

(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2019-530873

(P2019-530873A)

(43) 公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	4 B O 2 9
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/545 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/545 Z	
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569 F	
<b>CO 7 K 17/00 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 V	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-517370 (P2019-517370)  
 (86) (22) 出願日 平成29年9月29日 (2017. 9. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月13日 (2019. 5. 13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/074812  
 (87) 国際公開番号 WO2018/060447  
 (87) 国際公開日 平成30年4月5日 (2018. 4. 5)  
 (31) 優先権主張番号 62/402, 014  
 (32) 優先日 平成28年9月30日 (2016. 9. 30)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 519107571  
 バイオプロミック アクティエボラーク  
 スウェーデン国, 1 7 1 6 5 ソルナ,  
 トムテボダベージェン 2 3 アー  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100123582  
 弁理士 三橋 真二  
 (74) 代理人 100117019  
 弁理士 渡辺 陽一  
 (74) 代理人 100141977  
 弁理士 中島 勝  
 (74) 代理人 100150810  
 弁理士 武居 良太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 阻害成分の除去方法

(57) 【要約】

本発明は、分泌体液、排泄体液及び脳脊髄液からなる群から選択される体液を含む診断試料中の1種以上の疾患関連成分の存在を検出するインビトロ方法に関する。

この方法は、

a) 前記試料中に存在する1種以上の阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することができる1種以上のリガンドが少なくとも一部に接合した固相に前記試料を接触させる工程；

b) 前記1種以上の阻害成分を前記固相表面に存在する1種以上のリガンドに結合させ、それにより前記試料中の前記1種以上の阻害成分の量を低減する工程、及びその後、

c) 前記診断試料中の1種以上の疾患関連成分の存在を検出する工程を含む。

前記1種以上の阻害成分は、工程c)において結合しかつ検出を妨害する可能性があることを特徴とする。

【選択図】 図1

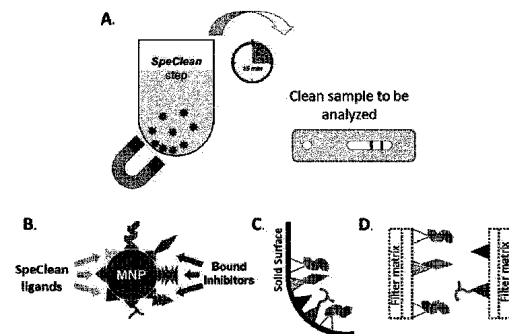


Fig. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

分泌体液、排泄体液及び脳脊髄液からなる群から選択される体液を含む診断試料中の 1 種以上の疾患関連成分の存在を検出するためのインビトロ方法であって、前記方法は、  
a) 前記試料中に存在する 1 種以上の阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することができる、1 種以上のリガンドが少なくとも一部に接合した固相に前記試料を接触させる工程、

b) 前記 1 種以上の阻害成分を前記固相表面に存在する 1 種以上のリガンドに結合させ、それにより前記試料中の前記 1 種以上の阻害成分の量を低減する工程、及びその後、

c) 前記診断試料中の 1 種以上の疾患関連成分の存在を検出する工程を含み、  
前記 1 種以上の阻害成分は、工程 c) において結合しかつ検出を妨害する可能性があることを特徴とする、インビトロ方法。

10

## 【請求項 2】

前記 1 種以上の阻害成分は複数種のタンパク質と複数種の炭水化物の混合物を含む、請求項 1 に記載のインビトロ方法。

## 【請求項 3】

前記 1 種以上の阻害成分は 5 ~ 1 0 0 0 k D a の分子量を持つ、請求項 2 に記載のインビトロ方法。

## 【請求項 4】

前記 1 種以上の阻害成分は少なくとも 1 種の糖タンパク質を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

20

## 【請求項 5】

前記 1 種以上の阻害成分は、I g - 1 鎖 C 領域、プロトロンビン、アポリポタンパク質 D、ウロモジュリン、グリコホリン - C、亜鉛 - - 2 - 糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン 1 8 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

## 【請求項 6】

前記 1 種以上の阻害成分は、アポリポタンパク質 D、ウロモジュリン及び亜鉛 - - 2 - 糖タンパク質からなる群から選択される、請求項 4 に記載のインビトロ方法。

30

## 【請求項 7】

工程 b) は、b 1) 前記 1 種以上の阻害成分が結合している前記固相から前記 1 種以上の疾患関連成分を含む前記試料を分離する工程を更に含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

## 【請求項 8】

前記固相は、1 種以上の前記リガンドが少なくとも一部に接合した 1 つ以上の粒子の表面である、請求項 1 ~ 7 に記載のインビトロ方法。

## 【請求項 9】

ステップ b) は、前記生体試料から前記 1 つ以上の粒子を除去するステップ b 1) を更に含む、請求項 7 及び 8 に記載のインビトロ方法。

40

## 【請求項 10】

前記粒子はナノ粒子又はマイクロ粒子である、請求項 6 又は 7 に記載のインビトロ方法。

## 【請求項 11】

前記粒子は磁性粒子又はラテックス粒子である、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

## 【請求項 12】

前記粒子は磁石の使用によって前記体液から除去される、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

## 【請求項 13】

前記粒子は遠心分離の使用によって前記体液から除去される、請求項 9 ~ 11 のいずれ

50

か一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 14】

前記粒子は、濾過の使用によって前記体液から除去される、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 15】

前記固相は、膜又は固体表面である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 16】

工程 c) は、前記試料を抗疾患関連成分抗体（検出抗体）と接触させ、その後前記診断試料中の抗疾患関連成分の存在を検出することを含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

10

【請求項 17】

工程 c) は、表面の少なくとも一部を抗疾患関連成分抗体で被覆された粒子を前記診断試料に加え、その後前記診断試料中の抗疾患関連成分の存在を検出することを含む、請求項 16 に記載のインビトロ方法。

【請求項 18】

前記検出は、化学試薬を加えることによって行われる、請求項 16 又は 17 に記載のインビトロ方法。

【請求項 19】

前記体液は、尿、痰、唾液、及び脳脊髄液からなる群から選択される、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

20

【請求項 20】

前記体液は、尿、痰及び唾液からなる群から選択される、請求項 19 に記載のインビトロ方法。

【請求項 21】

前記体液は尿である、請求項 20 に記載のインビトロ方法。

【請求項 22】

前記 1 種以上の疾患関連構成要素は、抗原を含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 23】

前記 1 種以上の疾患関連成分は、細菌全体、細胞、ウイルス又はそれらの断片を含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

30

【請求項 24】

前記 1 種以上の疾患関連成分は、少なくとも 1 種の多糖を含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 25】

前記 1 種以上の疾患関連成分は、少なくとも 1 種の病原体由来成分を含む、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 26】

前記少なくとも 1 種の病原体由来成分は、多糖である、請求項 25 に記載のインビトロ方法。

40

【請求項 27】

前記疾患関連成分は、LAM 等の結核菌抗原である、請求項 26 に記載のインビトロ方法。

【請求項 28】

前記疾患関連成分は、ホスホイノシトールマンノシド、リボマンナン、C - 多糖類肺炎連鎖球菌、及び PC (ホスホコリン) - ヒト内因性抗原から選択される、請求項 25 に記載のインビトロ方法。

【請求項 29】

前記 1 種以上のリガンドは、タンパク質に対する親和性を持つ、請求項 1 から 28 のい

50

ずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 30】

前記リガンドは、合成ペプチド等の生体分子である、請求項 1～29 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 31】

前記リガンドは、以下の成分：Ig - 1 鎖 C 領域、プロトロンビン、アポリポタンパク質 D、ウロモジュリン、グリコホリン - C、亜鉛 - - 2 - 糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質、及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分のうち 1 種以上に対する親和性を持つ生体分子である、請求項 30 に記載のインビトロ方法。

10

【請求項 32】

前記リガンドは、以下の成分：アポリポタンパク質 D、ウロモジュリン及び亜鉛 - - 2 - 糖タンパク質のうち 1 種以上に対する親和性を有する生体分子である、請求項 31 に記載のインビトロ方法。

【請求項 33】

前記リガンドは化学分子である、請求項 1～29 のいずれか一項に記載のインビトロ方法。

【請求項 34】

前記リガンドは、4 - メルカプトフェニルボロン酸、アミンベンゼンジアゾニウム化合物、及びポリミキシンからなる群から選択される、請求項 33 に記載のインビトロ方法。

