

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6050337号  
(P6050337)

(45) 発行日 平成28年12月21日(2016.12.21)

(24) 登録日 平成28年12月2日(2016.12.2)

(51) Int.Cl.	F I				
<b>GO 1 N 33/68</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/68	Z N A	
<b>GO 1 N 33/569</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/569	F	
<b>C 1 2 Q 1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/04		
<b>A 6 1 K 45/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K	45/00		
<b>A 6 1 P 31/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	31/04		

請求項の数 11 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-514556 (P2014-514556)  
 (86) (22) 出願日 平成24年6月5日(2012.6.5)  
 (65) 公表番号 特表2014-523525 (P2014-523525A)  
 (43) 公表日 平成26年9月11日(2014.9.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/040910  
 (87) 国際公開番号 W02012/170422  
 (87) 国際公開日 平成24年12月13日(2012.12.13)  
 審査請求日 平成27年6月1日(2015.6.1)  
 (31) 優先権主張番号 61/493,829  
 (32) 優先日 平成23年6月6日(2011.6.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502200830  
 ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 オハイオ 43205, コロンバス, チルドレンズ ドライブ 700  
 (73) 特許権者 513307634  
 ザ オハイオ ステイト ユニバーシティ  
 アメリカ合衆国 オハイオ 43212, コロンバス, キニアー ロード 1216  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテオミクスに基づく、慢性副鼻腔炎の診断用検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の上気道由来の分泌物から得られる試料における分類不能型インフルエンザ(NTHI)菌の存在を検出する方法であって、前記対象の上気道由来の分泌物から得られる試料において少なくとも1つのバイオマーカーの存在を検出するステップであって、前記バイオマーカーがOMP P2またはOMP P5であるステップ;を含む、前記方法。

【請求項 2】

少なくとも1つのバイオマーカーの存在を、対象の上気道の分類不能型インフルエンザ菌(NTHI)感染症の指標とする方法であって、前記対象の上気道由来の分泌物から得られる試料において、少なくとも1つのバイオマーカーの存在を検出するステップであって、前記バイオマーカーがOMP P2およびOMP P5から選択されるステップ;を含む、前記方法。

【請求項 3】

前記上気道が副鼻腔、中鼻道または上咽頭である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも1つのバイオマーカーの存在が、前記試料をOMP P2またはOMP P5に対して特異的な抗体と接触させることにより検出される、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

前記対象が慢性副鼻腔炎を患っている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 OMP P 2 または OMP P 5 に対して特異的な抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記バイオマーカーを検出するために、免疫測定法を使用する、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記試料を、前記バイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する固体基質を含むデバイスを用いて採取する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 9】

前記デバイスがバルーンカテーテルであり、前記固体基質がカテーテルの吸引口へ挿通される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

対象の上気道における分類不能型インフルエンザ (NTHI) 菌の存在を検出するための免疫測定法であって、

a) 前記対象の上気道の分泌物から得られる試料を基質と接触させるステップであって、前記基質上に前記対象の上気道における NTHI 菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーに対して特異的な抗体が固定化されており、ここで少なくとも一つのバイオマーカーが OMP P 2 または OMP P 5 である、ステップ；および

20

b) 前記試料を、前記対象の上気道における NTHI 菌の存在と関連する前記少なくとも 1 つのバイオマーカーに対して特異的な標識された抗体と接触させるステップ；を含む、前記免疫測定法。

【請求項 11】

対象の上気道の分類不能型インフルエンザ (NTHI) 感染症を診断するための免疫測定法であって、

a) 前記対象の上気道における分泌物から得られる試料を基質と接触させるステップであって、前記基質上に前記対象の上気道における NTHI 菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーに対して特異的な抗体が固定化されており、前記少なくとも一つのバイオマーカーが OMP P 2 または OMP P 5 である、ステップ；および

30

b) 前記試料を、前記対象の上気道における NTHI 菌の存在と関連する前記少なくとも 1 つのバイオマーカーに対して特異的な標識された抗体と接触させるステップ；を含む、前記免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、米国国立衛生研究所により与えられた、助成金番号第 R01DC05847 号および第 KL2RR025754 号下の政府支援によりなされた。米国政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0002】

40

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2011年、6月6日に出版された、米国特許仮出願第 61/493,829 号の優先権の利益を主張する。

