

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-519083

(P2013-519083A)

(43) 公表日 平成25年5月23日(2013.5.23)

(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	D 2 GO 4 5
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2012-551689 (P2012-551689)	(71) 出願人	510184449
(86) (22) 出願日	平成23年2月4日 (2011.2.4)		ザ バインディング サイト グループ
(85) 翻訳文提出日	平成24年10月5日 (2012.10.5)		リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2011/050197		イギリス ウェスト ミッドランズ B 1
(87) 国際公開番号	W02011/095820		5 1 Q T バーミンガム エッジバスト
(87) 国際公開日	平成23年8月11日 (2011.8.11)		ン キャルソープ ロード 8
(31) 優先権主張番号	1001950.3	(74) 代理人	100100549
(32) 優先日	平成22年2月5日 (2010.2.5)		弁理士 川口 嘉之
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100126505
			弁理士 佐貫 伸一
		(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染症予後診断アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、感染症による死亡のより大きなリスクがある対象を特定し、および/または感染症発症のより大きなリスクがある対象を特定する、感染症をもつ対象の予後診断の方法であって、その対象からの試料における遊離軽鎖 (F L C) の量を検出することを含む方法であって、より高い F L C の量が、感染症に起因する生存の減少、および/または感染症のリスクの増加、および/または感染症発症の増加したリスクを有することと関連する、方法を提供する。感染症を有する患者からの試料における遊離軽鎖 (F L C) の量を検出すること、およびその試料における F L C の量を、その患者から以前に得た試料において検出される F L C の量と比較することを含む、感染症を監視する方法であって、以前の試料と比べて、 F L C の検出量の増加が、患者における感染症の増加を示し、 F L C の量の減少が、患者における感染症の減少を示す、方法。また、該方法に使用するためのアッセイキットも提供される。1つ以上の抗 F L C 抗体および1つ以上の抗細菌性抗原抗体を含むアッセイキットもまた提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

感染症による死亡のより大きなリスクがある対象を特定し、および/または感染症発症のより大きなリスクがある対象を特定する、感染症をもつ対象の予後診断の方法であって、前記対象からの試料における遊離軽鎖（FLC）の量を検出することを含む方法であって、より高いFLCの量が、前記感染症に起因する生存の減少、および/または感染症のリスクの増加、および/または感染症発症の増加したリスクを有することと関連する、方法。

【請求項 2】

感染症を有する患者からの試料における遊離軽鎖（FLC）の量を検出すること、および前記試料における前記FLCの量を、前記患者から以前に得た試料において検出されるFLCの量と比較することを含む、感染症を監視する方法であって、前記以前の試料と比べて、前記FLCの検出量の増加が、前記患者における前記感染症の増加を示し、前記FLCの量の減少が、前記患者における前記感染症の減少を示す、方法。

10

【請求項 3】

前記感染症が、細菌感染症である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記感染症が、下部呼吸器感染症（例えば肺炎など）、尿路感染症、クロストリジウム・ディフィシル感染症、敗血症または腹膜炎である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 5】

前記遊離軽鎖の量が、前記試料における総遊離軽鎖の量である、請求項 1 ~ 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記FLCが、前記対象の血清の試料において測定される、請求項 1 ~ 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記総FLCが、抗遊離軽鎖抗体を使用する免疫アッセイにより測定される、請求項 1 ~ 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体が、抗遊離軽鎖および抗遊離軽鎖抗体の混合物である、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記FLCの量を、比ろう法または比濁法によって検出することを含む、請求項 1 ~ 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記対象が、B細胞関連疾患症状を有さない、請求項 1 および 3 ~ 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法において使用される取扱説明書を追加として含む、請求項 1 ~ 9 に記載の前記方法に使用するためのアッセイキット。

40

【請求項 12】

前記アッセイキットを使用して得たFLCの濃度が、対象の生存の増加を示す正常値を追加として含む、請求項 11 に記載のアッセイキット。

【請求項 13】

1つ以上の抗FLC抗体および1つ以上の抗細菌性抗原抗体を含む、請求項 1 ~ 10 に記載の方法に使用するためのアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、感染症のより大きなリスクを有する対象を特定し、および/または感染症発

50

症のリスクがある対象を特定する、感染症をもつ対象の予後診断の方法に関する。典型的に、感染症は細菌感染症である。例えば、それは下部呼吸器感染症（例えば肺炎など）、尿路感染症、クロストリジウム・ディフィシル感染症、敗血症または腹膜炎でありうる。

【背景技術】

【0002】

出願人らは、患者の広範なモノクローナルガンマグロブリン血症についてアッセイをする方法として、遊離軽鎖を長年にわたって研究してきた。そのような遊離軽鎖を診断に使用することについては、書籍「血清遊離軽鎖分析 (Serum Free Light Chain Analysis) 第5版 (2008年) A. R. Bradwellら、ISBN 0704427028」に詳しく説明されている。

10

【0003】

抗体は、重鎖および軽鎖からなる。それらは通常、二重対称 (two fold symmetry) で、2つの同一の重鎖および2つの同一の軽鎖で構成され、各々、可変および定常領域を含有する。各々の軽鎖/重鎖対の可変領域は、組み合わせさせて抗原結合部位を形成し、両鎖が抗体分子の抗原結合特異性に寄与する。軽鎖には、およびの2つのタイプがあり、どの抗体分子も、いずれか一方の軽鎖を用いて作られ、両方が用いられることはない。ヒトでは、分子より約2倍多くの分子が作られるが、これが異なる哺乳類もいる。通常は、軽鎖は重鎖に結合している。しかしながら、幾つかの結合していない「遊離軽鎖」が人々の血清または尿中で検出できる。遊離軽鎖は、通常、軽鎖が重鎖に結合することによって隠れている遊離軽鎖の表面に対する抗体を作ることによって特異的に識別しうる。遊離軽鎖 (FLC) では、この表面が露出され、それを免疫的に検出できる。または遊離軽鎖検出用の市販のキットとしては、例えば、英国バーミンガム、バインディングサイトリミテッド (Binding Site Limited) 社製の「フリーライト (Freelite) (商標)」が挙げられる。出願人らは、遊離 / 遊離

20

比率の量を測定することが患者におけるモノクローナルガンマグロブリン血症の診断の一助となることを以前に見いだしている。それは、例えば、完全型免疫グロブリン多発性骨髄腫 (MM)、軽鎖MM、非分泌MM、ALアミロイドーシス、軽鎖沈着症、くすぶり型MM、形質細胞腫およびMGUS (意義不明のモノクローナル免疫グロブリン血症) の診断における一助として使用されてきた。また、FLCの検出は、例えば他のB細胞疾患の診断の補助として、実際にモノクローナルガンマグロブリン血症一般の診断のために、尿ベンスジョンズタンパク質分析の代替物として使用されてきた。