20

【請求項 35】

前記固相は、異なる阻害成分に対して親和性を有する異なるリガンドを含む、請求項 1～34 に記載のインビトロ方法。

【請求項 36】

前記固相は、Ig - 1 鎖 C 領域、プロトロンビン、アポリポタンパク質 D、ウロモジュリン、グリコホリン - C、亜鉛 - - 2 - 糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質、及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される異なる阻害成分に対して親和性を有する異なるリガンドを含む、請求項 35 に記載のインビトロ方法。

30

【請求項 37】

分泌体液、排泄体液及び脳脊髄液からなる群から選択される体液を含む診断試料中の 1 種以上の疾患関連成分の存在を検出するためのインビトロ方法であって、

a) 前記体液中の、少なくとも 1 種のタンパク質を含む 1 種以上の阻害成分の量を低減して、浄化診断試料を提供する工程、及び

b) 工程 a) の浄化診断試料中の前記 1 種以上の疾患関連成分の存在を検出する工程を含むインビトロ方法。

【請求項 38】

前記 1 種以上の阻害成分は、Ig - 1 鎖 C 領域、プロトロンビン、アポリポタンパク質 D、ウロモジュリン、グリコホリン - C、亜鉛 - - 2 - 糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される、請求項 37 に記載のインビトロ方法。

40

【請求項 39】

前記 1 種以上の阻害成分は、アポリポタンパク質 D、ウロモジュリン及び亜鉛 - - 2 - 糖タンパク質からなる群から選択される少なくとも 2 種の阻害成分である、請求項 37 又は 38 に記載のインビトロ方法。

【請求項 40】

分泌体液、排泄体液及び脳脊髄液からなる群から選択される体液からなる群から選択される体液を含む診断試料から 1 種以上の阻害物質を除去するためのインビトロ方法であって、前記方法は、

50

a) 前記試料に、前記試料に存在する阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することのできる1種以上のリガンドが表面の少なくとも一部に接合した1つ以上の粒子を加える工程、

b) 前記1種以上の阻害成分を前記粒子に結合させる工程、及び

c) 前記試料から前記粒子を除去する工程を含み、

前記阻害成分は、それに続く免疫測定法に使用される際に前記診断試料を妨害することが可能な成分であることを特徴とするインビトロ方法。

【請求項41】

免疫測定法におけるその後の診断試料の使用の前に前記診断試料から阻害成分を除去するのに使用する固相であって、

前記固相は、その少なくとも一部に接合した少なくとも2つの異なる種類のリガンドを有し、

前記リガンドは、異なる阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することができ、

前記阻害成分は該診断用免疫測定法を妨害する可能性があることを特徴とする、固相。

【請求項42】

前記リガンドは請求項29～35のいずれか一項に定義した通りである、請求項41に記載の固相。

【請求項43】

前記固相は、その少なくとも一部に接合した異なるリガンドを持ち、前記リガンドは、Ig - 1鎖C領域、プロトンピン、アポリポタンパク質D、ウロモジュリン、グリコホリン - C、亜鉛 - 2 - 糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質、及びインターロイキン18結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも2種の阻害成分に対して親和性を持つ、請求項41又は42に記載の固相。

【請求項44】

前記固相は少なくとも1つの粒子である、請求項41～43のいずれか一項に記載の固相。

【請求項45】

前記粒子はナノ粒子又はマイクロ粒子である、請求項44に記載の固相。

【請求項46】

前記粒子は磁性粒子又はラテックス粒子である、請求項44又は45に記載の固相。

【請求項47】

前記粒子が表面活性化磁性粒子である、請求項44～46のいずれか一項に記載の固相。

【請求項48】

後続の免疫測定法で使用する診断試料を調製及び/又は浄化するための、請求項41～47のいずれか一項に記載の固相の使用。

【請求項49】

前記使用は、診断用免疫測定法が行われる前に前記診断試料から1種以上の阻害成分を除去又はその量を低減することを含む、請求項48に記載の使用。

【請求項50】

a) 免疫測定法において1種以上の疾患関連成分を捕捉及び検出する手段、及び

b) 体液中の少なくとも1種のタンパク質を含む1種以上の阻害成分の量を低減する手段を含む部品キット。

【請求項51】

体液中の1種以上の阻害成分の量を低減する手段は、請求項39～45のいずれか一項に記載の1種以上の固相を含む、請求項50に記載の部品キット。

【請求項52】

前記少なくとも1種のタンパク質は、Ig - 1鎖C領域、プロトンピン、アポリポタンパク質D、ウロモジュリン、グリコホリン - C、亜鉛 - 2 - 糖タンパク質、ヘパ

10

20

30

40

50

リン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質、及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される、請求項 50 又は 51 に記載の部品キット。

【請求項 53】

前記 1 種以上の疾患関連成分は、LAM 等の結核菌抗原である、請求項 50 ~ 52 のいずれか一項に記載の部品キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は診断用免疫測定法の分野に関し、さらに詳しくはその感度の改善に関する。

10

【背景技術】

【0002】

免疫測定法は、抗原と抗体との反応を通して溶液中の分子の濃度又は存在を決定する生化学的試験として広く用いられている。分析は、放射活性、蛍光活性、又は酵素活性等の標識活性を測定することで達成される。

【0003】

重要な用途は疾患の診断であり、ここでは免疫測定法が体液中の低濃度の疾患関連分子を検出するために使用される。一例として、結核 (TB) は、先進国でも途上国でも多面的な病気で、難しい公衆衛生上の課題であり、世界中で年間 300 万人が死亡している。世界保健機関 (WHO) によると、世界の人口の約 3 分の 1 が結核菌群の細菌に感染しており、結核は全成人の死亡の 26% を占め、最も一般的な致命的な感染症となっている。そのため、結核を効果的に制御するには感染経路の分断が必要であり、同様にそれには早期で正確な検出とそれに続く即時治療が必要である。

20

【0004】

結核、マラリア、HIV 等の感染症が世界的に莫大な負担となっているにも拘わらず、活動性疾患の診断のための現在の試験は不適切であり、深刻な限界がある。したがって、診断試験の感度及び精度を改善する方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

新規な方法、固相、及び固相に接合した体液から阻害剤を除去することができる 1 種以上のリガンドを含むキットを提供することで、上記の問題は克服又は少なくとも軽減された。

30

【0006】

本発明の第 1 の態様として、分泌体液、排泄体液及び脳脊髄液からなる群から選択される体液を含む診断試料中の 1 種以上の疾患関連成分の存在を検出するためのインビトロ方法であって、前記方法が、

a) 前記試料中に存在する 1 種以上の阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することができる 1 種以上のリガンドが少なくとも一部に接合した固相に前記試料を接触させる工程

b) 前記 1 種以上の阻害成分を前記固相表面に存在する 1 種以上のリガンドに結合させ、それにより前記試料中の前記 1 種以上の阻害成分の量を低減する工程、及びその後、

c) 前記診断試料中の 1 種以上の疾患関連成分の存在を検出する工程を含み、前記 1 種以上の阻害成分は、工程 c) において結合しかつ検出を妨害する可能性があることを特徴とする、インビトロ方法を提供する。

40

【0007】

本発明は、いくつかの体液が免疫測定法で検出可能な複合体の形成を阻止する阻害剤を含んでいるという洞察に基づいている。このように、本発明者らは、阻害成分の存在が免疫測定法の試験性能に悪影響を及ぼすことを見出した。それ故、阻害剤が存在すると、試料が標的抗原を含有している場合でも、目に見える又は記録された信号が生じず、従って、その試料は陰性であるとみなされてしまう。この問題を克服しそして失われた信号を元

50

に戻すために、本発明者らは、そのような阻害剤の濃度を減少させ、その結果、それに続く免疫測定で高い感度が見出される方法を見出した。

【0008】

本開示の文脈において、阻害成分は複数種のタンパク質と複数種の炭水化物の混合物を含んでもよい。例えば、阻害成分の分子量は、約5～1000kDaであってもよい。本発明の全ての側面において、阻害成分は少なくとも1種のタンパク質、例えば少なくとも1種の糖タンパク質を含んでもよい。