【0003】

本発明は、細菌性慢性副鼻腔炎の診断方法の開発において使用し得る、特定の細菌のタンパク質プロファイルの同定のための、プロテオミクス的手法を提供する。本発明は、病原菌のタンパク質プロファイルを使用して、対象の上気道における病原菌の存在を判定する方法を提供する。本発明はまた、病原菌のタンパク質プロファイルを使用して、対象の上気道の細菌感染症を診断する方法も提供する。さらに、本発明は、上気道の病原菌を同定するためのデバイス、免疫測定法およびキットを提供する。

【背景技術】

50

## 【0004】

中耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、咽頭炎、および非特異的上気道感染症（URTI）は、米国における外来患者の抗生物質処方約75%を占める。これらの感染症の85%超が、ウイルスに起因し、かつ合併症を起こすことなく治癒するという事実にもかかわらず、抗生物質の使用は依然として高いままである。それでもなお、実際に病原性微生物に起因する残りの感染症は、現在利用可能である以上に、より有効な管理を必要とする。URTIの原因となるほとんどの一般細菌は、多くの場合、上咽頭における共生生物でもあるため、細菌培養は限られた診断的価値しか提供しない。

## 【0005】

上気道感染症は、米国における来院の第一の理由である（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4）。上気道感染症と診断された場合、成人患者の約52%および小児科患者の45%は、抗生物質を処方される（非特許文献3、非特許文献4）。上気道感染症は、多因子性かつ多微生物性の疾患である。呼吸器ウイルス（例えばRSV、アデノウイルス、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス）による感染は、上咽頭の常在菌叢である、分類不能型インフルエンザ菌（*nontypeable Haemophilus influenzae*）、肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）およびモラクセラ・カタリス（*Moraxella catarrhalis*）のメンバーによる細菌の重感染の素因となる。ウイルス感染症は、多くの場合自己制御性であるが、細菌性疾患の治療の遅れは、合併症、永続する後遺症ならびに深刻な病的状態および死亡率をもたらす得る。

## 【0006】

診断は主に、臨床症状にもとづく。細菌性および非細菌性の病因による疾患の徴候および症状は、しばしば識別不能である。従来の微生物学的培養技術による特定の細菌の同定は、バイオフィーム内部で増殖している微生物を検出できないことが多い。コロニーを形成している常在細菌叢による検体の汚染は、しばしば、不確かな臨床的価値の検査培養報告をもたらす。無差別な抗生物質の使用は、上咽頭の共生細菌叢を変化させ、一般抗生物質に耐性である微生物の選択および出現を誘発する。近年の抗生物質処方の減少傾向にもかかわらず、不要かつ不適切な抗生物質治療は、特に中耳炎および副鼻腔炎の治療において一般的である。

## 【0007】

上気道感染症は、いまだに抗生物質の過用の主要な原因であり、従って、抗生物質耐性の広範な出現の主要な原因である。それゆえ、共生細菌と病原菌を識別し得る、早期のかつ迅速な診断検査が必要とされている。これらの検査は、抗生物質治療の賢明な使用を促進し、より有効な治療の選択を促進し、および結果を改善するであろう。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0008】

【非特許文献1】 American Academy of Pediatrics .  
Pediatrics , 2004 . 113 : 1451 - 1456

【非特許文献2】 Center for Disease Control and P  
revention web site

【非特許文献3】 Gonzales R , et al . JAMA , 1997 . 2  
78 ( 11 ) : 901 - 904

【非特許文献4】 Nyquist A - C . JAMA , 1998 . 279 ( 11  
) : 875 - 877

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

独自の増殖特性に因り、細菌バイオフィームは、共生状態と病原性状態を識別するために使用し得る、特徴的なタンパク質のセットを産生する。本発明は、細菌バイオフィーム

のタンパク質プロファイルを同定する方法を提供する。方法論には、副鼻腔の一般に無菌の部位から、特定の病原性微生物を同定する、微量のシグネチャータンパク質を検出することが含まれる。本明細書に記載の通り、10日間に渡って分類不能型インフルエンザ菌(NTHI)により産生されたバイオフィルムは、特定のタンパク質プロファイルを生成する。in vitroでNTHIにより形成されたバイオフィルムは、それらの環境中に、数日間同定可能であり続ける、シグネチャーとなるタンパク質のセットを放出する。外膜タンパク質(OMP)は、NTHIバイオフィルム上清の主要な成分である。特に興味深いものは、細菌の病原性に関連する主要なOMP:外膜タンパク質P5(OMP P5)および外膜タンパク質P2(OMP P2)である。追加のOMPとしては、高分子量アドヘシン1/高分子量アドヘシン2(HMW1/HMW2)、およびIgA-プロテアーゼが挙げられる。HMW1/HMW2、OMP P5は、上皮細胞への接着の媒介物質であり、OMP P2はポリリンであり、およびIgAプロテアーゼは、宿主IgAを切断するために機能する。

