

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5818818号
(P5818818)

(45) 発行日 平成27年11月18日(2015.11.18)

(24) 登録日 平成27年10月9日(2015.10.9)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 N

請求項の数 13 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2012-551689 (P2012-551689)	(73) 特許権者	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
(65) 公表番号	特表2013-519083 (P2013-519083A)		リミテッド
(43) 公表日	平成25年5月23日(2013.5.23)		イギリス ウェスト ミッドランズ B 1
(86) 国際出願番号	PCT/GB2011/050197		5 1 Q T バーミンガム エッジバスト
(87) 国際公開番号	W02011/095820		ン キャルソープ ロード 8
(87) 国際公開日	平成23年8月11日(2011.8.11)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成26年2月4日(2014.2.4)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	1001950.3	(74) 代理人	100126505
(32) 優先日	平成22年2月5日(2010.2.5)		弁理士 佐貫 伸一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(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) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細菌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するため、及び/又は、細菌感染症発症のより大きなリスクがある対象を特定するために、前記対象からの試料における遊離軽鎖 (F L C) の量を検出する方法であって、

前記試料が血清、全血、血漿または尿であり、

前記 F L C の正常範囲より高い量が、

(i) 前記細菌感染症に起因する生存の減少、

ならびに/又は、

(i i) 細菌感染症のリスクの増加、

及び/もしくは、

(i i i) 細菌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】

細菌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、および前記試料における前記 F L C 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 F L C の量と比較することを含む、細菌感染症を監視する方法であって、

前記試料が血清、全血、血漿または尿であり、

前記以前の試料と比べて、前記 F L C の検出量の増加が、前記患者における前記細菌感染症が存在する可能性の増加を示し、前記 F L C の量の減少が、前記患者における前記細菌

菌感染症が存在する可能性の減少を示す、方法。

【請求項 3】

前記感染症が、下部呼吸器感染症、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 または 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記下部呼吸器感染症が肺炎である、請求項 3 に記載の方法。

【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 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 F L C 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 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

総 F L C 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 のいずれか 1 項に記載の方法。

【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。

【請求項 9】

前記 F L C の量を、比ろう法または比濁法によって検出する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【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、3 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

細菌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するため、及び/又は、細菌感染症発症のより大きなリスクがある対象を特定するために、前記対象からの試料における遊離軽鎖 (F L C) の量を検出する方法、または

細菌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、および前記試料における前記 F L C 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 F L C の量と比較することを含む、細菌感染症を監視する方法

に使用するためのアッセイキットであって、

抗遊離軽鎖抗体および前記方法において使用される取扱説明書を含む、アッセイキット

【請求項 12】

前記取扱説明書は、正常値であると考えられている総遊離軽鎖の濃度の記載を含む、請求項 1 に記載のアッセイキット。

【請求項 13】

1 種以上の抗 F L C 抗体および 1 種以上の抗細菌性抗原抗体を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項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

10

20

30

40

50

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。

【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、組み合わさっ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、英国パーミンガム、

10

バイ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、尿ベンスジョーンズタンパク質分析の代替物として使用されてきた。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、F L C が好中球の機能に影響する可能性、およびF L Cの上昇と炎症プロセスとの公知の関連性に気づき、血清F L C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。

【発明の概要】

【0008】

今回、出願人らは、F L C、特に総F L C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、F L C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。

10

【0009】

明らかに健康な人からの血清中のF L Cの濃度は、ある程度、個人の腎臓のF L Cを濾過および排出する能力に影響される。F L Cクリアランスに限られる人では、血清に見られるF L Cレベルに増加がある。結果として、今日、F L Cは腎機能の良いマーカーと考えられている。単量体F L C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、F L Cの産生は多くの疾患の結果として起こりうるため、血清F L C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F L Cの生成に関与するので、これは臨床的に有用である。F L C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C R Pの使用を補完することができる。

【0011】

高いF L C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F L C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、F L C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。

30

【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F L C濃度と比較して調査した。F L Cレベル、特に総F L C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。

【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(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。

40

【0014】

本発明のさらなる態様は、対象からの試料中のF L C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、F L C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】

50

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。

【0017】

典型的に、感染症は細菌感染症であるが、ウィ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。

10

【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。

【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。

20

【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。

30

【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（Luminesx）（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。

【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、ボディピー、ローダミンレッド、カスケードブルー、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。

40

50

【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。

【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。

10

【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。

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

【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。

10

【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。

【0038】

単位GFR当たり1.7mg/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パーセンタイル(単位GFR当たり6.12mg/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】