30

【0004】

従来は、または軽鎖の1つの増加およびその結果としての異常な比率を求めた。例えば、多発性骨髄腫は悪性形質細胞のモノクローナル増殖に起因し、単一のタイプの免疫グロブリンを産生する単一のタイプの細胞の増加をもたらす。これは、個体内で観察される、またはいずれか遊離軽鎖の量の増加となる。この濃度の増加を測定し、通常は遊離の遊離に対する比率を求め、正常範囲と比較する。これはモノクローナル疾患の診断の一助となる。さらに、遊離軽鎖アッセイはまた患者の疾患の治療後にも使用しうる。例えば、ALアミロイドーシスに対する治療後の患者の予後診断を実施しうる。

40

【0005】

Katzmanら (Clin. Chem. (2002); 48(9):1437-1444) は、モノクローナルガンマグロブリン血症の診断における遊離および遊離免疫グロブリンに関する血清基準範囲および診断範囲について考察している。21~90才の人々を免疫アッセイによって調査し、免疫固定によって得た結果と比較し、B細胞疾患をもつ人々におけるモノクローナル遊離軽鎖 (FLC) を検出するための免疫アッセイを最適化した。

【0006】

およびFLCの量および / 比率を記録し、B細胞疾患の検出を目的として基準範囲を確定することができた。

【0007】

細菌感染症は、一般の集団および腎疾患をもつ人々の両方における主な死因である。腎

50

疾患をもつ人々で感染症のリスクが増加するのには多くの理由があり、そのうちの1つは尿毒症毒素の滞留である。尿毒症毒素は、健康な状態では腎臓から除去される分子であり、腎機能障害ではその血清濃度が増加する。オーストリアの研究チームが、FLCが好中球の機能に悪影響を及ぼすことを報告する研究論文を発表している（概説については、Cohen & Horl "Free immunoglobulin light chains as a risk factor in renal and extra renal complications" (2009) Seminars in Dialysis; 22: 369-372を参照されたい）。好中球は、免疫防御軽に一部を形成するにすぎず、発表されている研究はすべてインビトロであり、原因となる影響は生体内で示されていない。しかしながら、出願人は、FLCが好中球の機能に影響する可能性、およびFLCの上昇と炎症プロセスとの公知の関連性に気付き、血清FLCを測定することによって感染に関連して死亡するリスクがある患者を特定できるかもしれないと仮定した。

10

【発明の概要】**【0008】**

今回、出願人らは、FLC、特に総FLCについてアッセイすることを、感染症のより大きなリスクがある対象を特定し、および/または感染症発症のリスクがある対象を特定する、感染症をもつ対象の予後診断の方法に使用できることを見いだした。彼らは、FLC濃度が、対象におけるそのような感染症による死亡のリスクと統計的に有意に関連し、そのような感染症の有無の指標であることを見いだした。

【0009】

明らかに健康な人からの血清中のFLCの濃度は、ある程度、個人の腎臓のFLCを濾過および排出する能力に影響される。FLCクリアランスに限られる人では、血清に見られるFLCレベルに増加がある。結果として、今日、FLCは腎機能の良いマーカーと考えられている。単量体FLCカップ分子(25 kDa)は、二量体のラムダ分子(50 kDa)と異なるサイズであるので、それらは共に、例えばクレアチニン113 kDaと比べて、糸球体濾過のより良いマーカーである。しかしながら、クレアチニンと対照的に、FLCの産生は多くの疾患の結果として起こりうるため、血清FLCは典型的には単独で腎機能マーカーとして使用されないことになる。

20

【0010】

しかしながら、B細胞増殖/活性のマーカーは重要であり、B細胞はFLCの生成に関与するので、これは臨床的に有用である。FLC産生は、B細胞アップレギュレーションの初期指標である。この点において、それはT細胞によって媒介される炎症反応のマーカーであるCRPの使用を補完することができる。

30

【0011】

高いFLC濃度は、おそらく、慢性の腎臓もしくは炎症性の障害またはB細胞疾患の指標でありうる。つまり、異常なFLCアッセイ結果は、現在のところ幾つかのテストを組み合わせることを必要とする、さまざまな障害のマーカーでありうる。これとは逆に、FLCアッセイ結果が正常な場合、良好な腎機能、炎症性の状態が無い状態およびB細胞疾患の証拠がないことを示す。

【0012】

出願人は、さまざまな程度の腎機能障害を有する患者からの血清試料を詳しく調べた。患者の死因をFLC濃度と比較して調査した。FLCレベル、特に総FLCレベルが、感染症による死亡するリスクと明らかに関連することが観察された。

40

【0013】

本発明は、感染症による死亡のより大きなリスクがある対象を特定し、および/または感染症発症のより大きなリスクがある対象を特定する、感染症をもつ対象の予後診断の方法であって、その対象からの試料における遊離軽鎖(FLC)の量を検出することを含む方法であって、より高いFLCの量が、感染症に起因する生存の減少、および/または感染症のリスクの増加、および/または感染症発症の増加したリスクを有することと関連する方法を提供する。

【0014】

50

本発明のさらなる態様は、対象からの試料中のFLCの量を検出することを含む、感染症をもつ対象の予後診断の方法であって、FLCのより高い量が、感染症に起因する生存の減少と関連する方法を提供する。

【0015】

対象は、これまでに感染症と診断されたことがなくともよい。

【0016】

本発明のさらなる態様は、感染症を有する患者からの試料における遊離軽鎖（FLC）の量を検出すること、およびその試料におけるFLCの量を、その患者から以前に得た試料において検出されるFLCの量と比較することを含む、感染症を監視する方法であって、以前の試料と比べて、FLCの検出量の増加が、患者における感染症の増加を示し、FLCの量の減少が、患者における感染症の減少を示す方法を提供する。例えば、これを使用して、感染症における抗生物質などの治療の有効性を監視しうる。

10

【0017】

典型的に、感染症は細菌感染症であるが、ウイルス感染症でもありうる。例えば、それは下部呼吸器感染症（例えば肺炎など）、尿路感染症、クロストリジウム・ディフィシル感染症、敗血症または腹膜炎でありうる。

【0018】

FLCは、カッパまたはラムダFLCでありうる。しかしながら、カッパFLCまたはラムダFLCを単独で検出することは、患者における例えばモノクローナル産生されたどちらか一方のFLCの、例えば異常な高レベルを見逃しうるので、好ましくは総FLC濃度を測定する。

20

【0019】

総遊離軽鎖とは、試料中の遊離カッパ軽鎖と遊離ラムダ軽鎖の総量を意味する。

【0020】

好ましくは、対象は必ずしもB細胞関連疾患の症状を有することはない。症状としては、再発性感染、骨痛および疲労を挙げられうる。そのようなB細胞関連疾患は、好ましくは、骨髄腫（完全型免疫グロブリン骨髄腫、軽鎖骨髄腫、非分泌性骨髄腫など）、MGUS、ALアミロイドーシス、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ホジキンリンパ腫、濾胞中心細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、マントル細胞リンパ腫、プレB細胞白血病でも急性リンパ性白血病でもない。さらに、典型的に、個人は骨髄機能が低下していない。典型的に、個人は、多くのそのような疾患で典型的に見られる異常なFLC比率を有さない。

