBSS）、生理学的塩類溶液又はRinger溶液を含むが、これらに限定されない。

20

【0034】

本明細書で使用する場合、「培養溶液」又は「培地」という用語は、細胞の生存率を維持することのできる栄養素を指す。通常、栄養素は、アミノ酸、ビタミン、炭水化物、無機塩などを含有する。このような栄養素は、当該技術分野で周知であり、RPMI-1640培地又はDMEM培地を含むが、これらに限定されない。本発明において、培養溶液又は培地を対象由来の試料へ添加する目的は、刺激薬による刺激の間、細胞の生存率、特に試料におけるPBMCを維持することである。血液成分における細胞の生存率を維持するための方法は、当該技術分野で周知であり、実用的な需要に応じて当業者によって選択されることができる。いくつかの実施形態において、試料が全血の場合、適切な量のグルコース、塩化ナトリウム、塩化カリウム、及びこれらに類するものが添加されたリン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液であり得る培養溶液を添加することができる。いくつかの実施形態において、培養溶液は、適切な量のグルコース及び塩化カリウムが添加されたリン酸塩緩衝液である。いくつかの実施形態において、試料が末梢血単核球（PBMC）である場合、PBMC、培地、例えば、細胞培地（例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地など、血液細胞、特にPBMCの生存率を維持するのに適した細胞培地）を含有する末梢血パフィーコート又は他の血液成分を添加することができる。

30

【0035】

本明細書で使用する場合、「活動性結核（aTB）」という用語は、結核の病巣が活発である、例えば、喀痰スミア試験において陽性と検査され、又は微熱、咳、体重減少、疲労、食欲不振などの関連症状が伴うことを意味する。本発明において、結核は、肺結核及び肺外結核を含む。肺外結核は、例えば、リンパ性結核、結核性髄膜炎、結核性腹膜炎、腸結核、腎結核、精巣上体結核、雌性生殖系器官の結核（ファロピー管、子宮内膜、卵巣の結核を含む）、骨関節結核などを含む。

40

【0036】

本願の発明者らは、M. tuberculosisのRD部の多数の抗原をスクリーニングし、驚くべきことに、RV0183、PlcD、又はこれらの抗原性フラグメントがaTB患者由来の末梢血を刺激して、多量のIL-6を生じることができ、それゆえ、aTB集団を非aTB集団（例えば、潜伏結核感染（LTBI）に罹患している個体、慢性結核に罹患している患者又は結核感染に罹患していない個体）と区別することができることを発見した。しかしながら、本願よりも前

50

では、当該技術分野で通常使用される IGRA 及び TST が潜伏結核感染 (LTBI) を活動性結核と区別することができていない。この発見を基に、本発明者らは、活動性結核を診断するための新たな方法を開発する。

【0037】

それゆえ、一態様において、本発明は、RV0183、P1cD、又はこれらの抗原性フラグメントのうちの1つ又は2つ以上と、IL-6を検出することのできる試薬とを含むキットを提供する。

いくつかの好ましい実施形態において、RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又はP1cDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、RV0183及び/又はP1cDを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、RV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントを含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0038】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含む。

【0039】

任意に、キットは、以下の抗原性フラグメントの組み合わせをさらに含む：

- 1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号7~8及び11~12に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号5~7、11~12、22及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
- 4) 配列番号5、8~10、12、15及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント。

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、IL-6を検出することのできる試薬は、IL-6へ特異的に結合することのできる物質、例えば、抗体、ターゲティングポリペプチド又はアプタマーである。

任意に、試薬は、検出可能な標識をさらに含む。

【0040】

いくつかの好ましい実施形態において、試薬は、免疫学的アッセイによって、試料におけるIL-6のレベルを測定する。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択される。

【0041】

いくつかの好ましい実施形態において、試薬は、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、試薬は、IL-6のレベルをELISAによって測定する。

【0042】

いくつかの好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体である。

【0043】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、1)~5)、すなわち

- 1) 血液収集装置、例えば、発熱物質非含有真空血液収集管、
- 2) 抗凝血剤、例えば、ヘパリン、
- 3) 培養溶液又は培地、
- 4) 非特異的的刺激薬、例えば、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンA、
- 5) 希釈剤、例えば、リン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液、

10

20

30

40

50

から選択される1つ又は2つ以上の装置又は試薬をさらに含む。

【0044】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、活動性結核を診断するために、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定するために、又は活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングするために有用である。

【0045】

別の態様において、本発明は、活動性結核を診断するためのキットの製造における特異的刺激薬の使用であって、特異的刺激薬は、RV0183、P1cD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である、使用を提供する。

いくつかの好ましい実施形態において、RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は、P1cDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、RV0183、P1cD、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、RV0183の1つ又は2つ以上のフラグメントから選択される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含む。

【0046】

任意に、特異的刺激薬は、以下の抗原性フラグメントの組み合わせをさらに含む：

- 1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号7~8及び11~12に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号5~7、11~12、22及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
- 4) 配列番号5、8~10、12、15及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、IL-6へ特異的に結合することのできる抗体、ターゲティングポリペプチド又はアプタマーなど、IL-6を検出することのできる試薬を含む。

任意に、試薬は、検出可能な標識をさらに含む。

【0047】

いくつかの好ましい実施形態において、試薬は、免疫学的アッセイによって、試料におけるIL-6のレベルを測定する。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択される。

いくつかの好ましい実施形態において、試薬は、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、試薬は、IL-6のレベルをELISAによって測定する。

いくつかの好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体である。

【0048】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、1)~5)、すなわち

- 1) 血液収集装置、例えば、発熱物質非含有真空血液収集管、
- 2) 抗凝血剤、例えば、ヘパリン、
- 3) 培養溶液又は培地、
- 4) 非特異的刺激薬、例えば、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンA、
- 5) 希釈剤、例えば、リン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液、

から選択される1つ又は2つ以上の装置又は試薬をさらに含む。

【0049】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、対象が活動性結核に罹患しているかどうかを、以下のステップを含む方法によって診断し：

(1) 対象由来の少なくとも1つの試料を特異的刺激薬を用いて刺激しかつ当該少なくとも1つの試料を検査試料として使用すること、及び当該対象由来の非刺激試料を陰性対照試料として使用し、当該特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上であること、

(2) IL-6を検出することのできる試薬を使用すること、及び検査試料と陰性対照試料の間のIL-6のレベルにおける差異値を算出することによって、ステップ(1)における当該試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、ならびに

(3) 当該差異値を基準値と比較すること、又は当該差異値を統計分析へ供して、統計分析値を得ること、及び当該統計分析値を基準値と比較すること、及び当該対象が活動性結核に罹患しているかどうかを判定すること；であって、以下を含む；

当該試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球、又は末梢血パフィーコート、及び任意にさらなる成分、例えば、抗凝血剤、希釈剤などを含む。

【0050】

いくつかの好ましい実施形態において、当該差異値又は当該差異値から得られた統計分析値が基準値よりも大きな場合、このことは、試料を提供する対象が、活動性結核に罹患していることを示し、当該差異値又は当該差異値から得られた統計分析値が基準値以下の場合、このことは、試料を提供する対象が活動性結核に罹患していないことを示す。

【0051】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(3)において、当該差異値は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって、統計分析へ供される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(3)において、当該差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施される。

【0052】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、当該対象由来の1つ又は2つ以上の試料を、少なくとも2つの特異的刺激薬と一緒に又は個別に刺激すること、及び当該1つ又は2つ以上の試料を当該検査試料として用いることであって、当該特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(1)において、少なくとも2つの試料をRV0183とPlcDとで個別に刺激すること、及び当該少なくとも2つの試料を検査試料として使用することである。あるいは、いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、少なくとも1つの試料をRV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントで刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を当該検査試料として使用することである。

【0053】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、当該特異的刺激薬を、培地、例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地中に含有し、次いで、当該特異的刺激薬を使用して対象由来の試料を刺激し、それにより検査試料を生じる。

【0054】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)は、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することをさらに含む。いくつかの好ましい実施形態において、当該非特異的刺激薬は、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含む。

【0055】

10

20

30

40

50

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、対象由来の試料を、特異的刺激薬も非特異的刺激薬(例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地)も含有しない培地とともにインキュベートして、又は当該培地で希釈して、陰性対照試料を生じる。

【0056】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)の前に、方法は、次のステップ、すなわち(a)血液収集装置を用いることによって、対象から試料を得ること、(b)血液収集装置を又は当該対象由来の試料を抗凝血剤で処理すること、(c)当該対象由来の試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(d)当該対象由来の試料を希釈剤で希釈すること、のうちの1つ又は2つ以上をさらに含む。

10

【0057】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、対象由来の試料を刺激薬で、細胞(PBMCなど)が高い活性を有する温度(例えば、36~38、例えば約37)で刺激する。

【0058】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、対象由来の試料を刺激薬で少なくとも12時間、例えば、15~24時間、例えば、20~24時間刺激する。

別の態様において、本発明は、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定するためのキットの製造における特異的刺激薬の使用を提供し、特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である。

20

いくつかの好ましい実施形態において、RV0183は、配列番号禹1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又はPlcDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、RV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントから選択される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸を有する抗原性フラグメントを含む。

30

【0059】

任意に、特異的刺激薬は、以下の抗原性フラグメントの組み合わせをさらに含む：

- 1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号7~8及び11~12に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号5~7、11~12、22及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
- 4) 配列番号5、8~10、12、15及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント。

【0060】

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含む。

40

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、IL-6へ特異的に結合することのできる抗体、ターゲティングポリペプチド又はアプタマーなど、IL-6を検出することのできる試薬を含む。

任意に、試薬は、検出可能な標識をさらに含む。

いくつかの好ましい実施形態において、試薬は、免疫学的アッセイによって、試料におけるIL-6のレベルを測定する。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択される。

いくつかの好ましい実施形態において、試薬は、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、試薬は、IL-6のレベルをEL

50

ISAによって測定する。

いくつかの好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体である。

【0061】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、1)~5)、すなわち

- 1) 血液収集装置、例えば、発熱物質非含有真空血液収集管、
- 2) 抗凝血剤、例えば、ヘパリン、
- 3) 培養溶液又は培地、
- 4) 非特異的刺激性薬、例えば、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンA、
- 5) 希釈剤、例えば、リン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液、

から選択される1つ又は2つ以上の装置又は試薬をさらに含む。

【0062】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を、以下のステップを含む方法によって判定する：

(1) 当該療法を対象へ投与する前に、当該対象由来の少なくとも2つの試料を療法前試料として得ること、

(2) 当該対象由来の少なくとも1つの療法前試料を、特異的刺激性薬を用いて刺激すること、及び当該少なくとも1つの療法前試料を検査試料として使用すること、及び当該対象由来の少なくとも1つの非刺激性療法前試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である、

(3) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第一の差異値として算出することによって、ステップ(2)における試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、

(4) 当該療法を当該対象へ投与すること、

(5) 当該療法を当該対象へ投与した後、少なくとも2つの試料を当該対象から療法後試料として得ること、

(6) 当該対象由来の少なくとも1つの療法後試料を特異的刺激性薬で刺激すること、当該少なくとも1つの療法後試料を検査試料として使用すること、及び当該対象由来の少なくとも1つの非刺激性療法後試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である、

(7) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第二の差異値として算出することによって、ステップ(6)における当該試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、ならびに

(8) 当該第二の差異値を当該第一の差異値と比較すること、又は当該第一の差異値及び当該第二の差異値を統計分析へ個別に供して、当該第一の差異値の統計分析値及び当該第二の差異値の統計分析値を得ること、ならびに当該第二の差異値の統計分析値を当該第一の差異値の統計分析値と比較して、当該療法が活動性結核の治療において有効であるかどうかを判定すること；であって、以下を含む；

当該試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球、又は末梢血パフィーコートを含み、及び任意にさらなる成分、例えば、抗凝血剤、希釈剤などを含む。

【0063】

いくつかの好ましい実施形態において、当該第二の差異値が当該第一の差異値よりも大きな場合、又は当該第二の差異値の統計分析値が当該第一の差異値の統計分析値よりも大きな場合、当該療法は、活動性結核の治療において有効ではないことを示し、当該第二の差異値が当該第一の差異値よりも小さな場合、又は当該第二の差異値の統計分析値が当該第一の差異値の統計分析値よりも小さな場合、当該療法は、活動性結核の治療において有

10

20

30

40

50

効であることを示す。

【0064】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(8)において、当該第一の差異値及び当該第二の差異値の統計分析は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって実施される。いくつかのさらにより好ましい実施形態において、ステップ(8)において、当該第一の差異値及び当該第二の差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施される。

【0065】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、療法前試料及び療法後試料を同じ処理へ供する(例えば、同じ条件下で同じ特異的刺激薬で処理する)。いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、当該対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激薬と一緒に又は個別に刺激すること、及び当該1つ又は2つ以上の試料を検査試料として使用することであって、当該特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも2つの試料をRV0183及びPlcDで個別に刺激すること、及び当該少なくとも2つの試料を当該検査試料として用いることである。あるいは、いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも1つの試料をRV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントと一緒に刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を当該検査試料として使用することである。