【0009】

本開示の全ての側面の文脈における阻害成分の好ましい群は群1：Ig - 1鎖C領域、プロトンピン、アポリポタンパク質D、ウロモジュリン、グリコホリン - C、亜鉛 - 2 - 糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン18結合タンパク質阻害成分である。

10

【0010】

本開示の全ての側面の文脈における阻害成分のさらに好ましい群は群2：Ig - 1鎖C領域、アポリポタンパク質D、ウロモジュリン、グリコホリン - C、亜鉛 - 2 - 糖タンパク質、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質、及びインターロイキン18結合タンパク質阻害成分である。

【0011】

本開示の全ての側面の文脈における阻害成分のさらに好ましい群は群3：アポリポタンパク質D、ウロモジュリン及び亜鉛 - 2 - 糖タンパク質である。本発明者らは、これら3つのタンパク質が非常に強力かつ豊富な阻害剤であることを見出した。

20

【0012】

本発明の第1の側面の実施形態では、1種以上の阻害成分は群1、群2又は群3から選択される。一例として、阻害成分は、群3の阻害成分の全てであってもよい、又はそれを含んでもよい。

【0013】

本発明の第1の態様の実施形態では、工程b)は、前記1種以上の阻害成分が結合している前記固相から前記1種以上の疾患関連成分を含む前記試料を分離する工程b1)を更に含む。従って、前記1種以上の阻害成分を前記固相表面に存在する1種以上のリガンドに結合させる工程の後に、試料と固相とを互いに分離する工程を続けて行ってもよい。これにより、試料中の疾患関連成分の今後の検出が容易になる可能性がある。

30

【0014】

工程a)は、診断試料をリガンドが接合している固相と接触させることを含む。前記固相は、例えば、チップの表面又は試験管の表面の等の母体又は平坦な表面であってもよい。それ故、表面はプラスチック試験管の内表面であってもよい。従って、本発明の第1の側面の実施形態では、固相は膜又は固体表面である。このように、接触工程は、試料をチップに加えること、試料をチップが装着されている分析フローチャンバーに注入すること、試料を膜に通すこと、又は試料を試験管に加えることを含んでもよい。

【0015】

しかしながら、固相は、1つ以上の粒子の表面であってもよい、即ち、接触工程は、粒子を試料に加えてもよい。従って、本発明の第1の側面の実施形態では、固相は、1種以上の前記リガンドが少なくとも一部に接合した1つ以上の粒子の表面である。従って、固相は、同種の、即ち、粒子に接合した同種のリガンドを持つ粒子を含んでもよい。しかしながら、固相は、その表面に接合した第1の種類のリガンドを持つ第1の種類の粒子、その表面に接合した第2の種類のリガンドを持つ第2の種類の粒子、等々を含んでもよい。

40

【0016】

従って、工程a)は、前記試料中に存在する阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することができる1種以上のリガンドが少なくとも表面の一部に接合した1つ以上の粒子を前記試料に加えることを含んでもよい。

【0017】

50

更に、粒子が使用される場合、工程 b ) は更に、前記生体試料から前記 1 つ以上の粒子を除去する工程 b 1 ) を含んでもよい。これは、1 種以上の阻害成分を粒子表面に存在する 1 種以上のリガンドに結合させた後に行われ、試料中の阻害成分の量をこのように低減することができる可能性がある。

【 0 0 1 8 】

粒子は、活性化され、リガンドが固定化されている表面を持つ粒子であってもよい。それ故、粒子は化学的に活性化された粒子といえる。

【 0 0 1 9 】

例えば、粒子は、ナノ粒子又はマイクロ粒子であってもよい。それに加えて、又はその代わりに、粒子は磁性粒子又はラテックス粒子であってもよい。

【 0 0 2 0 】

例えば、磁石を用いて前記体液から粒子を除去してもよい。別の例として、遠心分離を用いて前記体液から粒子を除去してもよい。更なる例として、濾過を用いて体液から粒子を除去してもよい。

【 0 0 2 1 】

更に、工程 c ) は、前記試料を抗疾患関連成分抗体 ( 検出抗体 ) と接触させ、その後前記診断試料中の抗疾患関連成分の存在を検出することを含んでもよい。検出抗体を、任意の適切な方法で標識してもよく、例えば電磁分光法で及び / 又は光学密度 ( O D ) 測定で検出してもよい。検出は化学試薬を加えて行ってもよい。

【 0 0 2 2 】

検出抗体は表面に接合させることができる。従って、工程 c ) は、例えば、その表面の少なくとも一部に抗疾患関連成分抗体が被覆されている粒子を加えること、及びその後前記診断試料中の抗疾患関連成分の存在を検出することを含んでもよい。工程 a ) が、試料を、少なくとも一部に 1 種以上のリガンドが接合した粒子と接触させることを含む場合には、工程 c ) は、その表面の少なくとも一部を抗疾患関連成分抗体で被覆した粒子を前記診断試料に加え、前記粒子は、その後前記診断試料中の抗疾患関連成分の存在を検出することを含む。

【 0 0 2 3 】

従って、工程 a ) が、表面の少なくとも一部に 1 種以上のリガンドが接合した 1 つ以上の粒子を前記試料に加えることを含む場合は、工程 c ) は、前記診断試料に第 2 の粒子を加えることを含んでもよく、前記粒子はその表面の少なくとも一部を抗疾患関連成分抗体で被覆し、その後前記診断試料中の抗疾患関連成分の存在を検出してもよい。

【 0 0 2 4 】

本開示の文脈において、体液を、尿、痰、唾液、及び脳脊髄液からなる群から選択してもよい。これらは、検出法として O D 測定値を用いる今後の分析に非常に適している体液である。更に、体液は、尿、痰、及び唾液からなる群から選択されてもよい。これらは、採取が容易であり、大量に入手することができ、そして血液とは対照的に、比較的無菌かつ不透過性である体液である。そのため、そのような体液は、患者から試料を採取できる可能性が限られている環境での使用に適している。一例として、体液は尿であってもよい。

【 0 0 2 5 】

疾患関連成分は、抗原、即ち、生物において免疫応答を誘導することができる分子、又はその代謝産物を含んでもよい。例えば、疾患関連成分には、外因性抗原、即ち、注射や吸入等によって体外から体内に侵入した抗原が含まれても良い。一方、抗原は内因性抗原又は腫瘍抗原であってもよい。

【 0 0 2 6 】

本発明の第 1 の側面の実施形態では、1 種以上の疾患関連成分は少なくとも 1 種の多糖を含む。

【 0 0 2 7 】

1 種以上の疾患関連成分は、ヒト起源又は病原体起源のものであってもよい。1 種以上

10

20

30

40

50

の疾患関連成分は、細菌全体、細胞、ウイルスを含んでもよく、又はそれらの断片、例えば細胞壁成分等であってもよい。更に、1種以上の疾患関連成分は、タンパク質、炭水化物を含んでもよく、又はタンパク質若しくは炭水化物起因の分解生成物であってもよい。

【0028】

第1の側面の実施形態では、1種以上の疾患関連成分は少なくとも1種の病原体由来成分を含む。病原体由来成分は多糖であってもよい。

【0029】

病原体は、宿主生物に侵入する可能性があるウイルス、細菌、原虫、プリオン、真菌又は他の微生物等の感染因子である。病原体由来成分は、従って、そのような病原体に由来する分子である。病原体由来成分は更に、血液を含む全ての種類の生体試料において検出

10

される可能性がある。従って、本発明の別の態様では、体液を含む診断試料中の1種以上の病原体由来成分の存在を検出するためのインビトロ方法であって、前記方法は、

a) 前記試料中に存在する阻害成分に対して親和性を有しかつ結合することができる1種以上のリガンドが少なくとも一部に接合した固相に前記試料を接触させる工程、

b) 前記1種以上の阻害成分を前記固相表面に存在する1種以上のリガンドに結合させ、それにより前記試料中の前記1種以上の阻害成分の量を減少させる工程、及びその後、

c) 前記診断試料中の1種以上の疾患関連成分の存在を検出する工程を含み、

前記1種以上の阻害成分は、工程c)において結合しかつ検出を妨害する可能性があることを特徴とする、インビトロ方法が提供される。体液は、血液、尿、痰、唾液及び脳脊髄

20

液からなる群から選択されてもよい。

【0030】

一例として、疾患関連成分は、LAM等の結核菌抗原、又はその代謝産物であってもよい。LAMは、主要な結核菌の表面抗原リポアラビノマンナンである。LAMの代謝産物は、脱脂LAM等のLAM分解断片であってもよい。

