

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6648023号  
(P6648023)

(45) 発行日 令和2年2月14日(2020.2.14)

(24) 登録日 令和2年1月17日(2020.1.17)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 P
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 16 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-542382 (P2016-542382)	(73) 特許権者	518160355
(86) (22) 出願日	平成26年9月17日 (2014.9.17)		ユナイテッド キングダム リサーチ ア ンド イノベーション
(65) 公表番号	特表2016-539345 (P2016-539345A)		英国 スウィンドン ノース スター ア ベニュー ポラリス ハウス
(43) 公表日	平成28年12月15日 (2016.12.15)	(74) 代理人	100114188
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/052809		弁理士 小野 誠
(87) 国際公開番号	W02015/040377	(74) 代理人	100119253
(87) 国際公開日	平成27年3月26日 (2015.3.26)		弁理士 金山 賢教
審査請求日	平成29年9月14日 (2017.9.14)	(74) 代理人	100124855
(31) 優先権主張番号	1316524.6		弁理士 坪倉 道明
(32) 優先日	平成25年9月17日 (2013.9.17)	(74) 代理人	100129713
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		弁理士 重森 一輝
前置審査		(74) 代理人	100137213
			弁理士 安藤 健司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 結核のバイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 被験者から得た喀痰サンプルにおける、IL - 1 R a、IL - 1 0、IL - 1 3、IL - 1 5、FGF、G - C S F 及び V E G F から成る群より選択される 1 以上の宿主免疫系バイオマーカーのレベルを決定し、

(b) 喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルを 1 以上の基準値と比較することを含む、

被験者において結核を検出するための方法であって、

基準値と比較された喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルが被験者における結核の存在または非存在を示し、

基準値と比較して減少した IL - 1 R a、IL - 1 0、IL - 1 3、IL - 1 5、G - C S F 及び / 又は V E G F のレベルが被験者における結核の存在を示し、及び / 又は、基準値と比較して増加した F G F のレベルが被験者における結核の存在を示す、方法。

【請求項 2】

バイオマーカーが更に 1 以上の T h 1 サイトカインを含み、基準値と比較して減少した T h 1 サイトカインバイオマーカーのレベルが被験者における結核の存在を示す、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

T h 1 サイトカインが I F N - を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

バイオマーカーが I L - 1 3、F G F および I F N - を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5】

被験者が肺疾患に罹患している疑いがあり、被験者が、慢性咳、体重減少および発熱から選択される 1 以上の症状を示す、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

基準値と比較された喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルが、被験者が結核に罹患しているのか、あるいは別の呼吸器障害、例えば肺炎、喘息または慢性閉塞性肺疾患に罹患しているかの指標である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

基準値が、結核に罹患していない被験者からの喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

バイオマーカーのレベルを側方流動イムノアッセイ、多重サイトカインアッセイまたは抗体アレイにより決定する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

被験者から得られた喀痰サンプルにおける I L - 1 R a、I L - 1 0、I L - 1 3、I L - 1 5、F G F、G - C S F 及び V E G F から成る群より選択される 1 以上の宿主免疫系バイオマーカーを検出するのに適した 1 以上の試薬を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて被験者における結核を検出するための側方流動イムノアッセイ装置。

【請求項 10】

該装置が、前記 1 以上のバイオマーカーに特異的に結合する 1 以上の抗体を含む、請求項 9 記載の装置。

【請求項 11】

バイオマーカーが I L - 1 3、F G F および I F N - を含む、請求項 9 又は 10 記載の装置。

【請求項 12】

該装置が、標識抗体および固定化抗体を含み、標識抗体および固定化抗体のそれぞれがバイオマーカー上の異なるエピトープに結合する、請求項 9 ~ 11 のいずれか 1 項記載の装置。

【請求項 13】

固定化抗体がクロマトグラフィー担体物質上に結合している、請求項 12 記載の装置。

【請求項 14】

該装置が試験ストリップまたはディップスティックの形態である、請求項 9 ~ 13 のいずれか 1 項記載の装置。

【請求項 15】

被験者における結核の存在が、該装置を喀痰サンプルと接触させた後、該装置の試験領域において、視認可能なシグナルにより示される、請求項 9 ~ 14 のいずれか 1 項記載の装置。

【請求項 16】

被験者において結核を検出するための、請求項 9 ~ 15 のいずれか 1 項記載の側方流動イムノアッセイ装置の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は疾患のバイオマーカーの分野に関する。1つの態様においては、本発明は、そのようなバイオマーカーを使用して被験者において結核を検出または診断するための方法に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【0002】

発展途上国においては、人口過密、劣悪なインフラおよび高いHIV感染率ゆえに、結核は重大な公衆衛生上の問題である[1]。結核(TB)感染を減少させることにおける大きな障害の1つは、初期診療所(プライマリーヘルスクリニック)において使用される正確な診断試験が存在しないことである。そのような診療所が結核患者の大多数(60%)を診察するが、検査により確認された結核の診断を提供することができないのである[2]。時を得た且つ正確な診断が無ければ、患者1人当たり1年当たり15回の割合の密接な接触で感染が生じる[3]。

## 【0003】

現在の結核診断試験は喀痰サンプルにおける細菌の検出を要する。しかし、これらは、非生産的な又は少菌性の喀痰ゆえにHIV陽性被験者においては特に、感度および特異性において相当な変動を示す。現在の代表的な診断試験である喀痰培養は長時間を要し、高価であり、汚染を受けやすく、基盤設備を要する。分子に基づく新規試験、例えばGeneXpert(登録商標)は結核およびリファンピシン耐性の迅速な検出をもたらすが、高価であり、基盤設備を要し、塗抹試験陰性被験者(小児およびHIV陽性者を含む)においては感度不足である。

## 【0004】

マイクロフルイディクス(側方流動試験)に基づく迅速な試験は結核診断に著しく有望である。それらは使用し易く、安価であり、数分以内に結果を示し、特別な設備を要さず、室温で安定であり、これらのことは高い結核負荷、資材に乏しい状況における使用にそれらを理想的なものとする。側方流動試験は体液(尿および血液が最も一般的である)のサンプル中のマーカーを検出する。しかし、現在のところ、そのような試験は、マーカーおよび/またはサンプル型に関連した感度不足ゆえに、結核用には開発されていない。

## 【0005】

血液に基づく現在のIFN-放出アッセイ(IGRA)の低い感度[4]は結核の活動期中における血液から肺への結核特異的細胞の遊走によるものでありうる。なぜなら、胸水中には、同じ被験者の血液と比べて有意に高いレベルの細胞性および可溶性宿主免疫マーカーが存在するからである[5]。分析は、HIVの状態には無関係に、結核または他の呼吸器疾患の、96%の正確な分類をもたらした[5]。更に、高レベルのマーカーが直接的にエキスピボで存在しており、分析は抗原刺激を要しなかった。Mtb抗原は感染の段階によって相当に変動し、このことは、抗原非依存的試験が特異性を増強することを示唆している。

## 【0006】

微生物学的検査による結核の診断が喀痰サンプルの収集に依存しているにもかかわらず、他の呼吸器疾患、例えば喘息[6]、嚢胞性線維症[7]および慢性閉塞性肺疾患(COPD)[7]で見られるのとは異なり、可溶性画分(すなわち、宿主バイオマーカー)の診断可能性は評価されていない。

## 【0007】

したがって、被験者において結核を検出するための改良された方法が尚も必要とされている。特に、正確であるが迅速で経済的でありポイントオブケア(すなわち、検査施設以外の状況)での使用に適した方法が必要とされている。

## 【発明の概要】

## 【0008】

## 発明の概括

したがって、本発明は、(a)被験者から得た喀痰サンプルにおける1以上の宿主免疫系バイオマーカーのレベルを決定し、(b)喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルを1以上の基準値と比較することを含む、被験者において結核を検出するための方法であって、基準値と比較された喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルが被験者における結核の存在または非存在を示す、方法を提供する。

## 【0009】

1つの実施形態においては、バイオマーカーは可溶性タンパク質を含む。例えば、バイオマーカーは1以上のサイトカイン、ケモカインおよび/または増殖因子を含みうる。

【0010】

1つの実施形態においては、バイオマーカーは1以上のTh2サイトカインを含む。好ましくは、基準値と比較して減少したTh2サイトカインのレベルは被験者における結核の存在を示す。1つの実施形態においては、Th2サイトカインはインターロイキン-10(IL-10)および/またはインターロイキン-13(IL-13)を含む。

【0011】

もう1つの実施形態においては、バイオマーカーは、インターロイキン-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)、インターロイキン-15(IL-15)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)および血管内皮増殖因子(VEGF)から選択される1以上のサイトカインを含む。好ましくは、基準値と比較して減少したIL-1Ra、IL-15、G-CSFおよび/またはVEGFのレベルは被験者における結核の存在を示す。

【0012】

もう1つの実施形態においては、バイオマーカーは線維芽細胞増殖因子(FGF)を含む。好ましくは、基準値と比較して増加したFGFのレベルは被験者における結核の存在を示す。

【0013】

もう1つの実施形態においては、バイオマーカーは更に1以上のTh1サイトカインを含む。好ましくは、基準値と比較して減少したTh1サイトカインのレベルは被験者における結核の存在を示す。1つの実施形態においては、Th1サイトカインはIFN-を含む。

【0014】

もう1つの実施形態においては、バイオマーカーは、IL-1Ra、IL-10、IL-13、IL-15、FGF、G-CSF、VEGFおよびIFN-からなる群から選択される。好ましくは、バイオマーカーはIL-13、FGFおよび/またはIFN-を含む。

【0015】

1つの実施形態においては、被験者は肺疾患(または呼吸器障害)に罹患している疑いがあり、被験者は、慢性咳、胸痛および発熱から選択される1以上の症状を示す。好ましくは、基準値と比較された喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、被験者が結核に罹患しているのか、あるいは別の呼吸器疾患(例えば、肺炎、喘息または慢性閉塞性肺疾患)に罹患しているのかを示す。すなわち、バイオマーカーレベルは、被験者において結核が他の呼吸器疾患(例えば、肺炎、喘息または慢性閉塞性肺疾患)から識別されることを可能にする。

【0016】

1つの実施形態においては、基準値は、結核に罹患していない被験者からの喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルを含む。したがって、喀痰サンプルにおけるバイオマーカーレベルは、好ましくは、対照サンプルにおける(それぞれの個々のバイオマーカーに関する)対応バイオマーカーレベルと比較される。1つの実施形態においては、対照サンプルは、他の肺疾患(または呼吸器障害)、例えば肺炎に罹患していない被験者を含みうる。

【0017】

1つの実施形態においては、バイオマーカーのレベルは免疫アッセイにより決定される(例えば、各バイオマーカーは、抗体またはそのフラグメントを使用して検出される)。好ましくは、バイオマーカーレベルは、ELISAアッセイを用いて決定される。1つの実施形態においては、検出は、側方流動免疫アッセイを用いて行われる。もう1つの実施形態においては、バイオマーカーは、例えばLuminox(商標)ミクロスフェアを使用する多重(マルチプレックス)サイトカインアッセイを用いて検出される。

【0018】

10

20

30

40

50

もう1つの態様においては、本発明は、(a)被験者からの喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルが被験者における結核の存在または非存在を示すかどうかを前記方法により決定し、(b)喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルが結核の存在を示す場合には、結核に対して被験者を治療することを含む、肺疾患に罹患している疑いのある被験者の治療方法を提供する。