【0066】

いくつかの好ましい実施形態において、対象は、ヒトなどの哺乳類である。

いくつかの好ましい実施形態において、当該療法は、イソニアジド、リファンピシン、ストレプトマイシン、ピラジナミド、エタンブトール又はこれらの何らかの組み合わせなどの抗結核薬を当該対象へ投与することを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、特異的刺激薬を、培地、例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地中に含有し、次いで、当該特異的刺激薬を対象由来の試料を使用して刺激し、それにより検査試料を生じる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)は、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することをさらにも含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、非特異的刺激薬は、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、対象由来の試料を、特異的刺激薬も非特異的刺激薬(例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地)も含有しない培地とともにインキュベートし、又は当該培地で希釈し、それにより陰性対照試料を生じる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、対象由来の療法前試料は、血液収集装置を用いることによって得られる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(5)において、対象由来の療法後試料は、血液収集装置を用いることによって得られる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)の前に、方法は、以下のステップのうちの一つ又は二つ以上をさらにも含む：(a)血液収集装置又は対象由来の試料を抗凝血剤で処理すること、(b)当該対象由来の試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(c)当該対象由来の試料を希釈剤で希釈すること。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(5)の前に、方法は、以下のステップをさらにも含む：(a)血液収集装置又は対象由来の試料を抗凝血剤で処理すること、(b)当該対象由来の試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(c)当該対象由来の試

10

20

30

40

50

料を希釈剤で希釈すること。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、対象由来の試料を刺激薬で、細胞(PBMCなど)が高い活性を有する温度(例えば、36~38、例えば約37)で刺激する。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、対象由来の試料を刺激薬で少なくとも12時間、例えば、15~24時間、例えば、20~24時間刺激する。

#### 【0067】

別の態様において、本発明は、活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングのためのキットの製造における特異的刺激薬の使用を提供し、当該特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である。

10

#### 【0068】

いくつかの好ましい実施形態において、RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は、PlcDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、RV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントから選択される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有する。

20

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、配列番号13、14及び19において示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含む。

#### 【0069】

任意に、特異的刺激薬は、以下の抗原性フラグメントの組み合わせをさらに含む：

- 1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号7~8及び11~12に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号5~7、11~12、22及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
- 4) 配列番号5、8~10、12、15及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント。

30

#### 【0070】

いくつかの好ましい実施形態において、特異的刺激薬は、配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、IL-6へ特異的に結合することのできる抗体、ターゲティングポリペプチド又はアプタマーなど、IL-6を検出することのできる試薬を含む。

任意に、試薬は、検出可能な標識をさらに含む。

#### 【0071】

いくつかの好ましい実施形態において、試薬は、免疫学的アッセイによって、試料におけるIL-6のレベルを測定する。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択される。

40

いくつかの好ましい実施形態において、試薬は、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、試薬は、IL-6のレベルをELISAによって測定する。

いくつかの好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体である。

#### 【0072】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、1)~5)、すなわち

50

- 1) 血液収集装置、例えば、発熱物質非含有真空血液収集管、
  - 2) 抗凝血剤、例えば、ヘパリン、
  - 3) 培養溶液又は培地、
  - 4) 非特異的刺激性薬、例えば、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンA、
  - 5) 希釈剤、例えば、リン酸塩緩衝液又は生理学的塩類溶液、
- から選択される1つ又は2つ以上の装置又は試薬をさらに含む。

【0073】

いくつかの好ましい実施形態において、キットは、以下のステップを含む方法によって、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定する：

(1) 候補薬をモデル動物へ投与する前に、当該動物由来の少なくとも2つの試料を療法前試料として得ること、

(2) 当該動物由来の少なくとも1つの療法前試料を特異的刺激性薬で刺激すること、及び当該少なくとも1つの療法前試料を検査試料として使用すること、及び当該動物由来の少なくとも1つの非刺激性療法前試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である、

(3) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第一の差異値として算出することによって、ステップ(2)における当該試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、

(4) 当該候補薬を当該動物へ投与すること、

(5) 当該候補薬を前記動物へ投与した後、少なくとも2つの試料を当該動物から療法後試料として得ること、

(6) 当該動物由来の少なくとも1つの療法後試料を特異的刺激性薬で刺激すること、及び当該少なくとも1つの療法後試料を検査試料として使用すること、及び当該対象由来の少なくとも1つの非刺激性療法後試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激性薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である、

(7) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第二の差異値として算出することによって、ステップ(6)における当該試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、

(8) 当該第二の差異値を当該第一の差異値と比較すること、又は当該第一の差異値及び当該第二の差異値を統計分析へ個別に供して、当該第一の差異値の統計分析値及び当該第二の差異値の統計分析値を得ること、ならびに当該第二の差異値の統計分析値を当該第一の差異値の統計分析値と比較して、当該療法が活動性結核の治療において有効であるかどうかを判定すること；であって、以下を含む；

当該試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球、又は末梢血パフィーコート、及び任意にさらなる成分、例えば、抗凝血剤、希釈剤などを含む。

【0074】

いくつかの好ましい実施形態において、当該第二の差異値が当該第一の差異値よりも大きな場合、又は当該第二の差異値の統計分析値が当該第一の差異値の統計分析値よりも大きな場合、このことは、当該療法が活動性結核の治療において有効ではないことを示し、当該第二の差異値が当該第一の差異値よりも小さな場合、又は当該第二の差異値の統計分析値が当該第一の差異値の統計分析値よりも小さな場合、このことは、当該療法が活動性結核の治療において有効であることを示す。

【0075】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(8)において、当該第一の差異値及び当該第二の差異値の統計分析は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって実施される。いくつかの

10

20

30

40

50

さらにより好ましい実施形態において、ステップ(8)において、前記第一の差異値及び前記第二の差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施される。

【0076】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、療法前試料及び療法後試料を同じ処理へ供する(例えば、同じ条件下で同じ特異的刺激薬で処理する)。いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、当該対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激薬と一緒に又は個別に刺激すること、及び当該1つ又は2つ以上の試料を検査試料として使用することであって、当該特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも2つの試料をRV0183及びPlcDで個別に刺激して、当該少なくとも2つの試料を当該検査試料として用いる。あるいは、いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも1つの試料をRV0183の1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントと一緒に刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を当該検査試料として使用することである。

10

【0077】

いくつかの好ましい実施形態において、対象は、ヒトなどの哺乳類である。

いくつかの好ましい実施形態において、療法は、抗結核薬、例えば、イソニアジド、リファンピシン、ストレプトマイシン、ピラジナミド、エタンブトール又はこれらの何らかの組み合わせを対象へ投与することを含む。

20

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、特異的刺激薬を、培地、例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地中に含有し、次いで、当該特異的刺激薬を使用して対象由来の試料を刺激し、それにより検査試料を生じる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)は、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することをさらにも含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、非特異的刺激薬は、フィットヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含む。

30

【0078】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、対象由来の試料を、特異的刺激薬も非特異的刺激薬(例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地)も含有しない培地とともにインキュベートし、又は当該培地で希釈し、それにより陰性対照試料を生じる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、対象由来の療法前試料は、血液収集装置を用いることによって得られる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(5)において、対象由来の療法後試料は、血液収集装置を用いることによって得られる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)の前に、方法は、以下のステップのうちの一つ又は二つ以上をさらにも含む：(a)血液収集装置又は対象由来の試料を抗凝血剤で処理すること、(b)当該対象由来の試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(c)当該対象由来の試料を希釈剤で希釈すること。

40

【0079】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(5)の前に、方法は、以下のステップのうちの一つ又は二つ以上をさらにも含む：(a)血液収集装置又は対象由来の試料を抗凝血剤で処理すること、(b)当該対象由来の試料を培養溶液又は培地で処理すること、及び(c)当該対象由来の試料を希釈剤で希釈すること。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、対象由来の試料を当該刺激薬で、細胞(PBMCなど)が高い活性を有する温度(例えば、36~38、例えば約37)で刺激する。

50

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、対象由来の試料を当該刺激薬で少なくとも12時間、例えば、15~24時間、例えば、20~24時間刺激する。

【0080】

別の態様において、本発明は、以下のステップを含む、対象が活動性結核に罹患しているかどうかを診断するための方法を提供し：

(1) 当該対象由来の少なくとも2つの試料を提供すること、

(2) 当該対象由来の少なくとも1つの試料を特異的刺激薬で刺激して、当該少なくとも1つの試料を検査試料として使用すること、及び非刺激試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である、

(3) ステップ(2)における試料の各々におけるIL-6のレベルを測定し、当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6のレベルにおける差異値を算出すること、ならびに

(4) 当該差異値を基準値と比較すること、又は当該差異値を統計分析へ供して統計分析値を得ること、及び当該統計分析値を基準値と比較すること、及び当該対象が活動性結核に罹患しているかどうかを判定すること；であって、以下を含む；

当該試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球(PBMC)、又は末梢血パフィーコート、及び任意にさらなる成分、例えば、抗凝血剤、希釈剤などを含む、方法を提供する。

【0081】

いくつかの好ましい実施形態において、当該差異値又は当該差異値から得られた統計分析値が基準値よりも大きな場合、このことは、試料を提供する対象が活動性結核に罹患していることを示し、当該差異値又は当該差異値から得られた統計分析値が基準値以下の場合、このことは、試料を提供する対象が活動性結核に罹患していないことを示す。

【0082】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(4)において、当該差異値は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって、統計分析へ供される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(4)において、当該差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施される。

【0083】

いくつかの好ましい実施形態において、RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は、PlcDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、抗原性フラグメントは、RV0183の抗原性フラグメントである。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、対象は、ヒトなどの哺乳類である。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)において、対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激薬で一緒に又は個別に刺激すること、及び当該1つ又は2つ以上の試料を当該検査試料として用いることであって、以下を含む；当該特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される。

【0084】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)において、少なくとも2つの試料をRV0183とPlcDとで個別に刺激すること、及び当該少なくとも2つの試料を検査試料として使用することである。あるいは、いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)において、少なくとも1つの試料を1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントと一緒に刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を当該検査試料として使用することである。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(2)において、少なくとも1つの

試料を以下の抗原性フラグメントの組み合わせと一緒に刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を検査試料として使用することである：

- 1) 配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号5、11、13～14、19及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号7～8及び11～14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 4) 配列番号5～7、11～14、19、22、及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 5) 配列番号5、8～10、12、15、及び22～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
- 6) 配列番号5～25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント。

10

【0085】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)において、特異的刺激薬を、培地、例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地中に含有し、次いで、当該特異的刺激薬を用いて対象由来の試料を刺激し、それにより検査試料を生じる。

【0086】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)において、対象由来の試料を、特異的刺激薬も非特異的刺激薬(例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地)も含有しない培地とともにインキュベートし、又は当該培地で希釈し、それにより陰性対照試料を生じる。

20

いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(3)において、当該試料におけるIL-6のレベルを、免疫学的アッセイによって測定する。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択される。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(3)において、IL-6のレベルを、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを使用することによって、例えば、ELISAによって測定する。

いくつかの好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体である。

30

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)は、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することをさらに含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該非特異的刺激薬は、フィトヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)の前に、方法は、以下のステップのうち1つ又は2つ以上をさらに含む：(a)当該対象から試料を得ること、(b)ヘパリンなどの抗凝血剤を当該試料へと添加すること、(c)当該試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(d)培養溶液又は培地を当該試料へと添加すること(e)当該試料を希釈すること。

40

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)において、対象由来の試料を刺激薬で、細胞(PBMCなど)が高い活性を有する温度(例えば、36～38℃、例えば約37℃)で刺激する。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、対象由来の試料を刺激薬で少なくとも12時間、例えば、15～24時間、例えば、20～24時間刺激する。

【0087】

別の態様において、本発明は、以下のステップを含む、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定するための方法を提供し：

(1)当該療法を対象へ投与する前に、当該対象由来の少なくとも2つの試料を療法前試料として得ること、

50

(2) 当該対象由来の少なくとも1つの療法前試料を、特異的刺激薬を用いて刺激し、当該少なくとも1つの療法前試料を検査試料として使用すること、及び当該対象由来の少なくとも1つの非刺激療法前試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である、

(3) IL-6を検出することのできる試薬を用いて、当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第一の差異値として算出することによって、ステップ(2)における試料の各々におけるIL-6のレベルを測定すること、

(4) 当該療法を当該対象へ投与すること、

(5) 当該療法を当該対象へ投与した後、少なくとも2つの試料を当該対象から療法後試料として得ること、

(6) 当該対象由来の少なくとも1つの療法後試料を特異的刺激薬で刺激し、当該少なくとも1つの療法後試料を検査試料として使用すること、及び当該対象由来の少なくとも1つの非刺激療法後試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される1つ又は2つ以上である、

(7) IL-6を検出することのできる試薬を使用すること、及び当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第二の差異値として算出することによって、ステップ(6)における当該試料の各々におけるIL-6のレベルを判定すること、ならびに

(8) 当該第二の差異値を当該第一の差異値と比較すること、又は当該第一の差異値及び当該第二の差異値を統計分析へ個別に供して、当該第一の差異値の統計分析値及び当該第二の差異値の統計分析値を得ること、ならびに当該第二の差異値の統計分析値を当該第一の差異値の統計分析値と比較して、当該療法が活動性結核の治療において有効であるかどうかを判定すること；であって、以下を含む；

当該試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球(PBMC)、又は末梢血パフィーコートを含み、及び任意にさらなる成分、例えば、抗凝血剤、希釈剤などを含む。

#### 【0088】

いくつかの好ましい実施形態において、当該第二の差異値が当該第一の差異値よりも大きな場合、又は当該第二の差異値の統計分析値が当該第一の差異値の統計分析値よりも大きな場合、このことは、当該療法が活動性結核の治療において有効ではないことを示し、当該第二の差異値が当該第一の差異値よりも小さな場合、又は当該第二の差異値の統計分析値が当該第一の差異値の統計分析値よりも小さな場合、このことは、当該療法が活動性結核の治療において有効であることを示す。

#### 【0089】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(8)において、当該第一の差異値及び当該第二の差異値の統計分析は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって実施される。いくつかのさらに好ましい実施形態において、ステップ(8)において、当該第一の差異値及び当該第二の差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施される。

#### 【0090】

いくつかの好ましい実施形態において、RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は、PlcDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、抗原性フラグメントは、RV0183の抗原性フラグメントである。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、対象は、ヒトなどの哺乳類である。

