

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7699834号
(P7699834)

(45)発行日 令和7年6月30日(2025.6.30)

(24)登録日 令和7年6月20日(2025.6.20)

(51)国際特許分類		F I		
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
C 1 2 Q	1/48 (2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/6888(2018.01)	C 1 2 Q	1/6888	Z
請求項の数 9 (全38頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-533220(P2022-533220)	(73)特許権者	591135163	
(86)(22)出願日	令和2年12月1日(2020.12.1)		テンブル・ユニバーシティ・オブ・ザ・	
(65)公表番号	特表2023-504674(P2023-504674		コモンウェルス・システム・オブ・ハイ	
	A)		アー・エデュケーション	
(43)公表日	令和5年2月6日(2023.2.6)		TEMPLE UNIVERSITY -	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/062642		OF THE COMMONWEALTH	
(87)国際公開番号	WO2021/113199		SYSTEM OF HIGHER ED	
(87)国際公開日	令和3年6月10日(2021.6.10)		UCATION	
審査請求日	令和5年12月1日(2023.12.1)		アメリカ合衆国、19122 ペンシル	
(31)優先権主張番号	62/942,480		バニア州、フィラデルフィア、ブロード	
(32)優先日	令和1年12月2日(2019.12.2)		アンド モントゴメリー アベニュー	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100099759	
			弁理士 青木 篤	
		(74)代理人	100123582	
			弁理士 三橋 真二	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 検出と診断のためのコンビナトリアルMAP抗体検査

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

1 種以上の自己免疫疾患又は障害を診断するのに使用されるキットであって、前記キッ
トが、

a) 前記自己免疫疾患又は障害と正に相関するバイオマーカーを検出するための第1の
アッセイ、ここで、前記第1のアッセイのバイオマーカーが、熱ショックタンパク質65
(Hsp65)に特異的な抗体、Hsp65、及びHsp65をコードする核酸からなる
群から選択される1つ以上である、及び

b) 前記自己免疫疾患又は障害と負に相関するバイオマーカーを検出するための第2の
アッセイ、ここで、前記第2のアッセイのバイオマーカーが、プロテインキナーゼG(P
knG)に特異的な抗体、PknG、及びPknGをコードする核酸からなる群から選択
される1つ以上である、

c) MAP感染に関連するバイオマーカーを検出するための第3のアッセイ、ここで、
前記第3のアッセイのバイオマーカーが、マイコバクテリウム・アビウムパラ結核症亜種
(MAP)リポペンタペプチド(L5P)に特異的な抗体、L5P、及びL5Pをコード
する核酸からなる群から選択される1つ以上である、
を含み、

前記自己免疫疾患又は障害が、クローン病(CD)及び/又は潰瘍性大腸炎(UC)で
ある、キット。

【請求項2】

請求項 1 に記載のキットであって、前記第 1 のアッセイが、

- a) 第 1 の表面積；
- b) H s p 6 5 又はその抗原性断片が第 1 の表面積に結合している、前記 H s p 6 5 又はその抗原性断片；及び
- c) H s p 6 5 に特異的な前記抗体に対する標識抗体を含む溶液を含む診断装置を含む、キット。

【請求項 3】

前記第 2 のアッセイが、

- a) 第 1 の表面積；
- b) P k n G 又はその抗原性断片が第 1 の表面積に結合している、前記 P k n G 又はその抗原性断片；及び
- c) P k n G に特異的な前記抗体に対する標識抗体を含む溶液を含む診断装置を含む、請求項 1 に記載のキット。

10

【請求項 4】

前記第 3 のアッセイが、

- a) 第 1 の表面積；
- b) L 5 P 又はその抗原性断片が第 1 の表面積に結合している、前記 L 5 P 又はその抗原性断片；及び
- c) L 5 P に特異的な前記抗体に対する標識抗体を含む溶液を含む診断装置を含む、請求項 1 に記載のキット。

20

【請求項 5】

被験体における 1 種以上の自己免疫疾患又は障害を診断するための方法であって、前記方法が、以下の工程：

- a) 前記被験体における M A P 感染を検出する工程；
- b) 前記自己免疫疾患又は障害と正に相関する第 1 のバイオマーカーを検出する工程、ここで、前記第 1 のバイオマーカーが、H s p 6 5 に特異的な抗体、H s p 6 5、及び H s p 6 5 をコードする核酸からなる群から選択される 1 つ以上である；
- c) 前記自己免疫疾患又は障害と負に相関する第 2 のバイオマーカーを検出する工程、ここで、前記第 2 のバイオマーカーが、プロテインキナーゼ G (P k n G) に特異的な抗体、P k n G、及び P k n G をコードする核酸からなる群から選択される 1 つ以上である；
- d) 前記 M A P 感染、前記第 1 のバイオマーカー、及び前記第 2 のバイオマーカーが検出されたことが、前記被験体が前記自己免疫疾患又は障害を有することを示す、を含み、

30

前記自己免疫疾患又は障害が、クローン病 (C D) 及び / 又は潰瘍性大腸炎 (U C) である、方法。

【請求項 6】

M A P 感染の前記検出が、L 5 P に特異的な抗体、L 5 P、及び L 5 P をコードする核酸からなる群から選択される 1 つ以上を測定することをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

40

【請求項 7】

1 種以上の抗生物質で治療すべき 1 種以上の自己免疫疾患又は障害を有すると診断される被験体を選択するための方法であって、前記方法が、以下の工程：

- a) 前記被験体における M A P 感染を検出する工程；
- b) 前記自己免疫疾患又は障害と正に相関する第 1 のバイオマーカーを検出する工程、ここで、前記第 1 のバイオマーカーが、H s p 6 5 に特異的な抗体、H s p 6 5、及び H s p 6 5 をコードする核酸からなる群から選択される 1 つ以上である；
- c) 前記自己免疫疾患又は障害と負に相関する第 2 のバイオマーカーを検出する工程、ここで、前記第 2 のバイオマーカーが、プロテインキナーゼ G (P k n G) に特異的な抗体、P k n G、及び P k n G をコードする核酸からなる群から選択される 1 つ以上である；

50

d) 前記MAP感染、前記第1のバイオマーカー、及び前記第2のバイオマーカーが検出されたことが、前記被験体が前記自己免疫疾患又は障害を有することを示す；

e) 追加の臨床アッセイでMAPの存在を検出する工程；及び

f) 前記被験体が前記自己免疫疾患又は障害であることが示され、かつ前記臨床アッセイでMAPが検出されたことが、前記被験体をMAP感染に特異的な1種以上の抗生物質での治療が推奨されることを示す、

を含み、

前記自己免疫疾患又は障害が、クローン病(CD)及び/又は潰瘍性大腸炎(UC)である、方法。

【請求項8】

10

前記MAP感染の検出が、L5Pに特異的な抗体、L5P、及びL5Pをコードする核酸からなる群から選択される1つ以上を測定することをさらに含む、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記臨床アッセイが、MAPファージ増幅アッセイ、Pozzato培養アッセイ、Tika培養アッセイ、及びマイコバクテリア増殖インジケータチューブ(MGIT)培養アッセイからなる群から選択される1つ以上である、請求項7に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

関連出願の相互参照

本出願は、2019年12月2日に提出された米国仮出願第62/942,480号の優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

マイコバクテリウム・アビウムパラ結核症亜種(Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis)(MAP)は、牛の慢性下痢性消耗性疾患及び羊や山羊の消耗性疾患(Rathnaiah, G., et al., Front VetSci, 2017, 4: 187)であるヨーネ病(JD)(Over, K., et al., Crit Rev Microbiol, 2011, 37: 141-156)の原因として認められており、ヒトの炎症性腸疾患(IBD)であるクローン病(CD)の病因に關与していることが長い間疑われている(Chacon, O., et al., Annu Rev Microbiol, 2004, 58: 329-363)。MAP及び/又はCDはまた、多発性硬化症(Bo, M., et al., Microorganisms, 2020, 8; Cossu, D., et al., Future Microbiol, 2019, 14: 643-646; Slavin, Y.N., et al., J Neuroimmunol, 2018, 323: 49-52; Frau, J., et al., BMC Neurol, 2016, 16: 148; Cossu, D., et al., Sci Rep, 2016, 6: 29227; Mameli, G., et al., Sci Rep, 2016, 6: 22401; Mameli, G., et al., Eur J Neurol, 2016, 23: 140-147; Frau, J., et al., J Neurol Sci, 2015, 349: 249-250; Cossu, D., et al., Mult Scler, 2015, 21: 984-995)、I型糖尿病(Dow, C.T., et al., Microorganisms, 2019, 7; Bo, M., et al., Microorganisms, 2019, 7; Niegowska, M., et al., PLoS One, 2016, 11: e0157962; Hesam Shariah, S., et al., J Infect Dev Ctries, 2016, 10: 857-862; Niegowska, M., et al., Sci Rep, 2016, 6: 22266; Masala, S., et al., Pediatr Diabetes, 2015, 16: 189-195)、関節リウマチ(Bo, M., et al., J Inflamm Res, 2019, 12: 301-308; Naser, A., et al., Microorganisms, 2019, 7; Bo, M., et al., Clin Exp Rheumatol, 2018, 36: 376-381)、シェーグレン症候群(Zhang, P., et al., Microorganisms, 2019, 8)、非対称性側索硬化症(Pierce, E.S., Med Hypotheses, 2018, 119: 1-5)、セリアック病(Biet, F., et al., Dig Dis Sci, 2011, 56: 1794-1800)、鬱病(Euesden, J., et al., PLoS One, 2017, 12: e0173015)、甲状腺炎(Niegowska, M., et al., PLoS One, 2015, 10: e0133497)、並びにアルツハイマー病(Lin, T.M., et al., PLoS One, 2018, 13: e0186475)及びパーキンソン病(

30

40

50

Ami, G., et al., J Neuroimmunol, 2016, 293: 86-90) を含む神経変性疾患にも関係している。M A P の感染に関連する下痢 / 消耗性疾患は、非ヒト霊長類でも報告されている (McClure, H.M., et al., J Infect Dis, 1987, 155: 1011-1019)。

【 0 0 0 3 】

生きた M A P は、私たちの食品、飲料水に存在し、市販の低温殺菌ミルクから分離することができ (Ellingson, J.L., et al., J Food Prot, 2005, 68: 966-972; Grant, I.R., et al., Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 2428-2435)、M A P は、米国のウィスコンシン州、ミネソタ州、及びカリフォルニア州で購入された小売りの低温殺菌ミルク試料の 2 . 7 % で特定されている (Ellingson, J.L., et al., J Food Prot, 2005, 68: 966-972)。従って、ヒトはいつもこの動物の病原体に曝らされている可能性が極めて高い。M A P 特異抗体アッセイによりヒト血清をスクリーニングすると、C D 患者及び無症候性対照者を含む様々な基礎疾患のある被験体において、M A P 特異的免疫認識の証拠が見つかった (Singh, S.H., et al., Journal of Biological Sciences, 2014, 14: 237-247)。主に分子検出法に注目した以前のメタ分析は、非 I B D 対照者と比較して、C D 患者の試料中の M A P 検出の割合が有意に高いことを示す研究の傾向も示した (Abubakar, I., et al., Inflamm Bowel Dis, 2008, 14: 401-410; Feller, M., et al., Lancet Infect Dis, 2007, 7: 607-613)。ただし、M A P とこれらの状態のいずれかとの関連の証明における問題と論争 (Lichtenstein GR, Loftus EV Jr, Isaacs, KL, Regueiro, MD, Gerson LB and Sands BE の 4 9 8 ページ、ACG Clinical Guideline: Management of Crohn's Disease in Adults. <http://www.nature.com/ajgAm J Gastroenterol> 2018; 113:481-517; doi:10.1038/ajg.2018.27; 27 ; 2 0 1 8 年 3 月にオンラインで公開) は、ヒトから M A P を検出及び増殖させ得る決定的で再現可能な方法によって妨げられてきた。個々の小規模な研究ではヒト血液から M A P を培養して、対照者よりも C D 患者における有意に大きな成功を含んでいた (Naser, S.A., et al., Lancet, 2004, 364: 1039-1044; Naser, S.A., et al., The Open Inflammation Journal, 2009, 2: 22-23)。しかし、使用された方法 (M G I T P a r a T B 培養チューブ) は最適ではなく、3 ~ 6 か月のインキュベーションが必要であり、再現性は比較的低かった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 4 】

従って当技術分野では、M A P を検出し、M A P 関連の疾患又は障害を診断するための改善されたシステム及び方法に対するニーズが存在する。本発明は、この満たされていないニーズを満たすものである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

発明の要約

1 つの実施態様において、本発明は、1 種以上の自己免疫疾患又は障害を診断するのに使用されるキットを含み、このキットは、a) 前記自己免疫疾患又は障害と正に相関するバイオマーカーを検出するための第 1 のアッセイ、及び、b) 前記自己免疫疾患又は障害と負に相関するバイオマーカーを検出するための第 2 のアッセイを含む。

【 0 0 0 6 】

1 つの実施態様において、前記キットによって診断される前記自己免疫疾患又は障害は、クローン病 (C D)、潰瘍性大腸炎 (U C)、過敏性腸症候群 (I B S)、多発性硬化症 (M S)、1 型糖尿病 (T 1 D M)、シェーグレン症候群 (S S)、全身性エリテマトーデス (S L E)、鬱病、パーキンソン病 (P D)、アルツハイマー病 (A D)、セリアック病、甲状腺炎、関節リウマチ、乾癬、ブラウ症候群、リンパ管腫、及び複合性局所疼痛症候群 (C R P S) からなる群から選択される 1 つ以上である。

【 0 0 0 7 】

1 つの実施態様において、前記キットにおける第 1 のアッセイのバイオマーカーは、熱ショックタンパク質 6 5 (H S P 6 5) に特異的な抗体、H p p 6 5、及び H p p 6 5 を

コードする核酸からなる群から選択される１つ以上である。１つの実施態様において、前記第１のアッセイは、a) 第１の表面積；b) H s p 6 5 又はその抗原性断片であって、第１の表面積に結合している前記 H s p 6 5 又はその抗原性断片；及びc) H s p 6 5 に特異的な前記抗体に対する標識抗体を含む溶液を含む診断装置を含む。

【 0 0 0 8 】

１つの実施態様において、前記キットにおける第２のアッセイのバイオマーカーは、プロテインキナーゼ G (P k n G) に特異的な抗体、P k n G、及び P k n G をコードする核酸からなる群から選択される１つ以上である。１つの実施態様において、前記第２のアッセイは、a) 第１の表面積；b) P k n G 又はその抗原性断片であって、第１の表面積に結合している前記 P k n G 又はその抗原性断片；及びc) P k n G に特異的な前記抗体に対する標識抗体を含む溶液、を含む診断装置を含む。

10

【 0 0 0 9 】

１つの実施態様において、前記キットは、M A P 感染に関連するバイオマーカーを検出するための第３のアッセイをさらに含む。１つの実施態様において、前記第３のアッセイのバイオマーカーは、マイコバクテリウム・アビウムパラ結核症亜種 (M A P) リポペンタペプチド (L 5 P) に特異的な抗体、L 5 P、及び L 5 P をコードする核酸からなる群から選択される１つ以上である。１つの実施態様において、前記第３のアッセイは、a) 第１の表面積；b) L 5 P 又はその抗原性断片であって、第１の表面積に結合している前記 L 5 P 又はその抗原性断片；及びc) L 5 P に特異的な前記抗体に対する標識抗体を含む溶液、を含む診断装置を含む。

20

【 0 0 1 0 】

１つの実施態様において、本発明は、被験体における１種以上の自己免疫疾患又は障害を診断する方法を含み、この方法は、a) 前記被験体における M A P 感染を検出する工程；b) 前記自己免疫疾患又は障害と正に相関する第１のバイオマーカーを検出する工程；c) 前記自己免疫疾患又は障害と負に相関する第２のバイオマーカーを検出する工程；及びd) 前記 M A P 感染、前記第１のバイオマーカー、及び前記第２のバイオマーカーが検出された場合、前記被験体が前記自己免疫疾患又は障害を有すると診断する工程、を含む。

【 0 0 1 1 】

１つの実施態様において、前記方法によって診断される前記自己免疫疾患又は障害は、C D、U C、I B S、M S、T 1 D M、S S、S L E、鬱病、P D、A D、セリアック病、甲状腺炎、関節リウマチ、乾癬、ブラウ症候群、リンパ管腫、及び C R P S からなる群から選択される１つ以上である。

30

【 0 0 1 2 】

１つの実施態様において、この方法の M A P 感染の前記検出は、L 5 P に特異的な抗体、L 5 P、及び L 5 P をコードする核酸からなる群から選択される１つ以上を測定することをさらに含む。

【 0 0 1 3 】

１つの実施態様において、この方法の前記第１のバイオマーカーは、H s p 6 5 に特異的な抗体、H p p 6 5、及び H p p 6 5 をコードする核酸からなる群から選択される１つ以上である。１つの実施態様において、この方法の前記第２のバイオマーカーは、プロテインキナーゼ G (P k n G) に特異的な抗体、P k n G、及び P k n G をコードする核酸からなる群から選択される１つ以上である。

40

【 0 0 1 4 】

１つの実施態様において、この方法は、１種以上の自己免疫疾患又は障害を有すると診断された前記被験体に、前記１種以上の自己免疫疾患又は障害を治療するための治療薬を投与する工程をさらに含む。