ICD10レベルは、SPEによって測定した際、50mg/mLおよび60mg/mLにて死亡率の増加を示している。

20

【0040】

歴史的に見て、アッセイキットは、カップおよびラムダ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。

【0041】

好ましくは、アッセイでは、例えば約1mg/L ~ 100mg/Lまたは1mg/L ~ 80mg/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。

30

【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。

【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。

40

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

【0045】

中央値(単位GFR - 糸球体濾過率当たり1.7mg/LのFLC)を超える修正FLC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GFR当たり6.12mg/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

50

たりリスクを有した。

【0046】

また、FLC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FLC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。

【0047】

また、アッセイキットは、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。

10

【0048】

アッセイキットは、25mg/L未満、最も好ましくは20mg/L未満または約、10mg/L、5mg/Lもしくは4mg/L未満の試料中の総遊離軽鎖（FLC）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、1~100mg/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、FLCに対する1つ以上の抗体を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 FLC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1~100mg/Lまたは、好ましくは1~80mg/Lの総遊離軽鎖の量を検出するように構成される。

【0049】

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

20

【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、FLCに結合する抗遊離 または抗遊離 が検出される。

【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、100mg/L~1mg/L、25mg/L未満、20mg/L未満、10mg/L未満、5mg/L未満または1mg/Lまでの所定の濃度のFLC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（PEG）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。

30

【0052】

キットは、例えばFLC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、FLC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しうる。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、FLCについて20mg/L未満、より好ましくは15mg/L未満、約10mg/L未満、または5mg/L未満の、1つ以上の標準を含みうる。

40

【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、ELISA、フ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ィックでありうる。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

50

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。

【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 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）。

【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アッセイ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

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当たり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 $\text{ml s / min / } 1.73 \text{ m}^2$ 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当たりmg/Lでの、患者の血清総FLCレベルを得た。

参照文献：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

カップ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）

総血清FLC濃度は、カップ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】

10

20

30

40

50

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

【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

30

40

【0066】

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)、RO

50

C 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。

【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る。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ることは提案されていない。Cohen と同僚は、1995 年に、インビトロにおける 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。

【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る。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、100 nm 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る。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 ~ 80 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る。

【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。

【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 / N 0347835 (1294)) を参照されたい。

【0074】

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。

【0075】

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

10

20

30

40

50

(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。

【0076】

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。

【0077】

結果

【0078】

【表3】

USN	バッチ Id	結果 (mg/L)			KFLC + LFLC	%差異 総FLC 対 (KFLC + LFC)
		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%

【0079】

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; K a t z m a n n)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、バイディングサイト社、英国バーミンガム）をすべての血清について行った。

10

【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、 Kaplan-Meier生存分析、Coxs回帰分析およびカイ二乗分析を使用して調査した。50 mg/L未満またはこれを超える、および、65 mg/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。

20

【0083】

結果

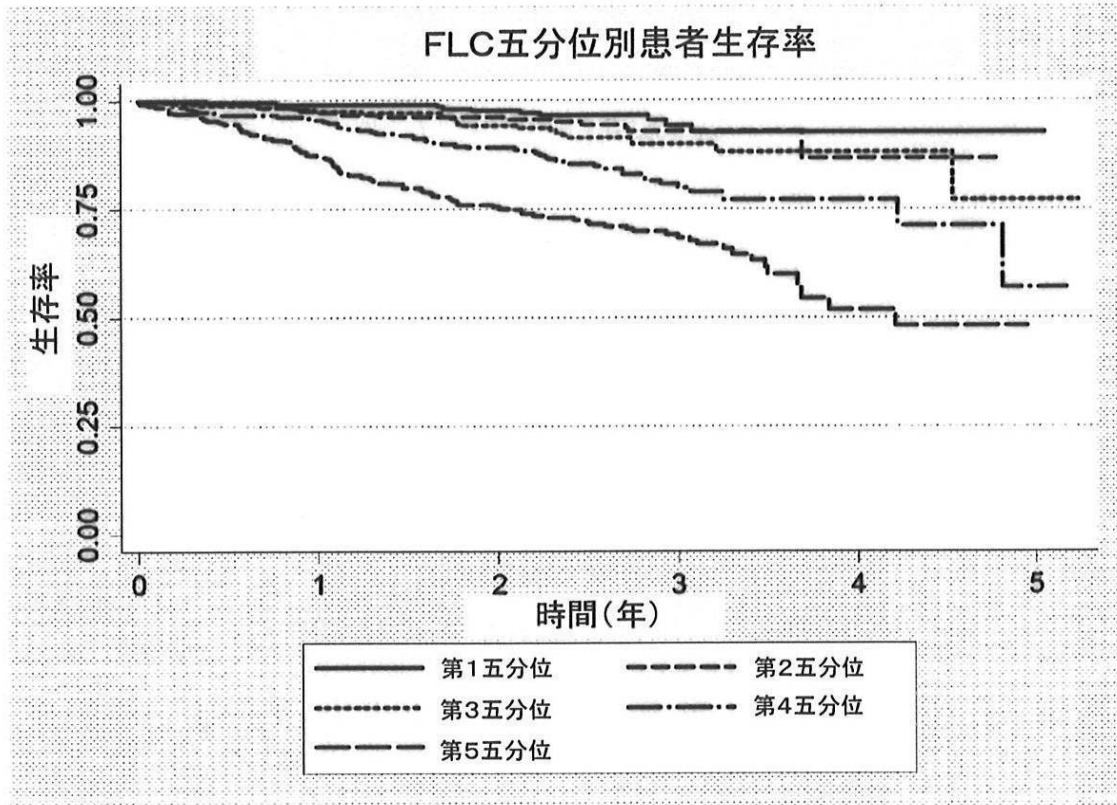
4.5年の追跡調査で、死亡は99名であった（=18.8%死亡率）。ポリクローナル血清遊離軽鎖（カッパとラムダ）のより高い濃度は、死亡率の増加と関連することが判明した。これは、利用された予後診断のカットオフが50 mg/Lまたは65 mg/Lであった場合であり、すべての統計の分析で見られた。主な死因は「循環器系」（心血管疾患）および「感染症/呼吸器系」であった。