いくつかの好ましい実施形態において、当該療法は、抗結核薬、例えば、イソニアジド

10

20

30

40

50

、リファンピシン、ストレプトマイシン、ピラジナミド、エタンブトール又はこれらの何らかの組み合わせを当該対象へ投与することを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、療法前試料及び療法後試料を同じ処理へ供する(例えば、同じ条件下で同じ特異的刺激薬で処理する)。いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、当該対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激薬と一緒に又は個別に刺激すること、及び当該1つ又は2つ以上の試料を検査試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激薬は独立して、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される。

#### 【0091】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも2つの試料をRV0183とPlcDとで個別に刺激すること、及び当該少なくとも2つの試料を検査試料として使用することである。あるいは、いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも1つの試料を1つ又は2つ以上の抗原性フラグメントと一緒に用いて刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を当該検査試料として使用することである。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも1つの試料を以下の抗原性フラグメントの組み合わせと一緒に刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を検査試料として使用することである：

- 1) 配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号5、11、13~14、19及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号7~8及び11~14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 4) 配列番号5~7、11~14、19、22、及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 5) 配列番号5、8~10、12、15、及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
- 6) 配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント。

#### 【0092】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、特異的刺激薬を、培地、例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地中に含有し、次いで、当該特異的刺激薬を使用して対象由来の試料を刺激し、それにより検査試料を生じる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、対象由来の試料を、特異的刺激薬も非特異的刺激薬(例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地)も含有しない培地とともにインキュベートし、又は当該培地で希釈して、それにより陰性対照試料を生じる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(3)において、試料におけるIL-6のレベルは、免疫学的アッセイによって判定される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択される。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(3)において、IL-6のレベルは、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを使用することによって、例えば、ELISAによって判定される。

いくつかの好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体である。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)は、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を陽性対照

10

20

30

40

50

試料として使用することをさらに含む。さらに、当該非特異的刺激薬は、フィトヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)の前に、方法は、以下のステップのうちの一つ又は二つ以上をさらに含む：(a)ヘパリンなどの抗凝血剤を当該療法前試料へと添加すること、(b)当該療法前試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(c)培養溶液又は培地を当該療法前試料へと添加すること、及び(d)当該療法前試料を希釈すること。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(5)の前に、方法は、以下のステップのうちの一つ又は二つ以上をさらに含む：(a)ヘパリンなどの抗凝血剤を当該療法後試料へと添加すること、(b)当該療法後試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(c)培養溶液又は培地を当該療法後試料へと添加すること、及び(d)当該試料を希釈すること。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)において、対象由来の試料を刺激薬で、細胞(PBMCなど)が高い活性を有する温度(例えば、36~38℃、例えば約37℃)で刺激する。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)において、対象由来の試料を刺激薬で少なくとも12時間、例えば、15~24時間、例えば、20~24時間刺激する。

#### 【0093】

別の態様において、本発明は、以下のステップを含む、活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングするための方法を提供する：

(1)候補薬をモデル動物へ投与する前に、当該動物由来の少なくとも二つの試料を療法前試料として得ること、

(2)当該動物由来の少なくとも一つの療法前試料を、特異的刺激薬を用いて刺激すること、及び当該少なくとも一つの療法前試料を検査試料として使用すること、及び当該動物由来の少なくとも一つの非刺激療法前試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される一つ又は二つ以上である、

(3)ステップ(2)における試料の各々におけるIL-6を判定すること、及び当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第一の差異値として算出すること、

(4)当該候補薬を当該動物へ投与すること、

(5)当該候補薬を前記動物へ投与した後、少なくとも二つの試料を当該動物から療法後試料として得ること、

(6)当該動物由来の少なくとも一つの療法後試料を特異的刺激薬で刺激すること、及び当該少なくとも一つの療法後試料を検査試料として使用すること、及び当該対象由来の少なくとも一つの非刺激療法後試料を陰性対照試料として使用することであって、以下を含む；当該特異的刺激薬は、RV0183、PlcD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される一つ又は二つ以上である、

(7)IL-6を検出することのできる試薬を用いること、及び当該検査試料と当該陰性対照試料の間のIL-6レベルの差異値を第二の差異値として算出することによって、ステップ(6)における当該試料の各々におけるIL-6のレベルを判定すること、ならびに

(8)当該第二の差異値を当該第一の差異値と比較すること、又は当該第一の差異値及び当該第二の差異値を統計分析へ個別に供して、それにより当該第一の差異値の統計分析値及び当該第二の差異値の統計分析値を得ること、ならびに当該第二の差異値の統計分析値を当該第一の差異値の統計分析値と比較すること、ならびに当該療法が活動性結核の治療において有効であるかどうかを判定すること；であって、以下を含む；

当該試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球(PBMC)、又は末梢血パフィーコート、及び任意にさらなる成分、例えば、抗凝血剤、希釈剤などを含む、方法を提供する。

#### 【0094】

いくつかの好ましい実施形態において、当該差異値又は当該差異値から得られた統計分

10

20

30

40

50

析値が基準値よりも大きな場合、このことは、試料を提供する対象が活動性結核に罹患していることを示し、当該差異値又は当該差異値から得られた統計分析値が基準値以下の場合、このことは、試料を提供する対象が活動性結核に罹患していないことを示す。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(8)において、当該差異値は、線形組み合わせ、線形回帰モデル、ロジスティック回帰モデル、線形判別分析(LDA)モデル、最近傍モデル及びマイクロアレイの予測分析(PAM)からなる群から選択される統計モデルを用いることによって、統計分析へ供される。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(8)において、当該差異値の統計分析は、ロジスティック回帰モデルを用いることによって実施される。

いくつかの好ましい実施形態において、RV0183は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、かつ/又は、P1cDは、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、抗原性フラグメントは、RV0183の抗原性フラグメントである。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該抗原性フラグメントは、配列番号5~25から選択されるアミノ酸配列を有する。

いくつかの好ましい実施形態において、モデル動物は、非ヒト哺乳類、例えば、マウス、モルモット、ウサギ、又は非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル又はアカゲザル)である。

いくつかの好ましい実施形態において、対象は、ヒトなどの哺乳類である。

#### 【0095】

好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)において、療法前試料及び療法後試料を同じ処理へ供する(例えば、同じ条件下で同じ特異的刺激薬で処理)。いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、当該対象由来の1つ又は2つ以上の試料を少なくとも2つの特異的刺激薬と一緒に又は個別に刺激して、当該1つ又は2つ以上の試料を検査試料として使用し、当該特異的刺激薬は各々独立して、RV0183、P1cD、及びこれらの抗原性フラグメントからなる群から選択される。

#### 【0096】

好ましくは、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも2つの試料をRV0183及びP1cDで個別に刺激して、当該少なくとも2つの試料を検査試料として用いる。あるいは、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも1つの試料を1つ又は2つ以上の当該抗原性フラグメントと一緒に刺激して、当該少なくとも1つの試料を当該検査試料として使用する。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、少なくとも1つの試料を以下の抗原性フラグメントの組み合わせで刺激すること、及び当該少なくとも1つの試料を検査試料として使用することである；

- 1) 配列番号13、14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 2) 配列番号5、11、13~14、19及び22に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 3) 配列番号7~8、11~14及び19に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 4) 配列番号5~7、11~14、19、22及び24に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、
- 5) 配列を5、8~10、12~15、19及び22~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント、又は
- 6) 配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメント。

#### 【0097】

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、特異的刺激薬を、培地、例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地中に含有し、次いで、対象由来の試料を刺激するために使用し、それにより検査試料を生じる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、動物由来の試料を、特異的刺激薬も非特異的刺激薬(例えば、RPMI-1640培地又はDMEM培地などの細胞培地)も含有しない培地とともにインキュベートし、又は当該培地で希釈し、

10

20

30

40

50

それにより陰性対照試料を生じる。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(3)において、試料におけるIL-6のレベルを免疫学的アッセイによって測定する。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該免疫学的アッセイは、ELISAアッセイ、Elispotアッセイ、ウェスタンブロット、及び表面プラズモン共鳴からなる群から選択される。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(3)において、IL-6のレベルは、抗IL-6抗体又はその抗原結合フラグメントを使用することによって、例えば、ELISAによって判定される。

いくつかの好ましい実施形態において、抗IL-6抗体は、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体である。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該抗IL-6抗体は、IgG抗体又はIgM抗体である。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)は、少なくとも1つの試料を非特異的刺激薬で刺激して、当該少なくとも1つの試料を陽性対照試料として使用することをさらに含む。いくつかのさらなる好ましい実施形態において、当該非特異的刺激薬は、フィトヘマグルチニン又はコンカナバリンAを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(1)の前に、方法は、以下のステップのうちの1つ又は2つ以上をさらに含む：(a)ヘパリンなどの抗凝固剤を当該療法前試料へと添加すること、(b)当該療法前試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(c)培養溶液又は培地を当該試料へと添加すること、及び(d)当該療法前試料を希釈すること。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(5)の前に、方法は、以下のステップのうちの1つ又は2つ以上をさらに含む：(a)ヘパリンなどの抗凝固剤を当該療法前試料へと添加すること、(b)当該療法前試料からPBMC又はPBMC含有血液成分(例えば、末梢血パフィーコート)を得ること、(c)培養溶液又は培地を当該試料へと添加すること、及び(d)当該療法後試料を希釈すること。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、対象由来の試料を刺激薬で、細胞(PBMCなど)が高い活性を有する温度(例えば、36~38、例えば約37)で刺激する。

いくつかの好ましい実施形態において、ステップ(2)及びステップ(6)において、動物由来の試料を刺激薬で少なくとも12時間、例えば、15~24時間、例えば、20~24時間刺激する。

#### 【0098】

別の態様において、本発明jは、以下を含むポリペプチドライブラリを提供する：

- 配列番号13に示されるアミノ酸配列を有する第一のペプチド、
- 配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する第二のペプチド、及び
- 配列番号19に示されるアミノ酸配列を有する第三のペプチド。

#### 【0099】

任意に、ポリペプチドライブラリは、以下のポリペプチドの組み合わせをさらに含む：

- 1) 配列番号5、11及び22に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、
  - 2) 配列番号7~8及び11~12に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、
  - 3) 配列番号5~7、11~12、22及び24に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、
- 又は
- 4) 配列番号5、8~10、12、15及び22~25に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

いくつかの好ましい実施形態において、ポリペプチドライブラリは、配列番号5~25に示されるアミノ酸配列を有する抗原性フラグメントを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、ポリペプチドライブラリは、試料におけるIL-6の発生を誘導することができ、当該試料は、末梢血単核球(PBMC)、例えば、全血(例えば、凝固防止処理した全血)、末梢血単核球(PBMC)、又は末梢血パフィーコートを含み、任意にさらなる成分、例えば、抗凝固剤、希釈剤などを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、ポリペプチドライブラリは、活動性結核を診断するために、活動性結核に及ぼす療法の治療効果を判定するために、又は活動性結核を治療することのできる候補薬をスクリーニングするために有用である。

【0100】

#### 本発明の有益な効果

本発明における多数の試行錯誤を通じて、特異的刺激薬（RV0183、PlcD、又はこれらの抗原性フラグメント）がaTB患者由来の末梢血を刺激して、多量のIL-6を生じることができ、それゆえ、aTB集団を非aTB集団（例えば、潜伏結核感染（LTBI）に罹患している個体、慢性結核に罹患している患者又は結核感染に罹患していない個体）と区別することができ、それにより活動性結核を診断するための単純で、簡便で、かつ迅速な、高い正確性及び特異性を有する方法を確立することができる。

10

【0101】

いくつかの好ましい実施形態において、対象由来の試料の刺激は、全血を収集すること、特異的刺激薬を添加すること、次いで適切な条件下でインキュベートすることによって達成することができる。実験条件、個人の技能、装置及び環境についての高い要求はない。結核診断のための従来手段（例えば、細菌培養、喀痰スミア試験、X線検出など）と比較すると、aTB患者の検出についてのより高い感度及び特異性を有し、診断に必要とされる時間を大いに短縮し、費用は高くなく、広く使用することができる。

【0102】

本発明の実施形態は、次の図面及び例に対する参照によって詳細に説明される。しかしながら、当業者は、次の図面及び例が本発明の範囲を規定するよりもむしろ、本発明を説明する目的のためにのみ使用されることを理解するであろう。次の図面及び好ましい実施形態の詳細な説明によると、本発明の種々の目的及び利点は、当業者にとって明らかである。

20

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】E. coil ER2566における有効な発現後のNi-NTA及びDEAEカラムを用いた2工程精製によって得られた組換え抗原RV0183のSDS-PAGE分析の結果を示し、レーン1は、タンパク質分子量標準物質を表し、レーン2は、2工程精製後のタンパク質RV0183を表す。

【図2】E. coil ER2566における有効な発現後のNi-NTA精製及び封入体復元によって得られた組換え抗原PlcDのSDS-PAGE分析の結果を示し、レーンMは、タンパク質分子量標準物質を表し、レーン1は、変性した封入体を表し、レーン2は、アフィニティカラムクロマトグラフィー後のタンパク質PlcDを表し、レーン4は、透析および復元後のタンパク質PlcDを表す。

30

【図3】組換え抗原RV0183で刺激した対象の全血におけるIL-6レベルの分析結果を示す。1µgの組換え抗原RV0183による500µl全血の20±2時間の刺激後、血漿試料を2倍希釈した。結果は、aTB患者におけるIL-6分泌レベルが潜伏感染集団におけるIL-6分泌レベルよりも有意に高かったことを示す（注：\*\*\*はp<0.001を表す）。