【 0 0 1 5 】

１つの実施態様において、本方法は、１種以上の抗生物質で治療すべき１種以上の自己免疫疾患又は障害を有すると診断される被験体を選択する方法を含み、この方法は、a) 前記被験体における M A P 感染を検出する工程；b) 前記自己免疫疾患又は障害と正に相

50

関する第1のバイオマーカーを検出する工程；c)前記自己免疫疾患又は障害と負に相関する第2のバイオマーカーを検出する工程；d)前記MAP感染、前記第1のバイオマーカー、及び前記第2のバイオマーカーが検出された場合、前記被験体が前記自己免疫疾患又は障害を有すると診断する工程；e)追加の臨床アッセイでMAPの存在を検出する工程；及びf)前記被験体が前記自己免疫疾患又は障害と診断され、かつ前記臨床アッセイでMAPが検出された場合、前記被験体をMAP感染に特異的な1種以上の抗生物質で治療する工程を含む。

【0016】

1つの実施態様において、前記方法の前記自己免疫疾患又は障害は、CD、UC、IBS、MS、T1DM、SS、SLE、鬱病、PD、AD、セリアック病、甲状腺炎、関節リウマチ、乾癬、ブラウ症候群、リンパ管腫、及びCRPSからなる群から選択される1つ以上である。

10

【0017】

1つの実施態様において、前記方法のMAP感染の前記検出は、L5Pに特異的な抗体、L5P、及びL5Pをコードする核酸からなる群から選択される1つ以上を測定することをさらに含む。

【0018】

1つの実施態様において、この方法の前記第1のバイオマーカーは、Hsp65に特異的な抗体、Hpp65、及びHpp65をコードする核酸からなる群から選択される1つ以上である。1つの実施態様において、前記方法の第2のバイオマーカーは、プロテインキナーゼG(PknG)に特異的な抗体、PknG、及びPknGをコードする核酸からなる群から選択される1つ以上である。

20

【0019】

1つの実施態様において、この方法の前記臨床アッセイは、MAPファージ増幅アッセイ、Pozzato培養アッセイ、TiKa培養アッセイ、及びマイコバクテリア増殖インジケータチューブ(MGIT)培養アッセイからなる群から選択される1つ以上である。

【図面の簡単な説明】

【0020】

本発明の実施態様の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むとよりよく理解されるであろう。本発明は、図面に示される実施態様の正確な構成び手段に限定されないことを理解されたい。

30

【0021】

【図1】図1は、実施例1で検査された患者のサブグループごとの代表的な人数及び臨床的特徴を示す($n = 201$)。

【図2】図2は、201名の被験者におけるファージアッセイ、並びにMGIT、TiKa、及びPozzato培養によるMAP検出の分析感度を示す例示的な結果を示す。1つの星印(*)は、2人のCD患者がUCも有すると診断されたことを示す。2つの星印(**)は、非CD群に14名のUCのみの被験者が含まれていることを示す。短剣印(†)は、2人の被験者のTiKa培養の結果が欠失していることを示す。

40

【図3】図3は、MGIT、TiKa、及びPozzato培養方法間の相互関係を示す例示的な結果を示す。星印(*)は、ブル研究室(Bull lab)からの「汚染された」結果の試料が2つあったことを示す。

【図4】図4は、2018年6月に検査されたファージアッセイ陽性のPBL試料で観察されたプラーク数を示す例示的なプレートを示す。全体として、プラーク数は1~500/半PBL試料の範囲であった(試料の残りの半分はPozzatoプロスで培養された)。

【図5】図5は、CD患者及び非CD対照者からのファージアッセイ陽性PBLで得られた平均プラーク数 $\pm 9.5\% \text{ CI}$ (又はSEM)を示す。T検定では、2つの被験者群の平均プラーク数に有意差はなかった(CD患者の63.85プラークと非CD対照者の53

50

． 27 プラーク、 p 値 = 0 . 6385) が、2つの被験者群内の分散は有意に異なる (p 値 = 0 . 0091)。

【図6】図6は、目的の共変量を有する臨床的に診断されたCD患者の関連分析を示す例示的な結果を示す。

【図7】図7は、採用されたすべての培養方法及び血清学的方法によって検出されたMAPの証拠を示す被験者の割合の比較を示す例示的な結果を示す。CD患者、UCのみの患者、及び非CD対照者(14人のUCのみの患者を含む)について別々に。

【図8】図8は、MAP培養及び血清学と選択された疾患(CD又はCD+UC)の発症率との関連分析を示す例示的な結果を示す。結果は、6変量ロジスティック回帰モデル(3つのアッセイ方法変数包含設定×2つの選択された疾患(CD又はCD+UC))から報告され、すべて年齢(52対>52)及び性別で調整されている。二重短剣印(†)は、Hsp65抗体の0.2単位の増分のOR及び95%CIを示す。

10

【図9】図9は、ファージアッセイと培養の結果の一致分析を示す例示的な結果を示す($n = 201$)。

【図10】図10は、IBSを有する1人の被験者の血液から回収されたファージ分離株の代表的な画像を示す。全ゲノム配列決定(WGS)によってMAPとして確認された。

【図11】図11は、Tika培養によって増殖させたヒトPBLからのMAP培養物の例示的なオーラミン染色を示す。

【図12】図12は、MAP分離株の樹状図を示す。示されているのは、ファージアッセイで、ウシの9つの組み立てられたMAPゲノムとNCBIで入手可能なウシ及びヒト由来の1つのゲノムに対して陽性であった同時試料を有していた1人の被験者(US5)から回収されたMAP株US5の関係を表す系統樹である。スケールバーは、この系統樹に表示されている他の株のゲノム全体で比較したサイトごとの変動の頻度を表す。

20

【図13】図13は、米国での採血から英国のQueen's University Belfastでの検査開始までのPBL試料経過時間の長さが、ファージアッセイで得られるプラーク数に及ぼす影響を示す例示的な結果を示す。一元配置分散分析は、採血の6日又は7日後に検査されたファージアッセイ陽性PBL試料と比較して、採血の4日後に検査されたファージアッセイ陽性PBL試料のプラーク数が有意に高いことを示す(p 値 = 0 . 0012)。

【図14A】図14A~Cを含む図14は、クローン病(CD)の強固な予測因子としてのHsp65抗体を示す例示的な結果を示す。図14Aは、CDドナーからの試料と健常対照者からの試料におけるHsp65抗体シグナルを示す例示的な結果の箱ひげ図を示す。図14Bは、実施例2で説明したロジスティック回帰分析のマーカープロットを示す。図14Cは、CDドナーと健常対照者に分類されたHsp65抗体シグナルのロジスティック回帰モデルの受信者動作特性(ROC)曲線を示す例示的な結果を示す。

30

【図14B】上記に同じ。

【図14C】上記に同じ。

【発明を実施するための形態】

【0022】

(詳細な説明)

本発明は、部分的には、MAP感染が必ずしも疾患又は障害として現れるとは限らないという知識に基づいており、従って当技術分野では、自己免疫疾患又は障害を含むMAP感染に関連する疾患又は障害を診断する改善された方法が必要とされている。本発明はまた、部分的には、特定の抗体がクローン病及び潰瘍性大腸炎を含む自己免疫疾患と正又は負に相関し、疾患に正に相関及び負に相関したバイオマーカーを組み合わせたモデルが、いずれかのバイオマーカー単独の診断よりも、改善された予測力を有するという新規発見に基づいている。さらに、本発明は、本発明の抗体を測定するためのキット及び方法と組み合わせて使用される、MAP感染を検出するための追加の臨床アッセイが、自己免疫疾患又は障害を診断することの予測可能性及び信頼性をさらに改善するという発見に基づく。

40

【0023】

定義

50

特に他に言及しない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。

【0024】

本明細書で使用される以下の各用語は、このセクションでそれに関連する意味を有する。

【0025】

冠詞「a」及び「an」は、本明細書では、冠詞の文法的目的語の1つ又は2つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指すために使用される。例として「要素」とは1つの要素又は2つ以上の要素を意味する。

【0026】

量、時間の長さなどの測定可能な値を指すときに本明細書で使用される「約」は、指定された値からの $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、又は $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味し、このような変動は開示された方法を実行するために適切である。

10

【0027】

疾患又は障害の徴候又は症状の重症度、そのような徴候又は症状を患者が経験する頻度、又はその両方が低下している場合、疾患又は障害は「軽減」している。

【0028】

本明細書で使用される「正確度」は、検出又は診断キット及び/又は方法の全体的な信頼性の程度の尺度としての、真の結果（真の陽性＋真の陰性）の合計比率を指す。

【0029】

本明細書で使用される「アッセイ」は、試料中の部分又は物質を定性的及び/又は定量的に測定するための任意の組成物、装置、システム、及び/又は方法を指す。例えば、生物学的試料（例えば血漿）中のバイオマーカー（例えば抗体）の存在を検出するか又はその量を測定するために、イムノアッセイを使用することができる。

20

【0030】

本明細書で使用される「抗原」は、免疫応答を誘発する分子を指す。この免疫応答には、抗体産生、又は特定の免疫学的コンピテント細胞の活性化、あるいはその両方を含み得る。熟練した技術者は、事実上すべてのタンパク質又はペプチドを含む任意の高分子が抗原として機能し得ることを理解するであろう。抗原が生成、合成、又は生物学的試料から誘導され得ることは、当業者には容易に明らかなはずである。そのような生物学的試料には、特に限定されるものではないが、組織試料、腫瘍試料、細胞、又は生体液が含まれ得る。

30

【0031】

本明細書で使用される「生物学的試料」は、本発明のバイオマーカーをアッセイすることができる任意の生物学的に得られた組織又は流体を指す。このような試料の例には、特に限定されるものではないが、血液、喀痰、リンパ液、肺洗浄液、尿、婦人科液、生検、羊水、塗抹標本が含まれる。

【0032】

本質的に液体である試料は、本明細書では「体液」と呼ぶことができる。試料は、患者から様々な技術によって、例えばある領域をこすり取るか拭き取るか、又は針を使用して体液を吸引することによって、得ることができる。様々な身体試料を採取するための方法は、当技術分野でよく知られている。多くの場合、試料は「臨床試料」、すなわち患者から得られた試料である。このような試料には、特に限定されるものではないが、細胞を含む場合も含まない場合もある体液、例えば血液（例えば全血、血清、又は血漿）、尿、喀痰、唾液、組織、又は細針生検試料、及び公知の診断、治療、及び/又は結果の履歴を持つ保管試料が含まれる。生物学的試料には、組織学的試験目的で採取された凍結切片などの組織切片も含まれ得る。試料には、生物学的試料の処理によって得られたすべての材料も含まれる。得られる材料には、特に限定されるものではないが、試料から単離された細胞（又はこれらの子孫）、試料から抽出されたタンパク質又は核酸分子が含まれる。生物学的試料の処理は、濾過、蒸留、抽出、濃縮、妨害成分の不活性化、試薬の添加などのうちの1つ以上を含み得る。

40

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される「バイオマーカー」は、生物学的プロセス、生物学的事象、及び／又は病的状態の特徴的な指標である部分又は物質を指す。例えば、抗体は、疾患（例えばクローン病などの自己免疫疾患又は障害）のバイオマーカーであり得る。

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用される「診断」という用語は、疾患又は障害の存在の決定を指す。本発明のいくつかの実施態様において、特定の疾患又は障害の存在の決定を可能にする診断を行うための方法が提供される。

【 0 0 3 5 】

「病気」とは、動物が恒常性を維持できず、及び病気が改善されない場合、動物の健康が悪化し続ける動物の健康状態のことである。対照的に動物の「障害」は、動物が恒常性を維持できる健康状態であるが、動物の健康状態は、その障害がない場合よりも不利である状態である。治療せずに放置しても、障害は、必ずしも動物の健康状態をさらに低下させるわけではない。

【 0 0 3 6 】

「患者」、「被験体」、「個体」などの用語は本明細書では互換的に使用され、インビトロ又はインサイチュを問わず、本明細書に記載の方法に適した任意の動物又はその細胞を指す。特定の非限定的な実施態様において、患者、被験体、又は個体はヒトである。

【 0 0 3 7 】

「説明資料」は、その用語が本明細書で使用される場合、本明細書に記載されている様々な疾患又は障害を特定、診断、又は軽減、又は治療するためのキットに含まれる、本発明の核酸、ペプチド、及び／又は化合物の有用性を伝達するために使用できる出版物、記録、図、又は任意の他の表現媒体を含む。任意選択的に、又は代替的に、説明資料は、被験体の細胞又は組織における疾患又は障害を特定、診断、又は軽減する１つ以上の方法を説明し得る。キットの説明資料は、例えば本発明の１つ以上の構成要素を含む容器に貼付するか、又は本発明の１つ以上の構成要素を含む容器と一緒に出荷することができる。あるいは、受領者が説明資料と構成要素を協力して使用することを意図して、説明資料を容器とは別に出荷することもできる。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される「イムノアッセイ」は、標的分子に特異的に結合することができる抗体を含む任意の結合アッセイを指す。アッセイは、標的分子を検出及び／又は定量するように、例えばサンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）を設計するか、又は標的分子に特異的な抗体を検出及び／又は定量するように、例えば間接的ＥＬＩＳＡを設計することができる。

【 0 0 3 9 】

「単離された」とは、自然の状態から変化又は除去されたことを意味する。例えば、生きている動物に自然に存在する核酸又はペプチドは「単離」されていないが、その天然状態の共存物質から部分的又は完全に分離された同じ核酸又はペプチドは「単離」されている。単離された核酸又はタンパク質は、実質的に精製された形で存在することができるか、又は、例えば宿主細胞などの非天然の環境に存在することができる。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用される「標識物」という用語は、「標識された」プローブを生成するために、直接又は間接的にプローブに結合される検出可能な化合物又は組成物を指す。標識物は、それ自体で検出可能である場合があり（例えば、放射性同位元素標識物又は蛍光標識物）、又は酵素標識物の場合、検出可能な基質化合物又は組成物（例えばアビジン - ビオチン）の化学的变化を触媒する場合がある。場合によっては、ＰＣＲ産物を検出するようにプライマーを標識することができる。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される「測定する」又は「測定」、あるいは「検出する」又は「検出」という用語は、試料中の所定の部分又は物質の存在、非存在、量（quantity）又は量（a

10

20

30

40

50

mont) (これは有効量であり得る) を評価することを意味し、そのような部分又は物質の定性的又は定量的濃度レベルの得ること、又はさもなければ被験体の臨床パラメータの値又は分類を評価することを含む。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用される「正常」、「健康」、及び「対照」という用語は交換可能に使用される。それらには、目的の疾患又は障害 (例えば、自己免疫疾患又は障害) を有すると診断されていない個体又は個体の群が含まれる。これらの用語はまた、本明細書では、正常な、健康な、又は対照の個体から得られた試料 (例えば、血漿などの生物学的試料) を説明するためにも使用される。

【 0 0 4 3 】

「核酸」は、ポリヌクレオチドを指し、ポリリボヌクレオチド及びポリデオキシリボヌクレオチドを含む。本発明による核酸は、ピリミジン及びプリン塩基、好ましくはそれぞれシトシン、チミン、及びウラシル、並びにアデニン及びグアニンの任意のポリマー又はオリゴマーを含み得る (Albert L. Lehninger, Principles of Biochemistry, at 793-800 (Worth Pub. 1982) を参照。これは、すべての目的のために完全に本明細書に組み込まれる)。実際、本発明は、任意のデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、又はペプチド核酸成分、並びにこれらの任意の化学的変種、例えばこれらの塩基のメチル化、ヒドロキシメチル化、又はグリコシル化形態などを企図する。ポリマー又はオリゴマーは、組成が不均一又は均一であり得、そして天然の供給源から単離され得るか、又は人工的若しくは合成的に生成され得る。さらに、核酸は、DNA 又は RNA、あるいはこれらの混合物であり得、そしてホモ二本鎖、ヘテロ二本鎖、及びハイブリッド状態を含む一本鎖又は二本鎖形態で恒久的又は一時的に存在し得る。

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される「ポリメラーゼ連鎖反応」(「PCR」) という用語は、クローニング又は精製を行わないで、ゲノム DNA の混合物中の標的配列のセグメントの濃度を上昇させる方法を記載する K. B. Mullis (米国特許第 4, 683, 195 号、4, 683, 202 号、及び 4, 965, 188 号、参照により本明細書に取り込まれる) の方法を指す。標的配列を増幅するためのこのプロセスは、所望の標的配列を含む DNA 混合物に大過剰の 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーを導入し、続いて DNA ポリメラーゼの存在下で熱サイクリングの正確な連続操作を行うことからなる。2 つのプライマーは、二本鎖標的配列のそれぞれの鎖に相補的である。増幅を行うために、混合物を変性させ、次にプライマーを標的分子内のこれらの相補的配列にアニーリングする。アニーリングに続いて、プライマーはポリメラーゼで伸長され、相補鎖の新しい対を形成する。変性、プライマーアニーリング、及びポリメラーゼ伸長の工程を何度も繰り返して (すなわち、変性、アニーリング、及び伸長は 1 つの「サイクル」を構成し、多数の「サイクル」があり得る)、所望の標的配列的増幅された高濃度のセグメントを得る。所望の標的配列の増幅されたセグメントの長さは、互いのプライマーの相対的な位置によって決定され、従って、この長さは、制御可能なパラメータである。プロセスの繰り返しの態様のために、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応」(以下「PCR」) と呼ばれる。標的配列の所望の増幅されたセグメントは混合物中の (濃度に関して) 主要な配列になるため、これらは「PCR 増幅された」と言われる。本明細書で使用される「PCR 産物」、「PCR 断片」、「増幅産物」、又は「アンプリコン」という用語は、変性、アニーリング、及び伸長の PCR 工程の 2 回以上のサイクルが完了した後得られる化合物の混合物を指す。これらの用語は、1 つ以上の標的配列の 1 つ以上のセグメントの増幅があった場合を包含する。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は交換可能に使用され、ペプチド結合によって共有結合されたアミノ酸残基から構成される化合物を指す。タンパク質又はペプチドには少なくとも 2 つのアミノ酸が含まれている必要があり、タンパク質又はペプチドの配列を構成できるアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドには、ペプチド結合によって互いに結合された 2 つ以上のアミノ酸を含