**【0019】**

1つの実施形態においては、結核の治療は、抗結核剤の治療的有効量を被験者に投与することを含む。好ましくは、治療は、イソニアジド(isoniazid)、リファンピシン(rifampicin)、エタンブトール(ethambutol)および/またはピラジナミド(pyrazinamide)を被験者に投与することを含む。もう1つの好ましい実施形態においては、結核の治療は少なくとも2カ月間、少なくとも4カ月間または少なくとも6カ月間投与される。

10

**【0020】**

もう1つの実施形態においては、喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルが結核の非存在を示す場合には、該方法は、異なる呼吸器状態、例えば肺炎、喘息または慢性閉塞性肺疾患に対して被験者を治療することを含む。例えば、肺炎の治療は、アモキシシリン(amoxicillin)、ドキシサイクリン(doxycycline)、クラリスロマイシン(clarithromycin)、アジスロマイシン(azithromycin)および/またはエリスロマイシン(erythromycin)を被験者に投与することを含む。

20

**【0021】**

もう1つの態様においては、本発明は、被験者から得られた喀痰サンプルにおける1以上の宿主免疫系バイオマーカーを検出するのに適した1以上の試薬を含む、被験者における結核を検出するための側方流動イムノアッセイ装置を提供する。

**【0022】**

1つの実施形態においては、該装置は、1以上の宿主免疫系バイオマーカーに特異的に結合する1以上の抗体を含む。好ましくは、該抗体は1以上のサイトカイン、ケモカインおよび/または増殖因子に結合する。より好ましくは、該抗体はIL-1Ra、IL-10、IL-13、IL-15、FGF、G-CSF、VEGFおよびIFN- $\gamma$ の1以上に特異的に結合する。最も好ましくは、該抗体はIL-13、FGFおよび/またはIFN- $\gamma$ に結合する。

30

**【0023】**

1つの実施形態においては、該装置は、標識抗体(例えば、検出可能なマーカー部分、例えば蛍光標識または放射能標識で標識された抗体)および固定化抗体(例えば、固相上に固定化された抗体)を含む。好ましくは、標識抗体および固定化抗体のそれぞれはバイオマーカー上の異なるエピトープに結合し、すなわち、該抗体はバイオマーカーへの結合に関して競合しない。したがって、標識抗体および固定化抗体は典型的にはバイオマーカーに同時に結合しうる。

**【0024】**

好ましくは、固定化抗体はクロマトグラフィー担体物質上に固定化されている。クロマトグラフィー担体物質は典型的には毛管活性物質、例えば、喀痰サンプルの流体成分の移動(遊走)を可能にする物質である。

40

**【0025】**

好ましい実施形態においては、該装置は試験ストリップまたはディップスティック、例えばクロマトグラフィー試験ストリップの形態である。1つの実施形態においては、試験ストリップとのサンプルの接触は固定化抗体へのサンプル中の液体の移動を可能にする。幾つかの実施形態においては、標識化抗体はクロマトグラフィー担体物質上に沈着しており、好ましくは、試験ストリップへのサンプルの添加の後で固定化抗体へと同様に移動する。好ましい実施形態においては、標識化抗体およびバイオマーカーは、クロマトグラフィーストリップの試験領域において固定化抗体により捕捉される複合体を形成する。被験

50

者における結核の存在は、好ましくは、該装置を喀痰サンプルと接触させた後、該装置の試験領域において、視認可能なシグナル（例えば、変色）により示される。

【0026】

もう1つの態様においては、本発明は、被験者において結核を検出するための、前記の側方流動イムノアッセイ装置の使用を提供する。

【0027】

発明の詳細な説明

本発明は、被験者において結核を検出するための新規方法を提供する。結核抗原（これは動的であり、該細菌の状態、存在量、株および毒性によって変化する）を検出することを試みるのではなく、該方法は、結核に特異的なタンパク質識別特性を示す宿主バイオマーカーを有利に使用する。この識別特性は、感染の原因であるマイコバクテリウムの株によっては影響されず、このことは、該方法を、抗原に基づく既存方法より広範に適用可能なものとする。更に、該方法は、結核を他の肺状態、例えば肺炎から識別するために使用されうる。該方法は喀痰サンプルに対して行われるが、抗原刺激も培養も必要としないため、該方法は迅速であり、検査施設以外の状況において実施可能である。したがって、該方法は、針の使用も血液採取も伴うことなく、高度な診断技術を要することなく、そして基盤設備、例えば医療施設、電気などを要することなく行われうる。これは、発展途上国において該方法の使用を促進させる際に特に重要である。

【0028】

結核の検出

1つの態様においては、本発明は、被験者において結核を検出するための方法を提供する。「結核を検出する」は、典型的には、該方法が、被験者が結核に罹患しているかどうかを決定するために使用されうることを意味する。したがって、特定の実施形態においては、該方法は、結核を診断するために、結核の存在に関して患者集団をスクリーニングするために、活動性結核感染を検出するために、肺のマイコバクテリア（例えば、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（*Mycobacterium tuberculosis*））感染の存在を検出するために、および/または被験者における結核感染の進行をモニタリングするために使用されうる。

【0029】

結核（TB）は、マイコバクテリウム、例えばマイコバクテリウム・ツベルクローシス（*Mycobacterium tuberculosis*）による感染により一般に引き起こされる慢性感染症である。1つの実施形態においては、結核の検出はマイコバクテリウム・ツベルクローシス（*Mycobacterium tuberculosis*）複合体の細菌による感染の検出を意味する。マイコバクテリウム・ツベルクローシス（*Mycobacterium tuberculosis*）複合体は、マイコバクテリウム・ツベルクローシス・センス・ストリクト（*Mycobacterium tuberculosis sensu stricto*）、マイコバクテリウム・アフリカヌム（*M. africanum*）、マイコバクテリウム・ベイジン（*M. Beijing*）などからなる。幾つかの場合に結核に関連づけられうるマイコバクテリウムの他の種には、マイコバクテリウム・ボビス（*Mycobacterium bovis*）、マイコバクテリウム・カネッティ（*Mycobacterium canettii*）およびマイコバクテリウム・マイクロティ（*Mycobacterium microti*）が含まれる。典型的には、そのようなマイコバクテリアに感染した被験者の約10%のみが活動性（すなわち、症候性）結核を発生する。活動性結核感染は通常、主として肺を冒して、胸痛、発熱、および痰を産生する慢性咳のような症状を引き起こす。肺以外の症状も例えば中枢神経およびリンパ系において生じうる。したがって、本方法は、典型的には、例えば前記症状の1以上を被験者が示す活動性結核感染を検出するために使用される。

【0030】

本方法は、結核を他の肺疾患または呼吸器障害、特に肺炎から識別するためにも使用されうる。該方法は、結核を非感染性肺疾患、例えば慢性閉塞性肺疾患（COPD）および

10

20

30

40

50

喘息から識別するためにも使用されうる。

【0031】

肺炎は、ウイルスまたは細菌による感染により典型的に引き起こされる肺の炎症状態である。肺炎の症状は咳、体重減少、胸痛および発熱をも含む。したがって、多くの場合、被験者にX線撮影をすることなく肺炎を結核から識別することは困難である。しかし、肺炎および結核は典型的には全く異なる治療レジメンでの治療を要し、誤診の結果は非常に重大となりうる。例えば、個々の被験者に関する治療効力の低減だけでなく、不正確な診断は感染症伝播の増強および経時的な薬物耐性の増強につながりうる。したがって、1つの態様において、本発明は、肺疾患に罹患している疑いのある（例えば、結核および/または肺炎の指標となる1以上の症状を示す）被験者が結核に罹患しているのか又は肺炎のような別の肺疾患に罹患しているのかを決定するための改良方法を提供する。

10

【0032】

被験者

1つの実施形態においては、被験者（対象）はヒトである。しかし、本発明の方法はヒトには限定されず、例えば非ヒト哺乳動物に対しても実施されうる。好ましい実施形態においては、被験者は成人であるが、幾つかの実施形態においては、該方法は小児または乳児に対して実施されうる。

【0033】

典型的には、被験者は肺疾患に罹患している疑いがある。したがって、被験者は、肺疾患、例えば慢性咳（典型的には痰の産生を伴うもの）、胸痛、呼吸困難、発熱および/または体重減少に関連した1以上の症状を示しうる。

20

【0034】

サンプル

本発明の幾つかの実施形態においては、バイオマーカーは、被験者からの喀痰サンプルにおいて検出される。喀痰（または痰）は、肺に由来する濃厚粘性流体である。喀痰サンプルは典型的には咳により肺から排出される。喀痰は唾液からは区別されるべきであり、唾液はかなり希薄であり、肺ではなく口に由来する。

【0035】

結核のような肺疾患に罹患している疑いのある被験者は典型的には、本明細書に記載されている方法を使用して分析されうる相当量の喀痰を産生する。被験者から喀痰サンプルを得るための方法はよく知られている。例えば、幾つかの場合には、被験者は、1回または2回深く息を吸い、ついで濃厚粘性喀痰サンプルを吐き出しうるまで咳をするように指示されうる。

30

【0036】

必要に応じて、喀痰サンプルを得る際に被験者を補助するために更に幾つかの手段が講じられうる。温かい湿った空気を吸うことは気道の粘液を薄めて、喀痰サンプルを喀出することをより容易にしうる。例えば、被験者は、3～15%の塩溶液を含む霧状物（例えば、ジェット携帯ネブライザーまたは超音波ネブライザーにより供給されるもの）を、咳をする前に5～15分間吸うことが可能である。

【0037】

宿主免疫系バイオマーカー

本発明の幾つかの実施形態においては、1以上の宿主免疫系バイオマーカーが検出される。「宿主バイオマーカー」は、典型的には、該バイオマーカーが（例えば、被験者に感染した病原体ではなく）被験者自体に由来することを意味する。例えば、宿主バイオマーカーは、感染因子の遺伝物質ではなく被験者のゲノムによりコードされうる。したがって、典型的には、宿主バイオマーカーはヒトタンパク質バイオマーカーである。

40

【0038】

「免疫系バイオマーカー」は、典型的には、該バイオマーカーが被験者の免疫系において発現されることを意味する。例えば、該バイオマーカーは免疫系の細胞（例えば白血球、例えばリンパ球、好中球またはマクロファージ）により発現されることが可能であり、

50

あるいは該バイオマーカーは免疫系の細胞に生物学的効果をもたらさう。好ましい実施形態においては、該バイオマーカーの1以上は免疫調節物質である。

【0039】

典型的には、該バイオマーカーは可溶性タンパク質またはペプチドである。例えば、該バイオマーカーは、免疫系の細胞により分泌される及び/又は免疫系の細胞上の細胞表面受容体に結合するシグナリング分子でありうる。

【0040】

好ましい実施形態においては、該バイオマーカーは1以上のサイトカイン、ケモカインおよび/または増殖因子を含む。サイトカインは、しばしば免疫系の細胞(例えば、白血球)上の受容体に結合することによる免疫調節作用を典型的に有するシグナリング分子(通常はタンパク質またはペプチド)の一群である。サイトカインの亜群の例には、リンホカイン、インターロイキンおよびインターフェロンが含まれる。

10

【0041】

ヘルパーT細胞応答は一般にはTh1またはTh2として分類され、Th1は細胞内病原体に対する細胞性(例えば、細胞傷害性T細胞およびマクロファージ)応答に古典的に関連しており、Th2は細胞外病原体に対する体液性(例えば、B細胞による分泌抗体産生)応答に関連している。Th1およびTh2応答は典型的には特定のサイトカインに関連しており、これらはそれに応じて分類されうる。