【図4】組換え抗原RV0183で刺激した対象の全血におけるIL-6レベルの分析結果を示す。2µgの組換え抗原RV0183による1ml全血の20±2時間の刺激後、血漿試料を5倍希釈した。結果は、aTB患者におけるIL-6分泌レベルがM. tuberculosisに潜伏感染した集団（LTBI（身体検査においてIGRA+））におけるIL-6分泌レベル及び非感染集団（身体検査においてIGRA-）におけるIL-6分泌レベルよりも有意に高かったことを示す（注：\*\*\*はp<0.001を表す）。

40

【図5】組換え抗原RV0183で刺激した対象の全血におけるIL-6のレベルの分析結果を示す。2µgの組換え抗原RV0183による1ml全血の20±2時間の刺激後、血漿試料を5倍希釈した。結果は、診療所におけるaTB患者におけるIL-6分泌レベルが、M. tuberculosisに感染していない個体におけるIL-6分泌レベルよりも有意に高かったことを示す（注：\*\*\*はp<0.001を表す）。

【図6】RV-0183の抗原フラグメントで刺激した対象の全血におけるIL-6レベルの分析結

50

果を示す。結果は、RV0183の抗原性フラグメント21個全部がaTB患者の全血におけるIL-6分泌レベルをインビトロ刺激によって亢進することができたのに対し、健常対照においてはIL-6応答がほぼなかったことを示し、緑色対赤色は、応答強度の増大を示す。

【図7】組換え抗原RV0183及び組換え抗原Plcdでそれぞれ刺激した対象の全血におけるIL-6レベルの分析結果を示す。2µgの組換え抗原RV0183又は2µgの組換え抗原Plcdによる1ml全血の20±2時間の刺激後、血漿試料を5倍希釈した。結果は、組換え抗原RV0183又は組換え抗原Plcdによる刺激後、aTB患者におけるIL-6分泌レベルが潜伏感染集団及び非感染集団におけるIL-6分泌レベルよりも有意に高かったことを示し、aTBは、活動性結核を表し、HCは、健常対照を表す。

【図8】組換え抗原RV0183及び組換え抗原Plcdを併用したアッセイのROC分析結果を示す。結果は、組換え抗原RV0183及び組換え抗原Plcdを併用したアッセイがaTB集団を検出するための感度及び特異度を亢進することができたことを示す。

【図9】RV0183のポリペプチドライブラリで刺激した対象の全血におけるIL-6レベルの分析結果を示す。診療所におけるTB患者、慢性結核に罹患している個体、及びTB肺疾患に罹患していない患者に由来する全血試料を、RV0183の21個の抗原性フラグメントからなるポリペプチドライブラリで同時刺激した。結果は、aTB患者におけるIL-6分泌レベルが非aTB試料におけるIL-6分泌レベルよりも有意に高かったことを示す（注：\*\*はp<0.01を表し、\*\*\*はp<0.001を表す）。

【発明を実施するための形態】

【0104】

配列情報

本発明に関する配列の情報を次の表1に提供する。

【表1】

表1：配列情報

配列番号	説明
1	組換えタンパク質 RV0183 のアミノ酸配列
2	組換えタンパク質 RV0183 のヌクレオチド配列
3	組換えタンパク質 Plcd のアミノ酸配列
4	組換えタンパク質 Plcd のヌクレオチド配列
5~25	RV0183 のポリペプチドライブラリのペプチド配列 (P1~P21)
26~29	プライマー

【0105】

組換えタンパク質RV0183のアミノ酸配列（配列番号1）

MTTTRTERNFAGIGDVRIVYDWWTPDTAPQAVVVLAHGLGEHARRYDHVAQRLGAAGLVITYALDHRHGHRSGGKRVLVRDISEYTADFDLTVGIAATREYPGCKRIVLGHSMGGGIVFAYGVERPDNYDLMLVLSAPAVAAQDLVSPVVAVAAKLLGVVVPGLPVQELDFTAISRDPVVQAYNTDPLVHHGRVPAGIGRALLQVGETMPRRAPALTAPLLVLHGTDDRLIPIEGSRRLLVCEVGSADVQLKEYPGLYHEVFNEPERNQVLDDVVAWLTERL

【0106】

組換えタンパク質RV0183のヌクレオチド配列（配列番号2）

GGATCCATGACTACCAACCCGGACTGAACGGAATTTTCGCGGGCATCGGCGATGTGCGCATCGTCTACGACGTCTGGACGCCGGACACCGCGCCGCAAGCGGTGGTCGTGCTGGCCCATGGTCTGGGCGAGCATGCCCGCCGCTACGACCATGTGCGCGCAGCGGCTCGGCGCGCCGGCCTGGTCACCTATGCGCTTGACCACCGCGGCATGGCCGCTCGGGTGGCAAACGGGTGCTAGTGAGAGACATCTCCGAGTACACCGCTGACTTCGACACCCCTGTTGGGATCGCCACCCGGGAATATCCCGGGTGCAAGCGCATCGTGCTCGGGCACAGCATGGGCGCGGCATTGTGTTGCTTACGGTGTGGAACGTCCAGACAACACTACGACCTGATGGTGCTTTTCGGCGCCGGCGGTGGCGGCACAGGACCTGGTGAGCCCGGTAGTGCGGTTGCCGCAAGCTTCTGGGCGTCTGGTGCCCCGGCTGCCGGTGCAGGAACTGGATTTTACTGCCATCTCTCGCACCCCTGAGGTGGTCCAGGCTTACAACACCGACCCACTCGTGCACCACGGACGGTTCCGGCCGGGATTGGCCGCGCGCTGCTGCAGGTGGGCGAGACCATGCCGCGGCGAGCACCGGCATTGACCGCGCCGCTGCTAGTGCTGCACGGCACCGATGACCGGCTGATCCCCATCGAGGGCAGCCGTCGCTGG

10

20

30

40

50

TCGAATGTGTGGGATCGGCCGACGTGCAGCTGAAGGAGTATCCCGGGCTGTACCACGAGGTGTTCAACGAGCCGGAGCGC  
AACCAGGTGCTCGACGATGTGGTCGCCTGGCTCACCGAGCGGTTGTAAGAATTC

## 【 0 1 0 7 】

組換えタンパク質PlcDのアミノ酸配列 (配列番号3)

DAGVSWKVYRNKTLGPISSVLTYSGLVTSFKQSADPRSDLVRFVGVAPSYSPASFAADVLANRLPRVSWV|PNVLESEHP  
AVPAAAGAFV|VNI|LR|LLANPAVWEKTAL|VSYDENGFFDHVVPATAPAGTPGEYV|VTPD|DQVPGSGG|IRGP|IGLF  
RVPCFV|SPYSRGPQMVHDTFDHTSQLRLLLETRFGV|VVPNLTAWRRSVTGDMTSTFNFAVPPNSSWPNLDYPGLHALSTV  
PQCVPNAAALGT|INRG|IPYRVDPDQ|IMPTQETTPTRG|IPSGPC

## 【 0 1 0 8 】

組換えタンパク質PlcDのヌクレオチド配列 (配列番号4)

GATGCCGGCGTCAGCTGGAAGGTGTATCGCAACAAGACACTCGGGCCCATCTCCTCGGTTCTTACTTACGGCTCGCTT  
GTGACGTCTTTCAAACAGTCAGCCGATCCCAGGTCAGATCTTGTCCGCTTTGGCGTGGCACCAAGCTATCCCGCGAGCTT  
CGCGGCCGACGTCTTAGCCAATAGACTGCCGCGGGTCTCCTGGGTGATTCCCAATGTTCTCGAATCCGAACATCCTGCGG  
TTCCAGCCGCGGCCGGGGCTTTCGCAATCGTCAACATCTTAAGAATATTGCTTGCCAATCCTGCGGTGTGGGAAAAGACG  
GCGCTGATCGTCAGCTACGACGAAAACGGCGGCTTTTTTCGACCACGTTGTTCTCTGCTACCGCGCCGGCCGGACTCCCGG  
CGAATATGTCACGGTGCCTGACATCGATCAGGTGCCGGGCTCCGGCGGAATACGCGGGCCGATCGGTTTTGGGCTTTTCGG  
TTCCCTGCTTCGTCATTTCCCGGTACAGCCGTGGCCCGCAGATGGTTCACGACACGTTTGACCACACCTCACAGCTGAGA  
TTGCTCGAAACTCGGTTCCGGGTGCCAGTTCCTCAACCTCACGGCTTGCGCGGCAGTGTGACCGGCGACATGACGTCAAC  
GTTCAACTTCGCTGTCCCGCCAACTCATCATGGCCAACTGGATTATCCCGGGCTGCACGCGCTATCAACGGTGCCGC  
AGTGCGTGCCCAACGCGGCGCTGGGCACGATAAACCGTGAATCCCGTATCGGGTTCCTGATCCACAGATCATGCCACG  
CAGGAAACCACGCCTACCCGTGGTATTCCGAGCGGTCCGTGCTAA

10

20

## 【 0 1 0 9 】

RV0183のポリペプチドライブラリのペプチド配列 (P1~P21) (配列番号5~25)

RV0183-p1: MTTTRTERNFAGIGDVRIVY (配列番号5)  
RV0183-p2: GDVRIVYDVWTPDTAPQAVV (配列番号6)  
RV0183-p3: TAPQAVVLAHGLGEHARRY (配列番号7)  
RV0183-p4: GEHARRYDHVAQRLGAAGLV (配列番号8)  
RV0183-p5: LGAAGLVTYALDHRGHGRSG (配列番号9)  
RV0183-p6: RGHGRSGGKRVLVRDISEYT (配列番号10)  
RV0183-p7: RDISEYTADFDTLVGIATRE (配列番号11)  
RV0183-p8: VGIATREYPGCKRIVLGHSM (配列番号12)  
RV0183-p9: IVLGHSMGGGIVFAYGVERP (配列番号13)  
RV0183-p10: AYGVERPDNYDLMVLSAPAV (配列番号14)  
RV0183-p11: VLSAPAVAAQDLVSPVVAVA (配列番号15)  
RV0183-p12: SPVVAVAAKLLGVVVPGLPV (配列番号16)  
RV0183-p13: VVPGLPVQELDFTAISRDP (配列番号17)  
RV0183-p14: AISRDPEVVQAYNTDPLVHH (配列番号18)  
RV0183-p15: TDPLVHHGRVPAGIGRALLQ (配列番号19)  
RV0183-p16: IGRALLQVGETMPRRAPALT (配列番号20)  
RV0183-p17: RRAPALTAPLLVLHGTDRL (配列番号21)  
RV0183-p18: HGTDDRLIPIEGSRRLVECV (配列番号22)  
RV0183-p19: RRLVECVGSADVQLKEYPGL (配列番号23)  
RV0183-p20: LKEYPGLYHEVFNEPERNQV (配列番号24)  
RV0183-p21: EPERNQVLDVVAWLTERL (配列番号25)

30

40

## 【 0 1 1 0 】

プライマー (5' -3') (配列番号26~29)

plcD-1-F: TTCAACCATCGCCGCTCTACCA (配列番号26)  
plcD-1-R: CCATCGCCGCTCTACCACT (配列番号27)  
plcD-2-F: GGATCCATGGATGCCGGCGTCTCAG (配列番号28)  
plcD-2-R: AAGCTTTTAGCACGACCGCTCG (配列番号29)

50

## 【0111】

本発明を実施するための具体的な様式

本発明は、次の例（本発明の保護範囲を制限するよう企図するものではない）に対する参照によって説明される。

## 【0112】

別段の記載がない限り、例において説明される実験及び方法（例えば、分子生物学的実験法及び免疫学的アッセイ）は、当該技術分野で周知の従来法によって、種々の参考文献において説明されるように実質的に実施される。例えば、参照により本明細書に組み込まれる Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、及び Ausubelら、*Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992)を参照されたい。酵素反応及び精製技術は、製造元の説明書に従って、例えば、当該技術分野で概して使用されるように又は本明細書に説明されるように実施される。製造元が記載していない試薬又は機器は、市販の従来製品である。当業者は、例が本発明を説明するために使用されるが、本発明の保護範囲を制限するよう企図するものではないことを理解している。本明細書に記載の開示された解決策及び他の参考文献はすべて、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0113】

例1. 組換えタンパク質RV0183のクローニング、発現及び内毒素除去精製1. 組換えタンパク質RV0183をコードする配列を含む発現ベクターの構築1.1.1 関心対象の遺伝子フラグメントの入手

関心対象の遺伝子フラグメントを人工的に合成した。発現ベクターを簡便に導入するために、関心対象の遺伝子フラグメントを合成するとき、BamHIについての酵素開裂部位を5'末端に付加し、EcoRIについての酵素開裂部位を3'末端に付加した。使用するベクターは、pMD18Tとした。それゆえ、2つの末端に酵素開裂部位含有するRV0183プラスミドを得た。

## 【0114】

酵素開裂：人工的に構築したRV0183をBamHI / EcoRIによる二重酵素消化へ供した。酵素開裂産物をアガロースゲル電気泳動法によって回収した。

## 【0115】

1.1.2 関心対象の遺伝子フラグメントの融合及び発現ベクターの構築

BamHI / EcoRIによる二重酵素消化へ供しておいたpT0-T7ベクター（当該ベクターの情報は、Luo Wenxin, Zhang Jun, Yang Haijieら、*Construction and application of an Escherichia coli high effective expression vector with an enhancer*, Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(5): 578~581において認めることができる）を、RV0183をコードする酵素開裂産物へライゲートし、それにより、RV0183の遺伝子フラグメントを含む発現ベクターpT0-T7-RV0183を得た。