10

20

30

40

50

む任意のペプチド又はタンパク質が含まれる。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される場合、この用語は、例えば当技術分野で一般にペプチド、オリゴペプチド、及びオリゴマーとも呼ばれる短鎖と、当技術分野で一般に、多くの種類があるタンパク質と呼ばれるより長い鎖の両方を指す。「ポリペプチド」には、特に、例えば生物学的に活性な断片、実質的に相同的なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変種、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、又はこれらの任意の組み合わせが含まれる。

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」には、cDNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、アンチセンスRNA、リボザイム、ゲノムDNA、合形成態、及びセンス鎖とアンチセンス鎖の両方の混合ポリマーが含まれ、非天然、又は誘導体化、合成、又は半合成のヌクレオチド塩基を含むように化学的又は生化学的に修飾され得る。また、特に限定されるものではないが、1つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、置換、又は他のポリヌクレオチド配列への融合を含む野生型又は合成遺伝子の改変が企図される。

【 0 0 4 8 】

「プライマー」という用語は、条件がプライマー伸長産物の合成に適している場合に、相補鎖に沿った合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを指す。合成条件には、4つの異なるデオキシリボヌクレオチド三リン酸と、少なくとも1つの重合誘導剤、例えば逆転写酵素やDNAポリメラーゼの存在が含まれる。これらは適切な緩衝液中に存在し、緩衝液は、補因子であるか又は様々な適切な温度でpHなどの条件に影響を与える成分を含み得る。プライマーは好ましくは、増幅効率が最適化されるように一本鎖配列であることが好ましいが、二本鎖配列を利用することができる。

【 0 0 4 9 】

抗体に関して本明細書で使用される「特異的に結合する」又は「に特異的」という用語は、試料中の特定の抗原を認識するが、他の分子を実質的に認識しないか又は結合しない抗体を指す。例えば、1つの種からのある抗原に特異的に結合する抗体はまた、1つ以上の種からのその抗原に結合することもできる。しかし、そのような異種間反応性は、それ自体が抗体の特異的分類を変えることはない。別の例では、ある抗原に特異的に結合する抗体は、その抗原の異なる対立遺伝子型にも結合し得る。しかし、そのような交差反応性はそれ自体が抗体の特異的分類を変えることはない。場合によっては、「特異的結合」又は「特異的に結合する」という用語は、抗体、タンパク質、又はペプチドと、第2の化学種との相互作用に関連して使用され得、相互作用が化学種上の特定の構造（例えば、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存することを意味し、例えば、抗体は、一般的にタンパク質ではなく、特定のタンパク質構造を認識して結合する。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識された「A」と抗体とを含む反応において、エピトープA（又は遊離の非標識A）を含む分子が存在すると、抗体に結合する標識Aの量が減少する。

【 0 0 5 0 】

「治療的」処置は、疾患又は障害の兆候又は症状を示す被験体に、それらの兆候又は症状を軽減又は排除する目的で、施される処置である。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される「疾患又は障害を治療すること」は、その疾患又は障害の徴候又は症状を患者が経験する重症度及び/又は頻度を低減することを意味する。

【 0 0 5 2 】

範囲：本開示全体を通して、本発明の様々な態様を範囲形式で提示することができる。範囲形式での説明は、単に利便性と簡潔性のためであり、本発明の範囲の融通の利かない限定と解釈されるべきではないことを理解されたい。従って範囲の記載は、具体的に開示されたすべての可能な部分範囲並びにその範囲内の個々の数値を有すると見なされるべきである。例えば、1～6などの範囲の記述は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6

10

20

30

40

50

、 3 ~ 6 などの開示された部分範囲、並びにその範囲内の個々の数字、例えば 1、 2、 2、 7、 3、 4、 5、 5、 3、 及び 6 などを有すると見なされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用される「感度」は、特定のマーカー又は病理学的状態が存在する場合に、それを正しく特定する能力（真の陽性率）を指す。本明細書で使用される「特異性」は、特定のマーカー又は病理学的状態が存在しない場合に、それを正しく除外する能力（真の陰性率）を指す。本明細書で使用される「分析感度」又は「分析特異性」は、被験体における感染性物質の存在又は不在をそれぞれ検出する能力であり、一方、本明細書で使用される「臨床的感度」又は「臨床的特異性」は、被験体の疾患又は障害をそれぞれ陽性又は陰性に診断する能力である。

10

【 0 0 5 4 】

説明

本発明は、一般に、患者の M A P 感染を検出するための及び / 又は自己免疫疾患又は障害を診断するためのキット、システム、及び方法に関する。本発明はまた、検出可能な M A P 感染を有する患者がいつ抗 M A P 療法で治療されるべきかを決定するための方法に関する。

【 0 0 5 5 】

バイオマーカー

様々な実施態様において本発明は、一般に、生物学的試料中の 1 種以上のバイオマーカーを検出又は測定するためのキット及び / 又は方法に関する。

20

【 0 0 5 6 】

様々な実施態様において、本発明の前記バイオマーカーは、生物学的試料で測定される。生物学的試料は、流体、組織、細胞、細胞成分、又はこれらの組み合わせなどのポリペプチド又は核酸を含む任意の供給源からの試料であり得る。生物学的試料は、例として、採血、体液引き抜き、又は生検などの適切な方法によって得ることができる。生物学的試料は検査試料として使用できる。あるいは、生物学的試料を処理して、ポリペプチド又は核酸、又は核酸のコピーへのアクセスを強化することができ、次に、処理された生物学的試料を検査試料として使用することができる。

【 0 0 5 7 】

30

1 つの実施態様において、本発明の前記バイオマーカーの 1 つ以上は 1 つ以上の抗体である。1 つの実施態様において、前記抗体の 1 つ以上は M A P に特異的である。1 つの実施態様において、前記抗体の 1 つ以上は M A P に特異的ではない。1 つの実施態様において、前記抗体の 1 つ以上は熱ショックタンパク質 6 5 に特異的な抗体（抗 H S P 6 5）を含む。1 つの実施態様において、前記抗体の 1 つ以上はプロテインキナーゼ G に特異的な抗体（抗 P k n G）を含む。1 つの実施態様において、前記抗体の 1 つ以上は、M A P リポペントペプチドに特異的な抗体（抗 L 5 P）を含む。

【 0 0 5 8 】

本明細書に記載の方法は、流体試料中の低濃度の抗体の特異的検出を可能にする。検出は、約 5 0、4 0、3 0、2 0、1 0、5、又はさらには 0 . 5 n g / m l までの抗体濃度、例えば約 1 0 0 0、7 5 0、5 0 0、4 0 0、3 0 0、2 0 0、1 0 0、7 5、5 0、4 0、3 0、2 0、1 0、5、さらには 0 . 5 n g / m l 未満の濃度まで実施することができる。

40

【 0 0 5 9 】

抗体の検出に関連する本明細書に記載の方法は、自己免疫疾患又は障害などの疾患又は障害の治療及び予防に関連する診断及び / 又は予後アッセイに特に関連する。多くの診断、予後及び / 又はモニタリングアッセイは、特定の病状又は疾患感受性の生物学的マーカーの検出に依存している。そのような生物学的マーカーは、一般に、特定の疾患に特徴的であるか、又は疾患に対する感受性に関連するタンパク質又はポリペプチドである。

【 0 0 6 0 】

50

特定の抗体の検出は、病状又は疾患の進行などの他の要因を評価するために、診断的又は予後的に使用され得る。抗体は通常、感染、疾患又は疾患感受性の生物学的マーカーとして機能する。例えば、M A P 抗原に特異的な抗体はM A P 感染を示す。M A P 感染は、クローン病や潰瘍性大腸炎などの多くの自己免疫疾患に因果関係があるとされている。ただし、M A P 感染だけでは、必ずしも症候性疾患を発症するリスクを予測できるわけではないことに注意されたい。従って、本明細書で企図されるように、抗体を含む自己免疫疾患又は障害と特異的に相関する追加のバイオマーカーが、迅速かつ正確な診断のために必要とされる。

【0061】

1つの実施態様において、本発明の前記バイオマーカーの1つ以上は1つ以上のタンパク質である。1つの実施態様において、前記タンパク質の1つ以上は、宿主に対して抗原性であり、免疫応答を誘導する。1つの実施態様において、前記免疫応答は、前記1つ以上のタンパク質に特異的な抗体を含む。

10

【0062】

1つの実施態様において、本発明の前記バイオマーカーの1つ以上は、1つ以上の核酸である。1つの実施態様において、前記核酸は、宿主に対して抗原性であり免疫応答を誘導するタンパク質をコードする。1つの実施態様において、前記免疫応答は、前記1つ以上のタンパク質に特異的な抗体を含む。

【0063】

アッセイ

20

様々な実施態様において、本発明は一般に、生物学的試料中の1種以上のバイオマーカーを検出又は測定するための1つ以上のアッセイを含むキット及び/又は方法に関する。いくつかの実施態様において、本発明は、前記1種以上のバイオマーカーが前記生物学的試料において差動的に発現されるかどうかを決定するための1つ以上のアッセイを含むキット及び/又は方法に関する。

【0064】

バイオマーカーは、一般に、当業者に知られている様々なアッセイ、方法、及び検出システムを介して測定及び検出することができる。様々な方法には、特に限定されるものではないが、イムノアッセイ、マイクロアレイ、P C R、R T - P C R、屈折率分光法 (R I)、紫外線分光法 (U V)、蛍光分析、電気化学分析、放射性化学分析、近赤外分光法 (近赤外)、赤外線 (I R) 分光法、核磁気共鳴分光法 (N M R)、光散乱分析 (L S)、質量分析、熱分解質量分析、ネフェロメトリー、分散ラマン分光法、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーと質量分析の組み合わせ、液体クロマトグラフィーと質量分析の組み合わせ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間 (M A L D I - T O F) と質量分析の組み合わせ、イオン噴霧分光法と質量分析の組み合わせ、キャピラリー電気泳動、比色分析、及び表面プラズモン共鳴 (Biacore Life Sciencesに提供されたシステムに従って) が含まれる。またP C T公開WO / 2 0 0 4 / 0 5 6 4 5 6 及びWO / 2 0 0 4 / 0 8 8 3 0 9 も参照されたい。これに関して、バイオマーカーは、上記の検出方法、又は当業者に知られている他の方法を使用して測定することができる。他のバイオマーカーは、それらを検出するために特別に設計又は調整された試薬を使用して同様に検出することができる。

30

40

【0065】

様々な実施態様において、被験体の生物学的試料において1種以上のバイオマーカーの発現レベルが増加又は減少しているかどうかを決定するために、少なくとも1種のバイオマーカーの発現レベルを、少なくとも1つの比較対照、例えば陽性対照、陰性対照、過去の平均、過去の標準、又は生体試料内の別の参照分子のレベルなどと比較する。診断アッセイの結果は、単独で、又は被験体からの他の情報と、又は被験体から得られた生物学的試料からの他の情報と、組み合わせて使用することができる。

【0066】

本発明のアッセイの様々な実施態様において、比較対照と比較した場合、バイオマーカー

50

一の発現レベルが、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも175%、少なくとも200%、少なくとも250%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、少なくとも600%、少なくとも700%、少なくとも800%、少なくとも900%、少なくとも1000%、少なくとも1500%、少なくとも2000%、少なくとも2500%、少なくとも3000%、少なくとも4000%、又は少なくとも5000%増加したときに、バイオマーカーの発現レベルは上昇又は増加していると決定される。

【0067】

本発明の方法の様々な実施態様において、比較物と比較した場合、生物学的試料におけるバイオマーカーの発現レベルが、少なくとも1倍、少なくとも1.1倍、少なくとも1.2倍、少なくとも1.3倍、少なくとも1.4倍、少なくとも1.5倍、少なくとも1.6倍、少なくとも1.7倍、少なくとも1.8倍、少なくとも1.9倍、少なくとも2倍、少なくとも2.1倍、少なくとも2.2倍、少なくとも2.3倍、少なくとも2.4倍、少なくとも2.5倍、少なくとも2.6倍、少なくとも2.7倍、少なくとも2.8倍、少なくとも2.9倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも4.5倍、少なくとも5倍、少なくとも5.5倍、少なくとも6倍、少なくとも6.5倍、少なくとも7倍、少なくとも7.5倍、少なくとも8倍、少なくとも8.5倍、少なくとも9倍、少なくとも9.5倍、少なくとも10倍、少なくとも11倍、少なくとも12倍、少なくとも13倍、少なくとも14倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも75倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、又は少なくとも1000倍増加したときに、バイオマーカーの発現レベルは上昇又は増加していると決定される。

【0068】

異なるタイプのバイオマーカー及びこれらの測定値は、本発明の組成物及び方法において組み合わせることができる。様々な実施態様において、1つ以上の抗体はバイオマーカーである。他の実施態様において、1つ以上のタンパク質はバイオマーカーである。1つの実施態様において、前記タンパク質の1つ以上は抗原性であり、抗体の産生を誘導する。様々な実施態様において、1つ以上の核酸はバイオマーカーである。1つの実施態様において、前記核酸は、抗体を誘導する1つ以上の抗原性タンパク質をコードする。

【0069】

1つの実施態様において、本発明の前記バイオマーカーは抗体である。1つの実施態様において、前記抗体は、抗体-抗原複合体の形成を測定することによって検出される。抗体-抗原複合体の検出を促進するために、適切な検出可能な標識物を利用することができる。当業者に知られている多くの異なる標識物及び標識方法が存在する。本発明で利用することができる標識物の種類の例には、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、コロイド金属、化学発光化合物、リン光化合物、及び生物発光化合物が含まれる。当業者は、適切な標識物を認識しているか、又は日常的な実験を使用してそのようなものを確認することができるであろう。標識部分は、例えばフルオレセインなどの蛍光色素、化学発光試薬、放射性同位元素、コロイド金又は着色ラテックスビーズなどのコロイド標識物、酵素標識物、又はその他の公知の標識複合体である従来の免疫組織化学的検出技術で観察可能である。

【0070】

例として、抗体に対する抗体上の標識物が化学反応に関与する場合、その反応の生成物を定量して結合を定量することができる。例えば標識物は、分光計で定量できる色の変化を引き起こす可能性がある。そのような場合の基準は、特定の波長の光の吸収であり得る。基準物質は、カラーチップ又はカラースケールの場合もある。さらに、標識物が発光性である場合、分光計で特定の波長の光の強度を測定することにより、結合を定量することができる。このような場合、基準値は強度値であり得る。さらに、結合は、抗体に特異的

10

20

30

40

50

な抗体上の標識物と、様々な表面積に結合した抗原に結合した標識物との間の相互作用を観察することによって定量することができる。例えば、抗体に特異的な抗体上の標識物が蛍光物質を含み、表面に結合した抗原がそれに結合した蛍光物質を有する場合、光への曝露後の蛍光物質間のエネルギーの移動を定量することができる。抗体 - 抗体 - 抗原複合体を、蛍光物質の1つを励起するのに十分な波長と強度の光に曝露することにより、蛍光物質間でエネルギーを移動することができる。他の蛍光物質が十分に接近している場合、エネルギーは励起された蛍光物質から他の蛍光物質に移動され、それによって他の蛍光物質が、最初の蛍光物質を刺激するために使用される波長とは異なる波長で光を放出する。次に、放出された波長での光の強度を、分光計などの様々な装置を使用して定量することができ、こうして、試料内の抗体と溶液内の抗原との間の結合が定量される。

10

【0071】

当技術分野で知られているように、検出可能な標識物を使用して、抗体 - 抗原複合体の任意のメンバーを直接（例えば、直接結合）又は間接的に（例えば、二次抗体）タグ付けして、検出を促進することができる。適切な検出可能な標識物を介して抗原と抗体との結合を検出するための様々な方法が、当技術分野で知られている。検出は、イムノアッセイなどを含む免疫学的技術などの、当技術分野で知られている任意の方法によるものであり得る。例えば、抗体 - 抗原複合体の検出は、特に限定されるものではないが、ウエスタンブロット分析、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射性免疫アッセイ（RIA）、競合免疫アッセイ、二重抗体サンドイッチアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、蛍光アッセイ、及び凝集アッセイなどの技術によって決定され得る。

20

【0072】

1つの実施態様において、本発明の前記アッセイは診断装置を含む。1つの実施態様において、前記診断装置は以下を含む：第1の表面積；タンパク質又はタンパク質の抗原性断片が第1の表面積に結合している、前記タンパク質又はタンパク質の抗原性断片；及びタンパク質に特異的な抗体に対する標識された抗体を含む溶液。1つの実施態様において、本発明の前記イムノアッセイは間接ELISAを含む。1つの実施態様において、前記イムノアッセイによって検出される抗体には、特に限定されるものではないが、Hsp65、PknG、及びL5Pが含まれる。