【0042】

1つの実施形態においては、バイオマーカーの1以上はTh2サイトカインである。本明細書に示されているとおり、Th2サイトカインのレベルは、結核を有する被験者からの喀痰サンプルにおいては、結核に罹患していない被験者の場合と比較して低い。したがって、Th2サイトカインは、好ましくは、インターロイキン-4、インターロイキン-10またはインターロイキン-13である。より好ましくは、バイオマーカーの1以上はIL-10またはIL-13を含む。そのような実施形態においては、基準値と比較して減少した1以上のTh2サイトカインのレベルは典型的には被験者における結核の存在を示す。

20

【0043】

あるいは、幾つかの実施形態においては、バイオマーカーの1以上はTh1サイトカインである。Th1サイトカインには、例えばインターフェロン- $\gamma$ が含まれる。幾つかの実施形態においては、実施例において示されているとおり、特定のTh1サイトカインのレベルが結核患者と非結核患者との間で統計的に異なることがある場合であっても、Th1サイトカイン、例えばIFN- $\gamma$ は、他のバイオマーカーと組合せて使用される場合には、診断のための潜在能力を有しうる。したがって、好ましい実施形態においては、バイオマーカーの1以上がTh1サイトカインである場合、少なくとも1つの他の宿主免疫系バイオマーカー(例えば、Th2サイトカインおよび/または増殖因子)が測定される。そのような実施形態においては、基準値と比較して減少した1以上のTh1サイトカインのレベルは典型的には被験者における結核の存在を示す。

30

【0044】

前記のものに加えて、種々の他のサイトカインが本発明の個々の実施形態において使用されうる。例えば、追加的サイトカインには、IL-1、IL-2、IL-7、IL-8、IL-9、IL-12、IL-17およびTNF- $\alpha$ が含まれる。特に好ましいサイトカインには、インターロイキン-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)、インターロイキン-15、血管内皮増殖因子(VEGF)および顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が含まれる。基準値と比較して減少したそのようなサイトカインのレベルは典型的には被験者における結核の存在を示す。

40

【0045】

ケモカインは、細胞間の化学誘引(走化性)を媒介するシグナリング分子である。ケモカインは、典型的には、炎症部位への白血球(例えば、好中球、単球/マクロファージまたはリンパ球)のような細胞のリクルートを、例えばそのような細胞上の細胞表面受容体

50

への結合によりもたらす。ケモカインは一般には可溶性タンパク質またはペプチドであり、幾つかの場合にはサイトカインの亜群として分類されうる。ケモカインの例には、単球走化性タンパク質 - 1 (MCP - 1)、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1 (MIP - 1)、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1 (MIP - 1)、インターフェロンガンマ誘導性タンパク質 10 (IP - 10)、RANTES (Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted) およびエオタキシンが含まれる。

【0046】

増殖因子は、典型的には細胞の成長、増殖および/または分化(血管新生を含む)を刺激しうるシグナリング分子である。サイトカインとして分類される幾つかの物質、例えば VEGF、G-CSF および GM-CSF は増殖因子とみなされることも可能であり、その逆も言える。増殖因子は一般にはタンパク質またはペプチドまたはステロイドである。本発明の幾つかの実施形態においては、バイオマーカーの1以上は線維芽細胞増殖因子(FGF)を含む。典型的には、基準値と比較して増加した、喀痰サンプルにおけるそのような増殖因子のレベルは、被験者における結核の存在を示す。

10

【0047】

バイオマーカーの組合せ

好ましい実施形態においては、複数(例えば、2、3、4、5、6個以上)の宿主免疫系マーカーのレベルが喀痰サンプルにおいて決定される。

【0048】

1つの実施形態においては、該方法は、少なくとも1つのTh2サイトカインおよび少なくとも1つの増殖因子のレベルを決定することを含む。もう1つの実施形態においては、該方法は、少なくとも1つのTh1サイトカインおよび少なくとも1つのTh2サイトカインのレベルを決定することを含む。好ましくは、該方法は、少なくとも1つのTh1サイトカイン、少なくとも1つのTh2サイトカインおよび少なくとも1つの増殖因子のレベルを決定することを含む。

20

【0049】

特に好ましい実施形態においては、バイオマーカーは、IL-1Ra、IL-10、IL-13、IL-15、FGF、G-CSF、VEGF および/または IFN- からなる群から選択される。より好ましくは、バイオマーカーはIL-13、FGF および/または IFN- を含む。例えば、特定の実施形態においては、バイオマーカーは(i) IL-13 および FGF、(ii) IL-13 および IFN-、(iii) FGF および IFN-、または(iv) IL-13、FGF および IFN- を含む。

30

【0050】

バイオマーカーレベルの決定

本方法においては、バイオマーカーレベルは被験者からの喀痰サンプルにおいて決定される。サンプル中の個々のバイオマーカーの量はいずれかの適当な方法により測定される。例えば、タンパク質バイオマーカーを検出するための方法は、該タンパク質に選択的に結合する抗体、捕捉分子、受容体またはそれらの断片の使用を含む。本明細書に記載されているバイオマーカーに結合する抗体は公知であり、あるいは、動物の免疫化および血清(ポリクローナル抗体を製造するため)または脾臓細胞(モノクローナル抗体を得るために不死化細胞系との融合によりハイブリドーマを製造するため)の収集を含む当該技術分野で公知の方法により製造されうる。本明細書に記載されているバイオマーカーのアミノ酸配列は公知であり、公にアクセス可能なデータベースから入手可能であり、抗体製造のために適当な免疫原を作製するために使用されうる。抗体のような検出分子は、所望により、固体支持体、例えばプラスチック表面もしくはビーズに、またはアレイにおいて結合されうる。タンパク質レベルを検出するための適当な試験形態には、イムノアッセイ、例えば酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ウエスタンブロット法、抗体アレイ、多重(マルチプレックス)サイトカインアッセイおよび免疫沈降が含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

50

## 【0051】

好ましい実施形態においては、バイオマーカーは、多重サイトカインアッセイを使用して、例えばLuminox（商標）マイクロスフェアを使用して検出されうる。例えば、各サイトカインバイオマーカーに特異的に結合する抗体は、マイクロスフェア、例えば、Luminox（商標）装置と共に使用されるように設計されたLuminox（商標）マイクロスフェアに結合されうる。多数（例えば、100個まで）の異なるタイプのマイクロスフェアが混合され、一緒に分析されうる。1つの実施形態においては、該方法は単一の反応容器内で行われる。マイクロスフェアの各集団はその特有の蛍光識別特性または色により識別されうる。

## 【0052】

典型的な多重サイトカインアッセイ形態においては、異なるビーズタイプは、異なるサイトカインバイオマーカーに対する抗体を含む。ビーズのアリコート量を小容量の試験喀痰サンプルと共にインキュベートする。ついで該ビーズを洗浄して未結合サンプルを除去する。ついで、検出可能なマーカー（例えば、ストレプトアビジン-フィコエリトリンの添加により検出可能なビオチン）に結合した検出抗体を加える。ついで該サンプルを、例えば流動分析装置において、種々のビーズタイプの分離により分析し、該マーカーの存在に関して検出する。各ビーズからのシグナル強度を、ビーズ調製物中に含まれる陰性対照ビーズのシグナル強度と比較して、該ビーズが各サイトカインに関して陽性であるか陰性であるかを決定する。

## 【0053】

もう1つの実施形態においては、バイオマーカーは、抗体アレイを使用して検出される。抗体アレイは、典型的には、固体支持体の別個の領域に固定化された免疫グロブリン分子またはその機能的誘導体もしくは等価体のアレイを含んでいて、異なる別個の領域は、異なるバイオマーカーに対する特異性を有する。固定化免疫グロブリンの、それらのそれぞれの抗原への結合パターンは、サンプルにおける個々のバイオマーカーの存在を示す。適当な抗体アレイは例えばChang（1983）J. Immunol. Methods 65, 217-223およびW000/39580に開示されている。

## 【0054】

あるいは、バイオマーカータンパク質のレベルは質量分析により決定されうる。質量分析はアナライトの分子量によりアナライトの検出および定量を可能にする。当技術分野で公知の質量分析の分野におけるいずれかの適当なイオン化方法が使用可能であり、電子衝撃（EI）、化学イオン化（CI）、フィールドイオン化（FDI）、エレクトロスプレーイオン化（ESI）、レーザー脱離イオン化（LDI）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）および表面増強レーザー脱離イオン化（SELDI）を包含するが、これらに限定されるものではない。いずれかの適当な質量分析検出方法、例えば四重極質量分析（QMS）、フーリエ変換質量分析（FT-MS）および飛行時間型質量分析（TOF-MS）が使用されうる。

## 【0055】

## 側方流動イムノアッセイ

特に好ましい実施形態においては、バイオマーカーのレベルは、側方流動イムノアッセイを用いて検出される。側方流動イムノアッセイは単一工程のポイントオブケア試験（POCT）に特に適しており、標的分子の検出のための高感度かつ迅速な手段を提供する。側方流動イムノアッセイはサンドイッチまたは競合試験形態において使用されうる。一般に、幾つかの利用可能なエピトープを有する高分子量アナライトはサンドイッチ形態で分析可能であり、一方、単一の利用可能なエピトープのみを提示する、より小さい分子は、競合アッセイにより検出されうる。

## 【0056】

適当な側方流動イムノアッセイ装置は例えばUS 2005/0175992およびUS 2007/0059682に開示されている。典型的には、側方流動装置は試験ストリップまたはディップスティック（これはサンプル中に浸される）の形態でありうる。サ

10

20

30

40

50

サンプル中の液体が適用域から試薬域へと側方に移動するように、該装置はクロマトグラフィー担体物質から形成されうる。典型的には、ついでアナライトの分子は、該アナライトに特異的な標識抗体と遭遇し、アナライト - 抗体複合体を形成する。ついで、この複合体は試験線域に向かって更に側方に移動し続け、該試験線域においては、（例えば、サンドイッチアッセイ形態においては）もう1つの抗体がクロマトグラフィー担体物質上に固定化されている。この第2の（固定化）抗体は、典型的には、第1（標識）抗体と比較してアナライト上の異なるエピトープに結合する。したがって、サンプル中のアナライトの存在は、固定化抗体による標識抗体 - アナライト複合体の捕捉により、該試験線域におけるシグナルの可視化（例えば、変色）により検出される。幾つかの場合には、アナライトの存在下および非存在下の両方において標識抗体に結合するもう1つの抗体（例えば、標識抗体のFc領域に結合する抗免疫グロブリン抗体）が、試験ストリップ上にも存在する対照線域において固定化されうる。該試験が正しく機能すれば、アナライトがサンプル中に存在するかどうかに無関係に、シグナルは対照線域において可視化されるはずである。

10

**【0057】**

代替的实施形態においては、バイオマーカーは競合側方流動イムノアッセイにより検出されうる。そのようなアッセイ形態においては、サンプルは典型的には、まず、（前記のサンドイッチアッセイ形態の場合のような標識抗体ではなく）標識アナライトまたはその類似体と遭遇する。ついで、サンプルに由来するアナライトは標識アナライトと一緒に試験線（この位置に、該アナライトに対する抗体が固定化されている）へと移動する。サンプル中の非標識アナライトは該抗体への結合に関して標識アナライトと競合し、その結果、該試験線における視認可能なバンドの非存在はサンプル中のアナライトの存在を示す。このアッセイ形態は、例えば、結核の存在の指標として陽性視覚的シグナルを得たい場合（例えば、バイオマーカーが、該疾患を有する被験者からの喀痰サンプルにおいては減少するTh2サイトカインである場合）に使用されうる。