## 【0116】

2. 組換えタンパク質RV0183の発現及び内毒素除去精製

構築した発現ベクターpT0-T7-RV0183で形質転換したE.coliであるER2566（ライブラリにおいて保存）を、カナマイシン（Kan）（100 µg / mlの終濃度）を含有する固相LB培地（LB培地の成分：10g / Lペプトン、5g / L酵母粉末、及び10g / L NaCl、以後同じ）上に延展した。静置培養を37 °Cで、単一のコロニーが明確に得られるまで実施した。単一のコロニーを拾い上げ、液相LB培地（100 µg / mlのカナマイシンを含有）へと移した。培養物を37 °Cで180rpmの振盪インキュベータの中で8時間インキュベートした。次いで、この細菌溶液を培養フラスコ中の500 mLの液相LB培地（100 µg / mlのカナマイシン含有）へと移し、37 °C、180rpmの振盪インキュベータの中でインキュベートした。培養フラスコ中の液体のOD<sub>600</sub>が約0.6~0.8に到達すると、IPTGを0.2mM/Lの終濃度で添加し、インキュベーションをさらに37 °C、180rpmで4時間実施した。この培養物を5000rpmで10分間遠心分離した後、この細菌を回収した。

10

20

30

40

50

組換えタンパク質RV0183を使用して全血を刺激したので、内毒素は、このタンパク質生成物から除去される必要があった。組換えタンパク質を精製して、内毒素を細菌タンパク質から除去するための方法は、当業者に周知である。例において、次の例示的な方法を使用した。

回収した細菌を緩衝液（50mM TB8.0）の中で懸濁し、氷浴中に置き、超音波によって破碎した後、12000rpmで10分間遠心分離して、封入体を回収した。

【0117】

Ni-NTAカラム精製：関心対象の発現したタンパク質の上清を自己集合したNi-NTAのカラム（溶媒の製造元：Qiagen）によって精製した。簡潔には、試料をNi-NTAカラムへ負荷した後、200mlの50mM TB8.0で溶出して、デオキシコール酸ナトリウムを除去し、最終的には、関心対象のタンパク質を100mlの溶離剤（150mMイミダゾール、50mM TB8.0）で溶出した。

DEAEカラム精製：溶出したタンパク質をさらに、DEAEカラムによって精製した。ローディングバッファは、50mM TB8.0とし、溶離剤は、400mM NaCl、50mM TB8.0とした。溶出したタンパク質を50mM TB8.0に対して透析し、保存した。

このタンパク質の精製の間、使用した緩衝液を注射用に水で調製し、使用した実験容器を乾燥させ、200℃で2時間を越えて焼灼した。

2ステップ精製によって得られた組換えタンパク質RV0183をSDS-PAGEによって検出し、結果を図1に示す。結果は、組換えタンパク質RV0183が約30kDの分子量を有し、2ステップ精製の後、組換えタンパク質RV0183が、95%を越える純度を有していることを示した。

リムルス試薬を使用して、精製した組換えタンパク質RV0183における内毒素を検出した。結果は、2ステップ精製後に、組換えタンパク質RV0183が、100EU/mgを下回る内毒素量を有していることを示した。

【0118】

例2. 組換えタンパク質PlcDのクローニング、発現及び内毒素除去精製

2.1 組換えタンパク質PlcDをコードする配列を含む発現ベクターの構築

関心対象の遺伝子フラグメントをPCR増幅によって得た。

【0119】

M. tuberculosisのゲノムフラグメントが長く、GC塩基量がより高かったので、関心対象のフラグメントを直接増幅することは困難であった。それゆえ、関心対象のフラグメントを、M. tuberculosis H37/RvのゲノムDNAをテンプレートとして用いる2回のPCR増幅を通じてのネステッドPCR法によって得た。

【0120】

2.1.1 PCRプライマーの設計

NCBIにおいて記録されているようなM. tuberculosis H37RvのPlcDタンパク質に対応する遺伝子配列により、プライマーをソフトウェアによって評価及びスクリーニングし、対応する酵素開裂部位を付加した。設計したプライマーを次の通り示した。

【表2】

表2：プライマー配列（配列番号26～29）

配列番号	プライマー名	プライマー配列	酵素開裂部位
26	<i>plcD</i> -1-F	5'-TTCAACCATCGCCGCCTCTACCA-3'	なし
27	<i>plcD</i> -1-R	5'-CCATCGCCGCCTCTACCAGT-3'	なし
28	<i>plcD</i> -2-F	5'-GGATCCATGGATGCCGGCGTCAG-3'	BamH I
29	<i>plcD</i> -2-R	5'-AAGCTTTTAGCACGGACCGCTCG-3'	Hind III

【0121】

### 2.1.2 1回目のPCR増幅反応

以下の表に従って、成分を0.5mlのエッペンドルフチューブ (Ependorf tube) の中で均質に混合し、20  $\mu$ lのPCR反応系を確立した。

【表 3】

<i>plcD</i> タンパク質コード遺伝子についての1回目のPCR反応系								
<i>plcD</i> -1-F	<i>plcD</i> -1-R	10 $\times$ 緩衝液	dNTP	DMSO	グリセロール	rTaq	テンプレート DNA	二重蒸留 H <sub>2</sub> O
0.4 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L	2 $\mu$ L	0.8 $\mu$ L	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	0.8 $\mu$ L	0.4 $\mu$ L	12.2 $\mu$ L

10

【0 1 2 2】

増幅プログラム：前変性を95 で10分間、本反応開始後、変性を95 で1分間、アニーリングを55 で1分間、伸長を72 で3分間を30周期、伸長を72 で10分間行った。

【0 1 2 3】

### 2.1.3 2回目のPCR増幅反応

初回のPCR産物をテンプレートとして使用し、次の表に従って、成分を0.5mlエッペンドルフチューブ (Ependorf tube) の中で均質に混合して、50  $\mu$ lのPCR反応系を形成した。

【表 4】

<i>plcD</i> タンパク質コード遺伝子についての2回目のPCR反応系								
<i>plcD</i> -2-F	<i>plcD</i> -2-R	10 $\times$ 緩衝液	dNTP	DMSO	グリセロール	rTaq	テンプレート DNA	二重蒸留 H <sub>2</sub> O
1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	5 $\mu$ l	2 $\mu$ L	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2 $\mu$ L	1 $\mu$ l	33 $\mu$ L

20

【0 1 2 4】

増幅プログラム：前変性を95 で10分間、変性を95 で1分間、アニーリングを55 で1分間、及び伸長を72 で3分間を30周期、伸長を72 で10分間行った。増幅産物を1%アガロースゲル電気泳動法によって識別及び回収した。

【0 1 2 5】

### 2.1.4 クローニングベクターの構築

以下の成分を0.5mlエッペンドルフチューブ (Ependorf tube) の中に入れて混合し、16 で12時間反応させ、それにより関心対象の遺伝子フラグメントをライゲートしたpMD18-Tクローニングベクターを得た。

【表 5】

pMD18-T ベクター	関心対象の遺伝子 フラグメント	溶液 I	総反応容積
0.5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	4.5 $\mu$ l	10 $\mu$ l

30

【0 1 2 6】

### 2.1.5 クローニングベクターをライゲートした産物を用いた形質転換

40  $\mu$ lのコンピテントDH5 細胞及び10  $\mu$ lのクローニングベクターライゲート産物を混合し、氷上で15分間インキュベートして、吸着させておいた。42 で90秒間の熱ショックの後、反応を氷浴によって即時終了させた。200  $\mu$ Lの抗生物質非含有LB培地を添加し、この培養物を振盪インキュベータにおいて37 で45分間インキュベートした。200  $\mu$ Lの培養溶液を、アンピシリンを含有する固相培地上へ延展し、この培養物を37 で12時間インキュベートした。

40

【0 1 2 7】

### 2.1.6 クローニングベクタープラスミドの回収

単一クローンコロニーを拾って、アンピシリンを含有する5mLの液体LB培地中に播種し

50

、振盪インキュベータの中で37 °Cで一晩インキュベートした。1.5mLの細菌溶液を1.5mLのエピンドルフチューブの中に入れ、12000gで1分間遠心分離し、上清を廃棄した。250 μLの溶液Iを添加し、沈殿物を振盪下で完全に懸濁した。250 μLの溶液IIを添加し、このチューブを数回穏やかに上下転倒させ、それにより細菌を溶解した。350 μLの溶液IIIを添加し、結果として生じる混合物を均質に混合し、氷浴中に15分間置いた。12000rpmで10分間遠心分離後、原形質回収のための平衡化しておいた吸着カラムへ上清を移し、室温で5分間静置させておいた。その後の回収操作は、ゲル抽出におけるステップと同じであった。

#### 【0128】

回収した産物を1%アガロースゲル電気泳動法によって識別し、回収が成功したことを確認した。関心対象の遺伝子フラグメントを含有する得られたpMD18-Tを酵素によって開裂させ、関心対象のクローニングしたフラグメントを回収し、クローニングベクターの一部を送って、配列決定した。

#### 【0129】

##### 2.1.7 PlcDを発現するクローニングベクターの構築

pMD-18Tの酵素開裂によって得られた関心対象の遺伝子フラグメントを、酵素で開裂させたPTO-T7ベクターへとライゲートし、このライゲーション系は、以下の通りであった：総反応容積10 μlにおけるPTO-T7ベクター（1 μl）、関心対象の遺伝子フラグメント（6 μl）、10 × T4 DNAリガーゼ緩衝液（1 μl）、及びT4 DNAリガーゼ（1 μl）。ライゲーションのための時間は、2時間とした。

#### 【0130】

##### 2.2 発現のためのクローニングベクターを用いた形質転換ならびにタンパク質の発現及び精製

###### 2.2.1 発現ベクターをライゲートした産物を用いた形質転換

このステップは、上述のライゲーションのステップと同じとした。ER2566コンピテント細胞を形質転換に使用し、形質転換したER2566を、カナマイシン含有LB耐性培地上へと延展した。

###### 2.2.2 PlcDタンパク質の発現及び精製

###### 関心対象のタンパク質の抽出

関心対象の正しいタンパク質を少量で発現させるために識別された細菌を活性化した。37 °Cで4時間のインキュベーション後、1mmol/LのIPTGを添加し、培養物を37 °Cで4時間維持した。細菌を9000gで6分間の遠心分離によって回収した。この細菌をすすいだ後、再度遠心分離して、沈殿物を回収した。この沈殿物を200mLの細菌溶液と5mLのTB8.0緩衝液との比で再懸濁した。再懸濁した細菌溶液を超音波処理によって破碎し、処理のための時間を500mLの細菌溶液あたり3分間で算出した。超音波処理後の試料を12000gで10分間遠心分離して、破碎した沈殿物を回収した。破碎した産物である沈殿物をTB8.0溶液で3回反復してすすぎ、各懸濁の後、37 °Cのインキュベータの中での振盪へ15分間供した。6M尿素を含有する15mLのTB8.0溶液中で再懸濁した後、この沈殿物を十分に通気した。沈殿物のほとんどを通気したとき、12000gで10分間の遠心分離を実施して、上清を回収し、これを後続の精製ステップにおいて使用した。

#### 【0131】

##### ニッケルイオンカラムアフィニティークロマトグラフィー

Ni-NTAカラム精製：関心対象のタンパク質の発現のための上清を、自己集合したNi-NTAカラムによって精製した（媒質の製造元：Qiagen）。試料をNi-NTAカラム上へと負荷し、0.2%のデオキシコール酸ナトリウム、50mMのTB8.0 + 6M尿素で溶出して、内毒素の一部を除去した後、200mlの50mM TB8.0 + 6M尿素で洗浄して、デオキシコール酸ナトリウムを除去し、最終的に、関心対象のタンパク質を100mlの溶離剤（150mMのイミダゾール、50mMのTB8.0、6Mの尿素）で溶出した。

#### 【0132】

##### タンパク質の還元

pIcDタンパク質を封入体の形態で発現させた。それゆえ、本実験では、6M尿素を使用して、この封入体を変性させ、溶解し、アフィニティークロマトグラフィー精製後にこの変性体を勾配透析法を用いることによって徐々に除去した。透析の間、ジチオトレイトール (DTT) を添加して、誤ったジスルフィド結合の形成を防止し、可溶性状態を保持する。透析ステップを以下の表に示した。結果を図 2 に示した。

【表 6】

pIcDタンパク質の透析及び復元のためのステップ

透析溶液	成分	透析時間
透析溶液 I	TB 8.0, 2 mmol/L DTT 中の 4 M 尿素	4 時間
透析溶液 II	TB8.0, 2 mmol/L DTT 中の 2 M 尿素	12 時間
透析溶液 III	TB8.0, 2 mmol/L DTT 中の 1 M 尿素	4 時間
透析溶液 IV	TB 8.0, 1 mmol/L DTT	4 時間
透析溶液 V	TB 8.0	4 時間

10

【0133】

#### 内毒素の除去及び検出

20

Shigui Liuら (Liu SG, Tobias R. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations [J]. Clinical Biochem, 1997, 30: 455 ~ 463) の方法によると、本実験において非イオン性界面活性剤を用いた抽出によって、内毒素を組換えタンパク質から除去した。

トリトンX-114をこのタンパク質溶液へと1% (w/v) の終濃度で添加し、これら2相を4で均質に混合した。15分間振盪した後、トリトンX-114を含有するタンパク質溶液を37の水浴中に10分間入れ、濁り系を観察し、油滴がこの溶液中に現れた。25、12000gで10分間の遠心分離後、水相を注意深く取り出した。先のステップを1回反復して、水相を収集した。処理されたタンパク質溶液中の内毒素量は、リムルス試薬ゲル法によって測定した。