30

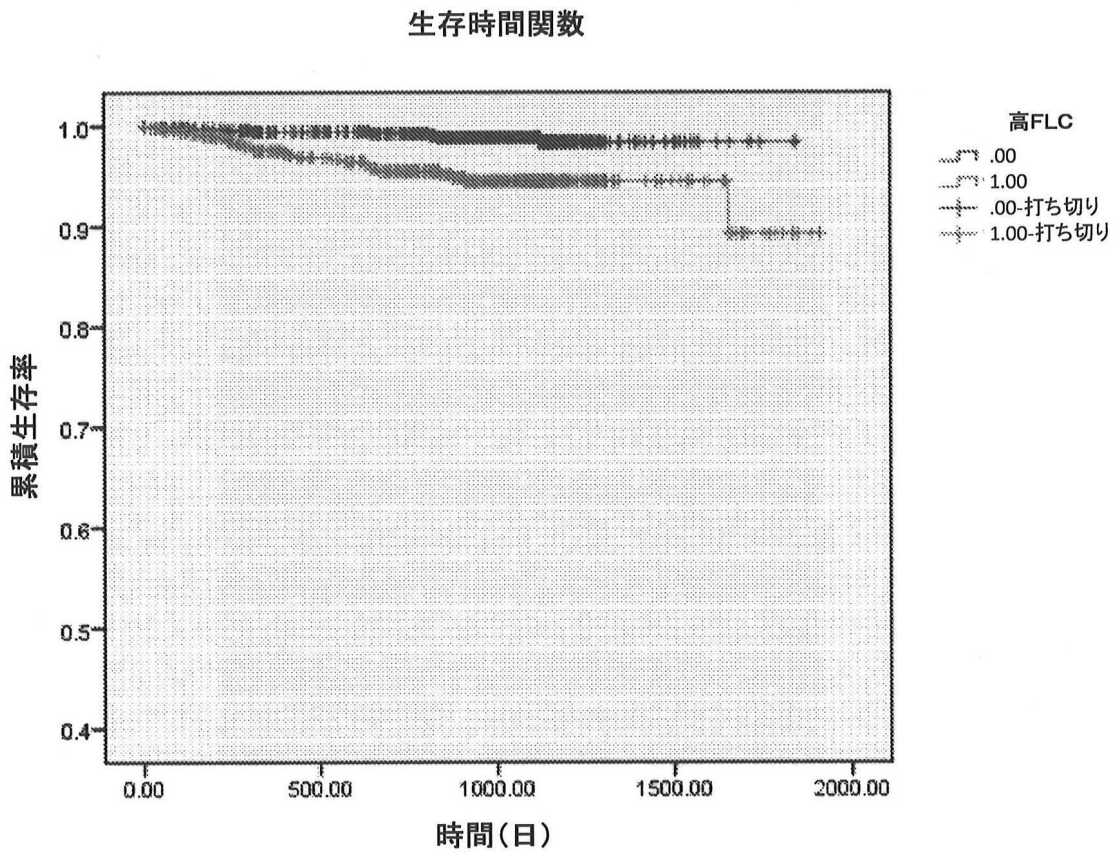
【0084】

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。

【図1】

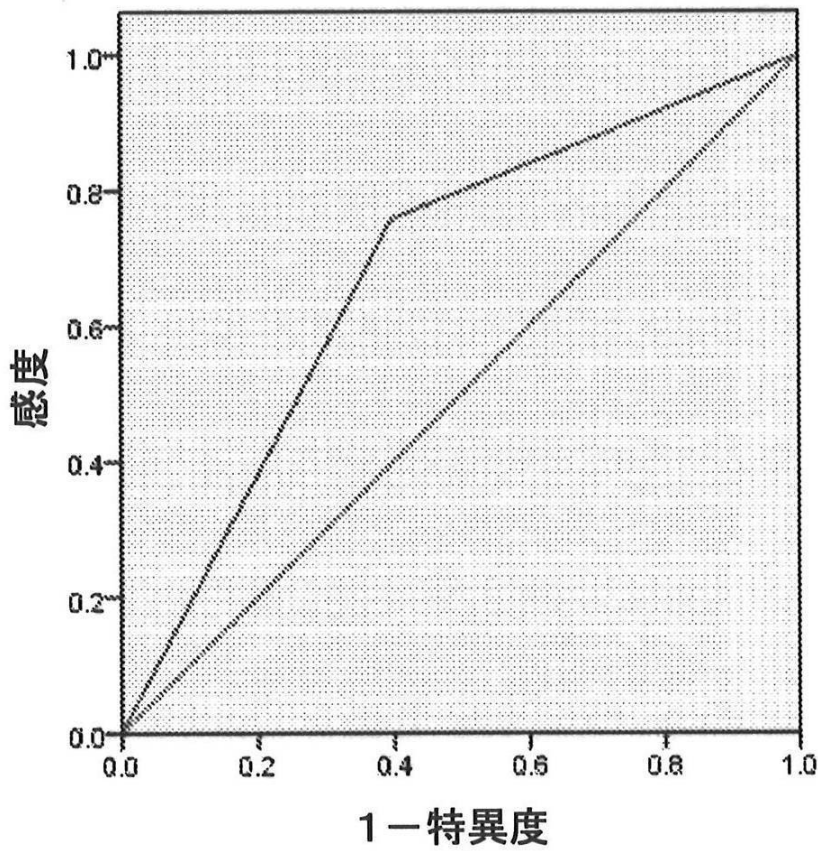


【図2】



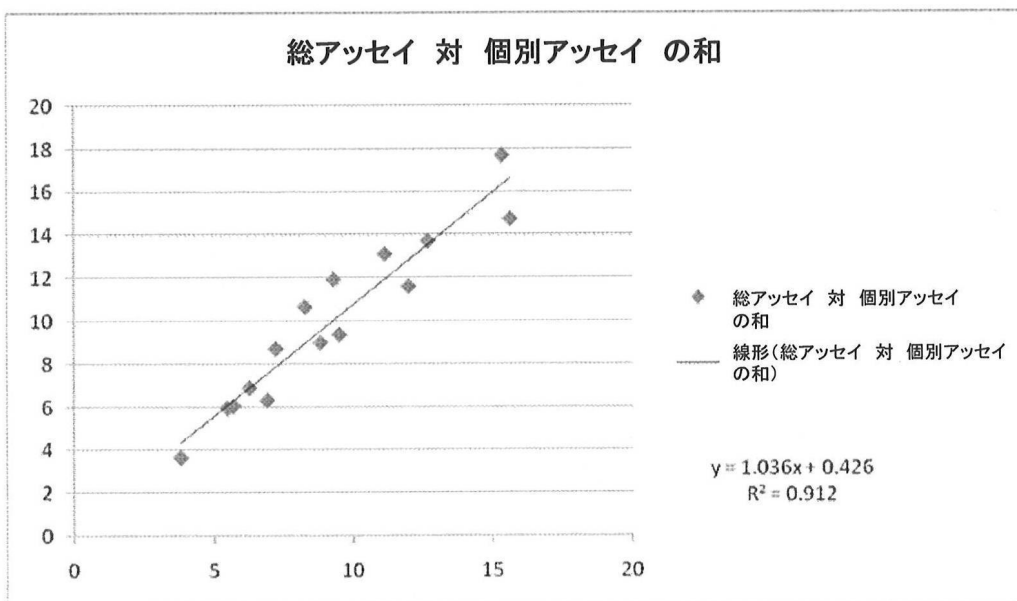
【 図 3 】

ROC曲線



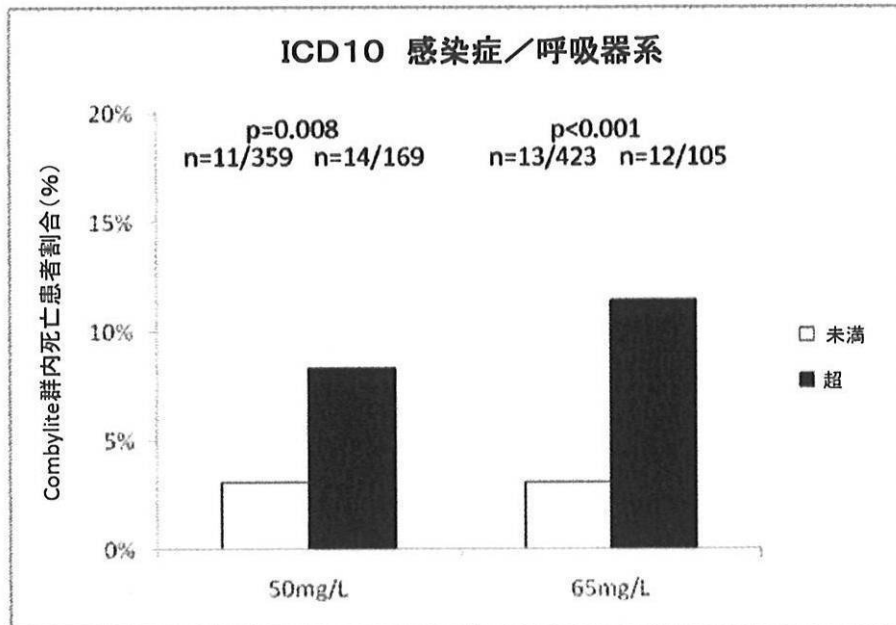
対角線は等値によって引かれる。

【 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

フロントページの続き

- (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

審査官 伊藤 裕美

- (56)参考文献 国際公開第2006/109793(WO, A1)
特開2007-292661(JP, A)
欧州特許出願公開第01870710(EP, A1)
米国特許第04792529(US, A)
MARSHALL G, BORDERLINE HIGH SERUM FREE LIGHT CHAIN [KAPPA]/[LAMBDA] RATIOS ARE SEEN NOT ONLY 以下備考, AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY IN DIALYSIS PATIENTS BUT ALSO IN NON-DIALYSIS DEPENDENT RENAL IMPAIRMENT