【0073】

30

本発明の1つの実施態様において、1種以上のバイオマーカーは、タンパク質又はポリペプチドである。被験体から得られた生物学的試料中のタンパク質/ポリペプチドレベルを測定する方法には、特に限定されるものではないが、免疫クロマトグラフィーアッセイ、イムノドットアッセイ、ルミネックスアッセイ、ELISAアッセイ、ELISPOTアッセイ、タンパク質マイクロアレイアッセイ、リガンド - 受容体結合アッセイ、受容体アッセイからのリガンドの置換、共有受容体アッセイからのリガンドの置換、免疫染色アッセイ、ウエスタンブロットアッセイ、質量分光光度アッセイ、放射免疫測定法（RIA）、放射性免疫拡散アッセイ、液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析アッセイ、オクタロニー免疫拡散アッセイ、逆相タンパク質マイクロアレイ、ロケット免疫電気泳動アッセイ、免疫組織染色アッセイ、免疫沈降アッセイ、補体結合アッセイ、FACS、酵素 - 基質結合アッセイ、酵素アッセイ、発色物質、蛍光物質、又は放射性基質などの検出可能な分子を使用する酵素アッセイ、そのような基質を使用する基質結合アッセイ基質、そのような基質を使用する基質置換アッセイ、及びタンパク質チップアッセイが含まれる（また、2007, Van Emon, Immunoassay and Other Bioanalytical Techniques, CRC Press; 2005, Wild, Immunoassay Handbook, Gulf Professional Publishing; 1996, Diamandis and Christopoulos, Immunoassay, Academic Press; 2005, Joos, Microarrays in Clinical Diagnosis, Humana Press; 2005, Hamdan and Righetti, Proteomics Today, John Wiley and Sons; 2007も参照されたい）。

40

【0074】

本発明の1つの実施態様において、1種以上のバイオマーカーは核酸である。核酸（例

50

例えば mRNA)を検出するための方法、例えば RT-PCR、リアルタイム PCR、マイクロアレイ、分岐 DNA、NASBAなどは、当技術分野でよく知られている。バイオマーカー配列のデータベースエントリーによって提供される配列情報を使用して、バイオマーカー配列の発現を検出し(存在する場合)、当業者に公知の技術を使用して測定することができる。例えば、配列データベースエントリー中の配列又は本明細書に開示される配列を使用して、例えば、ノーザンブロットハイブリダイゼーション分析又は特定の核酸配列を特異的かつ好ましくは定量的に増幅する方法において、バイオマーカー RNA 配列を検出するためのプローブを構築することができる。別の例として、配列を使用して、例えば、逆転写主体のポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)などの増幅主体の検出方法において、バイオマーカー配列を特異的に増幅するためのプライマーを構築することができる。遺伝子発現の変化が遺伝子増幅、欠失、多型、及び突然変異に関連する場合、検査集団及び参照細胞集団における試験された DNA 配列の相対量を比較することにより、試験及び参照集団における配列比較を行うことができる。ノーザンブロット及び RT-PCR に加えて、RNA は、例えば他の標的増幅法(例えば TMA、SDA、NASBA)、シグナル増幅法(例えば bDNA)、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、インサイチュハイブリダイゼーションなどを使用して測定することもできる。

10

【0075】

いくつかの実施態様において、定量的ハイブリダイゼーション法、例えばサザン分析、ノーザン分析、又はインサイチュハイブリダイゼーションを使用することができる(すべての増刊を含む Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F. et al., eds., John Wiley & Sons を参照されたい)。本明細書で使用される「核酸プローブ」は、DNA プローブ又は RNA プローブであり得る。プローブは、例えば、遺伝子、遺伝子断片(例えば 1 つ以上のエキソン)、遺伝子を含むベクター、プローブ又はプライマーなどであり得る。核酸プローブの使用の代表的な例については、例えば、米国特許第 5,288,611 号及び第 4,851,330 号を参照されたい。核酸プローブは、例えば全長核酸分子、又はその一部、例えば長さが少なくとも 15、30、50、100、250、又は 500 ヌクレオチドであり、厳密性条件下で適切な標的 mRNA 又は cDNA に特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドであり得る。ハイブリダイゼーション試料は、核酸プローブの mRNA 又は cDNA への特異的ハイブリダイゼーションを可能にするのに十分な条件下で維持される。適宜、高厳密性条件下又は中厳密性条件下で特異的ハイブリダイゼーションを行うことができる。好適な実施態様において、特異的ハイブリダイゼーションのためのハイブリダイゼーション条件は、高厳密性である。次に、特異的ハイブリダイゼーションは、存在する場合、標準的な方法を使用して検出される。検査試料中に mRNA 又は cDNA を有する核酸プローブ間で特異的ハイブリダイゼーションが起こる場合、試料中の mRNA 又は cDNA のレベルを評価することができる。この方法では、複数の核酸プローブを同時に使用することもできる。本明細書に記載されるように、核酸プローブのいずれか 1 つの特異的ハイブリダイゼーションは、目的の mRNA 又は cDNA の存在を示す。

20

30

【0076】

あるいは、本明細書に記載の定量的ハイブリダイゼーション法において、核酸プローブの代わりにペプチド核酸(PNA)プローブを使用することができる。PNA は、N-(2-アミノエチル)グリシン単位などのペプチド様の無機骨格を持ち、有機塩基(A、G、C、T、又は U)がメチレンカルボニルリンカーを介してグリシン窒素に結合している DNA 模倣物である(例えば、1994, Nielsen et al., Bioconjugate Chemistry 5:1 を参照)。PNA プローブは、標的核酸配列に特異的にハイブリダイズするように設計することができる。核酸配列への PNA プローブのハイブリダイゼーションは、生物学的試料中の標的核酸のレベルを決定するために使用される。

40

【0077】

別の実施態様において、被験体から得られた生物学的試料中の標的核酸配列に相補的であるオリゴヌクレオチドプローブのアレイを使用して、被験体から得られた生物学的試料

50

中の１種以上のバイオマーカーのレベルを決定することができる。オリゴヌクレオチドプローブのアレイを使用して、生物学的試料中の、１種以上のバイオマーカー単独のレベル、又は１つ以上の他の核酸のレベルに関連して１種以上のバイオマーカーのレベルを決定することができる。オリゴヌクレオチドアレイは、通常、異なる公知の位置で基質の表面に結合された複数の異なるオリゴヌクレオチドプローブを含む。「ジーンチップ」としても知られているこれらのオリゴヌクレオチドアレイは、当技術分野で一般的に記載されており、例えば米国特許第５，１４３，８５４号及びＰＣＴ特許公開ＷＯ９０／１５０７０及び９２／１００９２に記載されている。これらのアレイは、一般に、フォトリソグラフィ法と固相オリゴヌクレオチド合成法の組み合わせを組み込んだ機械的合成法又は光指向性合成法を使用して製造することができる。Fodor et al., Science, 251:767-777 (1991), Pirrung et al., 米国特許第５，１４３，８５４号（ＰＣＴ出願番号ＷＯ９０／１５０７０も参照）及びFodor et al., ＰＣＴ公開ＷＯ９２／１００９２及び米国特許第５，４２４，１８６号を参照されたい。機械的合成方法を使用してこれらのアレイを合成するための技術は、例えば、米国特許第５，３８４，２６１号に記載されている。

【００７８】

オリゴヌクレオチドアレイが調製された後、目的の核酸はアレイとハイブリダイズされ、そのレベルが定量される。ハイブリダイゼーション及び定量は、一般に本明細書に記載されている方法によって、また、例えば公開されたＰＣＴ出願番号ＷＯ９２／１００９２及びＷＯ９５／１９９５、並びに米国特許第５，４２４，１８６号に記載されている方法によって実施される。簡単に説明すると、標的核酸配列は、公知の増幅技術、例えばＰＣＲによって増幅される。通常、これは標的核酸に相補的なプライマー配列の使用を含む。非対称ＰＣＲ技術も使用できる。次に、一般に標識物を組み込んだ増幅された標的が、適切な条件下でアレイとハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーション及びアレイの洗浄が完了すると、アレイはスキャンされて、ハイブリダイズした核酸の量が決定される。スキャンから得られたハイブリダイゼーションデータは、通常、生物学的試料中の標的核酸の量又は相対量の関数としての蛍光強度の形態である。標的核酸は、１つ以上の比較物（例えば、陽性対照、陰性対照、量対照など）と組み合わせてアレイにハイブリダイズさせて、試料中の標的核酸の定量を改善することができる。

【００７９】

本発明によるプローブ及びプライマーは、放射性又は非放射性化合物を用いて、当業者に公知の方法によって直接又は間接的に標識して、検出可能及び／又は定量可能なシグナルを得ることができる。本発明によるプライマー又はプローブの標識は、放射性元素又は非放射性分子を用いて行われる。使用される放射性同位体の中では、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、又は ^3H を言及することができる。非放射性物質は、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、又はジゴキシゲニンなどのリガンド、ハプテン、色素、及び発光物質、例えば放射性発光物質、化学発光物質、生物発光物質、蛍光物質、又はリン光物質から選択される。

【００８０】

核酸は、公知の技術を使用して細胞から得ることができる。本明細書における核酸は、ｍＲＮＡを含むＲＮＡ、及びｃＤＮＡを含むＤＮＡを指す。核酸は、二本鎖又は一本鎖（すなわち、センス又はアンチセンス一本鎖）であり得、ポリペプチドをコードする核酸に相補的であり得る。核酸含有量はまた、生体液及び新鮮な又は固定された組織試料を含む生体試料に対して行われるＲＮＡ又はＤＮＡ抽出であり得る。

【００８１】

特定の核酸配列の検出及び定量のための当技術分野で知られている多くの方法があり、新しい方法が継続的に報告されている。公知の特定の核酸検出及び定量方法の大部分は、特定のハイブリダイゼーション反応において核酸プローブを利用する。好ましくは、二本鎖形態へのハイブリダイゼーションの検出は、サザンブロット技術である。サザンブロット技術では、核酸試料をサイズ（分子量）に基づいてアガロースゲルで分離し、膜に貼り付け、変性させ、ハイブリダイズする条件下で標識核酸プローブに曝露（混合）される。標識された核酸プローブがブロット上の核酸とハイブリッドを形成する場合、標識物はメ

ンブレンに結合する。

【 0 0 8 2 】

サザンブロットでは、核酸プローブは好ましくはタグで標識される。そのタグは、放射性同位元素、蛍光色素、又はその他のよく知られた材料であり得る。当技術分野で知られている生物学的試料中の核酸を特異的に検出するための別のタイプのプロセスは、米国特許第 6 , 1 5 9 , 6 9 3 号及び第 6 , 2 7 0 , 9 7 4 号、並びに関連特許に例示されるようなハイブリダイゼーション法である。これらの方法の 1 つを簡単に要約すると、目的の核酸に相補的な配列を有する少なくとも 1 0 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 1 5 ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも 2 5 ヌクレオチドの核酸プローブが試料中でハイブリダイズされ、解重合条件に供され、及び試料は A T P / ルシフェラーゼシステムで処理され、これは、核酸配列が存在する場合は発光する。定量的サザンブロッティングでは、目的の核酸のレベルを、目的の第 2 の核酸のレベル、及び / 又は 1 つ以上の比較核酸（例えば、陽性対照、陰性対照、量対照など）と比較することができる。

10

【 0 0 8 3 】

核酸の検出及び定量に有用な多くの方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ P C R ）を利用する。 P C R プロセスは当技術分野でよく知られている（米国特許第 4 , 6 8 3 , 1 9 5 号、第 4 , 6 8 3 , 2 0 2 号、及び第 4 , 8 0 0 , 1 5 9 号）。 P C R を簡単に要約すると、核酸増幅標的配列の反対の鎖に相補的な核酸プライマーを、変性した試料にアニーリングされる。 D N A ポリメラーゼ（通常は熱安定性）は、ハイブリダイズしたプライマーから D N A 二本鎖を伸長させる。このプロセスを繰り返して、核酸標的が増幅される。核酸プライマーが試料にハイブリダイズしない場合、対応する増幅された P C R 産物はない。この場合、 P C R プライマーはハイブリダイゼーションプローブとして機能する。

20

【 0 0 8 4 】

P C R では、本明細書の他の場所で論じられているように、核酸プローブをタグで標識することができる。最も好ましくは、二本鎖の検出は、目的の核酸に向けられた少なくとも 1 つのプライマーを使用して行われる。 P C R のさらに別の実施態様において、ハイブリダイズした二本鎖の検出は、電気泳動ゲル分離とそれに続く色素主体の視覚化を含む。

【 0 0 8 5 】

典型的なハイブリダイゼーション及び洗浄厳密性条件は、一部は、オリゴヌクレオチドプローブのサイズ（すなわち、ヌクレオチドの数の長さ）、塩基組成、及び一価及び二価カチオン濃度に依存する（ Ausbel et al., 1994, eds Current Protocols in Molecular Biology ）。

30

【 0 0 8 6 】

1 つの実施態様において、本発明による目的の核酸の定量的及び定性的プロファイルを決定するためのプロセスは、増幅が、ストリンジェントな条件で目的の核酸のセグメントと特異的にハイブリダイズすることができる標識プローブ、好ましくは標識加水分解プローブを使用して実行されるリアルタイム増幅であることを特徴とする。標識されたプローブは、各増幅サイクルが発生するたびに検出可能な信号を発することができ、各サイクルで得られた信号を測定することができる。

【 0 0 8 7 】

40

リアルタイム P C R などのリアルタイム増幅は当技術分野で周知されており、様々な公知の技術が、本プロセスの実施のための最良の方法で使用されるであろう。これらの技術は、加水分解プローブ、ハイブリダイゼーション隣接プローブ、又は分子ビーコンなどの様々な群のプローブを使用して実行される。加水分解プローブ又は分子ビーコンを使用する技術は、蛍光クエンチャー / レポーターシステムの使用に基づいており、ハイブリダイゼーション隣接プローブは、蛍光アクセプター / ドナー分子の使用に基づいている。

【 0 0 8 8 】

蛍光クエンチャー / レポーターシステムを備えた加水分解プローブは市場で入手可能であり、例えば、Applied Biosystems group（米国）によって商品化されている。 F A M 色素（ 6 - カルボキシ - フルオレセイン ）又は任意の他の色素ホスホルアミダイト試薬な

50

どの多くの蛍光色素を使用することができる。

【0089】

本発明の加水分解プローブのいずれか1つに適用される厳密性条件の中には、約65～75の範囲にあるT_mがある。好ましくは、本発明の加水分解プローブのいずれか1つのT_mは、約67～約70の範囲である。最も好ましくは、本発明の加水分解プローブのいずれか1つに適用されるT_mは約67である。

【0090】

1つの態様において、本発明は目的の核酸に相補的であるプライマーを含み、より具体的には、プライマーは、目的の核酸に実質的に相補的な12以上の連続したヌクレオチドを含むプライマーを含む。好ましくは、本発明で特徴づけられるプライマーは、約12～25ヌクレオチドの核酸配列にハイブリダイズするのに十分に相補的なヌクレオチド配列を含む。より好ましくは、プライマーは、標的フランキングヌクレオチド配列とわずか1、2、又は3ヌクレオチドだけ違う。別の態様において、プライマーの長さは、長さが変化してもよく、好ましくは長さが約15～28ヌクレオチド（例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、又は27ヌクレオチドの長さ）であり得る。

【0091】

1つの実施態様において、本発明の前記1つ以上のアッセイは培養アッセイである。1つの実施態様において、前記培養アッセイはMAPを培養するように特に改変されている。生物学的試料からMAPを増殖させることができる任意の公知の（又はまだ開発されていない）細胞培養の方法が、本発明の方法と共に使用され得ることを、当業者は認識しているであろう。1つの実施態様において、前記培養アッセイは、Pozzato培養アッセイ、TiKa培養アッセイ、及びマイコバクテリア増殖インジケータチューブ（MGIT）培養アッセイからなる群から選択される1つ以上である。

【0092】

1つの実施態様において、前記1つ以上のアッセイはファージ増幅アッセイである。1つの実施態様において、前記ファージ増幅アッセイは、MAPの検出のために最適化されている。生物学的試料からMAP感染を検出することができる公知の（又はまだ開発されていない）任意のファージ増幅アッセイを本発明の方法で使用できることを、当業者は認識しているであろう。

【0093】

キット

本発明はまた、本発明の方法において有用なキットに関する。そのようなキットは、例えば、本発明のバイオマーカー（例えば、抗体、ポリペプチド、及び/又は核酸）を定量的に分析するための材料、本発明のバイオマーカー（例えば、抗体、ポリペプチド、及び/又は核酸）の活性を評価するための材料、及び説明資料を含む、本明細書の別のところに記載される任意の方法で有用な化合物の様々な組合わせを含む。例えば1つの実施態様において、キットは、生物学的試料中の所望の抗体の定量に有用な構成要素を含む。さらなる実施態様において、キットは、生物学的試料中の所望の抗体の活性（例えば、結合活性、遮断活性など）の評価に有用な構成要素を含む。

【0094】

さらなる実施態様において、キットは、それを必要とする被験体から得られる生物学的試料中の本発明のバイオマーカーのレベルが、治療中又は治療後に調節されているかどうかを決定するための説明資料及び構成要素を含む、前記被験体に施される治療の有効性を追跡するためのアッセイの構成要素を含む。様々な実施態様において、本発明のバイオマーカーのレベルが、被験体から得られた生物学的試料において調節されているかどうかを決定するために、バイオマーカーのレベルは、陽性対照、陰性対照、過去の対照、過去の標準などのキットに含まれる少なくとも1つの比較物、又は生物学的試料内の別の参照分子のレベルと比較される。特定の実施態様において、バイオマーカーと参照分子の比率は、治療のモニタリングを支援するために決定される。