30

【0134】

#### 例3. RV0183特異的T細胞応答のためのマーカーのスクリーニング

##### 3.1 刺激された試料の収集及び処理

##### 3.1.1 インビトロ刺激のための試料の収集

凝固防止ヘパリンチューブを用いて、IGRAにおいて陽性であると検査された4名のaTB入院患者から5mlの末梢血を収集し、IGRAにおいて陽性であると検査されかつ臨床徴候のない4名の潜伏感染した個体から5mlの末梢血を収集した。

【0135】

##### 3.1.2 試料の刺激及び収集

試料を9本の内毒素非含有2mlエッペンドルフチューブの中へと、エッペンドルフチューブあたり500 µlの末梢血で分注し、このエッペンドルフチューブの各々へ、培養溶液 (15 µl) を添加した (培養溶液は、次の通り調製した。30 µlのPBSへ133.33mg/mlのD型グルコース及び166.67mM KClを添加し、PBSは次の通り調製した。2.9gのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、0.24 gのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、8 gのNaCl、及び0.2 gのKClへ、超純水を1Lの終容積となるよう添加した。)。このエッペンドルフチューブをN、Ta、及びPと命名し、Nチューブは、いかなる刺激薬も含有せず、Taチューブは、刺激抗原RV0183 (1 µg) を含有し、PチューブはPHA (20 µg) を含有した。

40

末梢血をエッペンドルフチューブへ添加した後、結果として生じる混合物を、チューブを上下転倒させることによって均質に混合し、37のインキュベータの中で20~24時間インキュベートし、血漿試料を5000rpmで収集し、血漿中のサイトカイン量を測定した。

50

## 【 0 1 3 6 】

## 3.2 血漿中のサイトカイン量の測定

収集した血漿試料中のサイトカインを、市販のMilliplex Kit (Merck Millipore, 米国ミズーリ州セントチャールズ市) (パッチ番号: HCYTMAG-60K-PX38、HCP2MAG-62K-PX23、HCP3MAG-63K-PX11) を用いることによって定量し、検出指数は、EGFを含む69種のサイトカインを含んでおり(表2を参照されたい)、検査プラットフォームはLuminex 200とした(以下のステップにおける洗浄溶液、標準試料、基準試料、及び磁気ビーズを当該キットから得た)。

## 【 0 1 3 7 】

検査ステップは、1) 洗浄溶液(200  $\mu$ l)を96穴検査プレートにおける各ウェルへ入れ、室温で10分間振盪し、及び洗浄溶液を取り出すこと、2) 対応するウェルへ標準試料(25  $\mu$ l)及び基準試料(25  $\mu$ l)を別個に入れ、2つのウェルを各試料について設定したこと、3) アッセイ緩衝液(25  $\mu$ l)を各試料ウェルへ添加すること、4) 標準試料ウェル、基準試料ウェル及びブランク対照ウェルの各々へ、血漿マトリックス(25  $\mu$ l)を添加すること(このマトリックスは、キットにおける試料希釈剤を指す)、5) 血漿試料(25  $\mu$ l)を各ウェルへ添加すること、6) 磁気ビーズ(25  $\mu$ l)を各ウェルへ添加し、2~8 で一晩インキュベートすること、7) ウェルの中の液体を取り出し、このウェルをウェルあたり200  $\mu$ lの洗浄溶液で2回洗浄すること、8) 検出抗体(25  $\mu$ l)を各ウェルへ入れ、室温で1時間インキュベートすること、9) ストレプトアビジン(Streptavidin) - フィコエリトリン(25  $\mu$ l)を各ウェルへ添加し、室温で30分間反応させること、10) ウェル中の液体を取り出し、プレートを2回洗浄すること、11) シース液(150  $\mu$ l)を各ウェルへ入れ、振盪下で均質に混合すること、11) このプレートをLuminex 200プラットフォームにおいて読み取ること、ならびに12) 各試料について、Nチューブの実測値をTaチューブの実測値から減算して、差分値を最終結果として得ること(すなわち、Ta - Nによって表される、サイトカインの実際増分値)を含んでいた(この方法は、二重抗体サンドイッチ法であった)。

## 【 0 1 3 8 】

結果を表3に示した。サイトカインを、aTB患者及び潜伏感染集団におけるサイトカインの異なる応答について分析し、TB感染個体が活動性結核(aTB)の状態にあるか又は潜伏結核感染(LTBI)の状態にあるかは、IL-6が有効に判定することができるスクリーニングによって認められた(臨床症状を有する入院TB患者はaTB患者とし、IGRAにおいて陽性と検査されかつ臨床症状を有さない対象は潜伏感染個体とした)。

【表 7 - 1】

表 3

		試料 1(aTB)	試料 2(aTB)	試料 3(aTB)	試料 4(aTB)	試料 5(LTBI)	試料 6(LTBI)	試料 7(LTBI)	試料 8(LTBI)
		刺激抗原 RV0183							
EGF	pg/ml	-15	-47	15.29	16.45	-19	-32	10	-5
FGF-2	pg/ml	3.42	21.6	25.42	7.51	-1.93	15.95	-1	2.7
エオタキシン	pg/ml	13	-7	-3	7	-18	10	10	-36
TGF-a	pg/ml	0.97	5.42	5.71	2.9	0.1	0.97	7.5	0.09
G-CSF	pg/ml	146.96	282.14	125	110.96	118.4	134.96	-65	22.21
FIt-3L	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
GM-CSF	pg/ml	18.82	71.82	30.3	16.75	17.17	26.81	16.41	26.15
フラクタルカイン	pg/ml	103	174	152.3	183.68	160.64	8	50	81.64
IFNa2	pg/ml	20.11	43.99	0	14.08	-3.45	17.61	13.32	17.21
IFN-g	pg/ml	14.74	16.89	2.03	5.81	-0.42	1.5	5.54	57.59
GRO	pg/ml	3362	2571	2792	461	344	3095	-4242	179
IL-10	pg/ml	55.65	70.29	0	9.39	4.07	0	5.4	0
MCP-3	pg/ml	494.02	9772.1	763	294.42	93.3	440.39	2137	192.95
IL-17P40	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
MDC	pg/ml	-100	57	9.24	34.53	-255	115	-12	40
IL-12P70	pg/ml	0	1.07	0.42	0	0	0.21	0.11	0
IL-13	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-15	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
sCD40L	pg/ml	885	-1481	1567	636	-636	-1707	-2639	-2161
IL-17A	pg/ml	0	1.35	0	0	0	0	-0.4	0
IL-1RA	pg/ml	0	45.6	0	0	0.39	0	15.05	0
IL-1a	pg/ml	29.62	83.48	66.36	31.88	0	-24.77	38.26	3.61
IL-9	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-1b	pg/ml	13.78	132.92	47.86	78.77	59.26	53.93	5.65	29.01
IL-2	pg/ml	0	0	0	0	0	0	-61.6	0
IL-3	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-4	pg/ml	-9.92	0	0	0	0	0	0	0
IL-5	pg/ml	0	0	0	0	0	0	-2.76	0
IL-6	pg/ml	790	6254.3	761.01	1098.7	403.11	241.52	329	248.01

10

20

30

【表 7 - 2】

IL-7	pg/ml	7.81	19.08	16.88	15.1	7.53	11.7	2.8	2.08
IL-8	pg/ml	5505.88	5694.9	5889.9	6290.9	6002.9	6015.9	0	460
IP-10	pg/ml	7761.01	0	0	0	589	-4975	0	9317
MCP-1	pg/ml	6668.62	0	0	6099.6	0	6729.6	0	6968.6
MIP-1a	pg/ml	412	3062.9	917.75	152.9	248.53	285	913	138.26
MIP-1b	pg/ml	515	2091	422	480	386	394	240	418
TNF-a	pg/ml	-12.67	159.5	43	56.05	63.51	39.22	49	39.33
TNF-b	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
VEGF	pg/ml	153	422	168	107.13	19.56	104	147	96.24
CXLC6	pg/ml	58	267	48	38.46	27	240	1	24.21
CXCL9	pg/ml	-543	-1447	-904	-10528	-227	-779	-1340	1041
CXCL11	pg/ml	-176	87	-144	-445.8	-37	-150	-203	-99
CXCL19	pg/ml	-21.31	-9.05	-28	-39	-1.17	-15.7	-9.31	-4.99
CXCL20	pg/ml	47.89	107.51	227.32	243.33	79.97	360.95	1.52	49.84
IL-11	pg/ml	0	5.23	0.07	-0.84	-1.74	1.7	-2.67	0
IL-29	pg/ml	-33	-217	-113.5	-124	0	0	0	0
M-CSF	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
XCL1	pg/ml	-24.55	-9.55	-19.74	-33.12	4.98	-46.29	-19.3	0
6C カイン	pg/ml	206	397	424	33	-64	94	518	-30.9
BCA-1	pg/ml	-0.83	39.21	6.69	3.15	6.32	4.77	5.54	8.84
CTACK	pg/ml	167	-21	-30	-29	-20	-4	-18	-20
ENA-78	pg/ml	1853	15438	2397	4530	798	13933	26926	256
エオタキシン-2	pg/ml	-39	-1498	170	-1087	-576	-194	-272	-412
エオタキシン-3	pg/ml	-17.91	63	142	54	-88	8	-8	-27
I-309	pg/ml	1.66	8.86	3.39	-0.21	-3.32	-4.9	7.54	1.35
IL-16	pg/ml	-25.14	-35.82	65.44	-63.86	-29.7	-289	-95.3	-10.09
IL-20	pg/ml	73	49	917.62	-113	-63	83	446	370
IL-21	pg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-23	pg/ml	1.56	23.47	174	0	0	-4.67	60.74	0
IL-28a	pg/ml	0	18.63	9.58	2.55	0	-2.55	7.7	-22.32
IL-33	pg/ml	0	0	60.02	0	2.43	0	0	0
LIF	pg/ml	0	0	0	13.58	0	3.76	16.1	0
MCP-2	pg/ml	103.43	813	5.5	70.97	36.72	12.29	-19.4	133.34
MCP-4	pg/ml	10.17	43	19	9.38	-7.69	-10.81	65	9.96
MIP-1d	pg/ml	191	4245	119	-375	-89	-1152	-9	-564
SCF	pg/ml	0	8.66	0.82	0	-5.14	0	5.77	0
SDF-1a	pg/ml	298	1086	1564	-511	-519	0	507	-410
TARC	pg/ml	-0.4	1.33	0	4.88	-2.55	-4.64	-10.1	-1.11
TPO	pg/ml	47	102	169	-47	-61	-71	30	-7
TRAIL	pg/ml	0	31.1	0	0	0	0.43	3.55	0

10

20

30

40

【 0 1 3 9 】

例4. RV0183を用いることによるTB感染集団からのaTB患者のスクリーニング

## 4.1 コホート対象情報

4.1.1 aTB患者：活動性結核と臨床診断された79名の患者、2) 潜伏結核感染 (LTBI) 集団及び健常集団：このコホートへと参加した37名の医療従事者であって、IGRAにおいて

50

陽性と検査されたが、結核の臨床症状を有さずかつ結核歴のない14名のヒースケア従事者を潜伏感染個体と診断し、IGRAにおいて陰性と検査されたその他の23名のヒースケア従事者を、*M. tuberculosis*に感染していない健常個体と診断した。

【0140】

#### 4.2 試料収集ならびに試料刺激及び培養のためのシステム

4.2.1 全血試料を3本の2mlエッペンドルフチューブの中へと、1本あたり500  $\mu$ l全血で分注し、この3本のエッペンドルフチューブをN、Ta及びPと命名し、Nチューブは、抗原を含有していない（例4において説明される通り調製された）培養溶液（15  $\mu$ l）を含んでおり、Taチューブは、組換え抗原RV0183（1  $\mu$ g）を含有する培養溶液（15  $\mu$ l）を含んでおり、Pチューブは、PHA（20  $\mu$ g）を含有する培養溶液（15  $\mu$ l）を含んでいた。

10

4.2.2 分注後、チューブを穏やかに上下転倒させることによって、全血を均質に混合し、37  $^{\circ}$ Cのインキュベータの中で20  $\pm$  2時間インキュベートした。

【0141】

4.2.3 インキュベーション後、血漿を5000rpmで10分間の遠心分離によって収集し、IL-6レベルを測定した。

【0142】

#### 4.3 血漿中のIL-6レベルの測定

IL-6 ELISA Kit (Xiamen Innovax Biotech CO., LTD.) を用いて、血漿中のIL-6レベルを測定した。

【0143】

20

1) 血漿試料の処理：試料を20%新生児ウシ血清 (NBS) で2倍希釈し、2) 試料添加及びインキュベーション：96穴IL-6検査プレートの各ウェルへ、処理した血漿（100  $\mu$ l）を入れ、反応を37  $^{\circ}$ Cで40分間実施し、このプレートを5回洗浄した後、洗浄物を取り出し、3) 酵素添加及びインキュベーション：酵素標識済み二次抗体（100  $\mu$ l）を各ウェルへ入れ、反応を37  $^{\circ}$ Cインキュベータの中で40分間実施し、プレートを5回洗浄した後、洗浄物を取り出し、4) 発色：発色溶液を入れ、反応を10分間実施し、終止溶液（50  $\mu$ l）を添加して反応を終止させ、5) 測定：450nmでの吸光値をELISA機器によって測定し、ならびに6) 各試料について、Nチューブの実測値をTaチューブの実測値から減算して、差分値を最終結果として得た（すなわち、Ta - Nによって表される、サイトカインの実際増分値）。

【0144】

30

結果を図3に示した。500  $\mu$ lの末梢血細胞を1  $\mu$ gの組換え抗原で刺激し、aTB患者と*M. tuberculosis*に潜伏感染した集団の間のIL-6分泌レベルに有意差があった。