20

**【0058】****抗体**

本明細書に記載されている検出方法は、好ましくは、本明細書に記載されている宿主免疫系バイオマーカーに結合する1以上の抗体を使用する。適当な抗体は商業的に入手可能であり、あるいは公知技術を用いて製造されうる。

**【0059】**

抗体は免疫グロブリン分子を含む。免疫グロブリン分子は、最も広い意味においては、2つのシトと通常は保存ジスルフィド結合とを含有する、抗体分子に特徴的な免疫グロブリンフォールドを含むポリペプチドのファミリーである免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。本明細書中で用いる抗体は、選択された標的バイオマーカーに結合しうる完全抗体または抗体フラグメントを意味し、Fv、ScFv、F(ab')およびF(ab')<sub>2</sub>、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、操作された抗体、例えばキメラ抗体、CDRグラフト化抗体およびヒト化抗体、ならびにファージディスプレイまたは代替技術を用いて製造された人工的に選択された抗体を包含する。

30

**【0060】**

抗体は動物血清から入手可能であり、あるいはモノクローナル抗体またはそのフラグメントの場合には細胞培養内で製造されうる。細菌、酵母、昆虫または好ましくは哺乳類細胞培養において、確立された方法に従い抗体を製造するために、組換えDNA技術が用いられうる。選択される細胞培養系は、好ましくは、抗体産物を分泌する。

40

**【0061】**

ハイブリドーマまたは哺乳類宿主細胞のインビトロでの増殖は、通常の標準的な培養培地である適当な培地、例えばダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）またはRPMI 1640培地内で行われ、該培地は、所望により、哺乳類血清、例えばウシ胎児血清または微量元素および成長維持サプリメント、例えばフィーダー細胞、例えば正常マウス腹腔滲出細胞、脾臓細胞、骨髄マクロファージ、2-アミノエタノール、インスリン、トランスフェリン、低密度リポタンパク質、オレイン酸などにより補充されうる。動物由来汚染

50

を最小にするために、該培地は無血清または動物産物非含有培地、例えば化学規定培地でありうる。細菌細胞または酵母細胞である宿主細胞の増殖は、当技術分野で公知の適当な培養培地において、例えば、細菌の場合には培地LB、NZCYM、NZYM、NZM、テリフィックブロス、SOB、SOC、2×YTまたはM9最小培地において、そして酵母の場合には培地YPD、YEPD、最小培地または完全最小ドロップアウト培地において同様に行われる。

#### 【0062】

昆虫細胞は、血清含有培地と比較して安価であり安全である無血清培地内で培養される。組換えバキュロウイルスは、当技術分野で公知の幾つかの鱗翅目細胞系のいずれか、例えばスポドプテラ・フルジペルダ (*Spodoptera frugiperda*) Sf9細胞でありうる宿主細胞系をトランスフェクトするための構築物および発現ベクターとして使用される。昆虫宿主細胞における組換えタンパク質の発現の総説はAltmannら(1999), *Glycoconj J* 1999, 16, 109-23ならびにKostおよびCondreay(1999), *Curr Opin Biotechnol*, 10, 428-33に記載されている。

10

#### 【0063】

インビトロ製造は比較的純粋な抗体調製物を提供し、大量の所望の抗体を得るための大規模化を可能にする。細菌細胞、酵母、昆虫および哺乳類細胞の培養のための技術は当技術分野で公知であり、均一懸濁培養(例えば、エアリフトリアクターまたは連続攪拌反応器におけるもの)、または固定化もしくは捕捉細胞培養(例えば、中空糸、マイクロカプセルにおけるもの、アガロースマイクロビーズまたはセラミックカートリッジ上のもの)を包含する。

20

#### 【0064】

大量の所望の抗体は、哺乳類細胞をインビボで増殖させることによっても得られうる。この目的のために、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を組織適合性哺乳動物内に注入して、抗体産生腫瘍の成長を引き起こさせる。所望により、該注射の前に、該動物を炭化水素、特に鉱油、例えばプリスタン(テトラメチルペンタデカン)でプライミングする。1~3週間後、それらの哺乳動物の体液から該抗体を単離する。例えば、Balb/cマウスからの抗体産生脾臓細胞との適当な骨髓腫細胞の融合により得られたハイブリドーマ細胞、または所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞系Sp2/0に由来するトランスフェクト化細胞を、プリスタンで所望により前処理されていてもよいBalb/cマウスの腹腔内に注入し、1~2週間後、該動物から腹水を採取する。

30

#### 【0065】

前記の及び他の技術は、例えばKohlerおよびMilstein, (1975) *Nature* 256: 495-497; US 4,376,110; HarlowおよびLane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor (これらを参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されている。組換え抗体分子の製造のための技術は前記参考文献、そしてまた、例えばEP 0623679、EP 0368684およびEP 0436597(これらを参照により本明細書に組み入れることとする)にも記載されている。

40

#### 【0066】

細胞培養上清を、主に、所望の標的を発現する細胞の免疫蛍光染色、免疫プロット法、酵素イムノアッセイ、例えばサンドイッチアッセイもしくはドットアッセイ、またはラジオイムノアッセイにより、所望の抗体に関してスクリーニングする。

#### 【0067】

抗体の単離のために、培養上清中または腹水中の免疫グロブリンは、例えば硫酸アンモニウムでの沈殿、吸湿性材、例えばポリエチレングリコールに対する透析、選択膜による濾過などにより濃縮される。必要に応じて、および/または所望により、通常のクロマトグラフィー法、例えばゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロース上のクロマトグラフィー、および/またはイムノアフィニティクロマトグラフィー、例

50

えば標的含有タンパク質もしくはプロテインAでのアフィニティークロマトグラフィーにより、該抗体を精製する。

【0068】

前記方法により産生された抗体は、標準的な方法に従い、細胞からの核酸の単離によりクローニングされうる。通常、抗体の核酸可変ドメインを単離し、それを使用して、抗体フラグメント、例えばs c F vを構築することが可能である。

【0069】

本明細書に記載されている方法は、抗体の重鎖可変ドメインおよび/または軽鎖可変ドメインをコードするインサートを含む組換え核酸を使用しうる。本質的に、そのような核酸は、コード化一本鎖核酸、コード化核酸とそれに対する相補的核酸とからなる二本鎖核酸、またはこれらの相補的(一本鎖)核酸自体を含む。

【0070】

更に、抗体は、抗体の人工レパートリーを得るために抗体遺伝子の突然変異誘発により製造されうる。この技術は抗体ライブラリーの製造を可能にし、抗体ライブラリーはまた、商業的に入手可能である。したがって、免疫グロブリンmp人工レパートリー、好ましくは人工ScFvレパートリーは免疫グロブリン源として使用されうる。

【0071】

単離された又はクローニングされた抗体は、当技術分野で公知の方法を用いる化学的カップリングにより、他の分子、例えば核酸またはタンパク質結合手段に連結されうる(例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor, ならびにManiatis, T., Fritsch, E. F. およびSambrook, J. (1991), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。そのような方法は、標識抗体を製造するために、または抗体を固相上に固定化するために使用されうる。

【0072】

幾つかの実施形態(例えば、側方流動イムノアッセイを含む)においては、抗体は標識されうる。典型的には、標識抗体は検出可能なシグナルを生成しうる。該シグナルは、例えば酵素活性、例えばプロテアーゼ活性、転写活性または発光誘導活性の生成でありうる。しかし、好ましくは、該シグナルは電磁放射、例えば光の放出または吸収である。より好ましくは、該シグナルは視認可能なシグナルであり、例えば、該シグナルは肉眼で検出可能である。該シグナルは、例えば、標識抗体が存在する場合に生じる変色でありうる。

【0073】

視認可能標識または蛍光標識を種々の物質、例えばペプチド、ポリペプチドおよび抗体にコンジュゲート化する方法は当技術分野でよく知られている。ある実施形態においては、抗体と標識との間にスペーサー手段を含有させることが望ましいかもしれない。スペーサー手段は、種々の長さの重合体(その長さは重合度の制御により制御されうる)であるリンカーまたはスペーサーを含みうる。多数のスペーサーおよびリンカーが当技術分野で公知であり、用途に応じたこれらの選択および使用方法が当業者に知られるであろう。どの程度のスペーサー長を用いるべきかも当業者に知られるであろう。

【0074】

基準値との比較

本発明の幾つかの実施形態においては、喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルは1以上の基準値と比較される。基準値は、例えば、正常被験者(すなわち、結核に罹患していない被験者)からの喀痰サンプル中に存在するバイオマーカーのレベルの、予め決定された測定値でありうる。幾つかの実施形態においては、基準値は、結核以外の肺疾患、例えば肺炎に罹患している被験者(または被験者の集団)から誘導されうる。基準値は、例えば、結核の症状を示さない(試験被験者に対して年齢および/または性別が釣り合わされた又は釣り合わされていない)被験者の対照集団、例えば5、10、100、10

10

20

30

40

50

00名以上の被験者におけるバイオマーカーの平均値または中央値に基づくものでありうる。好ましくは、試験サンプルにおけるバイオマーカーのレベルは、対照値と比較して少なくとも1%、5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%または少なくとも50%異なる。

【0075】

対照値は、例えば、被験者の対照集団から採取された1以上のサンプルを使用して、試験サンプル中の脂質レベルの決定の対応方法を用いて決定されうる。例えば、幾つかの実施形態においては、対照サンプルにおけるバイオマーカーレベルは試験サンプルに対する並行アッセイにおいて決定されうる。代替的实施形態においては、対照値は既に決定されていてもよく、あるいは得られた各試験サンプルに関して対照サンプルに対する対応決定を行うことを要することなく計算または推定されうる。

10

【0076】

側方流動アッセイの場合、サンプルにおけるバイオマーカーの存在または非存在は、典型的には、側方流動装置上の試験線における視認可能なシグナル（例えば、変色）の存在または非存在により決定可能であり、すなわち、結果は通常、肉眼により決定可能である。個々のバイオマーカーのレベルが個々のカットオフ値（これは本明細書に記載の基準値に対応しうる）を上回るか下回るかを決定するためにも側方流動装置が使用されうる、と当業者により認識されるであろう。カットオフおよび基準値は一般に、後記実施例に記載されているとおり、受診者動作特性曲線分析を含む種々の統計技術を用いて決定されうる。

20

【0077】

例えば、アッセイの準備および条件ならびに標識抗体、固定化抗体および対照抗体の相対量は、バイオマーカーのレベルが基準値を上回るか下回るかの指標を得るために試験線における視覚的シグナルの強度が対照線における視覚的シグナルと比較されうるように選択されうる。あるいは、側方流動試験は、結核に罹患していないことが知られている被験者からのサンプルに関する別の（対照）試験と並行して、被験者からのサンプルに関して行われうる。対照はまた、患者に由来しないが一定量のバイオマーカーを含有するサンプルでありうる。いずれの場合も、試験ストリップから結果を対照ストリップの場合と比較することは、基準値と比較された、被験者からの喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルの指標を与えうる。

30

【0078】

もう1つの代替的实施形態においては、側方流動装置上のシグナルを定量して、バイオマーカーレベルの、より正確な指標を得ることが可能である。例えば、試験線におけるシグナルの強度は、サンプル中のアナライトの量を定量するために決定されうる。側方流動リーダーのような携帯診断装置が、例えば、試験線を明らかにし、標識の指標となる光の特異的波長を測定するために使用されうる。そのようなリーダーにおいては、シグナルをアナライト濃度と相関させるために、イメージ・プロセッシング・アルゴリズムが組込まれうる。