30

【0021】

「総遊離軽鎖」という用語は、対象からの試料中のおよび遊離軽鎖の量を意味する。

【0022】

試料は、典型的に、対象からの血清の試料である。しかしながら、全血、血漿、尿、または組織、または体液のその他試料もまた、場合により利用しうる。

【0023】

典型的に、総FLCなどのFLCは、ELISAアッセイなどの免疫アッセイ、血清タンパク質電気泳動またはルミネックス（Luminex）（商標）ビーズなどの蛍光標識されたビーズを利用することによって測定する。

40

【0024】

例えば、サンドイッチアッセイは、抗体を使用して特異的抗原を検出する。アッセイに使用する1つ以上の抗体を、検出可能な検体に基質を変換できる酵素を用いて標識しうる。そのような酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよび当該技術分野において公知の他の酵素が挙げられる。代替的に、他の検出可能なタグまたは標識を、酵素の代わりに、または酵素と一緒に使用しうる。これらとしては、放射性同位元素、当該技術分野において公知の、広範な着色および蛍光標識、例えばフルオレセイン、アレクサフルオル、オレゴングリーン、ボディビー、ローダミンレッド、カスケー

50

ドブルー、マリーナブルー、パシフィックブルー、カスケードイエロー、金；およびビオチンなどの複合体（例えば、英国インビトロジェン社から入手可能）が挙げられる。また、染料ゾル、化学発光ラベル、金属ゾルまたは着色ラテックスも使用しうる。1つ以上のこれら標識を、本明細書において記載されているさまざまな発明に従ってELISAアッセイに使用するか、または代替的に、本明細書において記載されている他のアッセイ、標識された抗体もしくはキットに使用しうる。

【0025】

サンドイッチ型アッセイの構造はそれ自体、当該技術分野において周知である。例えば、FLCに対して特異的な「捕捉抗体」を基質に固定する。「捕捉抗体」は、当該技術分野において周知である方法によって基質に固定しうる。試料中のFLCは、「捕捉抗体」を介してFLCを基質に結合する「捕捉抗体」によって結合される。

10

【0026】

結合していない免疫グロブリンは洗い流しうる。

【0027】

ELISAまたはサンドイッチアッセイでは、結合している免疫グロブリンの有無は、目的のFLCの結合抗体とは異なる部分に対して特異的な、標識された「検出抗体」を使用することによって測定しうる。

【0028】

フローサイトメトリーを使用して、目的のFLCの結合を検出しうる。本技法は、例えば細胞選別など当該技術分野において周知である。しかしながら、それを使用して、ビーズなどの標識された粒子を検出し、それらのサイズを測定することもできる。実用フローサイトメトリー（Practical Flow Cytometry）、第3版（1994年）、H. Shapiro、Alan R. Liss、ニューヨーク、およびフローサイトメトリー第一原則（Flow Cytometry, First Principles）（第2版）2001年、A. L. Given、Wiley Lissなどの多数のテキストブックが、フローサイトメトリーについて説明している。

20

【0029】

FLCに対して特異的な抗体などの結合抗体の1つを、ポリスチレンまたはラテックスビーズなどのビーズに結合させる。ビーズを、試料および第2の検出抗体と共に混合する。検出抗体は、好ましくは、検出可能な標識で標識し、試料中で検出されるFLCに結合させる。これにより、アッセイされるFLCが存在する場合、標識されたビーズがもたらされる。

30

【0030】

また、本明細書において記載されている他の検体に特異的な他の抗体を使用して、それら検体の検出を可能にしうる。

【0031】

次いで、標識されたビーズを、フローサイトメトリーを介して検出しうる。異なる蛍光標識などの異なる標識を、例えば抗遊離 および抗遊離 抗体に対して使用しうる。また、本明細書において記載されている細菌特異的な抗原などの他の検体に対して特異的な他の抗体を、このアッセイまたは本明細書において記載されている他のアッセイに使用して、それら検体の検出を可能にしうる。これにより、結合したFLC各種の量を同時に測定でき、その他の検体の有無を決定できる。

40

【0032】

代替的にまたは付加的に、異なる大きさのビーズを、異なる抗体、例えば異なるマーカーに特異的な抗体に対して使用しうる。フローサイトメトリーは異なる大きさのビーズを識別することができ、よって試料中の各FLCまたはその他の検体の量を迅速に測定することができる。

【0033】

代替的な方法は、例えば、市販のルミネックス（商標）ビーズなどの蛍光標識されたビーズに結合する抗体を使用する。異なるビーズを異なる抗体とともに使用する。異なるビ

50

ーズを、異なるフルオロフォア混合物で標識し、それ故に異なる検体を蛍光波長によって測定できる。ルミネックスビーズは、アメリカ合衆国、テキサス州オースチン、ルミネックスコーポレーション(Luminex Corporation)社より入手可能である。

【0034】

好ましくは、アッセイは、比ろう法または比濁法を使用する。または FLC の検出に関する比ろう法および比濁法のアッセイは、一般に当該技術分野において公知であるが、総 FLC アッセイに関してはそうではない。それらは、アッセイとして最も良い感度のレベルを有し、および FLC 濃度は別々に測定されうるか、総 FLC 用の単一のアッセイに到達する。そのようなアッセイでは、抗 および抗 FLC 抗体を典型的に 60 : 40 の比率で含有するが、50 : 50 などの他の比率も使用されうる。

10

【0035】

また、抗体は、遊離 および遊離 軽鎖の混合物に対して作られうる。

【0036】

総 FLC などの FLC の量は、標準の所定値と比較され、FLC の正常範囲より高いか低いかを決定されうる。

【0037】

以下で詳細に論じるように、出願人らは、血清 FLC のより高い濃度が、感染症をもつ患者における生存が減少する可能性の著しい増加に関連することを見いだしている。例えば、低い血清 FLC レベルをもつ人々よりもその関連性がある。

20

【0038】

単位 GFR 当たり 1.7 mg / L を超える FLC レベルは、感染症による死亡リスクの増加に関連した。第 90 パーセントイル(単位 GFR 当たり 6.12 mg / L の FLC) を超えるレベルを持つ患者は、非常に著しく増加したリスクを有した。

【0039】

ICD 10 レベルは、SPE によって測定した際、50 mg / mL および 60 mg / mL にて死亡率の増加を示している。

【0040】

歴史的に見て、アッセイキットは、カッパおよびラムダ FLC を別々に測定し、比率を計算できるように作製されてきた。それらは、従来、疾患症状をすでに呈する個人に使用されている。