【0031】

疾患関連成分の更なる例には、ホスホイノシトールマンノシド、リボマンナン、C-多糖類肺炎連鎖球菌、及びPC(ホスホコリン)-ヒト内因性抗原、ホスファチジルコリン合成での中間体が含まれる。

【0032】

上記のように、本発明の全ての側面において、使用されるリガンドは、糖タンパク質等のタンパク質に対する親和性を有してもよい。タンパク質は、上記の群1、群2又は群3に列挙されている阻害成分のいずれか1種であってもよい。

30

【0033】

従って、リガンドは、群1、群2又は群3中の少なくとも1種の阻害成分に対して親和性を有してもよい。従って、固相に接合したリガンドは、群1、群2又は群3中の任意の数の種類の阻害成分に対して親和性を有し、それと結合することができる。一例として、固相に接合したリガンドは、群1、群2又は群3中の全ての阻害成分に対して親和性を有し、それと結合することができる。

【0034】

本発明の第1の側面の実施形態では、固相に接合したリガンドは、群1又は群2の少なくとも2種の阻害成分に対する親和性を有し、例えば、少なくとも3種、更に例えば、少なくとも5種の群1又は群2の阻害成分に対する親和性を持つ。

40

【0035】

本発明の第1の側面の実施形態では、固相に接合したリガンドは、群3の少なくとも1種の阻害成分に対する親和性を有し、例えば少なくとも2種、更に例えば全ての阻害成分に対する親和性を持つ。

【0036】

本発明の第1の側面の実施形態では、固相に接合したリガンドは、群3の少なくとも1種の、例えば少なくとも2種、更に例えば全ての阻害成分に対する親和性を有し、かつ、Ig - 1鎖C領域、プロトロンビン、グリコホリン - C、ヘパリン硫酸プロテオグリカ

50

ン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも 1 種の、例えば少なくとも 2 種の、更に例えば少なくとも 3 種の、更に例えば少なくとも 4 種、更に例えば少なくとも 5 種の阻害成分に対する親和性を持つ。

【0037】

本発明の第 1 の側面の実施形態では、固相に接合したリガンドは、群 3 の全ての阻害成分に対する親和性を有し、かつ、Ig - 1 鎖 C 領域、プロトロンビン、グリコホリン - C、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも 1 種の、例えば少なくとも 2 種の、更に例えば少なくとも 3 種の、更に例えば少なくとも 4 種、更に例えば少なくとも 5 種の阻害成分に対する親和性を持つ。

10

【0038】

本発明の第 1 の側面の実施形態では、固相に接合したリガンドは、群 3 の少なくとも 1 種の、例えば少なくとも 2 種、更に例えば全ての阻害成分に対する親和性を有し、かつ、Ig - 1 鎖 C 領域、グリコホリン - C、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも 1 種の、例えば少なくとも 2 種の、更に例えば少なくとも 3 種の、更に例えば少なくとも 4 種、更に例えば少なくとも 5 種の阻害成分に対する親和性を持つ。

20

【0039】

本発明の第 1 の側面の実施形態では、固相に接合したリガンドは、群 3 の全ての阻害成分に対する親和性を有し、かつ、Ig - 1 鎖 C 領域、グリコホリン - C、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも 1 種の、例えば少なくとも 2 種の、更に例えば少なくとも 3 種の、更に例えば少なくとも 4 種の、更に例えば少なくとも 5 種の阻害成分に対する親和性を持つ。

30

【0040】

このように、固相は、上記の群 1、群 2 又は群 3 に列挙された阻害成分等の異なる阻害成分に対して親和性を持つ異なるリガンドを含んでもよい。例として、少なくとも 2 種の、例えば少なくとも 3 種の、更に例えば少なくとも 5 種の異なる種類のリガンドを固相に接合させてもよく、各種類は異なる阻害成分に対して親和性を持つ。

【0041】

リガンドは、合成ペプチド等の生体分子であってもよい。一例として、リガンドは、上記の群 1、群 2 又は群 3 に列挙されている阻害成分の 1 種以上に対して親和性を持つ生体分子であってもよい。

【0042】

さらに、生体分子は、群 4 から選択されるアミノ配列を含むペプチドであってもよい：

C P R L S L H R P A L E D L L (配列番号 1)

C S I P V C G Q D Q V T V (配列番号 2)

C L A G L F G A A E G Q A F (配列番号 3)

C W F M P S A P Y W I L A (配列番号 4)

C L T C V D L D E C A I P G (配列番号 5)

C Y Y V Y N L T A P P E C H (配列番号 6)

C A L F Q T P S Y T Q P Y Q (配列番号 7)

C L R Y M Y R H K G T Y H (配列番号 8)

C E P V Y V Q R A K A Y L E (配列番号 9)

C R N P D E D P R G P W (配列番号 10)

C A K Q C P A L E V T W P (配列番号 11)

C V L V D P E Q V V Q R H (配列番号 12)

40

【0043】

50

群 4 から選択されるアミノ配列を含むペプチドは、群 1 又は群 2 の少なくとも 1 種の、例えば全ての、阻害成分に対して親和性を有してもよい。

【0044】

1 種又は数種の、例えば少なくとも 2 種、更に例えば少なくとも 3 種、更に例えば少なくとも 5 種の、上記ペプチドを固相に接合させることができる。一例として、上記の全ての異なる種類のペプチドを、表面又は単一粒子等の固相に接合してもよい。一例として、固相は、粒子に無作為に接合された 2 種以上から全てのペプチドを持つ粒子を含み、粒子間でほぼ均一にペプチドを分布させるようにしてもよい。代替として、固相は、表面に接合したペプチドを 1 種だけから数種持つ第 1 の種類の粒子、並びに表面に接合した他の種類のペプチドを持つ第 2 の種類の粒子等々を含んでも良い。一例として、固相は多数の異なる種類の粒子を含み、各種類の粒子は粒子表面に接合した、他の種類と異なる種類のリガンドを持つ。

10

【0045】

更に、リガンドは化学分子であってもよい。一例として、リガンドは、4 -メルカプトフェニルボロン酸、アミンベンゼンジアゾニウム化合物、及びポリミキシンからなる群から選択することができる。上記群のいくつかの化学分子を同時にリガンドとして使用することができる。

【0046】

本発明の第 1 の側面の構成として、体液を含む診断試料から 1 種以上の阻害成分を除去するためのインビトロ方法であって、前記方法は、

20

a) 前記試料に、前記試料に存在する阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することのできる 1 種以上のリガンドが表面の少なくとも一部に接合した 1 つ以上の粒子を加える工程、

b) 前記 1 種以上の阻害成分を前記粒子に結合させる工程、及び

c) 前記試料から前記粒子を除去する工程を含み、

前記阻害成分は、それに続く免疫測定法に使用される際に前記診断試料を妨害することが可能な成分であることを特徴とする方法が提供される。

体液は、本明細書において上記で考察したように、分泌体液、排泄体液及び脳脊髄液からなる群から選択してもよい。

30

【0047】

本発明の第 1 の側面の更なる構成として、その後の免疫測定法のために体液を含む診断試料を調製及び/又は洗浄するためのインビトロ方法であって、前記方法は、

a) 前記試料に、前記試料に存在する阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することのできる 1 種以上のリガンドが表面の少なくとも一部に接合した 1 つ以上の粒子を加える工程、

b) 前記試料中に存在する前記 1 種以上の阻害成分が前記粒子表面に存在する前記 1 種以上のリガンドに結合することを可能にする工程、及び、その後

c) 免疫測定法用に調製された診断試料を得る工程を含み、前記阻害成分は、アッセイ成分に結合し、診断用免疫測定法を妨害する可能性があることを特徴とする方法を提供する。