【 0 0 9 5 】

検出と診断

様々な実施態様において、本発明は、被験体の疾患又は障害を診断、その予後を評価、又はその発症リスクを評価するためのキット及び／又は方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明は、M A P 感染に関連する疾患又は障害を診断、その予後を評価、又はその発症リスクを評価するために使用できるバイオマーカーに関連するキット及び／又は方法を提供する。他の実施態様において、本発明の方法は、1 種以上の自己免疫疾患又は障害を有する被験体を診断するためのキット及び／又は方法に関する。

【 0 0 9 6 】

1 つの実施態様において、本方法は、被験体から得られた生物学的試料中の少なくとも 1 種のバイオマーカーのレベル（例えば抗体）を検出し、生物学的試料中の前記少なくとも 1 種のバイオマーカーのレベルを少なくとも 1 種のバイオマーカーの比較物と比較し、そして前記少なくとも 1 種のバイオマーカーが、比較物と比較して生物学的試料中で差動的に発現される場合、被験体が疾患又は障害を発症するリスクが高いと判断することを含む。1 つの実施態様において、前記バイオマーカーは、M A P 感染と正又は負に相関する。1 つの実施態様において、前記バイオマーカーは、1 種以上の自己免疫疾患又は障害と正又は負に相関する。1 つの実施態様において、前記バイオマーカーは 1 種以上の抗体を含む。1 つの実施態様において、前記抗体には、特に限定されるものではないが、抗 H s p 6 5、抗 P k n G、及び抗 L 5 P が含まれる。

【 0 0 9 7 】

いくつかの実施態様において、1 種以上の自己免疫疾患又は障害は、M A P 感染に関連している。いくつかの実施態様において、1 種以上の自己免疫疾患には、特に限定されるものではないが、クローン病（C D）、潰瘍性大腸炎（U C）、過敏性腸症候群（I B S）、多発性硬化症（M S）、1 型糖尿病（T 1 D M）、シェーグレン症候群（S S）、全身性エリテマトーデス（S L E）、鬱病、パーキンソン病（P D）、アルツハイマー病（A D）、セリアック病、甲状腺炎、関節リウマチ、ブラウ症候群、乾癬、及び複合性局所疼痛症候群（C R P S）が含まれる。

【 0 0 9 8 】

様々な実施態様において、被験体はヒト被験体であり、任意の人種、性別、及び年齢であり得る。代表的な被験体には、M A P 感染症を発症するリスクのある人、M A P 感染症の疑いがある人、M A P 感染症と診断された人、M A P 感染症に関連する 1 種以上の自己免疫疾患を有すると診断された人が含まれる。

【 0 0 9 9 】

いくつかの実施態様において、前記被験体の前記診断は、被験体が 1 種以上のバイオマーカーの差動的に発現されたレベルを有するかどうかを決定することを含む。いくつかの実施態様において、前記被験体を診断するために少なくとも 2 種のバイオマーカーが必要である。いくつかの実施態様において、前記被験体を診断するために少なくとも 3 種のバイオマーカーが必要である。いくつかの実施態様において、前記被験体を診断するために、少なくとも 1 種のバイオマーカーと少なくとも 1 種の追加の臨床アッセイが必要である。いくつかの実施態様において、前記被験体を診断するために、少なくとも 2 種のバイオマーカーと少なくとも 1 種の追加の臨床アッセイが必要である。いくつかの実施態様において、前記被験体を診断するために、少なくとも 3 種のバイオマーカーと少なくとも 1 種の追加の臨床アッセイが必要である。

【 0 1 0 0 】

1 つの実施態様において、本方法は、多次元非線形アルゴリズムを使用して、生物学的試料中の一連のバイオマーカーのレベル（例えば、抗体）が比較物試料中のレベルと統計的に差があるかどうかを決定することを含む。いくつかの実施態様において、アルゴリズムは、本質的に以下からなる群から引き出される：線形又は非線形回帰アルゴリズム；線形又は非線形の分類アルゴリズム；A N O V A；ニューラルネットワークアルゴリズム；遺伝的アルゴリズム；サポートベクトルマシンアルゴリズム；階層分析又はクラスタリン

10

20

30

40

50

グアルゴリズム；決定樹を使用した階層的アルゴリズム；カーネル主体のマシンアルゴリズム、例えばカーネル部分最小二乗アルゴリズム、カーネルマッチング追跡アルゴリズム、カーネルフィッシャー識別分析アルゴリズム、又はカーネル主成分分析アルゴリズム；ベイズ確率関数アルゴリズム；マルコフブランケットアルゴリズム；委員会ネットワークに配置された複数のアルゴリズム；及び、前進フローティング検索又は逆進フローティング検索アルゴリズム。

【 0 1 0 1 】

1つの実施態様において、本方法は、被験体の生物学的試料中の1種以上のマーカーを検出することを含む。いくつかの実施態様において、被験体の生物学的検査試料中の本発明の1種以上のマーカーのレベルが、比較物中のバイオマーカーのレベルと比較される。比較物の非限定的な例には、特に限定されるものではないが、陰性対照、陽性対照、標準対照、標準値、被験体の予想される正常なバックグラウンド値、被験体の過去の正常なバックグラウンド値、参照標準、参照レベル、被験体がメンバーである母集団の予想される通常のバックグラウンド値、又は被験体がメンバーである母集団の過去の通常のバックグラウンド値が含まれる。1つの実施態様において、比較物は、自己免疫疾患又は障害などの疾患又は障害を有さない被験体から得られた試料中の1種以上のバイオマーカーのレベルである。1つの実施態様において、比較物は、疾患又は障害を有さないことが知られている被験体から得られた試料中の1種以上のバイオマーカーのレベルである。

10

【 0 1 0 2 】

様々な実施態様において、本発明のキット及び/又は方法は、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の感度；少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の特異性；及び/又は少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の正確度を有するバイオマーカーを検出することができる。

20

【 0 1 0 3 】

様々な実施態様において、本発明のキット及び/又は方法は、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の感度；少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の特異性；及び/又は少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の正確度を有する感染性物質の存在を検出することができる。

30

【 0 1 0 4 】

様々な実施態様において、本発明のキット及び/又は方法は、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の感度；少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の特異性；及び/又は少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の正確度で、疾患又は障害を診断することができる。

40

【 0 1 0 5 】

治療

1つの実施態様において、本発明は、被験体におけるMAP感染を検出する方法を含む。1つの実施態様において、本発明は、検出可能なMAP感染症を有する被験体が自己免疫疾患と診断されるべきかどうかを決定する方法を提供する。1つの実施態様において、本発明の方法は、自己免疫疾患を有すると診断された被験体が、MAP感染症に特異的な治療薬で治療されるべきかどうかを決定する。1つの実施態様において、本発明の方法は、自己免疫疾患を有すると診断された被験体が、前記自己免疫疾患に特異的な治療薬で治

50

【 0 1 0 6 】

20

【 0 1 0 7 】

40

【 0 1 0 8 】

50

。局所投与と全身投与の両方が企図される。投与量は、特に限定されるものではないが、選択された組成物、特定の疾患、哺乳動物の体重、体調、年齢、予防又は治療のどちらが実施されるかなど、様々な要因によって異なる。そのような要因は、当技術分野でよく知られている動物モデル又は他の試験システムを使用する臨床家が容易に決定することができる。

【0109】

以下で論じられるように、任意選択的に持続放出のために処方され得る（例えば、マイクロカプセル化を使用して；WO 94 / 07529、及び米国特許第4,962,091号を参照；これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）治療薬を有する1つ以上の適切な単位投与投与形態は、静脈内及び筋肉内経路を含む非経口を含む様々な経路によって投与することができる。製剤は、適切な場合、個別の単位投与形態で便利に提示することができ、製薬でよく知られている方法のいずれかによって調製することができる。そのような方法は、治療薬を液体担体、固体マトリックス、半固体担体、細かく分割された固体担体、又はこれらの組み合わせと一緒にし、次に、必要であれば、生成物を所望の送達システムに導入又は成形する工程を含み得る。

10

【0110】

本発明の方法で使用される治療薬が投与のために調製される場合、それらは、医薬的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤と組み合わせて、医薬製剤、又は単位投与形態を形成し得る。そのような製剤中の総有効成分は、製剤の0.1～99.9重量%を含む。「医薬的に許容し得る」とは、製剤の他の成分と適合性があり、その受容者に有害ではない担体、希釈剤、賦形剤、及び/又は塩である。投与用の有効成分は、粉末又は顆粒として、溶液として、懸濁液、又はエマルジョンとして存在し得る。

20

【0111】

治療薬を含む製剤は、公知の容易に入手可能な成分を使用して、当技術分野で知られている手順によって調製することができる。本発明の治療薬はまた、例えば筋肉内、皮下又は静脈内経路による非経口投与に適切な溶液として処方することができる。

【0112】

治療薬の製剤はまた、水溶液又は無水の溶液、又は分散液の形態、あるいはエマルジョン又は懸濁液の形態をとることができる。

【0113】

従って、治療薬は、非経口投与用（例えば、注射、例えばボラス注射又は持続注入によって）に処方することができ、単位投与形態で、アンプル、充填済みシリンジ、少量注入容器、又は保存料を加えた多回投与容器で提供することができる。有効成分は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、又はエマルジョンなどの形態をとることができ、懸濁剤、安定剤、及び/又は分散剤などの配合剤を含むことができる。あるいは、有効成分は、使用前に適切なビヒクル、例えば無菌のパイロジェンフリー水で復元するために、無菌固体の無菌単離によって、又は溶液からの凍結乾燥によって得られる粉末形態であり得る。

30

【0114】

必要な有効量は複数の投与単位の投与により達成されるため、各投与形態の個々のエアロゾル投与に含まれる有効成分又は成分の単位含有量は、それ自体が特定の適応症又は疾患を治療するための有効量を構成する必要はない。さらに有効量は、投与形態中の用量より少ない用量を使用して、個別に又は一連の投与のいずれかで達成することができる。

40

【0115】

本発明の方法で使用される製剤は、任意の成分として、医薬的に許容し得る担体、希釈剤、可溶化剤又は乳化剤、及び当技術分野で公知のタイプの塩を含み得る。本発明の製剤に有用な担体及び/又は希釈剤の特定の非限定的な例には、水及び生理学的に許容される緩衝化生理食塩水、例えばリン酸緩衝化生理食塩水（pH 7.0～8.0）が含まれる。

【0116】

治療薬は、個々の治療用有効成分として、又は治療用有効成分の組み合わせのいずれかとして、医薬品と組み合わせて使用するために利用可能な任意の従来の手段によって、製

50

剤化及び投与することができる。これらは単独で投与することができるが、一般的には、選択された投与経路及び標準的な製薬慣行に基づいて選択された医薬担体と共に投与される。

【0117】

一般に、水、適切な油、生理食塩水、デキストロース水溶液（グルコース）、及び関連する糖溶液、並びにプロピレングリコール又はポリエチレングリコールなどのグリコールは、非経口溶液に適した担体である。非経口投与用の溶液には、有効成分、適切な安定剤、及び必要であれば緩衝物質が含まれる。単独の又は組み合わせた重硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、又はアスコルビン酸などの抗酸化剤は、適切な安定剤である。また、クエン酸とその塩、及びエチレンジアミン四酢酸ナトリウム（EDTA）も使用される。さらに、非経口溶液には、防腐剤、例えば塩化ベンザルコニウム、メチルパラベン又はプロピルパラベン、及びクロロブタノールを含めることができる。適切な医薬担体は、この分野の標準的な参考書であるRemington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。

10

【0118】

治療薬の有効成分は、哺乳動物、特にヒトでの使用に適した医薬的に許容し得る組成物に懸濁されるように製剤化することができる。そのような製剤には、アジュバント、例えば米国特許第4,082,735号、第4,082,736号、第4,101,536号、第4,185,089号、第4,235,771号、及び第4,406,890号に記載されているムラミルジペプチド誘導体（MDP）又はその類似体の使用が含まれる。有用な他のアジュバントには、ミョウバン（Pierce Chemical Co.）、脂質A、トレハロースジミコレート及びジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド（DDA）、フロイントアジュバント、及びIL-12が含まれる。他の成分には、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックポリマー（Pluronic（登録商標））、非イオン性界面活性剤、及び代謝性油、例えばスクアレン（米国特許第4,606,918号）が含まれ得る。

20

【0119】

さらに、標準的な製剤方法を使用して、作用の持続時間を制御することができる。これらは当技術分野で公知であり、制御放出調製物が含まれ、適切な高分子、例えばポリマー、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、又は硫酸プロタミンを含むことができる。高分子の濃度及び取り込み方法を制御して、放出を調整することができる。さらに、この薬剤は、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ（乳酸）、又はエチレンビニルアセレートコポリマーなどの高分子材料の粒子に取り込むことができる。取り込まれることに加えて、これらの薬剤はまた、化合物をマイクロカプセル中に捕捉するために使用することができる。

30

【0120】

従って、本発明の方法で使用される医薬組成物は、様々な経路を介して及び哺乳動物体内の様々な部位に送達されて、特定の効果を達成することができる（例えば、Rosenfeld et al., 1991; Rosenfeld et al., 1991a; Jaffe et al., 前出; Berkner, 前出、を参照）。投与のために複数の経路を使用することができるが、特定の経路が別の経路よりも迅速かつより効果的な反応を提供できることを、当業者は認識しているであろう。局所的又は全身的送達は、体腔への薬剤の塗布又は点滴注入、エアロゾルの吸入、又は吹送を含む投与によって、又は筋肉内、静脈内、腹膜、皮下、皮内、並びに局所投与を含む非経口導入によって達成することができる。

40

【0121】

治療薬の有効成分は単位投与形態で提供することができ、各投与単位、例えば小さじ一杯、錠剤、溶液、又は坐剤は、単独で、又は他の活性剤と適切に組み合わせられて、所定量の組成物を含む。本明細書で使用される「単位投与形態」という用語は、ヒト及び哺乳動物被験体の単位投与量として適切な物理的に別個の単位を指し、各単位は、単独で、又は他の活性剤と組み合わせて、本発明の組成物の所定量を所望の効果を生み出すのに計算された十分な量で、適宜、医薬的に許容し得る希釈剤、担体、又はビヒクルと一緒に含有す

50

る。本発明の単位投与形態の規格は、達成される具体的な効果、及び具体的な宿主における医薬組成物と組合わされる具体的な薬物動力学に依存する。

【0122】

実験例

本発明は、以下の実験例を参照することによりさらに詳細に説明される。これらの例は、例示のみを目的として提供されており、特に他に明記しない限り、限定することを意図したものではない。従って本発明は、決して以下の例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになる任意の及びすべての変更態様を包含すると解釈されるべきである。

【0123】

さらに説明しなくても当業者は、前述の説明及び以下の例示的な例を使用して、本発明を作成及び利用し、特許請求された方法を実施することができると考えられる。従って、以下の実施例は、決して本開示の残りの部分を制限するものとして解釈されるべきではない。

【0124】

実施例1：培養法、抗体による方法、及びファージ増幅法はMAPを可変的に検出する

2017年3月にTemple大学で開催されたMAP会議からのコンセンサス推奨に従って、ヒト血液試料からMAPを検出、分離、及び/又は培養することができる代替アプローチを調べるために、本例の試験が行われた(Kuenstner, J.T., et al., Front Public Health, 2017, 5: 208)。この試験の主な目的は、試験ヒト集団における生きた培養可能なMAP細菌血症の程度を評価し、培養された細菌を明確に特定し、様々な自己免疫疾患を有する数人の非CD被験者を含む対照者と比較して、CD患者におけるMAPの相対的優位性を決定することであった。副次的な目標には、異なる研究室で開発された2つの培養主体のアプローチ(TiKa培養とPozzato培養)である迅速なファージ増幅検出法と、既存のMGIT培養法、及び他のいくつかの研究室で開発された一連のMAP特異抗体検査の並行評価が含まれていた。最後に、結果の信頼性の程度を確立するために、最初に陽性のMAP検出を示した選択された被験者は、1年後にも繰り返し検査でフォローアップされた。

【0125】

本実施例の材料及び方法をここで本明細書に記載する。

【0126】

試験計画と参加者

試験プロトコールは、2017年10月20日にTemple大学IRB(IRBプロトコール#24790)によって精査された。この症例-対照試験には、201人の被験者が含まれ、CD患者が61人で非CD対照者が140人であった。非CD対照者群には、UC及びその他の様々な自己免疫疾患を有する16人の患者が含まれた。この試験の最初の159人の被験者は、Winter Park, Floridaの消化器病専門医であるIra Shafraan博士の業務から募集された。さらに、42人の被験者は、Human Paratuberculosis FoundationのWebサイト(www.humanpara.org)から募集され、第2グループの採血がニューヨーク市で行われた。2018年5月から8月にかけて、192人の被験者に対して1回の採血が行われた。9人の被験者について、2019年8月に2回目の血液試料を採取し、一過性又は持続性のMAP感染があるかどうかを調べた。これらの被験者の選択は、最初のMAP培養又はファージアッセイで陽性であったことと、1年後にPhiladelphiaで2回目の試料を提供できたかどうかに基づいている。これらの被験者の1人は慢性甲状腺炎と過敏性腸症候群(IBS)を有し、3人は慢性甲状腺炎を有し、4人の被験者は無症候性で健康、そして1人はIBSを有した。