30

【0041】

好ましくは、アッセイでは、例えば約 1 mg / L ~ 100 mg / L または 1 mg / L ~ 80 mg / L の試料中の FLC、例えば総 FLC を測定することができる。これは、圧倒的多数の人々において、異なる希釈にて試料を再アッセイすることを必要とせずに、血清 FLC 濃度を検出することが期待されている。

【0042】

好ましくは、その方法は、例えば抗遊離 軽鎖および抗遊離 軽鎖抗体またはその断片の混合物を利用することによる、免疫アッセイを利用して試料中の総遊離軽鎖の量を検出することを含む。そのような抗体は、50 : 50 の抗 : 抗 抗体の比率でありうる。FLC に結合する抗体または断片は、標識された抗体または断片を使用することによって直接的に、または抗遊離 もしくは抗遊離 抗体に対する標識された抗体を使用して間接的に検出しうる。

40

【0043】

抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルでありうる。ポリクローナルは同一鎖の異なる部分に対して作られるので同一タイプの軽鎖間の若干の変動を許容するため使用されうる。ポリクローナル抗体の作製については、例えば国際公開第 97 / 17372 号に記載されている。

【0044】

好ましくは、全生存の可能性の増加を示すのに有意であることが特定および判明した総

50

F L Cなどの血清F L Cの量は、50 mg / L未満である。47.4 mg / L未満のレベルで、 $P < 0.001$ を示した。

【0045】

中央値(単位G F R - 糸球体濾過率当たり1.7 mg / LのF L C)を超える修正F L Cレベルをもつ個人は、顕著により短い生存を有した。第90パーセンタイル(単位G F R当たり6.12 mg / LのF L C)を超えるレベルを持つ患者は、非常に著しく増加したリスクを有した。

【0046】

また、F L C用の、例えば本発明の方法で使用するためのアッセイキットも提供される。該キットは、試料中の総F L C量を検出する。それらは、本発明の方法に使用するための取扱説明書と組み合わせて提供される。

10

【0047】

また、アッセイキットは、1つ以上の抗F L C抗体および1つ以上の抗細菌性抗原抗体を含む本発明の方法、または感染アッセイで使用される。一般に、マーカーである抗原は、多くの感染病原体について知られている。抗体は、そのようなマーカーに対して提供され、さらに感染症を特徴付ける。

【0048】

アッセイキットは、25 mg / L未満、最も好ましくは20 mg / L未満または約、10 mg / L、5 mg / Lもしくは4 mg / L未満の試料中の総遊離軽鎖(F L C)の量を検出するように構成される。検量用の材料は、典型的に、1 ~ 100 mg / Lの範囲を測定する。アッセイキットは、例えば比ろう法アッセイキットでありうる。好ましくは、キットは、F L Cに対する1つ以上の抗体含む免疫アッセイキットである。典型的に、キットは、抗 および抗 F L C抗体の混合物を含む。典型的に、抗遊離 と抗遊離 抗体が50 : 50の混合物が使用される。キットは、試料中の1 ~ 100 mg / Lまたは、好ましくは1 ~ 80 mg / Lの総遊離軽鎖の量を検出するように構成される。

20

【0049】

また、(F a b)₂ またはF a b抗体などのF L Cに結合することができる抗体断片も使用される。

【0050】

抗体または断片は、例えば前述のような標識を用いて標識される。標識された抗免疫グロブリン結合抗体またはその断片が提供され、F L Cに結合する抗遊離 または抗遊離 が検出される。

30

【0051】

キットは、示された範囲でアッセイを検量できるように検量用の液を含みうる。検量用の液は、好ましくは、例えば、100 mg / L ~ 1 mg / L、25 mg / L未満、20 mg / L未満、10 mg / L未満、5 mg / L未満または1 mg / Lまでの所定の濃度のF L Cを含有する。キットはまた、抗体の量、およびラテックス粒子上にコーティングした「ブロッキング」タンパク質の量を最適化することによって、ならびに、例えばポリエチレングリコール(P E G)濃度などの、補助試薬の濃度を最適化することによって構成される。

40

【0052】

キットは、例えばF L Cについて複数の標準対照を含みうる。標準対照を使用して、F L Cまたは生じる他の構成要素の濃度に関する標準曲線を有効にする。そのような標準対照は、先に検量された標準曲線が使用される試薬および状態に対して妥当であることを確認する。典型的に、それらは対象からの試料のアッセイと実質的に同時に使用される。標準は、アッセイがより低い濃度の遊離軽鎖を検量できるように、F L Cについて20 mg / L未満、より好ましくは15 mg / L未満、約10 mg / L未満、または5 mg / L未満の、1つ以上の標準を含みうる。

【0053】

アッセイキットは、比ろう法または比濁法キットでありうる。それは、E L I S A、フ

50

ローサイトメトリー、蛍光、化学発光もしくはビーズタイプアッセイまたはディップステイックでありうる。一般に、そのようなアッセイは当該技術分野において公知である。

【0054】

アッセイキットはまた、本発明の方法で使用される取扱説明書を含みうる。取扱説明書は、正常値であると考えられている総遊離軽鎖の濃度の指標を含み、例えば、それ未満または実際にそれを超えると、個人の生存の確率の増加または減少のどちらか、または感染症が存在する可能性の増加の指標を示しうる。そのような濃度は、上記で定義された通りでありうる。

【0055】

本発明を、実施例を単なる例示として、以下の図を参照して説明する。

10

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】図1は、その総FLC濃度を基にして五分位に分けられた試験集団についての生存の確率を示す。五分位レベルは、 < 33.3 、 $33.4 \sim 47.3$ 、 $47.4 \sim 76.8$ 、 $67.9 \sim 106.3$ および $> 106.5 \text{ mg/L}$ である。

【図2】図2は、総FLCをGFRに対して修正し、そのあと五分位に分けたことを示す。高い総修正FLC五分位（4および5 = 下の線）は、重篤な感染症による死亡を予測した（ $P < 0.001$ ）。

【図3】図3は、感染症による死亡に関するリスクマーカーとしての上位2つの五分位についてのROC曲線である（単位GFRあたり 1.7 mg/L を超える総FLC修正レベルを異常と見なした）。

20

【図4】図4は、混合した抗 および抗 遊離軽鎖抗体を使用する総FLCアッセキットと比較しての、市販の別々の抗遊離 および抗遊離 アッセイキットを使用して得られた総FLC濃度の比較である。