40

体液は、本明細書において上に考察したように、分泌体液、排泄体液及び脳脊髄液からなる群から選択してもよい。

【0048】

本発明の第 2 の側面として、分泌体液、排泄体液及び脳脊髄液からなる群から選択される体液を含む診断試料中の 1 種以上の疾患関連成分の存在を検出するためのインビトロ方法であって、前記方法は、

a) 前記体液中の、少なくとも 1 種のタンパク質を含む 1 種以上の阻害成分の量を低減して、浄化診断試料を提供する工程、及び

b) 工程 a) の浄化診断試料中の前記 1 種以上の疾患関連成分の存在を検出する工程を含む方法が提供される。

50

## 【0049】

第2の側面に関して使用される用語及び定義は、上記の第1の側面に関して考察した通りである。

## 【0050】

阻害成分は、少なくとも1種の糖タンパク質等の少なくとも1種のタンパク質を含んでもよい。本発明の第2の側面の実施形態では、1種以上の阻害成分は、本明細書の上記に開示した阻害成分の群1、群2又は群3から選択される。

## 【0051】

従って、工程a)は、群1、群2又は群3における全ての阻害成分を低減する等、群1、群2又は群3における任意の数の種類の阻害成分の量を低減することを含んでもよい。

10

## 【0052】

本発明の第2の側面の実施形態では、ステップa)は、群1、群2又は群3の少なくとも2種の阻害成分の量を低減することを含み、例えば、群1又は群2の少なくとも3種の、更に例えば少なくとも5種の阻害成分の量を低減することを含む。

## 【0053】

本発明の第2の側面の実施形態では、ステップa)は、群3の少なくとも1種の、例えば少なくとも2種の、更に例えば全ての種類の、阻害成分の量を低減する工程、及びIg-1鎖C領域、プロトンピン、グリコホリン-C、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド-3-キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン18結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも1種の、例えば少なくとも2種の、更に例えば少なくとも3種の、更に例えば少なくとも4種の、更に例えば少なくとも5種の阻害成分の量を低減する工程を含む。

20

## 【0054】

本発明の第2の側面の実施形態では、ステップa)は、群3の少なくとも1種の、例えば少なくとも2種の、更に例えば全ての種類の阻害成分の量を低減する工程、及びIg-1鎖C領域、グリコホリン-C、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド-3-キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン18結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも1種の、例えば少なくとも2種の、更に例えば少なくとも3種に、更に例えば少なくとも4種の、更に例えば少なくとも5種の阻害成分の量を低減する工程を含む。

30

## 【0055】

本発明の第3の側面として、免疫測定法における前記診断試料のその後の使用の前に診断試料から阻害成分を除去するのに使用する固相であって、前記固相はその少なくとも一部に接合した、阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することができる1種以上のリガンドを持ち、前記阻害成分は、前記診断用免疫測定法を妨害する可能性があることを特徴とする、固相が提供される。

## 【0056】

第3の側面に関して使用される用語及び定義は、上記の第1の側面に関して考察した通りである。一例として、固相は、その少なくとも一部に接合した少なくとも2種のリガンドを持っていてもよい。従って、第3の側面は、免疫測定法における診断試料のその後の使用の前に診断試料から阻害成分を除去するのに使用するための固相を提供することができる、前記固相は、その少なくとも一部に接合した少なくとも2つの異なる種類のリガンドを有し、前記リガンドは、異なる阻害成分に対して親和性を持ちかつ結合することができる、ここで前記阻害成分は、前記診断用免疫測定法を妨害する可能性があることを特徴とする。

40

## 【0057】

例えば、一種又は複数種のリガンドは、上記の第1の側面の任意の実施形態において定義されたとおりであり得る。

## 【0058】

本発明の第3の側面の実施形態では、固相は少なくともその一部に接合した異なるリガ

50

ンドを持ち、従って前記リガンドは上記の群 1、群 2 又は群 3 から選択される少なくとも 2 種の阻害成分に対して親和性を持つ。

【0059】

一例として、固相は少なくとも 1 つの粒子であってもよい。更に、粒子はナノ粒子又はミクロ粒子であってもよい。更なる例として、粒子は磁性粒子又はラテックス粒子でもよい。

【0060】

粒子の表面はまた、リガンドを表面に結合させるために活性化されていてもよい。従って、粒子は表面活性化磁性粒子であってもよい。

【0061】

本発明の第 4 の側面として、その後の免疫測定法に使用する診断試料を調製及び / 又は浄化するための本発明の第 3 の側面による固相の使用が提供される。第 4 の側面に関して使用される用語及び定義は、上記の他の側面に関して考察した通りである。その使用は、診断用免疫測定が行われる前に、前記診断試料から 1 種以上の阻害成分を除去又は低減することを含んでもよい。阻害成分は、本明細書の上記の群 1、群 2 又は群 3 から選択することができる。従って、この使用は、群 1、群 2、又は群 3 の任意の数の種類の阻害成分の量を低減すること、例えば群 1、群 2、又は群 3 の全ての阻害成分を低減することを含んでも良い。

【0062】

更に、この使用は、群 1、群 2 又は群 3 の少なくとも 2 種の阻害成分の量を低減することを含んでもよく、例えば、群 1、群 2 又は群 3 の少なくとも 3 種、更に例えば少なくとも 5 種の阻害成分の量を低減することを含んでも良い。

【0063】

本発明の第 4 の側面の実施形態では、この使用は、群 3 の少なくとも 1 種の阻害成分の量を低減すること、例えば少なくとも 2 種の、更に例えば全ての阻害成分の量を低減すること、及び Ig - 1 鎖 C 領域、プロトンピン、グリコホリン - C、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも 1 種の量を低減すること、例えば少なくとも 2 種の、更に例えば少なくとも 3 種の、更に例えば少なくとも 4 種の、更に例えば少なくとも 5 種の量を低減することを含む。

【0064】

本発明の第 4 の側面の実施形態では、この使用は、群 3 の少なくとも 1 種の阻害成分の量を低減すること、例えば少なくとも 2 種の、更に例えば全ての阻害成分の量を低減すること、及び Ig - 1 鎖 C 領域、グリコホリン - C、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質及びインターロイキン 18 結合タンパク質阻害成分からなる群から選択される少なくとも 1 種の量を低減すること、例えば少なくとも 2 種の、更に例えば少なくとも 3 種の、更に例えば少なくとも 4 種の、更に例えば少なくとも 5 種の量を低減することを含む。

本発明の第 5 の側面として、

- a) 免疫測定法において 1 種以上の疾患関連成分を捕捉及び検出する手段、及び
- b) 体液中の、少なくとも 1 種のタンパク質を含む 1 種以上の阻害成分の量を低減する手段を含む部品キットが提供される。

【0065】

本発明の第 5 の側面の実施形態では、体液中の 1 種以上の阻害成分の量を低減する手段は、上記の第 3 の側面による 1 種以上の固相を含む。従って、キットは、本明細書に開示される阻害成分に対するリガンドが接合されている粒子を含んでもよい。しかしながら、体液中の 1 種以上の阻害成分の量を低減する手段は、膜、母体、チップ表面又は試験管の内面等の 1 種以上の阻害成分に対するリガンドがその上に固定化されている固相を含んでもよい。

【0066】

10

20

30

40

50

少なくとも1種以上の阻害成分は、少なくとも1種のタンパク質、例えば、少なくとも1種の糖タンパク質を含む。阻害成分は、上記の群1、群2又は群3に記載の阻害成分から選択してもよい。

【0067】

更に、1種以上の阻害成分の量を低減する手段は、少なくとも2種の異なる阻害成分、例えば、上記の群1、群2又は群3から選択される少なくとも2種の阻害成分を低減する手段を含んでもよい。

【0068】

免疫測定法において1種以上の疾患関連成分を捕捉及び検出する手段は、抗疾患関連成分抗体（検出抗体）、例えば、阻害成分に対するリガンドが接合している粒子以外の粒子に接合した抗疾患関連成分抗体等を含んでもよい。

10

【0069】

更に、本発明の第5の側面の実施形態では、1種以上の疾患関連成分は、LAM等の結核菌抗原である。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】図1は、免疫測定法の前に試料を浄化するための本開示の一般的な方法を示す。(A)リガンドを使用：粒子(B)表面、固体表面(C)、フィルター母体(D)に。