【0127】

診断と診断の分類

被験者は、同意書と、病歴及びBCG状態に関する質問票に記入した。CD又はUCの患者は、登録中に追加の質問票にも記入して、修正されたハーベイブラッドショー指数(

10

20

30

40

50

Harvey Bradshaw index : H B I) について評価された。すべての被験者情報は、標準的な医療行為に従って機密に保たれた。

【 0 1 2 8 】

手順

登録した 2 0 1 人の参加者全員から、血液試料が E D T A 採血管に採取された。末梢血白血球 (P B L) / バッフィーコート検体が全血試料から調製され、次に宅配便で、培養を行う各研究室 (それぞれ、英国ロンドンとベルファストの Bull and Grant 研究室、及び米国フロリダ州の Naser 研究室) に送付された。Bull and Grant 研究室への宅配便は、申請内容が国際税関規定に適合していなかったため、配達時間は 3 ~ 7 日であり、一方 Naser 研究室への宅配便の配達時間は 1 日であった。血液試料から血漿を採取し、後で血清学的検査を行うまで - 8 0 で凍結した。すべての試料は試験番号によって識別され、研究室の科学者には、すべての臨床情報、診断内容、及び個人情報を知られなかった。

10

【 0 1 2 9 】

M G I T 培養

E D T A バッフィーコートからの末梢血白血球 (P B L) を、補足物 (上記で詳述した O A D C 及びマイコバクチン J) を含む B A C T E C M G I T P a r a T B 培地に接種し、3 7 で 6 か月間インキュベートした。インキュベーション後、M G I T 培養物を遠心分離し、ペレットから D N A を抽出し、記載されているようにネステッド I S 9 0 0 P C R を実施した (Naser, S.A., et al., Lancet, 2004, 364: 1039-1044)。すべての P C R 陽性 M G I T 培養に継代培養を行い、純粋培養で M A P の回復を試みた。

20

【 0 1 3 0 】

T i K a 培養

Middlebrook 7H9 輸送培地で輸送されたバッフィーコートを、8 0 0 g で 1 0 分間、室温で遠心分離し、ペレットを 1 0 m l の新たに調製した T i K a - K i C (Bull, T.J., et al., Front Microbiol, 2016, 7: 2112) 除染カクテルに再懸濁し、次に 3 7 で 2 0 ~ 2 4 時間振盪 (1 5 0 r p m) しながらインキュベートした。試料を室温で 2 5 0 0 g で 1 5 分間遠心分離し、ペレットを 1 m l の回収培地 (P o z z a t o 培養) + T i K a 補足物 A (1 μ g / m l)、M 1、M 2、及び M 3 (1 μ l / m l) に再懸濁し、3 7 で 2 日間インキュベートした。次に試料を、P A N T A + マイコバクチン J (2 μ g / m l) 及び T i K a 補足物 A (1 μ g / m l) を補足した M G I T 培養チューブに添加し、3 7 で最大 4 か月間インキュベートした。目に見える増殖を示した培養物を室温で 2 5 0 0 g で 1 0 分間で遠心分離し、ペレットを 2 4 ウェルプレート中の固体 P o z z a t o 培養 (1 . 5 % 寒天) に継代培養し、次に T i K a 補足物 A (1 μ g / m l) を含む半固体 P o z z a t o 培養 0 . 7 5 % 寒天を重ねし、ガス透過膜で密封し、5 % C O 2 中 3 7 でインキュベートした。既に記載された (Bull, T.J., et al., J Clin Microbiol, 2003, 41: 2915-2923) ように、M A P D N A をコロニーから抽出した。I S 9 0 0 及び F 5 7 P C R 陽性バイオマスが得られた場合、試料は M A P 陽性で見なされた。

30

【 0 1 3 1 】

P o z z a t o 培養及びファージ増幅アッセイ

P B L 試料を遠心分離し (2 5 0 0 g で 1 5 分間)、1 0 % O A D C (Difco) 及び 2 m M C a C l 2 (Sigma) を補足した 1 m l の M i d d l e b r o o k 7 H 9 プロス (Difco) に再懸濁した。ファージ増幅アッセイ及び P o z z a t o 培養を、既に記載されたように実施した (Swift, B.M., et al., Virulence, 2016, 7: 779-788; Pozzato, N., et al., J Microbiol Methods, 2011, 84: 413-417; Grant, I.R., et al., J Dairy Sci, 2017, 100: 9723- 9735; Foddai, A., et al., Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 3896-3902)。簡単に説明すると、Pozzato et al. (Pozzato, N., et al., J Microbiol Methods, 2011, 84: 413-417) によって説明されているように、室温で 1 5 分間インキュベートし、完全にボルテックス混合した後、5 0 0 μ l の各 P B L 試料を、4 m l の改変 7 H 9 培地、P A N T A 抗生物質補足物、及びマイコバクチン J を含むスクリーキャップガラス培養チューブに接種したが、卵黄は添加しなかった (「 P o z z a t o 培養」

40

50

と呼ばれる) (Grant, I.R., et al., J Dairy Sci, 2017, 100: 9723-9735)。各 P B L 試料の 2 回目の 5 0 0 μ l を、最適化されたファージ増幅アッセイ (Foddai, A., et al., Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 3896-3902) に供し、次のように行なった: 1 0 8 個の D 2 9 マイコバクテリオファージを各 1 m l の検査試料に加えて、存在する M A P 細胞に感染させ、そして試料を 3 7 $^{\circ}$ でインキュベートした。2 時間後、外部シードファージを殺ウイルス剤 (最終濃度 1 0 m M の硫酸第一鉄アンモニウム) で 1 0 分間処理して不活化し、次に試料を 5 m l の 7 H 9 / O A D C / C a C l₂ (2 m M) プロスで希釈した。

【 0 1 3 2 】

ファージの添加から合計 3 . 5 時間経過するまで試料のインキュベーションを進め、その時点で試料全体を、シャーレ中のスメグマ菌 (Mycobacterium smegmatis) m c² 1 5 5 センサー細胞及び 5 m l の溶融 M i d d l e b r o o k 7 H 9 寒天培地に播種した。固化したら、寒天プレート を 3 7 $^{\circ}$ で一晩インキュベートし、翌日、試料中の生きたマイコバクテリアを示すであろう透明ゾーン (「プラーク」) の証拠がないか調べた。1 S 9 0 0 及び F 5 7 P C R 陽性バイオマス (ヘロルド卵黄 - マイコバクチン) (H E Y M) 上のプロスペレット又はコロニー) が得られた場合、P M L 試料は M A P 培養陽性に見なされた。

【 0 1 3 3 】

M A P 抗体アッセイ

各患者の血漿試料を、I D E X X パラ結核菌 (Mycobacterium paratuberculosis) 抗体検査キットを使用してアッセイして、ウシの血清、血漿、及び乳汁中の M A P に対する抗体を検出した。このキットは、既に記載されている (Bernstein, C.N., et al., J Clin Microbiol, 2004, 42: 1129-1135) ように、ヒトでの使用に適合するように改変された。ヒト血漿対照の光学密度 (O D) 値を使用して、試料 / 陽性 (S / P) 比を計算して、アッセイを解釈した。

【 0 1 3 4 】

P i p A 及び P k n G E L I S A 検査

感染中に M A P によって分泌される病原性因子に対する抗体を、既に記載されたように血漿検体で測定した (Bach, H., et al., Scand J Gastroenterol, 2011, 46: 30-39; Bach, H., et al., Biomed Res Int, 2018, 2018: 1450828)。これらの抗原には、プロテインチロシンホスファターゼ (P t p A) 及びプロテインキナーゼ G (P k n G) が含まれていた (Bach, H., et al., Biomed Res Int, 2018, 2018: 1450828; Bach, H., et al., Cell Host Microbe, 2008, 3: 316-322)。組換え P t p A 及び P k n G は、スメグマ菌で、公開されている手順に従って産生された (Bach, H., et al., Biomed Res Int, 2018, 2018: 1450828; Bach, H., et al., Cell Host Microbe, 2008, 3: 316-322)。

【 0 1 3 5 】

H s p 6 5 抗体アッセイ

血液からの H s p 6 5 抗体は、既に記載された直接 E L I S A アッセイによって測定された (Zhang, P., et al Microorganisms, 2019, 8)。アビウム菌 (Mycobacterium avium) hominissuis 亜種 (M A H) の組換え H s p 6 5 は GenScript Corp (<https://www.genscript.com/>) で契約研究により産生され、9 6 ウェルプレートのコーティングに使用された。

【 0 1 3 6 】

全ゲノム配列決定 (W G S)

主に T i K a 培養を使用して分離された、一人の被験者からの 1 つの M A P 分離株の全ゲノム配列が決定された。簡単に説明すると、P o z z a t o 半固体培養から 3 つのコロニーを T E x 1 緩衝液 (トリス塩酸 - E D T A, p H 8, Sigma, UK) で 1 回洗浄し、T E x 1 中で 9 8 $^{\circ}$ で 3 0 分間加熱して死滅させた後、g D N A を QiaPrep D N A キット (Qiagen, UK) を製造元の指示に従って使用して抽出した。全ゲノム配列決定法は既に記

10

20

30

40

50

載された通りであった (Witney, A.A., et al., BMC Med, 2016, 14: 46)。DNA 濃度と完全性は、それぞれゲノムスクリーンテブを使用する Qubit High Sensitivity DNA アッセイ (Life Technologies, UK) と Agilent TapeStation 2100 を使用して決定した。ライブラリの調製と試料の指数作成は、NexteraXT DNA を製造元の指示に従って行い、その後、ビーズ主体の正規化と他のライブラリを用いるプーリングにより配列決定した。配列決定は、Illumina 3 ケミストリーを使用して $2 \times 300 \text{ bp}$ の末端が対になったリードを使用して行い、Illumina MiSeq Sequence で配列決定を行い、リードを、bwa mem v0.7.3a-r367 (Li, H., arXiv, 2013, 1303.3997v2 [q-bio.GN]) を使用して M A P 参照ゲノム (RefSeq 受け入れ番号: NC_002944.2) にマッピングし、アラインメントを分類し、samtools v0.1.19 (Li, H., et al., Bioinformatics, 2009, 25: 2078-2079) で重複を削除し、及び部位統計量は samtools mpileup を使用して生成された。集められたゲノムは、NCBI Sequence Viewer (Version 3.36.0, NCBI, USA) 及び Snapgene (Version 4.3.11, GSL Biotech, USA) を使用して他のマイコバクテリアに対してマッピングされた。

【0137】

データ分析と統計的手法

データは、カテゴリ変数の頻度と割合、及び連続変数の平均 $\pm$ 標準偏差 (SD) 及び / 又は中央値 (範囲又は四分位範囲) として表された。潜在的な危険因子又は目的のアッセイ方法と選択された疾患状態 (すなわち、CD 又は CD + UC) との関連は、2 群についてのフィッシャーの直接確率検定と連続変数についてのワルド (Wald) 検定を使用して評価された。他の潜在的な危険因子、又は年齢や性別などの交絡変数が回帰モデルで調整されるときに、選択された疾患について、異なるアッセイ方法 (培養、抗体、又はその両方) を使用して、疾患との関連又は疾患の予測可能性について調査するために、多変量ロジスティック回帰分析を行なった。患者の転帰を予測する際のロジスティック回帰モデルに含めるための連続共変量又はアッセイ変数のカットオフ値を定義するために、カットオフを選択して、ユークリッド距離法に基づく最適な分類基準を達成した。連続変数の連続バージョンと二分バージョンの両方が、段階的変数選択手順の候補変数としてロジスティック回帰モデルに含まれた。0.10 の滞在確率と 0.25 のエントリー確率とを使用して、最終的な回帰モデルに到達した。従って、病状について有意でない予測能力を持つ変数は多変量ロジスティック回帰モデルから除去して、モデルを簡潔に保った。年齢と性別は、事前にすべての回帰モデルに含まれていた。CD 又は CD + UC の生のオッズ比と調整されたオッズ比の両方、及びこれらの 95% 信頼区間 (CI) は、適宜報告された。0.05 未満の P 値は統計的に有意であると見なされた。SAS バージョン 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) をすべてのデータ分析に使用した。

【0138】

本実施例の結果を本明細書に記載する。

【0139】

試験のサブグループごとの被験者群のデータを図 1 に示す。データは非対称であるため、平均年齢と標準偏差に加えて、患者年齢の中央値と年齢範囲が表示される。このアプローチは、年齢データなどの非対称分布に適している。この試験では、非 CD 患者は CD 患者よりもわずかに高齢であり (中央値: 57.5 歳対 47 歳)、同様の性別構成 (59% 対 54% の女性) を有するようであった。

【0140】

生 M A P 細菌血症の培養法の分析感度 (病気を検出する検査の能力である臨床感度ではなく、生物を検出する方法の能力) の最高値から最低値への順序は次のとおりである: 1) P o z z a t o 培養 (124 / 201、すなわちすべての被験者の 62%、35 / 61、すなわち CD 患者の 57%)、2) ファージアッセイ (113 / 201、すなわちすべての被験者の 56%、28 / 61、すなわち CD 患者の 46%)、3) T i K a 培養 (64 / 201、すなわちすべての被験者の 32%、22 / 61、すなわち CD 患者の 36%)、及び 4) M G I T 培養 (36 / 201、すなわちすべての被験者の 18%、15 / 6

1、すなわちCD患者の25%)。これらの結果は図2に要約されている。結果は各カテゴリーにおける被験者の数と%として報告され、CD及びUCのみの患者についての被験者数は括弧内に示されている。単一の星印(*)は、2人のCD患者がUCと診断されたことを示す。二重星印(**)は、非CDカテゴリーに14人のUCのみの被験者が含まれていたことを示す。短剣(†)は、2人の被験者のTiKa培養の結果が欠如していることを示す。

【0141】

3つの液体培養法(MGIT、TiKa、Pozzato)の結果の相互関係を図3に示す。星印(*)は、Bull研究室からの「汚染された」結果の試料が2つあったことを示す。追加のデータは、CD患者と非CD対照者で観察されたブランクの数を示している(図4と図5)。

10

【0142】

図6は、臨床的に診断されたCD患者と目的の様々なカテゴリー変数との関連を示す。注目すべきことに、より若い年齢層(52歳)は、より高齢の年齢層(>52歳)と比較してCDを有する可能性が高いようであった(OR(95%CI): 2.66(1.42、4.99); $p = 0.003$)。すべてのアッセイ法の中で、Hsp65抗体アッセイが陰性の0.74未満の場合、CDと非CDの症例を区別するように見えた($p = 0.06$ 及び0.02、表3を参照)。図7は、被験者間のすべての培養及び血清学的方法によって検出されたMAPの比較を示す。

【0143】

20

被験者のMAPの存在と臨床診断、すなわちCD又はCD+UC対(非CD、又は非CDでもUCでもない)を用いて、培養法及び血清学的方法との独立した関係を調べるために、関連分析用に多変量ロジスティック回帰モデルを使用した。MAP培養及び/又は抗体データとの関連に関する重要な知見は、CDを有するか又はCD若しくはUCのいずれかを有するオッズ比(OR)とその95%信頼区間(CI)及びp値を使用して提供される。すべての培養方法のORデータは、図8に年齢と性別を調整して示されており、これは、図6に含まれている未調整/限界オッズ比データよりも堅固である。結果は6つのロジスティック回帰モデル(3つのアッセイ方法変数包含設定×2つの選択された疾患(CD又はCD+UC))から報告され、すべて年齢(52対>52)及び性別で調整されている。NSは有意ではないことを示し、二重短剣(†)は、Hsp65抗体の0.2単位の増分についてのOR及び95%CIを示す。

30

【0144】

関連するp値は0.037であり、CD患者に対応するMAP陽性のMGIT培養についてOR(95%CI)は2.36(1.06、5.28)であり、この関連するp値は、この培養法の予測力を支持する。これは、UC被験者がCD被験者と一緒に分析に含まれた場合にも当てはまり、この分析の結果は、MGIT培養が陽性の被験者を陰性の被験者と比較した場合、CD+UCを有することについて、p値が0.006であり、調整済みOR(95%CI)が3.19(1.40、7.23)であった。

【0145】

TiKa培養は、陽性MAP培養について有意な関連(データは含まれていない)を示したが、TiKa、ファージアッセイ、及びPozzato培養法は0.10で、統計的に達しなかった。従って、前述の方法では、我々の試験でCDの存在を予測する最終モデルは作成されなかった。それにもかかわらず、ファージアッセイとPozzato培養法は、非CD/UCコホートで高率のMAP感染を検出したが、TiKa培養は、MGIT培養法で示されたものと同様の逆の傾向を示した(図2を参照)。

40

【0146】

いくつかの血清学的検査の中で、CDの存在との最も高く唯一の有意な相関はHsp65抗体で発生した。カットオフ値0.74で、この方法はCD患者と非CD被験者を区別する最高の能力を有していた(Hsp65Ab>0.74とHsp65Ab≤0.74を比較してCDを有する調整済みOR(95%CI): 2.40(1.25、4.61);