【図5】図5は、予後診断カットオフポイントとしての2つの異なるFLC濃度についての、4.5年の調査での患者の死亡の比較を示し、表は死因を示している。

【実施例】

【0057】

感染症予後診断

方法

30

さまざまな程度の腎機能障害をもつ1300人の患者から、血清試料を採集し（「基準」）、その後、最長63カ月の期間にわたって追跡調査した。

【0058】

より詳細には、患者は、パーミンガム大学病院の腎臓クリニックから募った。患者は、例えば蛋白尿、血尿、慢性腎臓疾患（すべての病期）、末期腎不全（血液透析および腹膜透析）および腎移植レシピエントを含む、腎臓にさまざまな問題を有する患者であった。

【0059】

行われたテストおよび評価は以下の通り：

血清クレアチニンおよび推定糸球体濾過率（eGFR）

単位GFRあたりFLCの修正レベルは次のように計算した：総血清FLC濃度（ mg/L ）を、コッククロフト・ゴルト式（REF）により mls/min/1.73m^2 で計算した推定糸球体濾過率で除した。このようにして、腎機能に依存しない単位GFRあたり mg/L での、患者の血清総FLCレベルを得た。

40

参考文献：Cockcroft DW, Gault MH：血清クレアチニンからのクレアチンクリアランスの予測（Prediction of creatinine clearance from serum creatinine）Nephron 16：31 41、1976

尿アルブミン/クレアチニン比率

カッパおよびラムダの両方の血清FLC濃度（フリーライト、バインディングサイトリミテッド社、英国パーミンガム）

50

総血清FLC濃度は、カッパFLCおよびラムダFLCの値を合計することによって計算した。

【0060】

追跡調査：

患者を、死亡するまでの期間および死因について追跡調査した。

【0061】

結果

患者生存のカプランマイヤー分析は、より高いFLCレベルをもつ患者は、減少した生存を有したことを示した ($P < 0.001$)。図1を参照されたい。

【0062】

死因を調査したとき、感染症に続いて死亡する可能性は、より高い総FLC濃度をもつ患者で著しくより高かった。

【0063】

【表1】

		総FLC 五分位 (n=各群での死亡数)					合計
		1	2	3	4	5	
死因	心血管	1	2	2	12	27	44
	感染症	3	1	7	8	19	38
	腎臓	0	0	1	4	12	17
	がん	2	2	2	3	7	16
	その他	2	0	0	3	1	6
	不明	0	0	0	0	1	1
	合計	8	5	12	30	67	122

10

20

30

【0064】

また、感染症による死亡のリスクは、腎機能（慢性腎臓病1～5病期）にも関連したが、これは、リスク群を明確に描出しなかった。

【0065】

【表2】

		慢性腎臓病の病期 (n=各群での死亡数)					合計
		1.00	2.00	3.00	4.00	5.00	
原因.Simp	心血管	1	0	15	18	10	44
	感染症	0	2	14	11	11	38
	腎臓	0	0	1	8	8	17
	がん	0	2	8	5	1	16
	その他	0	1	2	1	2	6
	不明	0	0	0	0	1	1
	合計	1	5	40	43	33	122

40

【0066】

50

総FLCと腎機能(eGFR)は密接に相関した($R = 0.645$ 、 $P < 0.001$)。従って、総FLCを感染症の予測に利用する上で腎機能の影響を除外するために、総FLCをGFRに対して修正し、そのあと五分位に分けた。高い総修正FLC五分位(4および5 = 下の線、図2)は、重篤な感染症による死亡を予測した($P < 0.001$)。

【0067】

感染症による死亡に関するリスクマーカーとしてこれらの上位2つの五分位を使用し(単位GFRあたり 1.7 mg/L を超える総FLC修正レベルを異常と見なした)、ROC曲線を使用して分析したとき、検査は有意に予測能があった($P < 0.0001$)。

【0068】

特定された主な感染症は、下部呼吸器感染症(肺炎)、尿路感染症、クロストリジウム・ディフィシル、敗血症または腹膜炎であった。

10

【0069】

考察

何らかの形の腎機能障害をもつ患者で結果を集めた。しかし、総FLCの上昇と感染症との間の関係が腎機能と独立であることを考えれば、一般に集団において、総FLCは感染症を同じように予測しうると思われる。検査(複数含む)は、低下した腎機能によるFLC濃度のバックグラウンドの上昇がない一般の集団ではより感度が良いであろうと推測されう。前述のように、FLCによって媒介される好中球の機能の抑制を報告する研究論文が、これまでに発表されている。好中球は、免疫防御系の一部を形成するにすぎず、我々の知る限りでは、血清FLC濃度を測定することが細菌感染症に起因する死亡のより大きなリスクがある患者を予測しうことは提案されていない。Cohenと同僚は、1995年に、インピトロにおけるFLCの白血球への影響について最初に報告したが、それ以降、生体内におけるFLC濃度を測定する研究を1報も発表していない。我々が観察した予測効果の程度は、特に血清FLC濃度を腎機能に対して修正した後、予想外であった。

20

【0070】

アッセイキット

本発明の方法は、以下のアッセイキットを利用しう。アッセイキットは、患者試料内の、例えば血清中に存在する総遊離と遊離軽鎖を定量する。これは、抗遊離および抗遊離軽鎖ヒツジ抗体の50:50混合物を用いて、100nmカルボキシル修飾ラテックス粒子をコーティングすることによって達成しう。以下に例示されたアッセイでは、総遊離軽鎖に関する測定範囲は、 $1 \sim 80 \text{ mg/L}$ である。しかしながら、他の測定範囲も同じように考慮されう。

30

【0071】

抗遊離および抗遊離抗血清は、一般に当該技術分野において公知の技術を使用して、この特定の場合ではヒツジで作製した。一般的な免疫化プロセスは、国際公開第97/17372号に記載されている。

【0072】

抗および抗抗血清を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を使用して等しい濃度まで希釈した。それら抗体を混ぜ合わせ、50%の抗抗体および50%の抗抗体を含む抗血清を作成した。

40

【0073】

抗体を、 10 mg/lot のコーティング量(coat load)でカルボキシル修飾ラテックスにコーティングした。これは、標準的な手順を使用して達成した。例えば、「微粒子試薬最適化: 微粒子の専門家からの実験室参照マニュアル(Microparticle Reagent Optimization: A laboratory reference manual from the authority on microparticles)」編者Caryl Griffin、Jim Sutor、Bruce Shull、著作権Seradyn Inc、1994年(P/N0347835(1294))を参照されたい。

50

【 0 0 7 4 】

この参照文献はまた、ポリエチレングリコール（PEG）を使用したアッセイキットの詳細も提供する。

【 0 0 7 5 】

混合した抗体を市販の および フリーライト（商標）キット（英国バーミンガム、バインディングサイトグループリミテッド（Binding Site Group Limited）社から入手）を使用して得られた結果と比較した。そのようなフリーライト（商標）キットは、遊離軽鎖の量および遊離軽鎖の量を、別々のアッセイにて特定する。総FLCキットを使用して曲線を作成し、対照濃度を使用して確認した。校正曲線は、1～80mg/Lの間の総遊離軽鎖について得ることができた。下記の結果の表において、フリーライト（商標）、フリーライト（商標）および総遊離軽鎖のアッセイを使用して、遊離軽鎖（FLC）、遊離軽鎖（FLC）および総FLCについて結果を得た。これらの結果を15の異なる正常血清試料について示す。比濁法により測定した結果を下表および図4に示す。