【0071】

【図2】図2は、様々な体液(100pg/ml)での、LAM-TbアッセイのSpeClean(試料浄化剤)による改善を示している。

20

【0072】

【図3】図3は、種々の抗原(100pg/ml)を加えた尿試料での、アッセイ感度の改善に対するSpeCleanの効果を示している。

【0073】

【図4】図4は、尿試料をSpeCleanで前処理した場合の免疫アッセイ(尿中のLAMの検出)の臨床的感度の違いを示している。未処理感度=47.6%、SpeClean処理=80.9%、n=21、LOD:0.4、OD:620nm。

【発明の詳細な説明】

【0074】

本発明者らは、その後の免疫測定法における感度が増大するように生体試料中の阻害化合物の量を低減する方法を見出した。

30

【0075】

例えば、主要な結核菌表面抗原リポアラビノマンナン(LAM)を健康な個人又は結核(TB)患者からの尿に加えた場合、PBS又は合成尿中の同量のLAMと比較した場合、LAM信号は、高い頻度で減少又は完全に消光される。この阻害効果は個体間で異なり、また同じ個体からでも様々な時点で採取した試料間でも異なる。

【0076】

以前のプロテオミクス研究では、健康な個人から採取した2800以上の尿中タンパク質が同定されているが、免疫測定法におけるそれらタンパク質の影響はまだ調査されていない。質量分析と組み合わせた様々なクロマトグラフィーを使用して、本発明者らは、例えば、健康な尿から、LAM免疫測定法に対して阻害効果を持つ可能性のある数種の豊富なタンパク質を単離、精製し、特徴付けすることができた。

40

【0077】

これらのタンパク質は、添加リン酸緩衝生理食塩水又は合成尿模倣液中で再構成されると、単独又は組み合わせで、LAM抗原をマスキングすることによって、又は検出抗体と相互作用させることによって、試験に対する阻害効果を発揮する。患者の尿の阻害効果を低減すると、明らかにLAMに基づく尿検査の診断感度と正確さが増すと考えられる。

【0078】

本明細書では、免疫測定法に対するこれらのタンパク質の阻害効果、作用機序の理解、

50

また体液からそれらを除去する方法を見出し、それによるアッセイ感度の回復を提示する。これは免疫測定法の感度に大きな利点を提供する。本明細書では、LAMアッセイは診断試料の前浄化から恩恵を得ることができる免疫測定法の例として使用されるが、この工程は他の免疫測定法にも適用可能である。

【0079】

尿は無菌であるため様々な疾患の診断に使用するのに適した母体であり、血液又は他の液体と比較してより大量に得ることができ、そして最も重要なことは血液の場合のように針が不要であり、従って、例えば、肝炎やHIV等の更なる内感染症を回避できる。

【0080】

そのために、体液から阻害剤を除去する試料浄化剤 (SpeClean) を構築するための2つの手法を使用した：

A) 尿中阻害剤に対する結合親和性を持つペプチドのファージディスプレイ技術による同定。磁石を用い体液から阻害剤を容易に除去するために、阻害タンパク質に対するリガンドとして作用する以下に列挙される12個のペプチドを同定し、磁性粒子 (MP) に接合させた。

B) 標的糖脂質抗原 (LAM) と阻害タンパク質 (主にN-アセチルグルコサミンからなる) の炭水化物部分との間の構造的相違についての我々の理解は、阻害剤に対する結合能力を持ついくつかのリガンドを同定するのに役立った。次にこれらのリガンドを用いて、体液から阻害剤を簡単に除去するための多くのリガンド-MP接合体を構築した。

【0081】

従って、前記生体試料が免疫測定法等のその後の診断アッセイに使用される前に、尿又は血漿、痰、唾液等の他の体液を含む生体試料 (体液) から阻害剤を除去する方法が初めて本明細書で提供される。前記阻害剤を除去するために、ナノ粒子又はマイクロ粒子等の粒子を本明細書で使用してもよい。前記粒子は、例えば、ラテックス又は磁性粒子である。一般的な方法を図1に示す。A) は、リガンドが固定化された磁性粒子をインキュベーション後、即ち阻害成分を結合させた後に、磁性を用いて試料からどのように除去できるかを示し、B) は、磁性粒子 (MNP) 表面に、及び結合阻害剤と共に固定化されたりリガンド (SpeCleanリガンド) を示し、C) は、固体表面に結合したりリガンドを示し、D) は、フィルター母体に結合したりリガンドを示す。

【0082】

現在の文脈で使用できる多様な表面、大きさ及び機能性を持つ磁性粒子を含む、様々な種類の粒子を提供する多くの製造業者がある。

【0083】

試料浄化剤 (例えば、本明細書で定義されるようにその表面の少なくとも一部に接合したりリガンド (化学的又は生物学的) を含む粒子) は、任意の体液から阻害剤を除去するために使用することができる技術である。この手法は、様々な診断方法と組み合わせて使用することができ、従って、LAMアッセイに限定されない。粒子へのリガンドの接合は従来の手段によって実施することができる。

阻害タンパク質及びリガンドの例

【0084】

下記は単離タンパク質 (診断アッセイを妨害する阻害タンパク質) のリストであり、これは免疫測定法でのその後の使用のための診断試料の浄化及び/又は調製でのリガンドとしての使用のためのそれに結合する生物学的分子の同定の基礎を形成する。本明細書に開示される方法においてリガンドとして使用する例を提示する、化学リガンドのリストも提供される。

<免疫測定法で阻害効果を示すタンパク質の例 (グループ1) >

Ig - 1鎖C領域

プロトンピン

アポリポタンパク質D

ウロモジュリン

グリコホリン - C

亜鉛 - 2 - 糖タンパク質

ヘパリン硫酸プロテオグリカン

ホスホイノシチド - 3 - キナーゼ相互作用タンパク質

インターロイキン18結合タンパク質

< ペプチドリガンド ( グループ 4 ) >

C P R L S L H R P A L E D L L ( 配列番号 1 )

C S I P V C G Q D Q V T V ( 配列番号 2 )

C L A G L F G A A E G Q A F ( 配列番号 3 )

C W F M P S A P Y W I L A ( 配列番号 4 )

C L T C V D L D E C A I P G ( 配列番号 5 )

C Y Y V Y N L T A P P E C H ( 配列番号 6 )

C A L F Q T P S Y T Q P Y Q ( 配列番号 7 )

C L R Y M Y R H K G T Y H ( 配列番号 8 )

C E P V Y V Q R A K A Y L E ( 配列番号 9 )

C R N P D E D P R G P W ( 配列番号 10 )

C A K Q C P A L E V T W P ( 配列番号 11 )

C V L V D P E Q V V Q R H ( 配列番号 12 )

化学リガンド ( 例 )

4 - メルカプトフェニルボロン酸

アミンベンゼンジアゾニウム化合物

ポリミキシン

< 実験の部 >

【 0 0 8 5 】

実験の部は、抗原に対する診断試料から阻害剤を除去する浄化工程、例えば ( L A M ) 検出を用いることの好ましい効果を説明する。

< 試料浄化剤 ( S p e C l e a n ) の準備 >

ペプチド ( 抗阻害剤 ) の各種母体への接合

【 0 0 8 6 】

アミノ基で官能化された、磁性微粒子、ニトロセルロース膜、ラテックスビーズ及びフリットをペプチドリガンドの固定化 / 接合に使用した。グループ 4 の等量の全ペプチドを固相に接合した。アミノ基を、最初にプロモ酢酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステルとのプロモアルキル化反応により臭素に変換した。次に、システイン化ペプチドを、pH を維持しながら活性化母体に滴下した。接収率を最大にするために、10 mM のトリプチルホスフィン反応混合物に加えチオール基が酸化しないようにし、母体表面で臭素との反応を可能にした。

【 0 0 8 7 】

得られた試料浄化剤を S p e C l e a n 1 と命名した。阻害化合物の量を低減するために、これを試料に加え、インキュベーション後に除去することができる。例えば、磁性粒子は磁石によって除去することができる。

母体表面への化学リガンドの接合

【 0 0 8 8 】

母体表面への 4 - メルカプトフェニルボロン酸の接合は、上記のようにして行った。ベンゼンジアゾニウム化合物及びポリミキシンの固定化のために、カルボキシル ( C O O H ) 官能化母体を使用した。簡単に説明すると、母体を最初に pH 6 . 0 の 2 - ( N - モルホリノ ) エタンスルホン酸で平衡化し、続いて N - ヒドロキシスクシンイミド ( N H S ) 及び 1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) - カルボジイミド ( E D C ) で 1 時間活性化した。洗浄後、アミン含有リガンドを加え、室温で 2 時間かけ接合させた。