#### 【0010】

これらの研究は、NTHIが関連するURTIの早期および迅速な同定のための、臨床診断検査およびデバイスの開発をサポートし、より効果的な治療の選択および改善された結果をもたらす。研究の例としてNTHIを使用したか、同一の方法を使用して、慢性副鼻腔炎の原因となることが知られるもの、例えば、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、モラクセラ・カタラリス(*Moraxella catarrhalis*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)およびステノトロフォモナス・マルトフィリア(*Stenotrophomonas maltophilia*)を含む、いかなる病原菌の存在をも同定し得る。

#### 【0011】

本発明はまた、一般に無菌の副鼻腔内で、分泌物の試料を得ること、およびこれら一般に無菌の部位から、特定の病原性微生物を同定する微量のシグネチャータンパク質の存在を迅速に検出することを含む、免疫測定デバイスを提供する。

#### 【0012】

本発明は、対象の上気道における病原菌の存在を検出する方法であって、前記方法が：  
a) 前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ；  
b) 前記試料のタンパク質プロファイルを作成するステップ；  
c) 前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルが病原菌を同定するステップ；  
および  
d) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が前記対象の上気道における病原菌の存在を示すステップ；を含む、方法を提供する。

#### 【0013】

本発明はまた、上述される、対象の上気道における病原菌の存在を検出する方法であって、前記対象の上気道における病原菌を低減または除去するための治療用化合物を投与するステップをさらに含む、方法を提供する。上気道の病原菌を低減または除去する、例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えば、ペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフトロキサム、セフトロキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬(副交感神経遮断薬)、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリンナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

#### 【0014】

本発明はまた、上述される、対象の上気道における病原菌の存在を検出する方法であって、前記上気道における病原菌の存在の有無を前記対象に告知するステップをさらに含む、方法を提供する。

【0015】

本発明はまた、上述される、対象の上気道における病原菌の存在を検出する方法であって、前記対象を細菌感染症と診断するステップをさらに含み、ここで前記対象の上気道における病原菌の存在が細菌感染症を示す、方法を提供する。

【0016】

「病原菌」という用語は、疾患の原因となるいかなる細菌をも指す。「共生細菌」という用語は、無害であるかまたは疾患の原因とならない細菌を指す。本発明の方法を、対象の上気道における、共生細菌と病原菌の存在を識別するためにも使用し得る。

10

【0017】

本発明はまた、対象の上気道の細菌感染症を診断する方法であって、前記方法が：a) 前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ；b) 前記試料のタンパク質プロファイルを生成するステップ；c) 前記試料のタンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルが病原菌を同定するステップ；およびd) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記タンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が前記対象の上気道の細菌感染症を示すステップ；を含む、方法を提供する。

【0018】

本発明はまた、上述される、対象の上気道の細菌感染症を診断する方法であって、前記上気道の細菌感染症の診断を前記対象に告知するステップをさらに含む、方法を提供する。

20

【0019】

本発明はまた、上述される、対象の上気道の細菌感染症を診断する方法であって、前記細菌感染症を治療するための治療用化合物を投与するステップをさらに含む、方法を提供する。細菌感染症の治療は、病原菌に起因する症状を軽減もしくは緩和するか、または感染部位から細菌を除去する。上気道の細菌感染症を治療する、例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えばペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム・スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフポドキシム、セフロキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬（副交感神経遮断薬）、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリンナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。「タンパク質プロファイル」という用語は、いかなる特定の試料中のタンパク質の存在の有無をもモニタし得るように、少なくとも部分的に同定されるかまたは特徴付けられた、少なくとも1つのタンパク質を指す。「基準のタンパク質プロファイル」という用語は、既知の対照または標準試料に関して作成されたタンパク質プロファイルを指す。

30

40

【0020】

基準のプロファイル中の1つまたは複数のタンパク質が、試料のプロファイル中に、細菌の感染または病原性を示す濃度で存在する場合、試料のタンパク質プロファイルは基準のタンパク質プロファイルと関連する。試料タンパク質プロファイルが、基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するために、プロファイルをスコア化して、検出された断片の質量が、そうであろうと予測されるペプチド配列に由来する可能性はどれくらいであるか、および、上清中にどれくらいの量のペプチドが存在するかを予測する。質量分析データを解析するソフトウェアプログラムを使用してもよい。例えば、Mascot（マトリックスサイエンス社（Matrix Science）、マサチューセツ