【0145】

#### 例5. RV0183を用いることによる一般集団からのaTB患者のスクリーニング

##### 5.1 コホート被験者情報

5.1.1 aTB患者：活動性結核と臨床診断された207名の患者、

5.1.2 健康診断を受ける被験者、及び医療従事者：一般部門で健康診断を受けた65名の被験者であって、IGRAにおいて陽性と検査されかつ臨床症状を有さない被験者を*M. tuberculosis*に潜伏感染した個体と診断し、IGRAにおいて陰性と検査された被験者を*M. tuberculosis*に感染していない個体と診断した。82名の医療従事者のうち、IGRAにおいて陽性と検査されかつ臨床症状を有さない医療従事者を*M. tuberculosis*に潜伏感染した個体と診断し、IGRAにおいて陰性と検査された医療従事者を*M. tuberculosis*に感染していない個体と診断した。

40

【0146】

##### 5.2 試料収集ならびに試料刺激及び培養のためのシステム

5.2.1 3mlの末梢血を各被験者から収集し、全血を3本の2mlエッペンドルフチューブへ1本あたり1ml全血で分注し、この3本のエッペンドルフチューブをN、Ta及びPと命名した。各エッペンドルフチューブへ、（例4において説明した通り調製された）培養溶液（30  $\mu$ l）を入れ、Nチューブへ抗原を含有しない培養溶液を入れ、Taチューブへ組換え抗原RV0183（2  $\mu$ g）を含有する培養溶液（30  $\mu$ l）を入れ、PチューブへPHA（40  $\mu$ g）を含有する

50

培養溶液 (30  $\mu$ l) を入れ、

【0147】

5.2.2 分注後、チューブを上下転倒させることによって全血を均質に混合し、37 のインキュベータの中で20 $\pm$ 2時間静的にインキュベートし、

5.2.3 インキュベーション後、これらのエッペンドルフチューブを遠心分離器の中に入れ、血漿試料を5000rpmで10分間の遠心分離によって収集し、IL-6分泌レベルを測定し、

【0148】

### 5.3 血漿中のIL-6分泌レベルの測定

IL-6 ELISA Kit (Xiamen Innovax Biotech CO., LTD.) を用いて、血漿中のIL-6レベルを測定した。 10

【0149】

IL-6を測定するための方法は、例4において説明した方法と同じであった。

【0150】

結果を図4に示した。RV0183を用いた末梢血細胞の刺激後、aTB患者とM. tuberculosisに潜伏感染した集団の間には、IL-6分泌レベルに有意差があった。aTB患者とM. tuberculosisに感染していない個体の間にも、IL-6レベルに有意差があり、結果を図5に示した。先の結果は、RV0183がaTB患者を検出するために使用することができることを示した。

【0151】

### 例6. RV0183の抗原性フラグメントを用いることによるaTB患者のスクリーニング

 20

#### 6.1 コホート被験者情報

例5と同じ。

【0152】

#### 6.2 試料収集ならびに試料の刺激及び培養のためのシステム

6.2.1 診療所におけるaTB被験者を集め、15mlの全血を各被験者から収集し、この全血を22本のエッペンドルフチューブへ、1本あたり500  $\mu$ lの全血で分注した。これらのうち、1本のエッペンドルフチューブを陰性対照チューブ(N)として用い、その他の21本のエッペンドルフチューブをP1、P2、P3~P21と命名した。P1チューブへペプチドフラグメントRV0183-p1 (1  $\mu$ g) を入れ、P2チューブへペプチドフラグメントRV0183-p2 (1  $\mu$ g) を入れるなどし、最後にはペプチドフラグメントRV0183-p21 (1  $\mu$ g) をP21チューブへ入れた。 30

6.2.2 分注後、チューブを上下転倒させることによって全血を均質に混合し、37 のインキュベータの中で20 $\pm$ 2時間静的にインキュベートし、

6.2.3 インキュベーション後、このエッペンドルフチューブを遠心分離器の中に入れ、血漿試料を5000rpmで10分間の遠心分離によって収集し、IL-6分泌レベルを測定し、

【0153】

### 6.3 血漿中のIL-6分泌レベルの測定

IL-6 ELISA Kit (Xiamen Innovax Biotech CO., LTD.) を用いて、血漿中のIL-6レベルを測定した。

IL-6を測定するための方法は、例4において説明した方法と同じであった。 40

【0154】

結果を図6に示した。RV0183の抗原性フラグメント(p1~p21)で刺激したaTB患者の全血において、IL-6分泌レベルは、異なる程度まで増大したのに対し、健常被験者において、IL-6応答はほぼなかった。この結果は、抗原性フラグメントが活動性結核を診断するために使用することができることを示した。

【0155】

### 例7. RV0183及びP1cDを併用することによるaTB患者のスクリーニング

#### 7.1 コホート被験者情報

aTB (IGRA+) は、TB-IGRAにおいて陽性と検査されかつ活動性結核と診断された患者を表し、aTB (IGRA-) は、TB-IGRAにおいて陰性と検査されかつ活動性結核と診断された患 50

者を表した。HC (IGRA+) は、TB-IGRAにおいて陽性と検査された健常被験者を表し、HC (IGRA-) は、TB-IGRAにおいて陰性と検査された健常被験者を表した。aTB (IGRA+) については55名、aTB (IGRA-) については9名、HC (IGRA+) については13名、及びHC (IGRA-) については52名の被験者がいた。

【0156】

## 7.2 試料収集ならびに試料の刺激及び培養のためのシステム

7.2.1 4mlの末梢血を各被験者から収集し、全血を4本の2mlエッペンドルフチューブへ、1本あたり1ml全血で分注し、この4本のエッペンドルフチューブをN、Ta1、Ta2、及びPと命名し、(例4において説明通り調製された)培養溶液(30 $\mu$ l)を各エッペンドルフチューブへ入れ、Nチューブへ抗原を含有しない培養溶液を入れ、Ta1チューブへ組換え抗原RV0183(2 $\mu$ g)を含有する培養溶液(30 $\mu$ l)を入れ、Ta2チューブへ組換え抗原P1cd(2 $\mu$ g)を含有する培養溶液(30 $\mu$ l)を入れ、PチューブへPHA(40 $\mu$ g)を含有する培養溶液(30 $\mu$ l)を入れ、

10

7.2.2 分注後、チューブを上下転倒させることによって全血を均質に混合し、37 $^{\circ}$ Cのインキュベータの中で20 $\pm$ 2時間静的にインキュベートし、

【0157】

7.2.3 インキュベーション後、このエッペンドルフチューブを遠心分離器の中に入れ、血漿試料を5000rpmで10分間の遠心分離によって収集し、IL-6分泌レベルを測定し、

【0158】

## 7.3 血漿中のIL-6分泌レベルの測定

20

IL-6 ELISA Kit (Xiamen Innovax Biotech CO., LTD.)を用いて、血漿中のIL-6分泌レベルを測定した。

IL-6を測定するための方法は、例4において説明した方法と同じであった。

結果を図7A～図7Bに示した。RV0183及びP1cdを用いた被験者の全血の刺激から結果として生じた実際に変化したIL-6レベルは、aTB患者のスクリーニングにおいて相補的な効果を有していた。ROC分析をさらに用いて、活動性結核の診断において、RV018もしくはP1cdを単独で用いた効果、又はRV0183及びP1cdを併用した効果を検査した。ROC曲線は、アッセイにおけるRV0183及びP1cdの併用が、このアッセイの感度及び特異度を亢進させることができることを示し、結果を図8に示した。

先の結果からわかるように、RV0183又はP1cdを用いた刺激から結果的に生じた実際に変化したIL-6レベルは、aTB患者の検出のために単独で使用することができ又は併用することができ、高い感度及び特異度を有していた。

30

【0159】

## 例8. M. tuberculosisの他の抗原が活動性結核をスクリーニング又は診断する能力の評価

### 8.1 コホート被験者情報

活動性結核と臨床診断された5名の患者、及び臨床症状を有さない5名の潜伏感染した個体から、全血試料を収集した。

【0160】

### 8.2 試料収集及び試料刺激培養のためのシステム

8.2.1 10mlの全血試料を収集し、9本のエッペンドルフチューブへ1本あたり1mlの全血で分注した。これらのうち、1本のエッペンドルフチューブを陰性対照チューブ(N)として用い、その他の8本のエッペンドルフチューブへ、表3に列挙されるような7種の抗原のうち1種を1本あたり2 $\mu$ gで入れ、

40

【0161】

8.2.2 分注後、チューブを上下転倒させることによって全血を均質に混合し、37 $^{\circ}$ Cのインキュベータの中で20 $\pm$ 2時間静的にインキュベートし、

【0162】

8.2.3 インキュベーション後、このエッペンドルフチューブを遠心分離器の中に入れ、血漿試料を5000rpmで10分間の遠心分離によって収集し、IL-6分泌レベルを測定し、

【0163】

50

### 8.3 血漿中のIL-6分泌レベルの測定

IL-6 ELISA Kit (Xiamen Innovax Biotech CO., LTD.) を用いて、血漿中のIL-6レベルを測定した。

【0164】

IL-6を測定するための方法は、例4において説明した方法と同じであった。

【0165】

結果を表4に示した。ESAT-6、CFP-10、RV1009、RV1884c、RV2389c、RV2450c、RV3097c、及びRV3542などの抗原を用いた刺激後、aTB試料とLTBI試料の間にIL-6レベルの有意な変化はなく、すなわち、これらの抗原を使用して活動性結核を潜伏結核感染と区別することはできなかった。

【表8】

表4

	aTB	aTB	aTB	aTB	aTB	LTBI	LTBI	LTBI	LTBI	LTBI
<b>ESAT-6</b>	<b>0.085</b>	<b>0.162</b>	<b>0.132</b>	<b>0.203</b>	<b>0.162</b>	<b>0.051</b>	<b>0.069</b>	<b>0.097</b>	<b>0.071</b>	<b>0.125</b>
<b>CFP-10</b>	<b>0.038</b>	<b>0.074</b>	<b>0.139</b>	<b>0.12</b>	<b>0.074</b>	<b>0.044</b>	<b>0.075</b>	<b>0.1</b>	<b>0.079</b>	<b>0.061</b>
<b>RV1009</b>	<b>0.054</b>	<b>0.086</b>	<b>0.157</b>	<b>0.094</b>	<b>0.086</b>	<b>0.057</b>	<b>0.072</b>	<b>0.074</b>	<b>0.066</b>	<b>0.065</b>
<b>RV1884C</b>	<b>0.172</b>	<b>0.062</b>	<b>0.135</b>	<b>0.121</b>	<b>0.062</b>	<b>0.037</b>	<b>0.074</b>	<b>0.106</b>	<b>0.096</b>	<b>0.054</b>
<b>RV2389C</b>	<b>0.205</b>	<b>0.053</b>	<b>0.282</b>	<b>0.132</b>	<b>0.053</b>	<b>0.081</b>	<b>0.065</b>	<b>0.1</b>	<b>0.198</b>	<b>0.055</b>
<b>RV2450C</b>	<b>0.07</b>	<b>0.075</b>	<b>0.818</b>	<b>0.379</b>	<b>0.075</b>	<b>0.148</b>	<b>0.082</b>	<b>0.282</b>	<b>0.094</b>	<b>0.059</b>
<b>RV3542</b>	<b>0.067</b>	<b>0.171</b>	<b>0.251</b>	<b>0.279</b>	<b>0.171</b>	<b>0.054</b>	<b>0.023</b>	<b>0.091</b>	<b>0.136</b>	<b>0.129</b>
<b>RV3097C</b>	<b>0.073</b>	<b>0.067</b>	<b>0.032</b>	<b>0.207</b>	<b>0.067</b>	<b>0.064</b>	<b>0.136</b>	<b>0.086</b>	<b>0.284</b>	<b>0.057</b>

【0166】

例9. RV0183のポリペプチドライブラリを用いることによる、異なる肺疾患に罹患している患者からのaTB患者のスクリーニング

#### 9.1 コホート被験者情報

9.1.1 活動性TB症例：活動性結核と臨床診断された101名の患者、

9.1.2 慢性結核の症例：臨床症状を有さなかった19名の慢性結核患者、

9.1.3 診療所における非TB肺疾患を有する症例：IGRAにおいて陽性と検査され、M. tuberculosisに潜伏感染した個体である症例；IGRAにおいて陰性と検査され、M. tuberculosisに感染していなかった個体である症例。

【0167】

#### 9.2 試料収集ならびに試料の刺激及び培養のためのシステム

9.2.1 試料収集：試料の収集及び処理は、例5において説明したのと同じであった。

9.2.2 試料の刺激及び培養：RV0183の21個の抗原性フラグメント（配列番号5～25）を含むポリペプチドライブラリを刺激薬（Ta）として用いて、全血を刺激した。このポリペプチドライブラリの各ポリペプチドを1µg/mLの濃度の溶液として製剤し、これらの溶液を等量で混合した後、30µLを本実験において用いた。他の操作は、例5において説明したのと同じであった。

【0168】

#### 9.3 IL-6レベルの測定

例5と同じ。

【0169】

結果を図9に示した。RV0183のポリペプチドライブラリを用いた全血試料の刺激後、aT

10

20

30

40

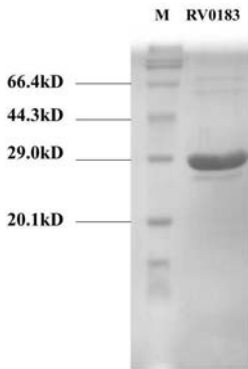
50

B患者におけるIL-6レベルは、慢性肺結核患者及び他の肺疾患患者におけるIL-6レベルよりも有意に高く、このポリペプチドライブラリがaTB患者をスクリーニングするために使用することができることを示した。