【 0 0 8 9 】

得られた試料洗浄剤を S p e C l e a n 2 と命名した。

10

20

30

40

50

一般的なアッセイの説明（LAMアッセイ、LAM抗原の検出）

- ・ 捕捉抗LAM抗体で被覆された磁性粒子を尿/他の体液に加えてインキュベートする。
- ・ 洗浄後、ビオチン化検出抗体を加えてインキュベートする。
- ・ 洗浄後、アビジン-HRP酵素接合体を加えてインキュベートする。
- ・ テトラメチルベンジジンを洗浄した後、TMB基質を加え、発色強度（450nmで記録された光学濃度）で検出。

【0090】

体液はあらゆる色の形成を阻止する阻害剤を含んでいる可能性があるため、信号がより低いもの或いはないものとして視認又は記録され、それ故、標的抗原を含んでいても陰性に見なされる。この問題を克服しそして失われた信号を元に戻すには、阻害剤を除去し体液を浄化する必要がある。そのために、捕捉粒子を加える前の阻害剤の洗浄のためにSpeClean1又はSpeClean2を使用した本開示の試料洗浄工程を用いる。それ故、上記のアッセイ又は方法を行う前に洗浄工程を導入する。

結果

実施例1

【0091】

以下において、実施例1はLAM（抗原）アッセイであり、実施例2～4は、抗原（LAM）アッセイが行われる前に行われる追加の試料洗浄工程を含む。このデータから、試料中に存在し抗原に結合する阻害分子は、抗原に結合する捕捉粒子（LAM）を生体試料に加える前に除去されるので、抗原検出試験（この文脈ではLAM）の前に洗浄工程を実施することでアッセイの感度が改善することが分かる。

	<u>450nmの信号</u>
合成尿	0.251
合成尿 + 100 pg/ml LAM	4.440
尿	0.28
尿 + 100 pg/ml LAM	0.31

【0092】

LAMを加えた合成尿では、その中に阻害分子が存在しないため、LAMの信号が高い。しかしながら、LAMを加えた尿中ではLAMの信号は低いかほとんど存在しない。

実施例2

【0093】

+/- 100 pg/mlのLAMを加えた1人の健康なドナーの尿に対するSpeCleanの効果

試料	<u>SpeClean</u>	<u>外径450nm</u>
尿	-	0.14
尿 + 100 pg LAM/ml	-	0.17
尿 + 250 pg LAM/ml	-	0.51
尿 + 500 pg LAM/ml	-	0.93
尿	+	0.22
尿 + 100 pg LAM/ml	+	3.11
尿 + 250 pg LAM/ml	+	4.12
尿 + 500 pg LAM/ml	+	7.74

【0094】

これは、アッセイを実施する前のSpeClean工程（即ち、試料中の阻害剤の除去）が抗原（LAM）検出試験の感度を高めることを示している。浄化工程が行われない場合、抗原についての低い信号（LAM）しか得られないか、或いは信号（LAM）が全く得られない。

実施例3

【0095】

5人の健康なドナーの様々な程度の阻害を持つ尿に対するSpeCleanの効果。こ

の実験では、尿試料に 100 pg/ml の LAM を加えた。

試料	SpeClean	450nm
D1	-	0.400
D1	+	4.149
D2	-	3.88
D2	+	4.30
D3	-	1.34
D3	+	4.19
D4	-	3.65
D4	+	4.40
D5	-	0.31
D5	+	2.88
合成尿 (LAM無)		0.251
合成尿 + 100 pg/ml LAM		4.440

10

#### 【0096】

この実験は、試料洗浄剤で処理した後に正常信号 (LAM 添加合成尿) に戻る個々の尿中に、低濃度 (D2、D4)、中濃度 (D3) 及び高濃度 (D1、D5) の範囲の様々な量の阻害剤が存在することを明確に示している。

#### 実施例 4

#### 【0097】

LAM を加えた健康な尿に対する 2 種類の異なる SpeClean 組成物 (SpeClean 1 と SpeClean 2 (上記参照)) の効果。

20

試料	SpeClean	450nm
1 - 尿	-	0.22
2 - 尿 + 100 pg/ml	-	0.24
3 - 尿	1	0.18
4 - 尿 + 100 pg/ml	1	4.22
5 - 尿 + 50 pg/ml	1	2.88
6 - 尿 + 20 pg/ml	1	2.11
7 - 尿	2	0.28
8 - 尿 + 100 pg/ml	2	4.78
9 - 尿 + 50 pg/ml	2	3.11
10 - 尿 + 20 pg/ml	2	2.25

30

#### 【0098】

この実験は、生物学的リガンドに基づく試料洗浄剤 (SpeClean 1) が化学に基づく試料洗浄剤 (SpeClean 2) と同じくらい良好に機能することを示している。

#### 実施例 5

#### 【0099】

様々な体液における LAM - TB アッセイの SpeClean による改善の効果を調べるために実験を行った。SpeClean 1 を加えた又は加えていない尿、痰、唾液及び脳脊髄液を、上記の実施例 1 ~ 4 に記載のアッセイで試験した。結果を図 2 に示し、これは、SpeClean 1 組成物を加えることで、全ての生体試料のアッセイにおける OD を明らかに増強することを明確に示している。

40

#### 実施例 6

#### 【0100】

様々な抗原 (ホスホイノシトールマンノシド、リボマンナン及び C - 多糖 S . ニューモニエ) を加えた尿試料中でアッセイを実施する場合の SpeClean による改善の効果を見るために実験を行った。結果を図 3 に示すが、SpeClean 1 で処理した全ての試料で未処理試料と比較して 620 nm での OD が明らかに改善した、即ちアッセイ感度が試験した全ての抗原で増加した。

50

## 実施例 7

## 【0101】

アッセイ感度のSpeCleanによる改善の効果を、肺結核が確認されている21人の様々なTB患者から収集された尿試料にて試験した。

## 【0102】

図4は、尿試料をSpeClean1組成物で前処理した場合の免疫アッセイ（尿中のLAMの検出）の臨床的感度の差を示す。SpeClean1による前処理の結果、大部分の試料において陽性信号が増加し、感染個体の31.8%を正確に同定することから80.9%感染患者に対してアッセイの臨床感度の全体的な改善がもたらされた。

## 実施例 8

## 【0103】

アポリタンパク質D、ウロモジュリン及び亜鉛 - 2 - 糖タンパク質に対するペプチドリガンドを、本明細書の上記に開示した接合方式に従って磁性微粒子に接合させ、SpeClean3と表示される試料洗浄剤を得る。

## 【0104】

SpeClean3を尿試料に加え、またインキュベーション後には除去し、その後、抗原（LAM）アッセイを上記の一般的なアッセイの記載に従って実施する。

## 実施例 9

## 【0105】

アポリタンパク質D、ウロモジュリン及び亜鉛 - 2 - 糖タンパク質に対するペプチドリガンドを、本明細書の上記に開示した接合方式に従って固体表面に接合させて、SpeClean4と表示される試料洗浄剤を得る。

## 【0106】

尿試料をSpeClean4表面と接触させ、インキュベートのために放置する。次いで、試料を表面から分離し、その後、抗原（LAM）アッセイを上記の一般的なアッセイの記載に従って実施する。

## 実施例 10

## 【0107】

アポリタンパク質D、ウロモジュリン及び亜鉛 - 2 - 糖タンパク質に対するペプチドリガンドを、上記に開示した接合方式に従って試験管の内面に接合させて、SpeClean5と表示された試料洗浄剤を得る。