【0079】

肺疾患の治療

40

もう1つの態様においては、本発明は、肺疾患または呼吸器障害に罹患している疑いのある被験者の治療方法を提供する。典型的には、該方法は、前記の検出方法を行い、その結果に基づいて被験者を治療する工程を含む。特に、喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルが被験者における結核の存在を示す場合には、該方法は、典型的には、抗結核治療（例えば、1以上の治療剤を含む）の治療的有効量を該被験者に投与する工程を含む。典型的には、結核に対するそのような治療は長期にわたって、例えば少なくとも1カ月間、少なくとも2カ月間、少なくとも3カ月間、少なくとも4カ月間または少なくとも6カ月間、継続される。

【0080】

他の実施形態においては、喀痰サンプルにおけるバイオマーカーのレベルが被験者におけ

50

る結核の非存在を示す場合には、該方法は、肺疾患に対する代替療法を該被験者に投与する工程を含みうる。該代替療法は例えば肺炎、喘息または慢性閉塞性肺疾患に対する治療でありうる。例えば、幾つかの場合には、抗肺炎治療剤が被験者に投与されうる。一般には、結核以外の肺疾患に対するそのような治療は結核治療に対するものより短期間でありうる。したがって、そのような実施形態においては、治療は1週間まで、2週間まで、3週間まで、または1カ月間まで継続されうる。

#### 【0081】

結核を治療するのに有用な治療剤および方法は当業者によく知られている。例えば、抗結核療法は投与を、イソニアジド (isoniazid)、リファンピシン (rifampicin)、エタンブトール (ethambutol) および/またはピラジナミド (pyrazinamide) から選択される1以上の物質の投与を含みうる。典型的には、活動性結核感染は、2以上の治療剤の組合せを使用して治療される。該治療は、好ましくは、少なくとも6カ月間投与されるが、これは初期集中治療期間およびそれに続く長期継続期間に分けられうる。したがって、活動性結核感染に対する標準的な短期治療はイソニアジド (isoniazid)、リファンピシン (rifampicin)、ピラジナミド (pyrazinamide) およびエタンブトール (ethambutol) の2カ月間、ならびにそれに続くイソニアジド (isoniazid) およびリファンピシン (rifampicin) のみの更に4カ月間である。そのような一次治療が失敗した場合には、二次治療が幾つかの場合に用いられうる。二次治療はアミノグリコシド (例えば、アミカシン (amikacin)、カナマイシン (kanamycin)); フルオロキノロン (例えば、シプロフロキサシン (ciprofloxacin)、レボフロキサシン (levofloxacin)); チオアミド (例えば、エチオンアミド (ethionamide)、プロチオンアミド (prothionamide)); シクロセリン (例えば、クロセリン (closerin)); テリジドン (terizidone)、カプレオマイシン (capreomycin)、ビオマイシン (viomycin) またはエンビオマイシン (enviomycin) を含みうる。

#### 【0082】

一方、肺炎 (特に細菌性肺炎) を治療するために使用される治療剤は一般には広域スペクトル抗生物質である。例えば、適当な抗生物質には、アモキシシリン (amoxicillin)、ドキシサイクリン (doxycycline)、クラリスロマイシン (clarithromycin)、マクロライド (例えば、アジスロマイシン (azithromycin) またはエリスロマイシン (erythromycin)) が含まれる。幾つかの場合には、セファロスポリン (cephalosporin)、カルバペネム (carbapenem) およびバンコマイシン (vancomycin) も使用可能であり、例えば、静脈内投与され、特に院内感染の場合には組合せて使用されうる。典型的には、該治療は例えば3~5日間、7~10日間または2週間まで投与されうる。

#### 【0083】

治療剤は、種々の技術を用いて被験者に投与されうる。例えば、治療剤は全身投与可能であり、これは、筋肉内または静脈内注射を含む注射、経口、舌下、経皮、皮下または鼻腔内投与を含む。好ましくは、治療剤は経口投与される。投与される治療剤の濃度および量は典型的には、疾患の性質、投与される治療剤のタイプ、投与方式ならびに被験者の年齢および健康状態に応じて変動するであろう。

#### 【0084】

治療剤は、例えば医薬上許容される希釈剤と共に、例えば固体もしくは錠剤形態または液体形態の医薬組成物中に製剤化されうる。該組成物は通常、医薬上許容される量の希釈剤、賦形剤および他の適当な担体を含む。適当な担体および製剤は、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 1985) に記載されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 5 】

## キット

他の実施形態においては、本発明は、前記方法を実施するのに適したキットを提供する。特に、該キットは、前記バイオマーカー、例えば 1 以上の宿主免疫系バイオマーカーまたは本明細書に記載されているバイオマーカーの組合せを検出するのに適した試薬を含みうる。典型的には、該試薬は、本明細書に記載されているバイオマーカーまたはバイオマーカーの組合せに特異的に結合する抗体を含みうる。例えば、該キットは 1 個、2 個、3 個または 4 個の異なる抗体を含むことが可能であり、それらのそれぞれは、前記のものから選択される異なるバイオマーカーに結合する。

## 【 0 0 8 6 】

そのようなキットは、所望により、1 以上の追加的成分、例えば、バイオマーカーに結合する抗体を使用して E L I S A アッセイを行うのに適した試薬を更に含みうる。例えば、該キットは、各バイオマーカーのための捕捉および検出抗体、二次抗体、検出試薬、固相（例えば、反応プレートまたはビーズ）、標準物（例えば、組換えタンパク質の形態の既知濃度の各バイオマーカー）および E L I S A 法のいずれかの工程を行うのに適したバッファーを含みうる。該キットは、前記試薬を貯蔵するためのバイアル、容器および他のパッケージング材ならびに本明細書に記載されている方法を実施するための説明を更に含みうる。

## 【 0 0 8 7 】

特に好ましい実施形態においては、該キットは側方イムノアッセイ装置の形態であり、または側方イムノアッセイ装置を含む。そのような装置は、本明細書に記載されている宿主免疫系バイオマーカーまたはバイオマーカーの組合せに特異的に結合する 1 以上の抗体を含みうる。適当な抗体は商業的に入手可能であり、または公知技術を用いて製造される。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 8 8 】

【 図 1 】患者の人口統計。T B = 結核；非 T B = 他の呼吸器疾患；W B A = 全血アッセイ；C O P D = 慢性閉塞性肺疾患；R T I = 気道感染症（未決定）；I Q R = 四分位範囲。

【 図 2 】抗原刺激の非存在下の 24 時間のインキュベーションの後のサイトカインレベル（皆無（N i l）対照）。24 時間のインキュベーションの後のサイトカインレベルに関する 20 個の T B および 26 個の非 T B（他の呼吸器障害）の分析。長方形は四分位範囲を示し、線は中央値を示し、棒は 5 ~ 95 % の範囲を示し、点は外れ値を示す。T B および非 T B の比較のためにマン - ホイットニー U 検定を用いてデータを分析した。P 値  $\leq 0.035$  が有意とみなされ、示されている。

【 図 3 】P P D の存在下の 24 時間のインキュベーションの後のサイトカインレベル。P P D の存在下の 24 時間のインキュベーションの後のサイトカインレベルに関する 20 個の T B および 26 個の非 T B（他の呼吸器障害）の分析。長方形は四分位範囲を示し、線は中央値を示し、棒は 5 ~ 95 % の範囲を示し、点は外れ値を示す。T B および非 T B の比較のためにマン - ホイットニー U 検定を用いてデータを分析した。P 値  $\leq 0.035$  が有意とみなされ、示されている。

【 図 4 】エクスピボの血清および唾液におけるサイトカインレベル。A : 20 名の T B（灰色）被験者および 42 名の非 T B（白色）被験者からのエクスピボの唾液の分析。B : 25 名の T B（灰色）被験者および 52 名の非 T B（白色）被験者からのエクスピボの血清の分析。長方形は四分位範囲を示し、線は中央値を示し、棒は 5 ~ 95 % の範囲を示し、点は外れ値を示す。T B および非 T B の比較のためにマン - ホイットニー U 検定を用いてデータを分析した。P 値  $\leq 0.035$  が有意とみなされ、示されている。

【 図 5 】喀痰は直接的にエクスピボで高レベルのサイトカインを示す。A : T B 患者からの血清（白色）、唾液（灰色）および喀痰（黒色）（それぞれ  $n = 25$ 、 $20$  および  $23$ ）におけるサイトカインレベルの比較。示されている値は、消化中の喀痰サイトカインの希釈度に関して調節されていないことに注意されたい。B : T B（ $n = 23$ ）被験者およ

10

20

30

40

50

び非TB (n = 29) 被験者の喀痰からのエキスピボサイトカインレベルの分析。長方形は四分位範囲を示し、線は中央値を示し、棒は5 ~ 95%の範囲を示し、点は外れ値を示す。TBおよび非TBの比較のためにマン・ホイットニーU検定を用いてデータを分析した。P値 < 0.035が有意とみなされ、示されている。

【図6】エキスピボの喀痰におけるサイトカインレベルのヒートマップ。TBを有する被験者 (n = 23) および他の呼吸器障害を有する被験者 (非TB ; n = 29) に関して中央値が示されている (赤色 = 高、青色 = 低)。

【0089】

次に、以下の特定の実施形態に関する単なる例示として本発明を説明することとする。

【0090】

実施例

本研究においては、結核の診断のための最適な流体およびバイオマーカーの組合せを決定するために、幾つかのサンプル型を分析した。喀痰宿主バイオマーカーは、抗原で刺激された血液におけるレベルより有意に高く、塗抹試験またはHIV状態には無関係に、結核の、96%の正確な分類をもたらした。したがって、本発明は、結核の「検査施設を要さない検出」を可能にする試験を提供する。この利益は明らかである。すなわち、毎年1000万の新たな診断がなされるが、検査施設により確認されるのは16%に過ぎず、結核を迅速に検出することができれば結核の負担が大幅に低減されるであろう。

【0091】

方法

被験者：

被験者をメディカル・リサーチ・カウンシル・ユニット (Medical Research Council Unit) (Fajara, The Gambia) において外来および病棟から連続的に募集した。全ての被験者は、2週間を超える咳の持続と、結核を示唆する1つの他の臨床症状 (すなわち、体重減少、発熱) とを示す成人 (18歳以上) であった。除外基準には、結核または併存疾患、例えばマラリアに対する過去の治療が含まれた。書面によるインフォームドコンセントの後、全ての被験者は完全な血液学的、微生物学的、生化学的な及び症状の評価を受けた。HIV試験を行い、喀痰、唾液、血清およびヘパリン処理血液サンプルを免疫学的評価のために収集した。臨床症状 (アンケート、身体検査)、胸部X線および微生物学的検査 (喀痰塗抹試験および培養) を用いて患者を以下の2群に分類した：培養により確認された結核を有する患者、および他の呼吸器疾患を有する患者 (図1)。液体培養 (BACTEC (商標), Becton-Dickinson, USA) を用いて喀痰培養を行い、キャピリア (Capilia) 迅速TB試験 (Taun Laboratories, Japan) を使用してマイコバクテリウム・ツベルクローシス (Mycobacterium tuberculosis) 複合体 (MTC) の存在を確認した。ガンビア政府 / MRC 共同倫理委員会から倫理的承認を得た。