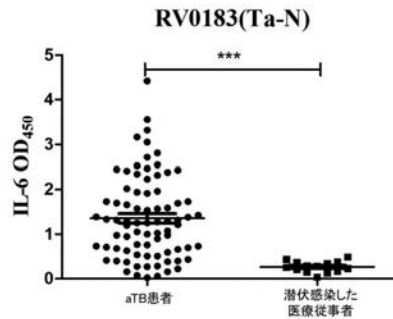
【 0 1 7 0 】

本発明の具体的な実施形態を詳細に説明してきたが、当業者は、開示された教示全部により、種々の修正及び変更を行うことができること、ならびにこのような修正及び変更が本発明の範囲内であることを理解するであろう。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲及びその何らかの等価物によって与えられる。

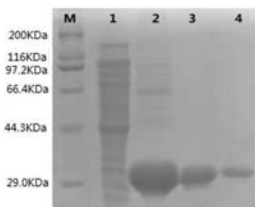
【 図 1 】



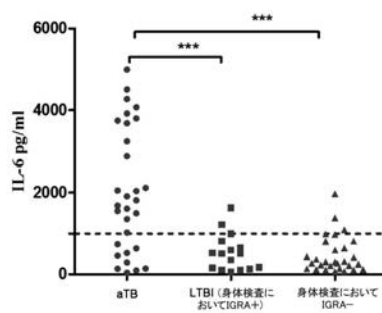
【 図 3 】



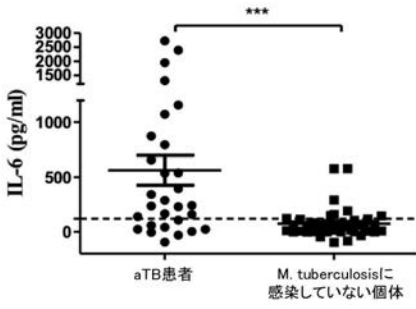
【 図 2 】



【 図 4 】



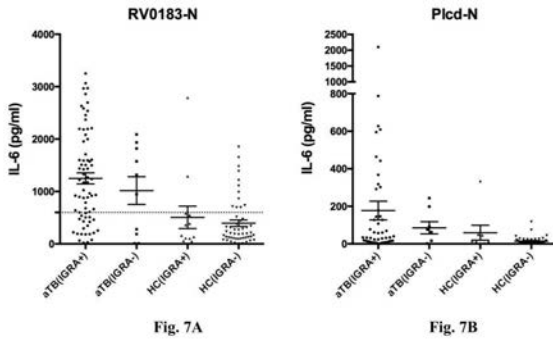
【 図 5 】



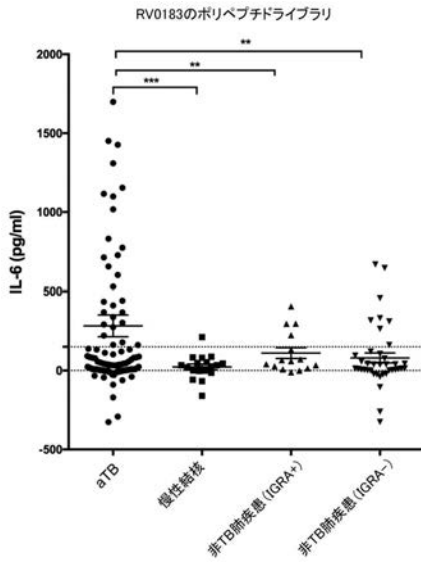
【 図 6 】

	RV0183P	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	p17	P18	P19	P20	P21
TB-1	0.35	0.04	0.14	0.05	0.00	0.01	0.05	0.03	0.04	0.02	0.01	0.00	0.01	0.07	0.03	0.06	0.00	0.10	0.03	0.00	0.10	0.03
TB-2	0.33	0.10	0.09	0.03	0.00	0.01	0.12	0.06	0.09	0.05	0.07	0.04	0.18	0.07	0.11	0.06	0.11	0.02	0.01	0.02	0.01	
TB-3	2.34	0.16	0.40	0.18	0.00	0.10	0.26	0.01	0.06	0.18	0.20	0.00	0.09	0.00	0.15	0.00	0.45	0.00	0.06	0.06	0.00	
TB-4	1.35	0.02	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	0.12	0.19	0.00	0.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.03	0.00	
TB-5	3.12	0.27	0.14	0.08	0.39	0.18	0.03	0.13	0.28	0.55	0.06	0.03	0.04	0.13	0.18	0.11	0.33	0.00	0.09	0.00	0.00	
TB-6	1.95	0.14	0.08	0.20	0.13	0.20	0.28	0.19	0.28	0.07	0.07	0.16	0.15	0.13	0.29	0.11	0.09	0.00	0.11	0.26	0.10	0.15
HC-1	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.03	0.00	0.01	0.00	0.02	0.05

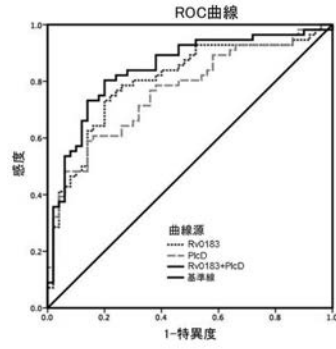
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



	AUC	感度	特異性	p
Rv0183	0.803	73%	80%	<0.001
PlcD	0.767	60.70%	84%	<0.001
Rv0183+PlcD	0.844	80.40%	80%	<0.001

【配列表】

2019508684000001.app

## 【 国际调查报告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/CN2017/071462
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
G01N 33/68 (2006.01) i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
G01N 33/-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC: xiamen university, ge shengxiang, liu yongliang, chen mengyuan, zhang jun, xia ningshao, activity, RV0183, PLCD, IL-6, amino acid, peptide, sequence, KIT, DIAGNOS+, MYCOBACTERIUM, TUBERCULOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YANG, Yonghui et al. "Expression Levels of IL-6, IL-37 and TNF- $\alpha$ in Active Pulmonary Tuberculosis and Their Correlation", Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, vol. 22, no. 12, 31 December 2015 (31.12.2015), ISSN:1006-1703, page 1239, the abstract, and page 1241, left column, lines 3-6	1-4, 8
Y	JIA, Hao. "jie2he2 fen1qi2gan3jun1 Rv0183 dan4bai2 dui4 fei4pao4ju4shi4 xi4bao1 (RAW264.7) sheng1wu4xue2 xiao4ying4 de yan2jiu1", shuo4shi4 xue2wei4 lun4wen2, 31 December 2010 (31.12.2010), page 1, the abstract, paragraph 3	1-4, 8
A	CN 104017806 A (FUDAN UNIVERSITY et al.) 03 September 2014 (03.09.2014) the whole document	1-4, 8
<input checked="" 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 another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 24 March 2017	Date of mailing of the international search report 21 April 2017	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WEN, Bo Telephone No. (86-10) 61648419	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/CN2017/071462

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104897893 A (FUDAN UNIVERSITY HUASHAN HOSPITAL) 09 September 2015 (09.09.2015) the whole document	1-4, 8
A	US 2011021367 A1 (GOPAL, BALSUBRAMANIAN) 27 January 2011 (27.01.2011) the whole document	1-4, 8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/CN2017/071462

**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: 5-7  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
[1] claims 5-7 are method claims, and the subject matter relates to a diagnosis or therapy of abortive tuberculosis, and constitutes a method of diagnosis implemented on human or animal body, or a method of treatment for the human or animal body by therapy, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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/CN2017/071462

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104017806 A	03 September 2014	None	
CN 104897893 A	09 September 2015	None	
US 2011021367 A1	27 January 2011	US 8058022 B2	15 November 2011
		WO 2011012962 A1	03 February 2011
		INCHE 200901774 A	04 February 2011

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2017/071462
A. 主题的分类 G01N 33/68(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) G01N33/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, CNKI, WPL, EPODOC: 厦门大学, 葛胜祥, 刘永亮, 陈梦媛, 张军, 夏宁邵, 活动, 结核, 分枝杆菌, 试剂盒, RV0183, PLCD, IL-6, 诊断, 氨基酸, 肽, 序列, KIT, DIAGNOS+, MYCOBACTERIUM, TUBERCULOSIS		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	杨永辉等, "IL-6、IL-37和TNF- $\alpha$ 在活动性肺结核中表达水平及相关性" 标记免疫分析与临床, 第22卷, 第12期, 2015年12月31日(2015-12-31), ISSN: 1006-1703, 第1239页摘要部分和第1241页左栏第3-6行	1-4, 8
Y	贾浩, "结核分枝杆菌Rv0183蛋白对肺泡巨噬细胞(RAW264.7)生物学效应的研究" 硕士学位论文, 2010年12月31日(2010-12-31), 第I页摘要部分第3段	1-4, 8
A	CN 104017806 A (复旦大学等) 2014年9月3日(2014-09-03) 全文	1-4, 8
A	CN 104897893 A (复旦大学附属华山医院) 2015年9月9日(2015-09-09) 全文	1-4, 8
A	US 2011021367 A1 (GOPAL, BALSUBRAMANIAN) 2011年1月27日(2011-01-27) 全文	1-4, 8
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2017年3月24日		国际检索报告邮寄日期 2017年4月21日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号(86-10)62019451		受权官员 温博 电话号码(86-10)61648419

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/071462

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1.  权利要求: 5-7  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:  
[1] 权利要求5-7是方法权利要求, 其主题涉及对于活动性结核的诊断或治疗, 构成了人体或动物体上实施的诊断方法, 或通过治疗对人体或动物体进行处置的方法, 属于PCT细则39.1(4)规定的  
不要求检索的主题。
2.  权利要求:  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3.  权利要求:  
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/071462

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	104017806	A	2014年 9月 3日	无	
CN	104897893	A	2015年 9月 9日	无	
US	2011021367	A1	2011年 1月 27日	US	8058022 B2 2011年 11月 15日
				WO	2011012962 A1 2011年 2月 3日
				IN	CHE200901774 A 2011年 2月 4日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/35 (2006.01)	C 0 7 K 14/35	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	Z
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z
C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z

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

- (72)発明者 ゲー、シェンシャン  
中華人民共和国 3 6 1 0 0 5 フージェン プロヴィンス、シャアメン、スーミン ディストリ  
クト、スー ミン ナン ロード ナンバー4 2 2
- (72)発明者 リュウ、ヨンリヤン  
中華人民共和国 3 6 1 0 0 5 フージェン プロヴィンス、シャアメン、スーミン ディストリ  
クト、スー ミン ナン ロード ナンバー4 2 2
- (72)発明者 チェン、メンユアン  
中華人民共和国 3 6 1 0 0 5 フージェン プロヴィンス、シャアメン、スーミン ディストリ  
クト、スー ミン ナン ロード ナンバー4 2 2
- (72)発明者 チャン、チュン  
中華人民共和国 3 6 1 0 0 5 フージェン プロヴィンス、シャアメン、スーミン ディストリ  
クト、スー ミン ナン ロード ナンバー4 2 2
- (72)発明者 シア、ニンシャオ  
中華人民共和国 3 6 1 0 0 5 フージェン プロヴィンス、シャアメン、スーミン ディストリ  
クト、スー ミン ナン ロード ナンバー4 2 2
- Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CA01 CA25 DA36 FB03 JA01  
4B063 QA18 QQ06 QQ42 QR32 QR62 QR75 QS16 QS25  
4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 DA75 DA76 DA86 EA50 FA74

专利名称(译)	用于诊断活动性结核病的方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019508684A</a>	公开(公告)日	2019-03-28
申请号	JP2018537822	申请日	2017-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学 北京宏泰生物制药企业有限公司		
申请(专利权)人(译)	Shaamen大学 北京宏泰生物制药企业有限公司		
[标]发明人	グーシエンシャン チャンチュン シアニンシャオ		
发明人	グー、シエンシャン リュウ、ヨンリヤン チェン、メンユアン チャン、チュン シア、ニンシャオ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C40B40/10 C12N15/31 C07K14/35 C12Q1/6851 C12Q1/686 C12Q1/6876 C12N15/63		
CPC分类号	C40B40/10 G01N33/5695 G01N33/6854 G01N33/6869 G01N2333/5412 G01N2800/12 G01N2333/35 G01N33/68 G01N2500/00 G01N2800/26 G01N2800/52 A61K39/04 G01N33/577 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C40B40/10 C12N15/31 C07K14/35 C12Q1/6851.Z C12Q1/686.Z C12Q1/6876.Z C12N15/63.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CA01 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/JA01 4B063 /QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QS16 4B063/QS25 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045 /EA50 4H045/FA74		
优先权	201610034476.6 2016-01-20 CN		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于诊断受试者是否患有活动性结核的方法，用于确定治疗对活动性结核的治疗效果的方法，用于筛选能够治疗活动性结核的候选药物的方法公开了包含特异性刺激剂和用于检测IL-6水平的试剂的方法和试剂盒，所述方法和试剂盒属于分子生物学，免疫学和疾病诊断领域。【选择图表】无

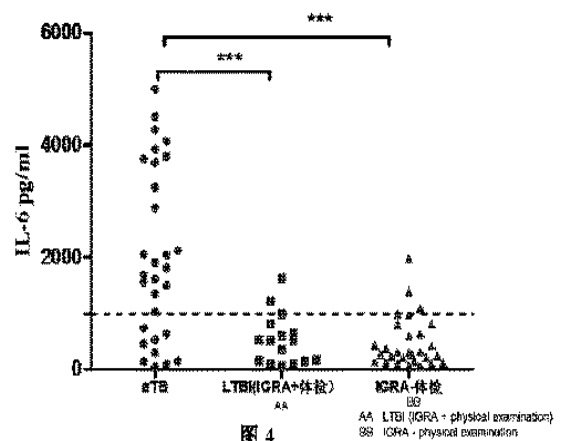


图 4