50

p 値 0 . 0 0 9 ; 図 8) 。 P k n G 抗体もまた、非 C D / U C 被験者と比較して、我々の患者で C D / U C の存在と有意な負の相関があった (P k n G 陰性と陽性を比較して C D / U C を有する調整済み O R (9 5 % C I) : 2 . 1 8 (1 . 1 2 、 4 . 2 3) ; p 値 : 0 . 0 2 2) 。スピアマンの相関は、H s p 6 5 抗体が H B I と弱い相関を示し (スピアマン係数 = 0 . 2 8 、 p = 0 . 0 3) 、及びそのようなデータを有していた 6 0 人の C D 患者の間で、ファージブランク数は H B I と非常に弱い相関を示した (スピアマン係数 = 0 . 1 2 、 p = 0 . 3 7) 。試験集団の H B I の範囲は限られており、5 を超える H B I を有している患者はほとんどいなかったことは注目に値する。

【 0 1 4 7 】

M G I T 培養と H s p 6 5 抗体アッセイは、年齢と性別について調整 (及び後者の場合は互いに) した後では、それぞれ独自の (培養又は抗体) カテゴリーで及び培養と抗体を組み合わせたセットで独立して、試験集団の C D 患者と非 C D 被験者の最良の識別因子であった (図 8 を参照) 。3 つの培養方法すべてを 1 つのカテゴリーに組み合わせると、すなわち、3 つの培養方法のいずれかが陽性である場合は培養が陽性であり、そうでない場合は陰性であるとする、このカテゴリーとファージアッセイの間の全体的な一致は、正確な 9 5 % C I (6 8 % 、 8 0 %) で 7 5 % の割合を達成した。2 つの診断方法間の一致のカッパ統計 (S E) は、0 . 2 6 (0 . 0 8) で 9 5 % C I は (0 . 1 1 、 0 . 4 2) であり、一致の強さは公正であることが示されている (図 9) 。

【 0 1 4 8 】

生 M A P 細菌血症は、C D や U C のいずれでもない自己免疫状態の患者でも検出された : 1) P o z z a t o 培養 (3 3 / 5 7 、すなわち 5 8 %) 、2) ファージアッセイ (3 6 / 5 7 、すなわち 6 3 %) 、3) T i K a 培養 (1 9 / 5 6 、すなわち 3 4 %) 、及び 4) M G I T 培養 (9 / 5 7 、すなわち 1 6 %) 。最初に M A P 培養陽性又はファージアッセイが陽性であった 9 人の被験者はすべて、1 年後に得られた 2 回目の血液試料の 2 回目のファージアッセイで陽性であった。

【 0 1 4 9 】

I B S を有する一人の被験者の血液から回収された 1 つの生きた分離株の明確な同定は、全ゲノム配列決定 (W G S) によって、及び大規模なゲノムバンクの M A P 分離株と比較された組み立てられた連続配列によって、M A P として確認された。分離株ファージ、T i K a 培養分離株、及び W G S 樹状図を、それぞれ図 1 0 、図 1 1 、及び図 1 2 に示す。

【 0 1 5 0 】

本実施例の結論をここに記載する。

【 0 1 5 1 】

この例は、生きた M A P 菌が非常に多くの人の血液中に存在し、この感染状態が持続する可能性があることを明確に示している。生 M A P 細菌血症は、C D 、U C 、U C を有する C D 、その他の様々な自己免疫疾患の患者、又は無症候性の被験者を含む、検査されたグループのいずれに対しても排他的ではなかった。

【 0 1 5 2 】

この試験では、3 つの培養方法とファージ主体の方法 + 培養方法とを比較し、各方法の使用に関する専門知識を備えた様々な研究所で処理された血液バツフィーコートに分注試料で、ブラインドで及び並行して検査した。すべての M A P 培養陽性は、ネステッド I S 9 0 0 P C R (Naser, S.A., et al., Lancet, 2004, 364: 1039-1044) 、又は又は I S 9 0 0 プラス M A P 遺伝子 F 5 7 P C R (Bull, T.J., et al., J Clin Microbiol, 2003, 41: 2915-2923 を使用する検証済み特異的分子同定法により同定及び確認された。同じ試料のアリコートを各方法で試験したが、すべてのラボで同じ方法を実行するのに十分な資金がなかった。選択された方法には、Naser (Naser, S.A., et al., The Open Inflammation Journal, 2009, 2: 22-23) によって提唱されたヒト P B L の M A P について以前使用された M G I T 培養方法と、2 つの新しい培養方法 [T i K a 除染と培養 (Bull, T.J., et al., Front Microbiol, 2016, 7: 2112) 及び 7 H 9 + プロスでの培養 (ここでは P o z z a t o 培養と呼ぶ ; Pozzato, N., et al., J Microbiol Methods, 2011, 84: 4

10

20

30

40

50

13-417; Grant, I.R., et al., J Dairy Sci, 2017, 100: 9723- 9735)] が含まれた。M G I T法を使用したバツフィーコート白血球画分からのM A Pの培養単独は、非C D対照者と比較してC D患者との相関の上昇を示した。他の2つの方法(T i K a培養及びP o z z a t o培養)でも、かなりの数の患者からM A Pを培養したが、いずれの群間にも有意差はなかった。以前のメタ分析(Feller and Abubakar, 2007)は、対照者と比較してC D患者からの試料で分子検出方法を使用すると、高率のM A P検出を示した。

【 0 1 5 3 】

培養の結果は全体として、この結論を完全には支持していない。しかし、これらの以前の分析は、主にランダムに標的化された胃腸粘膜生検からのデータに基づいていたが、本試験では、不一致を説明できる可能性のある血液試料を検査した。さらに及び再度並行して、別の研究室で盲検化された試料のアリコートについて、生きたM A Pを検出するように設計された最適化ファージ増幅アッセイが含まれた(Foddai, A., et al., Appl Environ Microbiol, 2009, 75: 3896-3902)。この迅速な培養主体のノファージ増幅アッセイは、マイコバクテリア特異的ファージを取り込んで増幅することができ、その後バーストして子孫ファージを放出する、試料中に存在する生きたマイコバクテリア細胞のみを検出する。放出されると、これらはブランクアッセイされ、ブランク(元の溶解されたマイコバクテリアを含む)は種特異的P C Rに供され、48時間以内にM A Pの存在を検出及び定量することができる。この試験では、ファージが検査された試料のアリコートをさらにP o z z a t o培地でインキュベートし、再検査して、一定期間の増殖後に陽性を確認した。この方法は、2日以内に試料中の生きたマイコバクテリアを検出することができ、重要なことに、最初はM A P陽性であり1年後に追跡できた9人の患者のうちすべてが、この時間後に血液中のM A Pが陽性のままであったことを示すことができた。

【 0 1 5 4 】

この結果は、両方の代替培養アプローチ(T i K a培養及びP o z z a t o培養)が、被験者グループに関係なく、生きたM A Pを参照M G I T法よりも効果的に培養できたことを示す。これらの知見は、M G I T P a r a T B培地の組成が、ヒトP B LからのM A Pの分離に最適ではないことを示唆している。M G I T培養アプローチは、非C D対照者と比較して、C D患者のP B Lからより多くのM A P陽性培養物をもたらした可能性がある(C D患者の以前のヒトP B L検査から予測される結果(Naser, S.A., et al., Lancet, 2004, 364: 1039-1044; Naser, S.A., et al., The Open Inflammation Journal, 2009, 2: 22-23)) が、T i K a培養及びP o z z a t o培養により、C D患者と同様の又はより多くの非C D対照者が生きたM A Pについて陽性であると検査された。この観察結果の1つの説明は、血液中に持続するM A P表現型が完全に増殖能力のある生理学的状態にないか、又は他のマイコバクテリア種で発生するように休眠期に入ったことである。これはおそらくこれらの表現型の誘導に、より関与している。従って、増殖が起こる前に、何らかの形のM A Pの蘇生が必要かも知れない。T i K aプロスとP o z z a t oプロスの組成が異なることが、M A P蘇生能力のこの不一致の理由かも知れない。どちらもM i d d l e b r o o k 7 H 9に基づいているが、T i K aシステムは、T i K a補足P o z z a t o培地と、それに続くT i K a補足M G I T培養での長期培養を含み、一方、本試験で使用したP o z z a t o培地では、M A Pを牛の糞便から分離するために既に記載されているように(Pozzato, N., et al., J Microbiol Methods, 2011, 84: 413-417) 卵黄を添加することはせず、インキュベーション中に培養物の光学密度をモニターできるようにした。この場合、必須成分を決定するためにさらなる作業が必要である。

【 0 1 5 5 】

各研究所での試料検査間のさらなる違いは、培養時のP B Lの年齢であった。試料の輸送時間が異なり、それが、供された条件に影響を及ぼした可能性がある。通過にかかる時間が長くなったために、P B L試料中のM A P細胞の生存が減少した可能性がある。これは、検査時に、より古いP B L試料についてファージアッセイで得られたブランク数の有意差によって証明される(図13)。おそらく、P B L検査を数日間遅らせて、輸送培地(O A D Cが追加されたM G I T培地)でM A P細胞を蘇生させるか、P B L細胞を溶解

してMAP細胞を培養に利用できるようにすることが有益であろう。

【0156】

本実施例の結果は、基礎疾患に関係なく、かなりの割合の被験者がMAP細菌血症を有し、複数の培養方法で陽性であることを示している。この知見には3つの説明が考えられる：1) 生きたMAPは摂取された食物から受動的に獲得され、食物摂取の直後に宿主によって排除されない。食事で消費され、消化過程を生き延び、IBDの「漏れやすい腸」を通過して血中に入る他の生物は、これらの宿主中で持続的な生細菌血症を引き起こさないため、この説明はありそうにない；2) MAPが存在し、持続性で、生きているが、ヒト宿主で病気を引き起こすことはない。なんらかの影響を与えることなく、公知の病原体による持続性細菌血症の既知の例がないため、この説明もありそうにない；3) MAPは持続的に一部の宿主に感染し、病原体が、一部の感受性の高いヒト宿主の疾患過程に影響を与える可能性がある。特定の科学理論に拘束されることはないが、3番目の説明は最も可能性が高いと言われており、MAPが人畜共通感染症の病原体であることを示唆している。この場合、ヒトの感染は、少数の動物(10%)のみが進行した臨床的JDを発症し、大部分は非顕性持続感染を示す、牛の公知の病原性状態に似ている(Magombedze, G., et al., PLoS One, 2013, 8: e76636)。

10

【0157】

以前の研究では、無症候性のマイコバクテリア感染症を有する可能性のある明らかに健康な個人の割合が示された。免疫認識試験(Zhang, P., et al., Microorganisms, 2019, 8)では、288人の健康な血液ドナーの2.8%が、マイコバクテリア熱ショックタンパク質65に対する抗体(抗Hsp65抗体)が陽性であったが、109人のCD患者の67.9%とシェーグレン症候群患者の85.7%が抗Hsp65抗体に陽性であり、MAP感染と免疫提示及びプロセッシングが一般的であることを示唆している。

20

【0158】

この実施例は、ヒトにおけるこの生物の役割を完全に調べるために、さらに詳細なMAP研究が緊急に必要であることを示している。明らかなさらなる研究分野は、MAPを標的にして排除しようとする管理された臨床試験に適用されるより良い治療法の発見である(Graham, D.Y., In Proceedings of Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course (ACG), San Antonio, Texas, October 25-30, 2019)。MAP培養及びファージアッセイの研究は、これらの方法の専門家によって、病因が不明な他の疾患で実施されるべきである。最後に、最良事例の最小限の手段として、MAPが人畜共通感染症の病原体である可能性は、世界中の政府によって、食品や環境に広がるJDとMAPをより適切に管理するための公衆衛生対策を促すはずである。

30

【0159】

実施例2：抗体バイオマーカーは、健康なドナーと比較した場合、CDを確実に予測する

前の実施例では、すべてのドナーが胃腸病学施設から募集された。そのため、1種以上の炎症性腸疾患の診断に関係なく、ドナーの健康状態は全体的にあまり良くなかった。CDのバイオマーカーとしてのHsp65抗体の予測力をよりよく理解するために、実施例1の61人のCDドナーからの試料を、288人の健康な赤十字血液ドナー(対照)の試料と比較した。図14Aに示すように、対照者と比較して、CDドナーのHsp65抗体のレベル間には大きな有意差があった(p 値 <0.00001)。さらに、ロジスティック回帰により、 0.9912341 のC統計量が得られた(図14B)。この測定値の範囲は $0.5 \sim 1.0$ であり、値 1.0 は、モデルが群内でこれらを完全に識別することを示し、Hsp65抗体がCDの優れた予測因子であることを示唆している。さらに、受信者動作特性(ROC)曲線(AUC)下の面積は 0.99123 であった(図14C； p 値 <0.00001)。ROCは、真陽性率(感度)と偽陽性率($1 - \text{特異度}$)間のトレードオフを評価することによってモデルのパフォーマンスを要約し、最大値が 1.0 であることは完全な予測を示唆し、再度これは、ロジスティック回帰モデルが、Hsp65抗体シグナルに基づくCD対非CDの分類を正確に予測することを示している。比較。最後に、51個の真陽性(TP；予測CD、実際のCD)と281個の真陰性(TN；予測

40

50

非 C D ; 実際の非 C D) を示す分析は、以下の点推定値を示唆した (9 5 % C I) : 感度 : 0 . 8 4 (0 . 7 2 , 0 . 9 2) 、特異性 : 0 . 9 8 (0 . 9 5 , 0 . 9 9) 、正の予測値 : 0 . 8 8 (0 . 7 7 , 0 . 9 5) 、及び負の予測値 : 0 . 9 7 (0 . 9 4 , 0 . 9 8) 。従って、H s p 6 5 抗体は、C D を予測するための堅固なマーカーとして機能する。
【 0 1 6 0 】

H s p 6 5 抗体のみの予測力は堅固に見えるが、Pinsky and Zhu は、正に相関する一次マーカーと負に相関するマーカーを組み合わせると常に A U C が増加し、結果として得られるバイオマーカーパネルの予測力が向上することを示した (Biomarker Insights, 2011:683-93) 。従って、特定の理論に拘束されることはないが、H s p 6 5 抗体などの C D と正に相関するマーカーと上記の実施例 1 に記載された P k n G 抗体などの C D と負に相関するマーカーを組み合わせることにより、M A P 感染及び関連する C D を予測する能力をさらに高めることができると考えられる。さらに、M A P リポペンタペプチド (L 5 P) に対する抗体などの M A P 特異的バイオマーカーは、診断された疾患に関係なく、M A P 感染の存在 (アクティブ又はリモートの) を検出するのに役立つであろう。

【 0 1 6 1 】

本明細書で引用されるすべての特許、特許出願、及び刊行物の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明は特定の実施態様を参照して開示されてきたが、本発明の他の実施態様及び変更態様が、本発明の真の精神及び範囲から逸脱することなく、当業者によって考案され得ることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、そのようなすべての実施態様及び同等の変更態様を含むと解釈されることを意図している。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

変数	CD患者 (2人はUCも有した) (n=61)	UC患者のみ (n=14)	非CD患者 (UCのみの被験者を含む) (n=140)
年齢、N	61	13	130
平均 (SD)	46.2 (15.5)	44.1 (17.3)	52.6 (17.4)
中央値 (範囲)	47.0 (21.0-72.0)	42.0 (24.0-80.0)	57.5 (17.0-85.0)
性別、N (%)			
女性	33 (54.1%)	7 (50.0%)	82 (58.6%)
男性	28 (45.9%)	7 (50.0%)	58 (41.4%)
HB指数、N	60	13	該当せず
平均 (SD)	2.4 (2.0)	1.5 (1.8)	該当せず
中央値 (範囲)	2.0 (0.0-7.0)	1.0 (0.0-5.0)	該当せず

Fig. 1

【図 2】

被験者の カテゴリー	検出方法			
	フージーアッセイ	Pozza to 培養	T i K a 培養	M G I T 培養
CD* (n = 61)	28, 46%	35, 57%	22, 36%	15, 25%
UCのみ (n = 14)	6, 43%	10, 71%	1, 7%	4, 29%
非CD** (n = 140)	85, 61%	89, 64%	42, 30%	21, 15%
全ての被験者 (n=201)	113, 56%	124, 62%	64, 32%	36, 18%