【0092】

微生物学的証明

LED顕微鏡法を用いてチール・ニールセン (ZN) 染色により喀痰サンプルを分析した。アリコートを除染し、培養した (BACTEC (商標), Becton-Dickinson, USA)。陽性培養をキャピリア (Capilia) 迅速TB試験 (Taun Laboratories, Japan) により確認し、グリセロール中で -70 で貯蔵した。

【0093】

スポリゴタイピング (Spoligotyping)

貯蔵された単離物を、DNA抽出のためにOADC (オレイン酸、アルブミン、デキストロースおよびカタラーゼ) サプリメントを含有するミドルブルック (Middlebrook) 7H9プロス内で増殖させた。商業的に入手可能な膜 (Isogen Biosciences, The Netherlands) を使用するスポリゴタイプ (spo

10

20

30

40

50

l i g o t y p e ) 分析のために10ngのDNAを使用した。Matlab (Mathworks, USA)において設計されたソフトウェアを使用して、スポリゴタイプフィルムをスキャンし、分類し、ついで手動での編集および確認を行った。各スポリゴタイプパターンをバイナリーコードに分類し、結果をマイクロソフトアクセス (Microsoft Access) データベース (Redmond, USA) に入力した。スポリゴタイプ分析のみによりマイコバクテリウム・ツベルクローシス (M. tuberculosis) またはマイコバクテリウム・アフリカヌム (M. africanum) として信頼しうる状態で分類することができた単離物に関しては、大きな配列の多型RD702およびTbD1を定める系統の存在または非存在を、既に記載されているとおりに評価した。

#### 【0094】

##### 多重サイトカインアッセイ

##### サンプル調製物

血清および唾液をアリコート化し、必要となるまで-20で凍結した。喀痰を0.1% ジチオトレイトール (DTT) で室温で15分間消化した。当容量のリン酸緩衝食塩水 (PBS) を加え、サンプルを遠心分離し (600 g<sub>max</sub>, 5分間)、上清を集め、-20で貯蔵した。ヘパリン処理血液に関しては、24ウェルプレートのウェル当たり450μlの未希釈血液を使用した。血液を精製タンパク質誘導体 (PPD) (10μg/mL; Statens Serum Institute, Denmark)、ESAT-6/CFP-10 (EC; 10μg/mL) および2つの休眠抗原Rv0081およびRv2029 (共に10μg/mL) で刺激した。24時間のインキュベーション (37、5% CO<sub>2</sub>) の後、上清を集め、分析まで-20で貯蔵した。

#### 【0095】

##### サイトカイン産生に関する多重分析

カスタム13プレックス (13重) (刺激された血液) または27プレックス・バイオプレックス (Bio-Plex) (血清、唾液および喀痰) 予混サイトカイン/ケモカインキットのいずれかを製造業者の説明 (Bio-Rad, Belgium) に従い使用して、サンプルを分析した。フィルタープレートを予め湿らせた後、50μlのビーズ懸濁液を各ウェルに加え、2回洗浄した。ついで50μlのサンプルおよび標準物に加え、300rpmで1時間インキュベートした。該プレートを3回洗浄し、ついで50μlの検出抗体に加え、該プレートを300rpmで30分間インキュベートした。洗浄後、25μlのストレプトアビジン-PEを各ウェルに加え、10分間インキュベートした。該プレートを再び洗浄し、125μlのアッセイバッファー中に再懸濁させ、密封し、混合し、バイオプレックス (Bio-Plex) マネージャーソフトウェア (バージョン4.0) を使用して直ちにバイオプレックス (Bio-Plex) 分析装置上で読取った。アッセイ間変動を抑制するために、各プレートに対して品質管理を行った。

#### 【0096】

##### 統計分析

抗原特異的サンプル (全血アッセイのみ) から測定されたアナライトの値からバックグラウンドを除去した (未刺激結果)。唾液、血清および喀痰の値は全て未刺激サンプルから誘導され、したがって、バックグラウンド除去を要しなかった。結核および非結核被験者を、マン・ホイットニーU検定を用いて比較し、ロジスティック回帰および受診者動作特性曲線分析を行い、年齢および性別に関して補正した。マッチした喀痰および抗原刺激培養を、フリードマン検定およびそれに続くダンの多重比較検定を用いて分析した。Graphpad Prismバージョン6.0 (Software MacKiev, USA) およびSPSS v20 (IBM, USA) での統計分析を用いてグラフを作成した。偽発見率 (FDR) の原因となるためには0.035以下のP値を有意とみなした。

#### 【0097】

##### 結果

##### 被験者の人口統計

合計で52名の非結核被験者および27名の確認された結核被験者を分析した (図1)

10

20

30

40

50

。結核被験者および非結核被験者の間で年齢の中央値において差はなかったが、結核群は非結核群より有意に高い男性比率を有していた（81%対49%）。これはガンビアにおける結核の疫学に適合し、そのようなものとして全ての結果を性別および年齢に関して補正した。非結核群においては、最終診断は臨床評価および治療応答に基づくものであり、52名中13名の被験者が慢性閉塞性肺疾患（COPD； $n = 5$ ）、喘息（ $n = 2$ ）、肺炎（ $n = 6$ ）と診断され、残りは一般的な気道感染症（RTI；確認された診断は無し）に分類された。被験者の数は、サンプルの入手可能性ゆえに、各サンプル型ごとに様々であった（図1）。20名の結核被験者および26名の非結核被験者を全血抗原（WBA）刺激分析に用い、25名の結核被験者および52名の非結核被験者を血清分析に用い、20名の結核被験者および42名の非結核被験者を唾液分析に用い、23名の結核被験者および29名の非結核被験者を喀痰分析に用いた。

10

#### 【0098】

全血24時間抗原刺激培養上清を使用した結核の分類

Nil（抗原無し）、EC、PPD、Rv0081およびRv2029での一晚の刺激の後の結核被験者および非結核被験者のサイトカインプロファイル进行分析した。プロファイルを各サイトカインに関して抗原刺激（Ag）、Ag-NilおよびNilで比較した。IP10およびMCP-1レベルは全刺激後に両群において高かったが（それぞれ、平均値7522 pg/mLおよび6547 pg/mL）、TGF- $\beta$ 、EGFおよびVEGFは低かった（それぞれ、平均値9 pg/mL、26 pg/mLおよび23 pg/mL）。Nil培養において、非結核被験者と比較して、確認された結核を有する被験者において有意に高い幾つかの分析が認められ、それらにはIP10、CD40L、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ およびIFN- $\gamma$ が含まれた（それぞれ、 $p = 0.0005$ 、 $p = 0.0089$ 、 $p = 0.0020$ 、 $p = 0.0016$ および $p = 0.0313$ ；図2）。抗原刺激後、バックグラウンド除去前に相違の大部分が観察され、CD40LおよびTGF- $\beta$ のレベルは、使用抗原には無関係に、結核被験者においては非結核被験者と比較して有意に高かった。バックグラウンド除去後、PPD刺激培養において相違の大部分が観察され、結核被験者においては非結核被験者と比較して高レベルのCD40L、IL-10およびTGF- $\beta$ （それぞれ、 $p = 0.0089$ 、 $p = 0.0034$ および $p < 0.0001$ ）、ならびに低レベルのIFN- $\gamma$ 、IL-2およびMIP-1（それぞれ、 $p = 0.0313$ 、 $p = 0.0040$ および $p = 0.0351$ ；図3）が認められた。結核の診断のための最適な抗原-バイオマーカーの組合せを決定するために、ロジスティック回帰分析を行った。PPD刺激後には、最良の分類子は、0.86 [95%CI 0.73~1.0]のAUC、96.2% [95%CI 80.4~99.9]の感度、80.0% [95%CI 56.3~94.3]の特異性および4.8の尤度比を有するTGF- $\beta$ であった。EC刺激後には、TGF- $\beta$ のレベルは84.6%の感度 [95%CI 65.1~95.6]および80%の特異性 [95%CI 56.3~94.3]をもたらした。最良の分類はPPD刺激の後で達成され、CD40L、TGF- $\beta$ およびIL10の組合せが結核または非結核の89%の正確な分類を示した（データ非表示）。重要なことに、該抗原のいずれの刺激の後も、異なるMtb株（マイコバクテリウム・ツベルクローシス（*M. tuberculosis*）またはマイコバクテリウム・アフリカヌム（*M. africanum*））に感染した結核被験者の宿主免疫プロファイルにおける相違は認められなかった（データ非表示）。

20

30

40

#### 【0099】

エクスピボの唾液および血漿サイトカインレベルの分析

発展途上国における有効な診断試験の主要因は診断までの時間である。したがって、直接的にエクスピボでサイトカインレベルに関して体液を評価することを望んだ。唾液は血清より高いレベルのサイトカインを示したが、分析したいずれのサイトカインに関しても結核被験者と非結核被験者との間で相違は認められなかった（図4A）。結核被験者においては血清は比較的低いレベルの全サイトカインを有し、MIP-1が最高レベル（86 pg/mL）で検出された。しかし、結核被験者からの血清においては、非結核被験者

50

と比較して有意に高いレベルのIL-6、IL7およびG-CSFが存在した（それぞれ、 $p < 0.0001$ 、 $p = 0.0014$ および $p = 0.0003$ ；図4B）。

#### 【0100】

喀痰は直接的にエクスピボで高レベルのサイトカインを示す：

本発明者らは、エクスピボサイトカインレベルに関して、消化された喀痰の可溶性画分を分析したところ、抗原刺激を要することなく、唾液および血清の両方と比較して驚くべき高いレベルを見出した。結核を有することが確認された被験者からのエクスピボサイトカインレベルの横断研究を行った（図5A）。IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-7、IL-8、IL-12（ $p < 0.0001$ ）およびMIP-1のレベルは全て、唾液および血清の両方と比較して、喀痰においては有意に高かったが（図5AにIL-7およびIL-8により示されている）、IL-1、IL-17、G-CSF、GM-CSF、MCP-1およびTNF- $\alpha$ は、血清と比較して、唾液および喀痰の両方において有意に高かった（図5AにG-CSFおよびMCP-1により示されている）。IL-6は、血清（ $p < 0.01$ ）および喀痰（ $p < 0.0001$ ）と比較して血清において低い唯一のサイトカインであり、血清と喀痰との間の差は無く（データ非表示）、それらの3つのサンプル型の間でIFN- $\gamma$ レベルにおける差は認められなかった（図5A）。

#### 【0101】

次に、結核被験者および非結核被験者からの喀痰におけるサイトカインレベルを比較した（図6および図5B）。興味深いことに、炎症性サイトカインにおいては有意な相違は見出されなかったが（すなわち、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IP-10；データ非表示）、有意に低いレベルのIL-10（ $p = 0.004$ ）、IL-13（ $p = 0.003$ ）およびIL-15（ $p = 0.022$ ）が、非結核被験者の場合と比較して、結核被験者から喀痰において見出された（図6および図5B）。また、非結核被験者と比較して結核被験者においては、先天性（innate）サイトカインIL-1Ra、G-CSFおよびVEGFは全て有意に低かったが（それぞれ、 $p = 0.005$ 、 $p = 0.004$ 、 $p = 0.030$ ）、FGFは有意に高かった（結核被験者においては中央値287 pg/mLであるのに対し、非結核被験者においては2.2 pg/mL； $p = 0.007$ ；図6および図5B）。FGFのレベルのみは結核の74%の正確な分類をもたらした（感度78% [95% CI 56~93] および特異性67% [95% CI 47~83]）。ロジスティック回帰は、IL-13、FGFおよびIFN- $\gamma$ の組合せが結核の96%の正確な分類および非結核の85%の正確な分類（全体では90%）をもたらすことを示した。重要なことに、胸水の分析で既に認められていたとおり [5]、HIV同時感染を有する被験者において、相違は観察されなかった。