10

【 0 0 7 6 】

予備結果は、抗 および抗 遊離軽鎖抗体に基づく総遊離軽鎖アッセイを使用する原理は実行可能であることを示す。

【 0 0 7 7 】

結果

【 0 0 7 8 】

20

【表3】

USN	バッチ Id	結果 (mg/L)			KFLC + LFLC	%差異 総FLC 対 (KFLC + LFLC)
		KFLC	LFLC	総FLC		
1	104	3.37	3.51	6.31	6.88	-8.3%
2	151	3.42	5.39	8.99	8.81	2.0%
3	158	3.28	6.21	9.35	9.49	-1.5%
4	161	2.05	3.62	6.06	5.67	6.9%
5	179	6.83	5.84	13.71	12.67	8.2%
6	180	2.19	3.27	5.96	5.46	9.2%
7	181	2.98	5.27	10.64	8.25	29.0%
8	182	4.72	7.26	11.6	11.98	-3.2%
9	216	2.54	4.66	8.7	7.2	20.8%
10	217	3.01	3.24	6.88	6.25	10.1%
11	219	7.12	8.53	14.73	15.65	-5.9%
12	227	1.47	2.31	3.66	3.78	-3.2%
13	228	8.16	7.2	17.67	15.36	15.0%
14	229	4.51	6.61	13.1	11.12	17.8%
15	231	3.69	5.6	11.91	9.29	28.2%
					平均 差異	8.3%

30

40

【 0 0 7 9 】

50

追加補助データ 調査集団

2005年11月8日から2006年1月10日の間、病院研究室は、血清タンパク質電気泳動(SPE)を依頼された723の血清試料血清を受け取った。小児患者、免疫グロブリン補充を受けた患者からの試料、同一患者の2次およびそれに続く試料は、分析から除外した。また、異常な / 遊離軽鎖(FLC)比率(0.25未満もしくは1.65を超える; Katzmann)または異常なSPE結果(免疫固定によって確認した場合)によって示された、モノクローナルガンマグロブリン血症の証拠をもつ患者もすべて除外した。これにより、最終のデータ分析に528患者が残った。

【0080】

研究室分析

すべての血清について、血清タンパク質電気泳動(SPE; セビア(Sebia)社、英国)によって血清タンパク質異常について分析した。異常なSPEバンドが存在する、または疑いの高い指数をもつ人のすべての試料(原因不明の低ガンマグロブリン血症、幅広領域、または支持する臨床上の詳細を伴う低免疫グロブリン)に関して、血清免疫固定(IFE; セビア社)を行った。診断の設定における血清の遊離軽鎖(sFLC)分析の評価の一部として、シーメンス デイドベリング プロスペック(Prospect)濁度計を使用して製造業者の取扱説明書に従い、FLC測定(フリーライト、バインディングサイト社、英国パーミンガム)をすべての血清について行った。

【0081】

患者追跡調査

2010年7月、最初の研究の終わりから4年6カ月後、患者の記録を検討した。全患者について、最後の追跡調査の日付または死亡の日付を記録し、死亡診断書を入手した。死亡診断書に記載されている主要な死因を世界保健機関疾病および関連保健問題の国際統計分類第10改訂版(ICD 10)に従って分類した。

【0082】

データ分析

高い混合(+)FLC濃度と死亡の確率の増加との関連性を、カプランマイヤー生存分析、コックス回帰分析およびカイ二乗分析を使用して調査した。50mg/L未満またはこれを超える、および、65mg/L未満またはこれを超える、両方のカテゴリー別カットオフについて調査した。

【0083】

結果

4.5年の追跡調査で、死亡は99名であった(=18.8%死亡率)。ポリクローナル血清遊離軽鎖(カッパとラムダ)のより高い濃度は、死亡率の増加と関連することが判明した。これは、利用された予後診断のカットオフが50mg/Lまたは65mg/Lであった場合であり、すべての統計的分析で見られた。主な死因は「循環器系」(心血管疾患)および「感染症/呼吸器系」であった。