Fig. 2

【図 3】

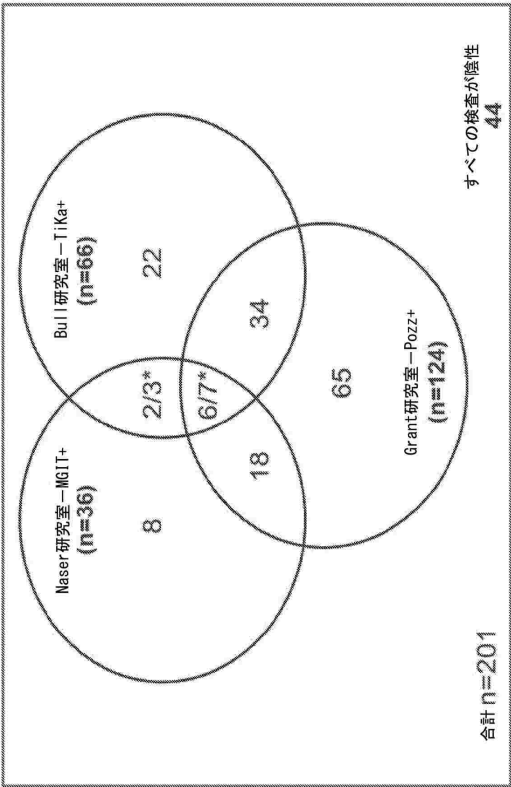


Fig. 3

【図 4】

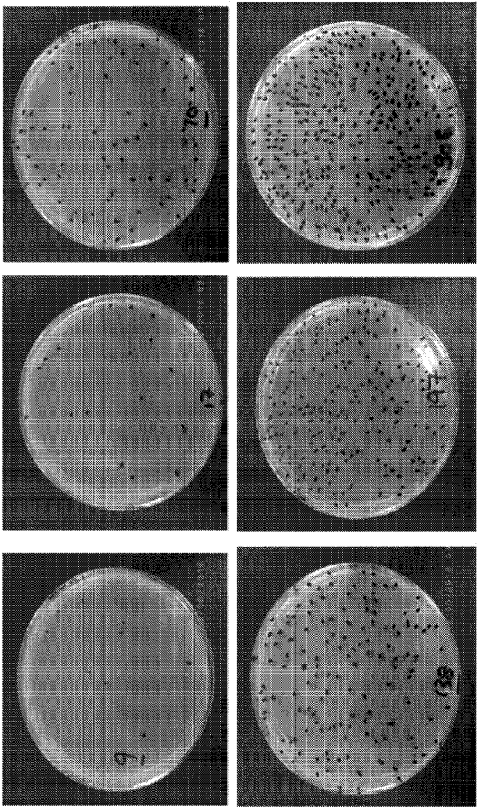


Fig. 4

10

20

30

40

50

【図 5】

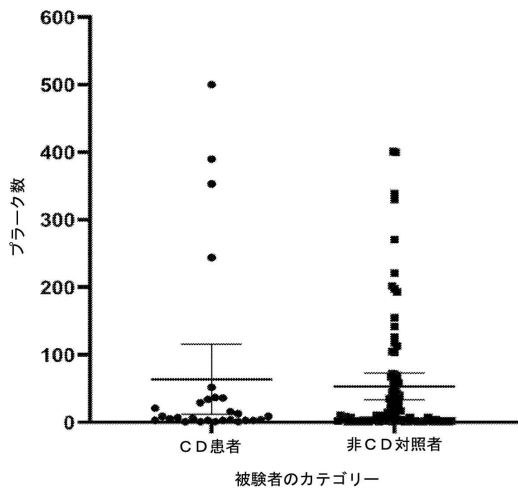


Fig. 5

【図 6】

変数	N	CD患者 (n=61)	非CD患者 (n=140)	オッズ比	フィッシャーの 正確度 検定p値
年齢、全体	191	61 (31.9%)	130 (68.1%)		0.003
≤ 5 2	91	39 (42.9%)	52 (57.1%)	2.66 (1.42, 4.99)	
> 5 2	100	22 (22.0%)	78 (78.0%)	基準	
性別、全体	201	61 (30.3%)	140 (69.7%)		0.64
男性	86	28 (32.6%)	58 (67.4%)	1.20 (0.65, 2.20)	
女性	115	33 (28.7%)	82 (71.3%)	基準	
MGIT培養、全体	201	61 (30.3%)	140 (69.7%)		0.11
陽性	36	15 (41.7%)	21 (58.3%)	1.85 (0.88, 3.89)	
陰性	165	46 (27.9%)	119 (72.1%)	基準	
Tika培養、全体	199	60 (30.2%)	139 (69.8%)		0.41
陽性	64	22 (34.4%)	42 (65.6%)	1.34 (0.71, 2.53)	
陰性	135	38 (28.1%)	97 (71.9%)	基準	
Pozzato培養、全体	201	61 (30.3%)	140 (69.7%)		0.43
陰性	77	26 (33.8%)	51 (66.2%)	1.30 (0.70, 2.39)	
陽性	124	35 (28.2%)	89 (71.8%)	基準	
ファージアッセイ、全体	201	61 (30.3%)	140 (69.7%)		0.064
陰性	88	33 (37.5%)	55 (62.5%)	1.82 (0.99, 3.34)	
陽性	113	28 (24.8%)	85 (75.2%)	基準	
Hsp65抗体、全体	201	61 (30.3%)	140 (69.7%)		0.020
>0.74	89	35 (39.3%)	54 (60.7%)	2.14 (1.16, 3.95)	
≤0.74	112	26 (23.2%)	86 (76.8%)	基準	
PknG抗体、全体	200	61 (30.5%)	139 (69.5%)		0.35
陰性	120	40 (33.3%)	80 (66.7%)	1.40 (0.75, 2.63)	
陽性	80	21 (26.3%)	59 (73.8%)	基準	
PtpA抗体、全体	200	61 (30.5%)	139 (69.5%)		0.73
陰性	146	46 (31.5%)	100 (68.5%)	1.20 (0.60, 2.39)	
陽性	54	15 (27.8%)	39 (72.2%)	基準	
MAP IDEXX抗体、全体	201	61 (30.3%)	140 (69.7%)		0.62
陽性	135	43 (31.9%)	92 (68.1%)	1.25 (0.65, 2.39)	
陰性	66	18 (27.3%)	48 (72.7%)	基準	

Fig. 6

【図 7】

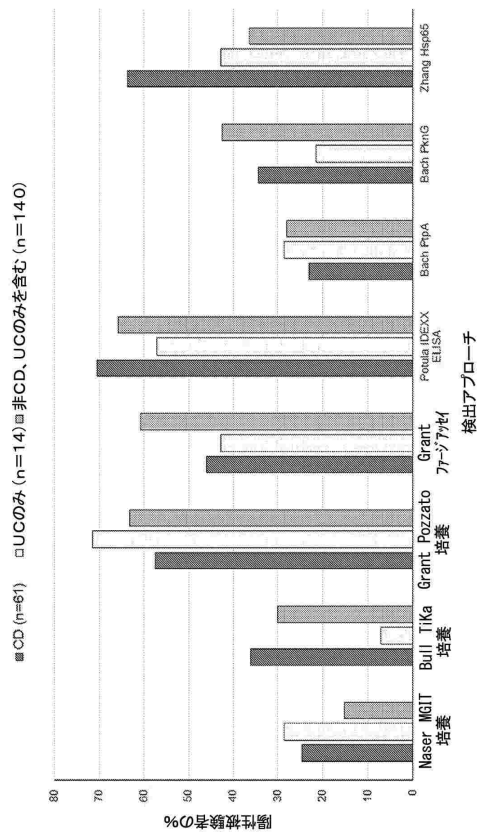


Fig. 7

【図 8】

アッセイ方法	CD対非CD		CD+UC対非CD+UC	
	n	調整オッズ比 (95% CI)	p値	調整オッズ比 (95% CI)
培養のみ使用	191	2.36 (1.06, 5.28)	0.037	3.19 (1.40, 7.23)
抗体のみ使用	191	2.40 (1.25, 4.61)	0.009	1.32 (1.05, 1.67) ‡
PknG抗体 (-対+)		-	NS	2.18 (1.12, 4.23)
培養と抗体の両方を使用	191	2.54 (1.11, 5.81)	0.027	3.51 (1.51, 8.16)
Hsp65抗体 (>0.74対≤0.74)		2.51 (1.29, 4.88)	0.007	2.30 (1.19, 4.45)
PknG抗体 (-対+)		-	NS	2.13 (1.08, 4.20)

Fig. 8

【図 9】

アッセイ	いずれかの培養で陽性 N (%)	すべての培養で陰性 N (%)	合計 N (%)
フアージアッセイ+ (ブランク+IS900)	131 (65%)	25 (12%)	156 (78%)
フアージアッセイ陰性	26 (13%)	19 (9%)	45 (22%)
合計	157 (78%)	44 (22%)	201

Fig. 9

【図 10】

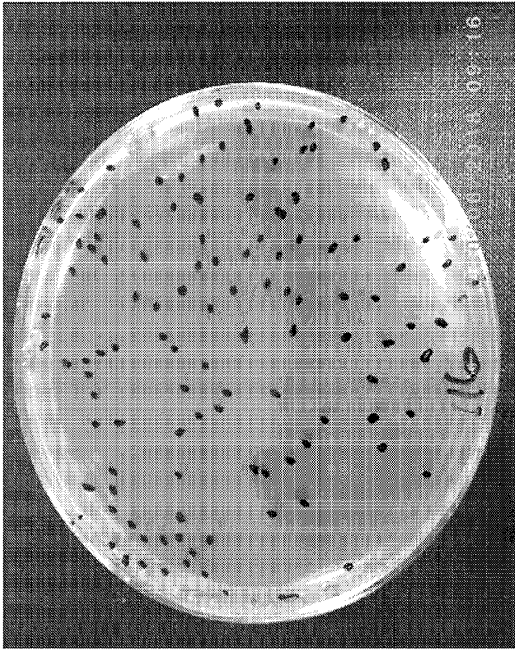


Fig. 10

【図 11】

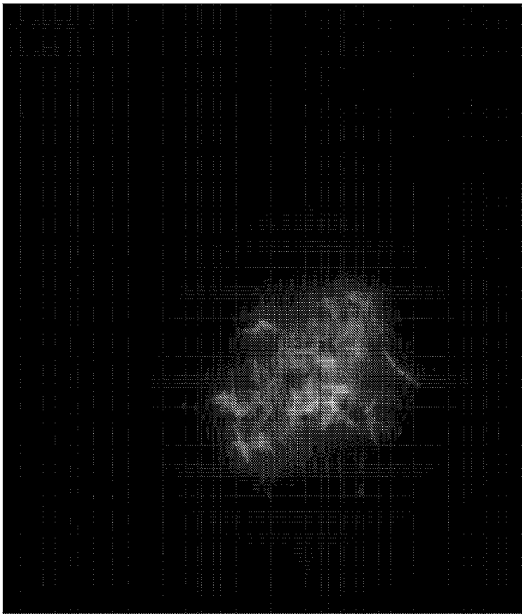


Fig. 11

【図 12】

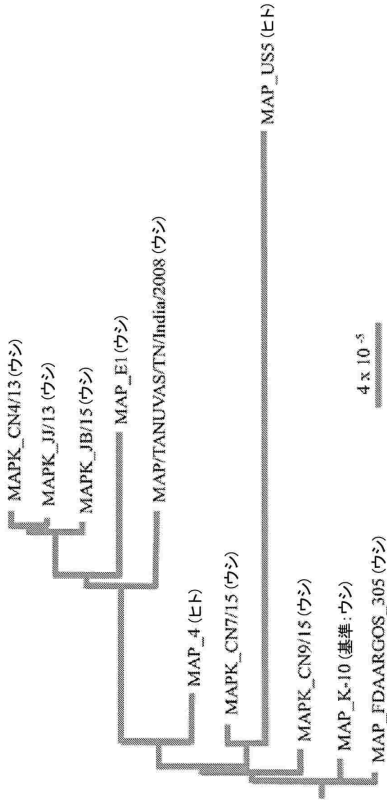


Fig. 12

10

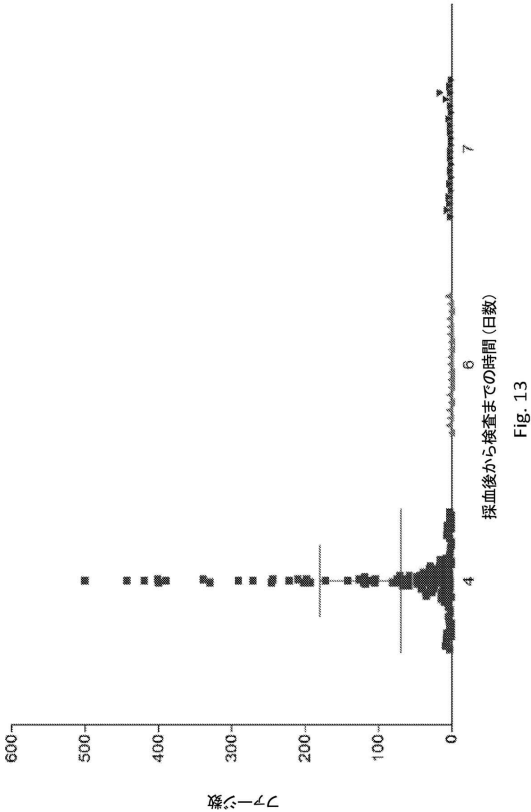
20

30

40

50

【図 1 3】



【図 1 4 A】

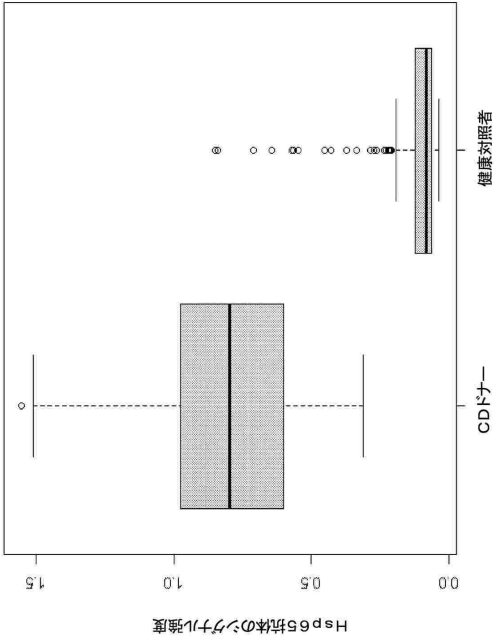


Fig. 14A

【図 1 4 B】

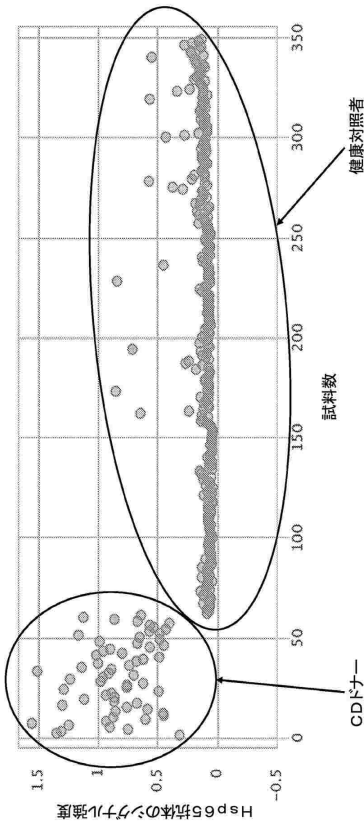


Fig. 14B

【図 1 4 C】

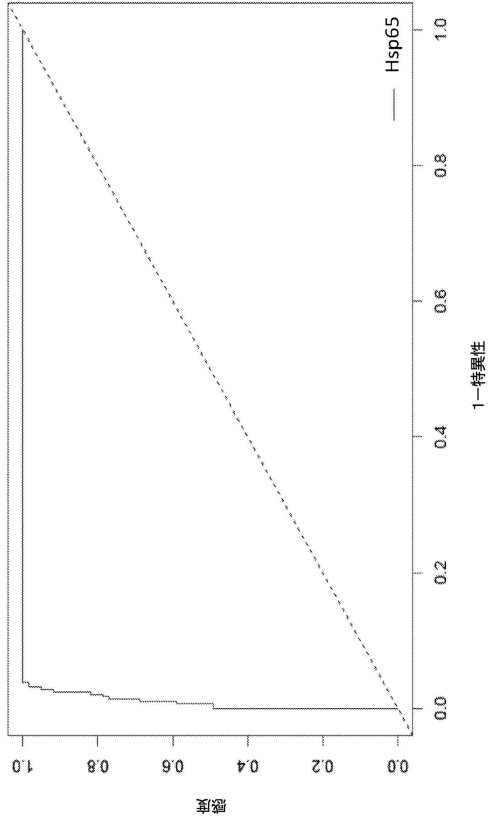


Fig. 14C

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	A
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 N	15/54 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
		C 1 2 N	15/54	

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210
弁理士 池田 達則

(72)発明者 ジョン トッド クエンストナー
アメリカ合衆国, ペンシルベニア 1 9 1 2 2, フィラデルフィア, ブロード アンド モントゴメ
リー アベニュー, テンプル ユニバーシティ - オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイアー
エデュケーション

(72)発明者 ラグハバ ポチュラ
アメリカ合衆国, ペンシルベニア 1 9 1 2 2, フィラデルフィア, ブロード アンド モントゴメ
リー アベニュー, テンプル ユニバーシティ - オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイアー
エデュケーション

審査官 北条 弥作子

(56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 1 0 5 2 8 (J P , A)
特開 2 0 0 4 - 0 3 3 2 1 0 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 2 5 2 7 1 0 (U S , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 2 3 2 6 4 (U S , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 3 1 1 5 6 3 (U S , A 1)
米国特許第 0 7 4 8 8 5 8 0 (U S , B 1)
国際公開第 2 0 1 8 / 1 4 7 2 9 1 (W O , A 1)
T R Stevens , Circulating antibodies to heat-shock protein 60 in Crohn's disease and ulcerat
ive colitis , Clin Exp Immunol. , 1992年11月 , 90(2) , pp.271-4 , doi: 10.1111/j.1365-22
49.1992.tb07941.x.
Julien Verdier , Specific IgG response against Mycobacterium avium paratuberculosis in ch
ildren and adults with Crohn's disease , PLoS One. , 2013年05月02日 , 8(5) , e62780 , do
i: 10.1371/journal.pone.0062780.
Horacio Bach , Immunogenicity of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis proteins i
n Crohn's disease patients , Scand J Gastroenterol. , 2011年01月 , 46(1) , pp.30-9 , doi: 1
0.3109/00365521.2010.513061.

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 5 3
C A p l u s / M E D L I N E (S T N)