#### 【0102】

患者1名当たり2~3個のサンプルに関して結核の微生物学的確認を行い、サンプルの収集時期は様々であった（24時間以内の3個のサンプルがMRCにおける標準である）。塗抹試験の結果においてはサンプルによる変動が認められ、したがって、本発明者らは、同一被験者から得られた複数の喀痰サンプルにおいてサイトカインレベルを決定することを望んだ（ $n = 15$ ）。分析したいずれのサイトカインのレベルにおいも相違は見出されなかった（図5C）。

#### 【0103】

##### 考察

結核に関する側方流動に基づくポイントオブケア試験の開発のための重要な基準は、高い感度および特異性に加えて、結果を得るまでの時間である。資材に乏しい状況においては、経過観察の喪失またはケアの不履行が医療提供における主な課題である。したがって、結核試験を受けてから数時間以内に患者が診断され適当なケアを受けることが必要不可欠である [2]。血液由来宿主免疫因子に基づく現在の診断試験は少なくとも24時間のサンプル加工を要し、その場合にも、レベルは、しばしば、迅速な試験の更なる開発には低すぎる。本発明者らが知る限りにおいては、本発明者らは、結核診断の新規手段として喀痰におけるサイトカインのレベルを調べた最初の研究グループである。本発明者らは、

最小のサンプル調製を要するエクスピボの喀痰において極めて高いレベルのサイトカインを見出した。FGF、IL-13およびIFN- の組合せは、類似症状(すなわち、2週間を超える咳の持続)を示す被験者において、結核の96%の正確な分類をもたらした。これらの知見は結核に関する迅速なポイントオブケア試験の開発を可能にする。

#### 【0104】

本発明者らは、結核に関する感度および特異性が、血液と比較して感染部位からのサンプルを分析することにより有意に増加したことを既に示している[5]。これは、結核疾患中の血液から肺へのCD4+ T細胞の遊走により、血液中にはこれらの細胞は実質的に存在しないが、肺には優勢な高活性化集団が存在することによるものである[5]。これらの細胞は、該感染と闘うために要求されるIFN- および他のサイトカインの産生をもたらし、したがって、血液の場合と比較して増加したレベルの、肺由来サンプル中に存在する可溶性因子と直接的に相関する。喀痰はMtbの微生物学的検出のために通常使用される。それは容易に入手可能であり、サイトカインレベルはHIV同時感染によっては影響されないようであり、したがって、それは結核に関する側方流動試験の開発のための理想的なサンプル型となる。また、感染株の影響は認められず、同一被験者からの異なる喀痰サンプルで再現性は高かった。

#### 【0105】

IL-4、IL-5、IL-10、IL-13、IL-7、IL-8およびMIP-1Bのレベルは全て、唾液および血清の両方と比較して喀痰においては有意に高かったが、IL-1b、IL-17、G-CSF、GM-CSF、MCP-1およびTNF- は全て、唾液および喀痰と比較して血清においては有意に低く、唾液と喀痰との間で差は無かった。これらの知見は、末梢と比較して局所的に応答することになる免疫サブセットにおける相違を示している。例えば、血液と比較して唾液および喀痰においては先天性およびTh17サイトカインのレベルの増加が認められ、これはこれらの部位における粘膜関連免疫の増強を示している。興味深いことに、エクスピボサンプル型の間でTh1サイトカインレベルにおける差は観察されず、結核被験者からのエクスピボ喀痰においては、他の呼吸器障害を有する被験者の場合と比較して、IFN- 、IP-10およびTNF- レベルにおける有意差も認められなかった。逆に、Th2サイトカインであるIL-10およびIL-13は共に、非結核被験者と比較して結核被験者においては有意に低く、これは、免疫病理の増強をもたらす、結核を有する被験者におけるTh1応答に対する偏向を示している。G-CSFは好中球のリクルートメントに要求され、結核被験者からの喀痰においては非結核被験者からの場合と比較して有意に低いことが判明した。これは興味深いことである。なぜなら、好中球は結核に対する防御免疫応答における主要成分であり[8]、G-CSFの投与は結核治療に対する応答を増強することが示されているからである[9]。ほとんどの因子は、非結核被験者と比較して、結核被験者において低かったが、FGFは有意に高かった。線維芽細胞増殖因子(FGF)シグナリング経路は多数の気道疾患の発病ならびに正常な肺の成長および発生に不可欠である[10]。興味深いことに、Mtb感染線維芽細胞はその抗原提示能を喪失し、このことは、Mtbが、線維芽細胞に感染してTヘルパー免疫監視を逃れうることにより、細菌の存続をもたらすことを示唆している[11]。

#### 【0106】

FIND(Foundation for Innovative New Diagnostics)により示唆され決定された診断開発要件は少なくとも75%、そして理想的には>95%の感度(100%の培養陽性サンプルを含む)を含む。本発明者らは、培養により確認された結核を有する被験者を分析したに過ぎず、これらのうち3名のみが塗抹試験陰性であり(14%)、したがって、塗抹試験陰性被験者における感度を決定することはこの段階では困難である。しかし、喀痰からのFGF、IL-13およびIFN- の組合せを用いる、結核の96%の正確な分類は、血液、呼気または尿に基づく現在の試験から報告された結果より有意に高い。本発明者らは本発明者らの分析を27種のサイトカイン/ケモカインに限定したが、検出に利用可能なアナライトが増加すれば、>9

10

20

30

40

50

5%の特異性および感度を可能にするマーカーがおそらく決定されるであろう。結論として、本発明者らは、血液の代わりに喀痰を使用することが、免疫に基づく結核試験の診断精度を有意に増加させ、結果を得るまでの時間を短縮させることを示した。これらの知見は、資材が制限された状況における使用に適用可能である、側方流動に基づく迅速な結核診断試験の将来の開発に有望である。

#### 【0107】

##### 要約

結核(TB)は発展途上国における重大な公衆衛生上の問題であり、毎年900万の新たな症例および140万人の死亡が見られる。結核負荷を減少させることにおける大きな障害は、最低限度の基盤施設を有する診療所で使用される迅速かつ正確な診断試験が存在しないことである。本発明者らは、結核を示唆する症状を示しているが確認前の患者からのサンプルを分析した。臨床的および微生物学的評価の後、彼らは結核または他の呼吸器疾患(非結核)を有すると診断された。本発明者らは、結核の診断のための最適なサンプル型およびバイオマーカーの組合せを決定するために、喀痰、唾液、血清および全血抗原刺激培養における宿主バイオマーカーを評価した。ESAT-6/CFP-10(EC)またはPPDでの全血の一晩の刺激は高レベルのサイトカインを産生し、PPD刺激後、最良の分類子は、0.86[95%CI 0.73~1.0]のAUC、96.2%[95%CI 80.4~99.9]の感度、80.0%[95%CI 56.3~94.3]の特異性および4.8の尤度比を有するTGF- $\beta$ であった。EC刺激後には、TGF- $\beta$ のレベルは84.6%の感度[95%CI 65.1~95.6]および80%の特異性[95%CI 56.3~94.3]をもたらした。最良の分類はPPD刺激の後で達成され、CD40L、TGF- $\beta$ およびIL10の組合せが結核または非結核の89%の正確な分類を示した。しかし、24時間の刺激は「迅速」な診断試験に理想的ではない。エキスピボの唾液は、エキスピボの血清と比較して有意に高いレベルのサイトカインを有するが、患者群を区別することができなかった。IL-7、IL-8およびG-CSFの血清レベルは全て、結核被験者においては、非結核被験者と比較して有意に高かった(それぞれ、 $p < 0.0001$ 、 $p = 0.0014$ および $p = 0.0003$ )。本発明者らは喀痰の可溶性画分におけるサイトカインレベルも分析した。それは通常の微生物学的検査に使用され、成人肺結核患者の大多数から入手可能である。結核被験者からの喀痰においては、非結核被験者の場合と比較して、炎症性サイトカインレベル(IFN- $\gamma$ 、IP-10、TNF- $\alpha$ )における有意差は認められなかったが、有意に低いレベルのTh2サイトカイン(IL-10( $p = 0.0004$ )、IL-13( $p = 0.0003$ )およびIL-15( $p = 0.0221$ ))および先天性サイトカイン(IL-1ra( $p = 0.0005$ )、VEGF(0.0301)およびG-CSF( $p = 0.0041$ ))ならびにより高いFGF( $p = 0.007$ )が認められた。IL-13、FGFおよびIFN- $\gamma$ の組合せは、HIVの状態に無関係に、結核の96%の正確な分類および非結核の85%の正確な分類(全体で90%)をもたらした。したがって、本発明は結核に関する迅速なポイントオブケア試験を提供する。

#### 【0108】

##### 参考文献:

1. WHO Global Tuberculosis Report 2012. WHO fact sheet number 104. [http://www.who.int/tb/publications/factsheet\\_global.pdf](http://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf)において入手可能。

#### 【0109】

2. Bartz H-G, Cook GS, Reid SD. Towards lab-free TB diagnostics. WHO-TDR 2011. [http://www.stoptb.org/wg/tb\\_hiv/assets/documents/MSF\\_Stop%20TB\\_Imperial\\_TAG\\_TowardsLabFreeTBDX\\_July%2011\\_Web2.pdf](http://www.stoptb.org/wg/tb_hiv/assets/documents/MSF_Stop%20TB_Imperial_TAG_TowardsLabFreeTBDX_July%2011_Web2.pdf)においてアクセスされる。

## 【0110】

3. WHO tuberculosis fact sheet number 104. March, 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>においてアクセスされる。

## 【0111】

4. WHO diagnostics evaluation series. Laboratory-based evaluation of 19 commercially available rapid diagnostic tests for tuberculosis. 2008. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/diagnostic-evaluation-2.pdf>においてアクセスされる。

10

## 【0112】

5. Sutherland JS, Garba D, Fombah AE, Mendy-Gomez A, Mendy FS, Antonio M, Townend J, Id eh RC, Corrah T, Ota MO. Highly accurate diagnosis of pleural tuberculosis by immunological analysis of the pleural effusion. PLoS One 2012; 7: e30324.

## 【0113】

6. Dente FL, Carnevali S, Bartoli ML, Cianchetti S, Bacci E, Di Franco A, Vagaggini B, Paggiaro P. Profiles of proinflammatory cytokines in sputum from different groups of severe asthmatic patients. Ann Allergy Asthma Immunol 2006; 97: 312-320.

20

## 【0114】

7. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, Buhl R, Schmitt-Grohe S, Zielen S, Schubert R. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. Cytokine 2010; 50: 152-157.

30

## 【0115】

8. Yang CT, Cambier CJ, Davis JM, Hall CJ, Crosier PS, Ramakrishnan L. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. Cell Host Microbe 2012; 12: 301-312.

40

## 【0116】

9. Cormican LJ, Schey S, Milburn HJ. G-CSF enables completion of tuberculosis therapy associated with iatrogenic neutropenia. Eur Respir J 2004; 23: 649-650.

## 【0117】

10. Dosanjh A. The fibroblast growth factor pathway and its role in the pathogenesis of lung disease. J Interferon Cytokine Res 2012; 32: 111-114.

50

【0118】

11. Mariotti S, Sargentini V, Pardini M, Giannoni F, De Spirito M, Gagliardi MC, Greco E, Teloni R, Fraziano M, Nisini R. Mycobacterium tuberculosis may escape helper T cell recognition by infecting human fibroblasts. Hum Immunol 2013; 74: 722-729.