AND INFLAMMATORY STATES, 米国, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL PATHOLOGY, 2009年 8月 1日, V132 N2, P309
FAGNART O C, 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, 1988年 1月 1日, V19 N1-2, P119-132

(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)	传染病预后分析		
公开(公告)号	JP5818818B2	公开(公告)日	2015-11-18
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		
当前申请(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		
CPC分类号	G01N33/6857 G01N33/574 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	川口义行		
审查员(译)	伊藤弘美		
优先权	2010001950 2010-02-05 GB		
其他公开文献	JP2013519083A JP2013519083A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种对感染的受试者进行预后的方法，所述受试者识别受感染引起的死亡风险较大的受试者和/或识别感染风险较高的受试者，包括从所述受试者的样品中检测游离轻链 (FLC) 的量的方法，更高 FLC 的量由于感染存活率降低，和/或增加的感染风险，和/或发展传染病的风险增加。检测游离轻链 (FLC) 的量来自患者的样品中具有感染，和 FLC 的样品中的量，比较 FLC 的量从患者先前获得的样品中检测到的其中检测到的 FLC 量增加表明患者感染增加， FLC 量减少表明患者感染减少展会上，方式。还提供了用于该方法的测定试剂盒。还提供了包含一种或多种抗 FLC 抗体和一种或多种抗细菌抗原抗体的测定试剂盒。

(21) 出願番号	特願2012-551689 (P2012-551689)	(73) 特許権者	510184449
(86) (22) 出願日	平成23年2月4日 (2011.2.4)		
(63) 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)		
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/050197		
(87) 国際公開番号	WO2011/095820		
(87) 国際公開日	平成23年8月11日 (2011.8.11)	(74) 代理人	100100549
審査請求日	平成26年2月4日 (2014.2.4)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	1001950.3	(74) 代理人	100126505
(32) 優先日	平成22年2月5日 (2010.2.5)		弁理士 佐貫 伸一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100131392
			弁理士 丹羽 武司