## 【0108】

尿試料を試験管に加え、インキュベートのために放置後に試験管から取り出す。次いで、試料の抗原（LAM）アッセイを上記の一般的なアッセイの説明に従って実施する。

10

20

30

【 図 1 】

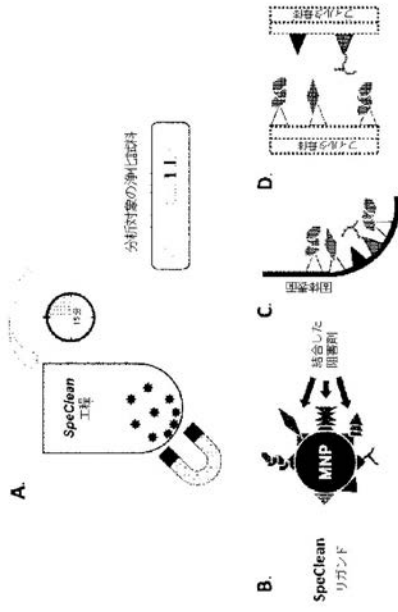


Fig. 1

【 図 2 】

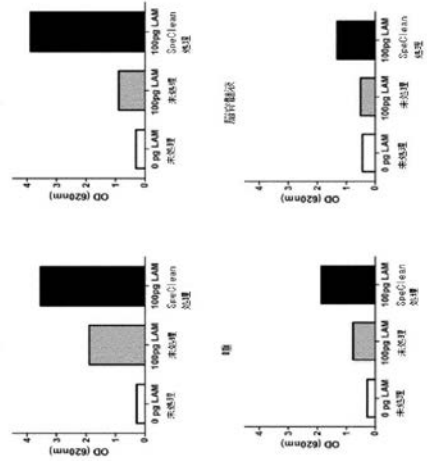


Fig. 2

【 図 3 】

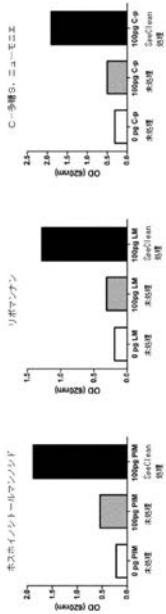


Fig. 3

【 図 4 】

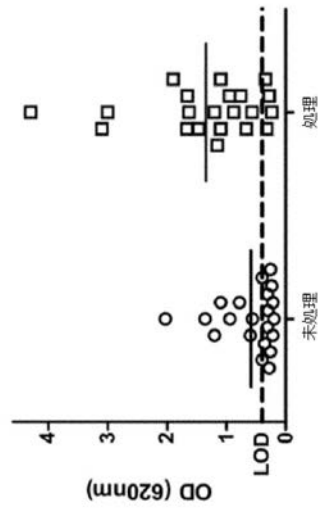


Fig. 4

【配列表】

2019530873000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/074812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CA 2 160 607 A1 (KOBAYASHI HISAKA [GB]; TAKAHASHI YOJI [JP]) 17 April 1997 (1997-04-17)	1-4, 7-12, 16-24, 29,30, 33,37, 40,48-50
Y	the whole document	1-53
X	WO 2008/134526 A2 (UNIV FLORIDA [US]; GOODISON STEVE [US]; ROSSER CHARLES JOEL [US]) 6 November 2008 (2008-11-06)	41-47,50
Y	page 33; claims 29-31; table 4	41-53
X	WO 2011/144934 A1 (CAMBRIDGE ENTPR LTD [GB]; BAHN SABINE [GB]; SCHWARZ EMANUEL [GB]; LEVI) 24 November 2011 (2011-11-24)	41-43, 50-52
Y	page 24; claim 11	41-53
	----- -/--	
<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		*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
*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
*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)		*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
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
30 November 2017	08/12/2017	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Moreno de Vega, C	

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/074812
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/301906 A1 (COLLIER GORDON BRUCE [CA] ET AL) 29 November 2012 (2012-11-29) claims 1-31; figure 8 -----	1-53
X	EP 2 728 354 A1 (MITSUBISHI CHEM MEDIENCE CORP [JP]) 7 May 2014 (2014-05-07)  paragraphs [0015], [0016], [0035]; claims 1-10 -----	1-3, 7-12, 16-26, 29,30, 33,37, 40,50
Y	BESTON HAMASUR ET AL: "A Sensitive Urinary Lipoarabinomannan Test for Tuberculosis", PLOS ONE, vol. 10, no. 4, 23 April 2015 (2015-04-23), page e0123457, XP055228258, DOI: 10.1371/journal.pone.0123457 the whole document -----	1-53
Y	WO 2016/012449 A1 (TBDIADIRECT AB [SE]) 28 January 2016 (2016-01-28) the whole document -----	1-53

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/074812

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CA 2160607	A1	17-04-1997	NONE
-----			
WO 2008134526	A2	06-11-2008	US 2010184049 A1 22-07-2010 WO 2008134526 A2 06-11-2008
-----			
WO 2011144934	A1	24-11-2011	CA 2799663 A1 24-11-2011 EP 2572195 A1 27-03-2013 US 2013178385 A1 11-07-2013 WO 2011144934 A1 24-11-2011
-----			
US 2012301906	A1	29-11-2012	CN 103649752 A 19-03-2014 EP 2715356 A1 09-04-2014 US 2012301906 A1 29-11-2012 US 2014072989 A1 13-03-2014 WO 2012166200 A1 06-12-2012
-----			
EP 2728354	A1	07-05-2014	CN 103620407 A 05-03-2014 EP 2728354 A1 07-05-2014 JP 5808808 B2 10-11-2015 JP WO2013002309 A1 23-02-2015 KR 20140057523 A 13-05-2014 US 2014193842 A1 10-07-2014 WO 2013002309 A1 03-01-2013
-----			
WO 2016012449	A1	28-01-2016	NONE
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>C 1 2 M</b>	<b>1/34</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K	17/00		
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	F	
			C 0 7 K	7/08	Z N A	

(81) 指定国・地域 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, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, 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

(74) 代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72) 発明者 ベストン ハマスル

スウェーデン国, 1 7 1 6 2 ソルナ, ヨーアン エンバリス ベーグ 5

(72) 発明者 レック イグナトビッチ

スウェーデン国, 1 7 4 5 9 スンドビュベリ, ラベットベーゲン 3 1

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB15 CC01 DG08 FA12 GA02 GA08 GB10

4H045 AA10 AA20 AA30 AA40 BA16 BA17 BA60 EA50 FA71 FA81

专利名称(译)	如何去除抑制成分		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019530873A</a>	公开(公告)日	2019-10-24
申请号	JP2019517370	申请日	2017-09-29
发明人	ベストン ハマスル レック イグナトビッチ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/569 C07K17/00 C12M1/34 C07K7/08		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/54393 G01N33/569 G01N33/5695		
FI分类号	G01N33/543.541.A G01N33/53.D G01N33/545.Z G01N33/569.F G01N33/53.V C07K17/00 C12M1/34.F C07K7/08.ZNA		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/CC01 4B029/DG08 4B029/FA12 4B029/GA02 4B029/GA08 4B029/GB10 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA60 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA81		
代理人(译)	青木 笃 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎 池田 达则		
优先权	62/402014 2016-09-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测诊断样品中一种或多种疾病相关成分的存在的方法，所述诊断样品包含选自分泌液，排泄液和脑脊髓液的体液。这个方法 a) 使样品与固相接触，该固相具有至少一部分与至少一种与存在于样品中的一种或多种抑制组分具有亲和力并能够结合的配体结合的配体； b) 将一种或多种抑制成分与固体表面上存在的一种或多种配体结合，从而减少样品中一种或多种抑制成分的量，然后， c) 包括检测所述诊断样品中一种或多种疾病相关成分的存在。一种或多种抑制成分的特征在于它们可以在步骤c) 中结合并干扰检测。[选型图]图1

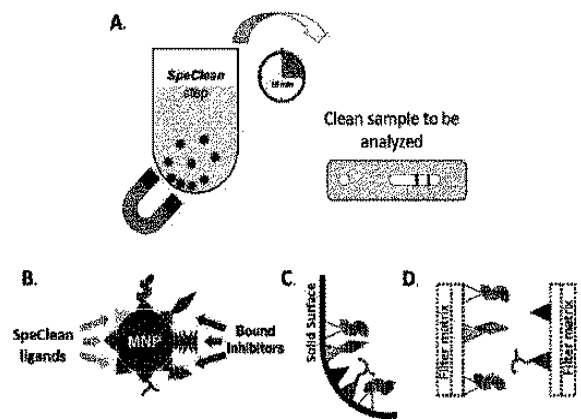


Fig. 1