【0119】

本明細書に記載されている全ての参考文献を参照により本明細書に組み入れることとする。本発明は例示として記載されているが、特許請求の範囲に定められている本発明の範囲から逸脱することなく改変および修飾が施されうると理解されるべきである。更に、特定の特徴に対する公知均等物が存在する場合には、本明細書において特に言及されている場合と同様に、そのような均等物も包含される。本発明の更なる利点および特徴は図面および非限定的な実施例から明らかである。

10

【図1】

群	合計 n=	% 男性	年齢(中央値[IQR])
TB	27	81	28[23-36]
非TB	52	49	27[22-33]
アッセイで用いた被験者			
	TB	非TB	
血清	25	52	
唾液	20	42	
WBA	20	29	
喀痰	23	29	
非TB診断	n (%)		
COPD	5 (8)		
喘息	2 (3)		
肺炎	6 (10)		
RTI	39 (75)		

TB = 結核; 非TB = 他の呼吸器疾患; WBA = 全血アッセイ; COPD = 慢性閉塞性肺疾患; RTI = 気道感染症(未決定); IQR = 四分位範囲

患者の人口統計

FIG. 1

【図2】

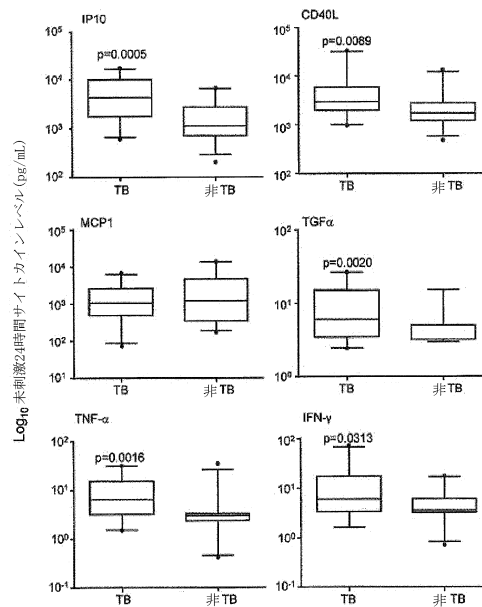


FIG. 2

【 図 3 】

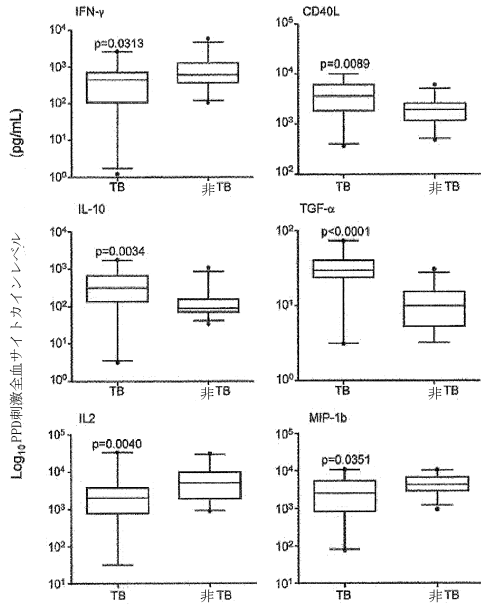


FIG. 3

【 図 4 】

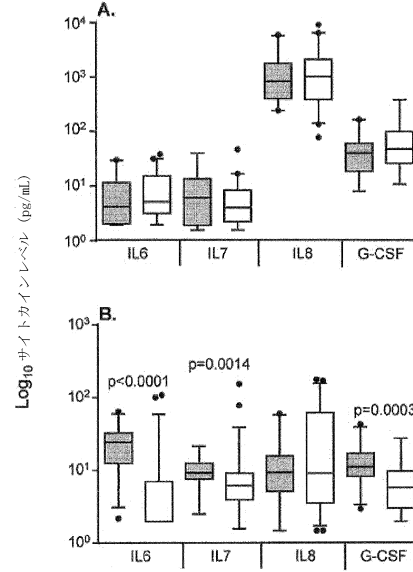


FIG. 4

【 図 5 】

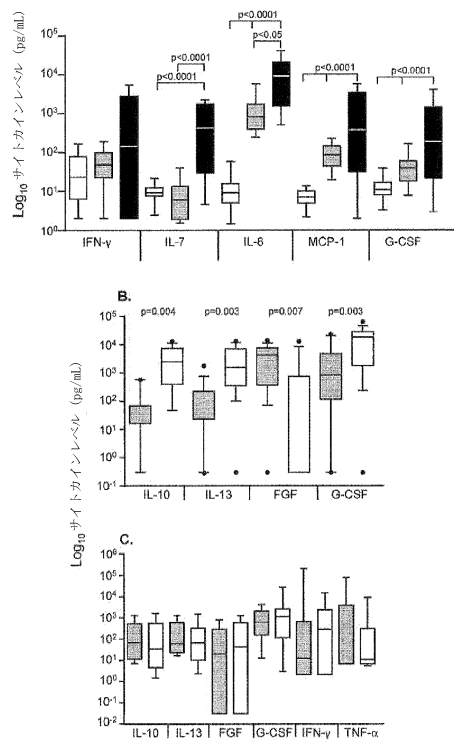


FIG. 5

【 図 6 】

	TB	非TB	p値
IL1β	2499	4577	ns
IL1ra	3458	11082	0.0005
IL2	0	0	ns
IL4	39	7	ns
IL6	41	98	ns
IL7	423	357	ns
IL8	2283	1422	ns
IL9	0	22	ns
IL10	7	210	0.0004
IL12	268	802	ns
IL13	25	155	0.0003
IL14	0	3	0.0221
IL17	0	0	ns
エオシニン	0	0	ns
FGF	287	7	0.0071
G-CSF	189	1905	0.0041
IFN-γ	144	659	ns
IP10	5064	9164	ns
MCP-1	373	1186	ns
MIP-1α	49	57	ns
MIP-1β	702	473	ns
PDGF	43	150	ns
RANTES	35	7	ns
TNF-α	11	64	ns
VEGF	2811	2564	0.0301

低 → 高  
アライメント # (pg/mL)

FIG. 6

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 31/06	(2006.01)	A 6 1 P 31/06
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 K 31/43	(2006.01)	A 6 1 K 31/43
A 6 1 K 31/65	(2006.01)	A 6 1 K 31/65
A 6 1 K 31/7048	(2006.01)	A 6 1 K 31/7048
A 6 1 K 31/7052	(2006.01)	A 6 1 K 31/7052
A 6 1 K 31/4409	(2006.01)	A 6 1 K 31/4409
A 6 1 K 31/496	(2006.01)	A 6 1 K 31/496
A 6 1 K 31/133	(2006.01)	A 6 1 K 31/133
A 6 1 K 31/4965	(2006.01)	A 6 1 K 31/4965

(74)代理人 100143823  
弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448  
弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519  
弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483  
弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100203035  
弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100185959  
弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749  
弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255  
弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267  
弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100146318  
弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812  
弁理士 城山 康文

(72)発明者 サザーランド, ジェーン  
ガンビア国、バンジュール、ピーオー・ボックス・273、アトランティック・ブルバード、メ  
ディカル・リサーチ・カウンシル・ユニット気付

審査官 高田 亜希

(56)参考文献 特表2004-526154(JP, A)  
特開2010-112844(JP, A)  
特開2007-316078(JP, A)  
特開2007-284362(JP, A)  
国際公開第2012/112945(WO, A1)  
Rodrigo Ribeiro-Rodrigues et al., Sputum Cytokine Levels in Patients with Pulmonary Tu  
berculosis as Early Markers of Mycobacterial Clearance, Clinical And Diagnostic Labora  
tory Immunology, 2002年 7月, Vol.9, No.4, P818-823

YI Zheng-jun et al. , Level of let-7c and target gene cytokine in sputum of patients with pulmonary tuberculosis and analysis of its function , Chinese Journal of Zoonoses , 中国 , 2013年 4月 , 29(4) , P385-388

Roberta Cassano et al. , Respirable rifampicin-based microspheres containing isoniazid for tuberculosis treatment , Journal of Biomedical Materials Research , 2011年12月8日 , Vol 100A, Issue2 , P536-542

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	结核生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP6648023B2</a>	公开(公告)日	2020-02-14
申请号	JP2016542382	申请日	2014-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	医药研究委员会		
申请(专利权)人(译)	医学研究理事会		
[标]发明人	サザーランドジェーン		
发明人	サザーランド,ジェーン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N37/00 G01N33/53 G01N33/543 A61K45/00 A61P31/06 A61P11/00 A61K31/43 A61K31/65 A61K31/7048 A61K31/7052 A61K31/4409 A61K31/496 A61K31/133 A61K31/4965		
CPC分类号	A61P11/00 A61P31/06 C12Q1/6883 G01N33/5695 G01N33/6863 G01N33/50 A61K45/06 G01N33/6893 G01N2333/485 G01N2333/50 G01N2333/5428 G01N2333/5437 G01N2333/5443 G01N2333/545 G01N2333/57 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/68 G01N37/00.102 G01N33/53.P G01N33/543.521 A61K45/00 A61P31/06 A61P11/00 A61K31/43 A61K31/65 A61K31/7048 A61K31/7052 A61K31/4409 A61K31/496 A61K31/133 A61K31/4965		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 安藤健二 市川英彦 青木孝弘 五味渊拓哉 近藤俊 饭野洋一 市川雄介 森山正博		
优先权	2013016524 2013-09-17 GB		
其他公开文献	JP2016539345A5 JP2016539345A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

在一个方面，本文提供了一种用于在受试者中检测结核病的方法，该方法包括：(a) 确定从受试者获得的痰样品中一种或多种宿主免疫系统生物标志物的水平；(b) 将痰液样本中生物标志物的水平与一个或多个参考值进行比较；其中痰样品中生物标志物的水平与参考值相比，指示受试者中结核病的存在与否。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6648023号 (P6648023)
(45) 発行日 令和2年2月14日(2020.2.14)	(24) 登録日 令和2年1月17日(2020.1.17)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO I N 33/68 (2006.01)	GO I N 33/68	
GO I N 37/00 (2006.01)	GO I N 37/00	1 O 2
GO I N 33/53 (2006.01)	GO I N 33/53	P
GO I N 33/543 (2006.01)	GO I N 33/543	5 2 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
請求項の数 16 (全 27 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-542382(P2016-542382)	(73) 特許権者 518160355	
(86) (22) 出願日 平成26年9月17日(2014.9.17)	ユナイテッド キングダム リサーチ ア	
(65) 公表番号 特表2016-539345(P2016-539345A)	ンド イノベーション	
(43) 公表日 平成28年12月15日(2016.12.15)	英国 スウィンドン ノース スター ア	
(86) 国際出願番号 PCT/GB2014/052809	ベニュー ホラリス ハウス	
(87) 国際公開番号 W02015/040377	(74) 代理人 100114188	
(87) 国際公開日 平成27年3月26日(2015.3.26)	弁理士 小野 誠	
審査請求日 平成29年9月14日(2017.9.14)	(74) 代理人 100119253	
(31) 優先権主張番号 1316524.6	弁理士 金山 賢教	
(32) 優先日 平成25年9月17日(2013.9.17)	(74) 代理人 100124855	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 英国(GB)	弁理士 拜倉 道明	
前置審査	(74) 代理人 100129713	
	弁理士 直森 一輝	
	(74) 代理人 100137213	
	弁理士 安藤 健司	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 结核のバイオマーカー		