【0084】

図(図5)は、異なるカテゴリーにおける感染症/呼吸器系の原因による死亡の割合(%)を表わす。統計的有意性は、カイ二乗分析によって決定した。

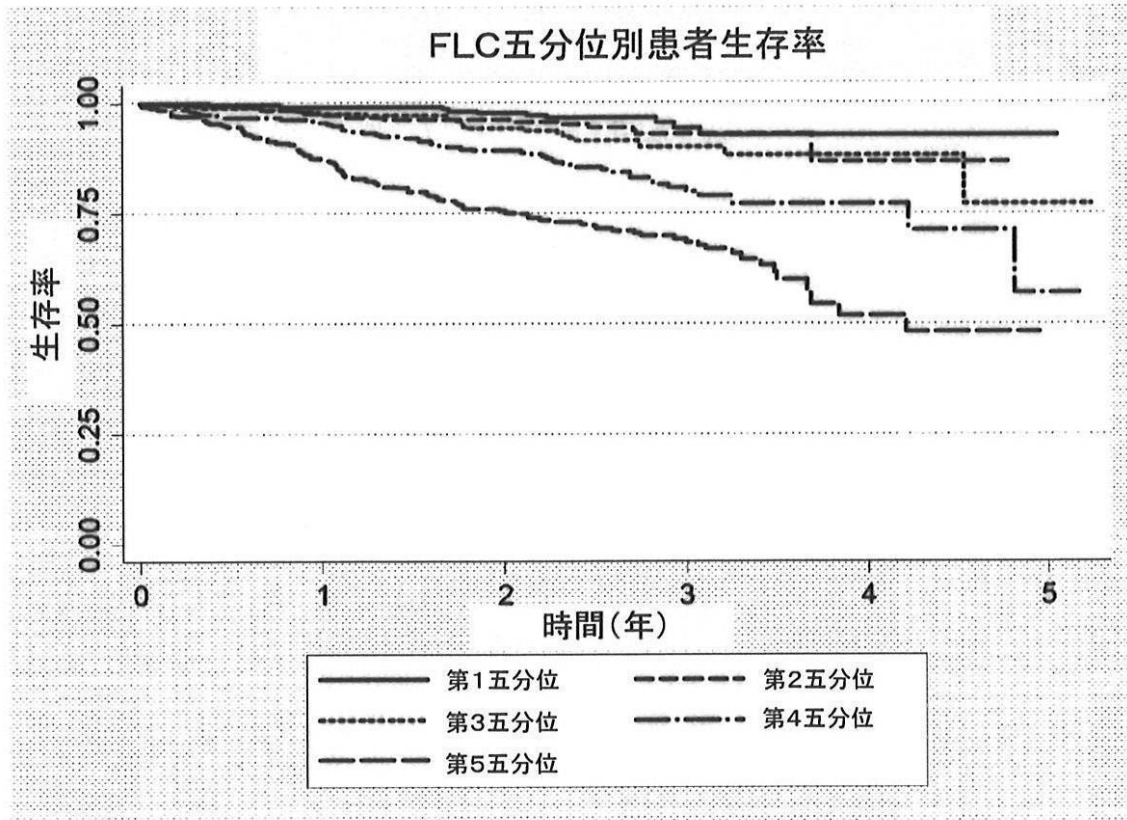
10

20

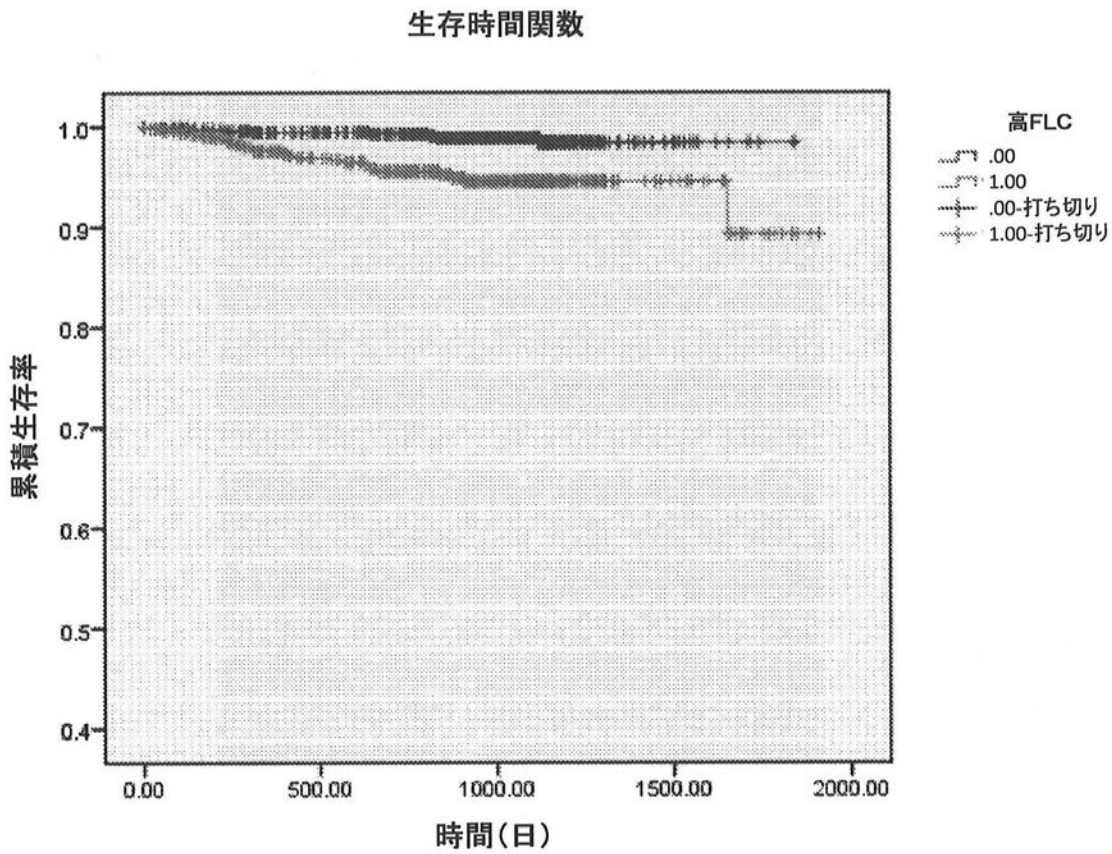
30

40

【図1】

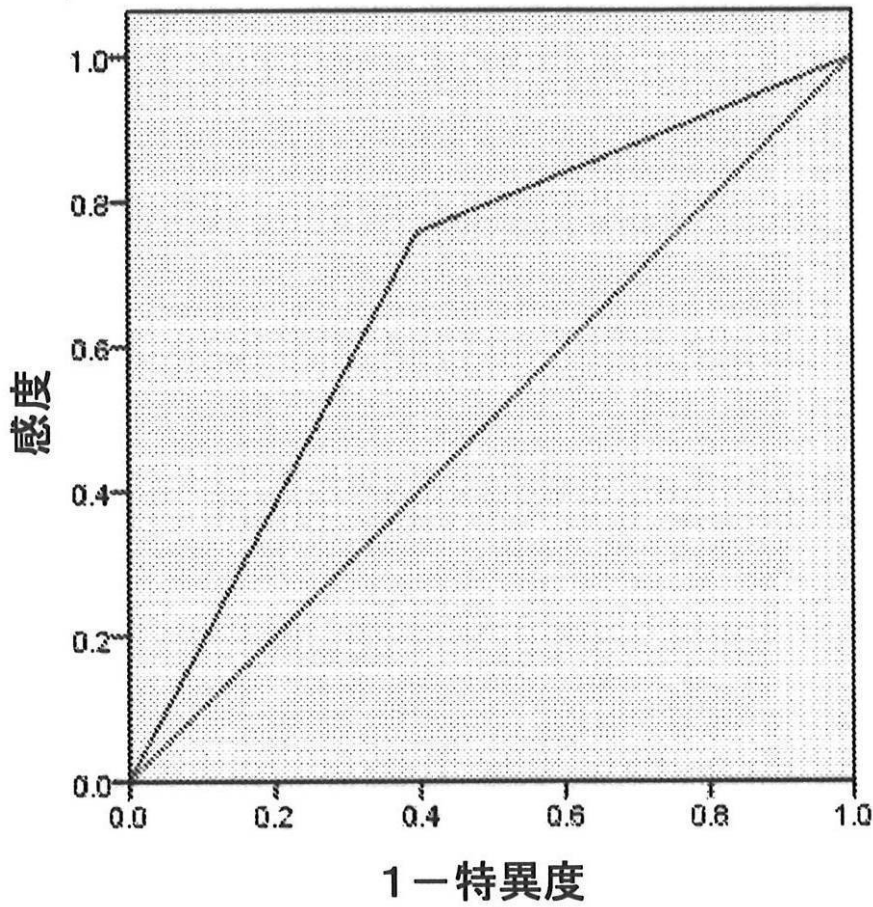


【図2】



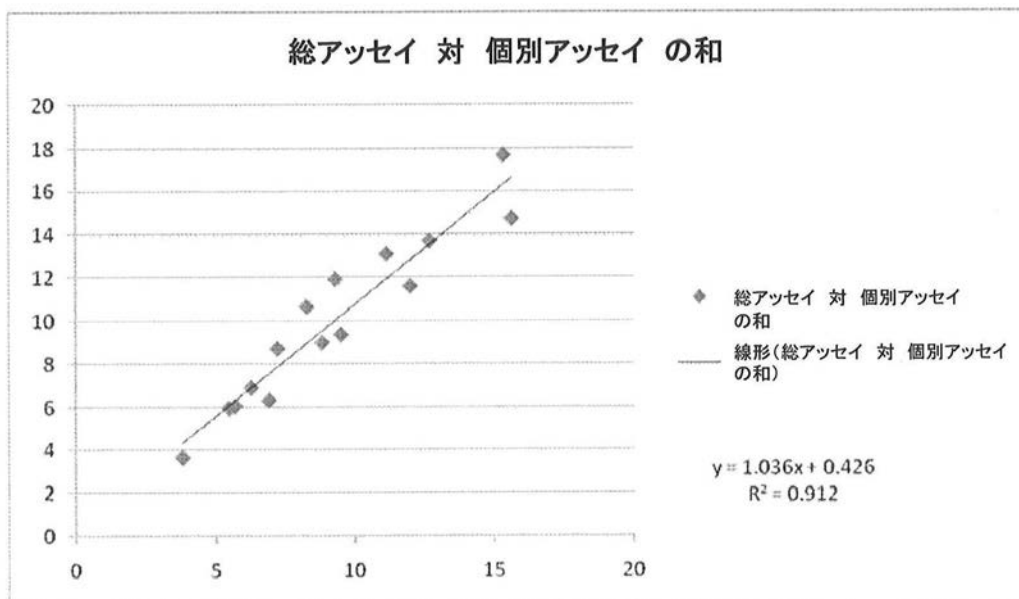
【 図 3 】

ROC曲線



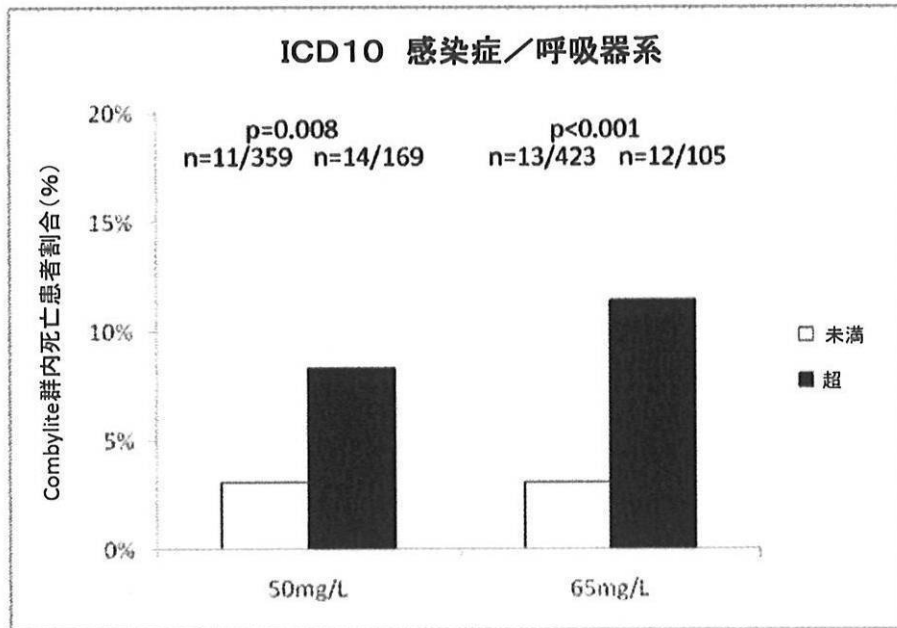
対角線は等値によって引かれる。

【 図 4 】



【 図 5 】

全患者集団の割合(%)としてのICD10



実際の死因			
<50mg/L	>50mg/L	<65mg/L	>65mg/L
肺炎 × 7	肺炎 × 10	肺炎 × 9	肺炎 × 8
敗血症	敗血症 × 2	敗血症	敗血症 × 2
慢性閉塞性肺疾患 × 2	呼吸器不全	慢性閉塞性肺疾患 × 2	呼吸器不全
アスペルギルス腫	肺水腫	アスペルギルス腫	肺水腫

【 国際調査報告 】

		PCT/GB2011/050197
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 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 practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARSHALL G ET AL: "Borderline high serum free light chain [kappa]/[lambda] ratios are seen not only in dialysis patients but also in non-dialysis-dependent renal impairment and inflammatory states", AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 2009 AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL PATHOLOGISTS USA LNKD-DOI:10.1309/AJCP8VOT5TVLAQBQ,, vol. 132, no. 2, 1 August 2009 (2009-08-01), page 309, XP002625348, the whole document ----- -/--	1-13
<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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
1 March 2011		16/03/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Bayer, Martin

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2011/050197

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 792 529 A (RUDICK RICHARD A [US] ET AL) 20 December 1988 (1988-12-20) figure 2 table 1 column 5 - column 6 claims 1-7	1-13
X	----- FAGNART O C ET AL: "FREE KAPPA AND LAMBDA LIGHT CHAIN LEVELS IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS AND OTHER NEUROLOGICAL DISEASES", JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, XX, vol. 19, no. 1-2, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 119-132, XP002266256, ISSN: 0165-5728, DOI: DOI:10.1016/0165-5728(88)90041-0 the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2011/050197

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4792529	A	NONE	20-12-1988

フロントページの続き

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

(72)発明者 ミード, グラハム

イギリス ウェスト ミッドランズ B15 1QT パーミンガム エッジバストーン キャルソ
ープ ロード 8 ザ バインディング サイト グループ リミテッド内

(72)発明者 ブラッドウェル, アーサー

イギリス ウェスト ミッドランズ B15 1QT パーミンガム エッジバストーン キャルソ
ープ ロード 8 ザ バインディング サイト グループ リミテッド内

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA36

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013519083A5	公开(公告)日	2014-04-10
申请号	JP2012551689	申请日	2011-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	结合点集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	结合部位集团有限公司		
[标]发明人	ミードグラハム ブラッドウェルアーサー		
发明人	ミード, グラハム ブラッドウェル, アーサー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6857 G01N33/574 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36		
代理人(译)	川口义行		
优先权	2010001950 2010-02-05 GB		
其他公开文献	JP5818818B2 JP2013519083A		

摘要(译)

本发明提供了预测患有癌症的受试者的方法，鉴定具有未诊断的癌症的更高风险的受试者和/或鉴定具有更大的发展癌症的风险的受试者的方法，所述方法包括检测游离轻链的量(FLC)，其中较高量的FLC与由于癌症导致的存活降低和/或患者具有未诊断的癌症和/或具有增加的发展癌症的风险的风险增加相关。