50

州、ボストン)は、試料が基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するために使用し得る相互相関ではなく、観察されたペプチド断片と予測されたペプチド断片間の一致の統計的評価により、質量分析データ解析を実施する。例えば、Electrophoresis, 20(18) 3551-67 (1999)を参照のこと。

【0021】

前述の方法を、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、肺炎球菌(Streptococcus pneumoniae)、モラクセラ・カタリス(Moraxella catarrhalis)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)またはステノトロフォモナス・マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia)を含む、上気道に感染するいかなる病原菌に対しても実施し得る。

10

【0022】

本発明はまた、対象の上気道の病原菌を低減または除去するための、薬物の調製のための治療用化合物の使用を提供し、ここで前記対象は、基準のタンパク質プロファイルと関連するタンパク質プロファイルを有し、およびここで関連は、対象の上気道の病原菌の存在を検出するかまたは細菌感染症を診断する前述の方法のうちのいずれかにより判定される、前記対象の上気道における前記病原菌の存在または細菌感染症を示す。

【0023】

本発明はまた、対象の上気道の病原菌の低減または除去のための、または対象の上気道の細菌感染症の治療のための治療用組成物を提供し、ここで前記対象は、基準のタンパク質プロファイルと関連するタンパク質プロファイルを有し、およびここで関連は、前記対象の上気道における病原菌の存在を検出するかまたは細菌感染症を診断する前述の方法のうちのいずれかにより判定される、前記対象の上気道における病原菌の存在または細菌感染症を示す。

20

【0024】

上気道の細菌感染症を治療する、例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えば、ペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム - スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフポドキシム、セフロキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬（副交感神経遮断薬）、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クオルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリンナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

30

【0025】

本発明の別の態様において、本発明は、対象の上気道における分類不能型インフルエンザ菌(NTHI)細菌の存在を検出する方法であって、前記方法が：a)前記対象の上気道から試料を得るステップ；b)前記試料中で少なくとも1つのバイオマーカーの存在を検出するステップであって、前記バイオマーカーが：HMW1/HMW2、OMP P5、OMP P2およびIgA-プロテアーゼから成る群から選択されるステップ；を含み、およびここで、前記少なくとも1つのバイオマーカーの存在が、前記対象の上気道におけるNTHI菌の存在を示す、方法を提供する。一実施形態において、前記方法は、試料中のOMP P2および/またはOMP P5の存在を検出することを含み、ここでOMP P2および/またはOMP P5の存在は、前記対象の上気道におけるNTHI菌の存在を示す。

40

【0026】

本発明はまた、対象の上気道におけるNTHI菌の存在を検出する方法であって、前記対象の上気道のNTHI菌を低減または除去するための治療用化合物を投与するステップ

50

をさらに含む、方法を提供する。上気道のNTHI菌を低減または除去する、例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えば、ペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム - スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフボドキシム、セフロキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬（副交感神経遮断薬）、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリンナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

10

## 【0027】

本発明はまた、対象の上気道のNTHI感染症を診断する方法であって、前記方法が：a) 前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ；b) 前記試料において少なくとも1つのバイオマーカーの存在を検出するステップであって、前記バイオマーカーが：HMW1/HMW2、OMP P5、OMP P2およびIgA - プロテアーゼから成る群から選択されるステップ；を含み、およびここで、前記少なくとも1つのバイオマーカーの存在が、前記対象の上気道のNTHI感染症を示す、方法を提供する。一実施形態において、前記方法は、試料中のOMP P2および/またはOMP P5の存在を検出することを含み、ここでOMP P2および/またはOMP P5の存在は、前記対象の上気道のNTHI菌感染症を示す。

20

## 【0028】

本発明はまた、上述される、対象の上気道のNTHI感染症を診断する方法であって、前記上気道のNTHI感染症の診断を、前記対象に告知するステップをさらに含む、方法を提供する。

## 【0029】

本発明はまた、上述される、対象の上気道のNTHI感染症を診断する方法であって、前記対象の上気道のNTHI感染症を治療するための治療用化合物を投与するステップをさらに含む、方法を提供する。NTHI感染症の治療は、NTHI菌に起因する症状を軽減もしくは緩和するか、または感染部位からNTHI菌を除去する。上気道のNTHI感染症を治療する、例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えば、ペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム - スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフボドキシム、セフロキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬（副交感神経遮断薬）、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリンナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

30

40

## 【0030】

「上気道」という用語には、鼻または鼻孔、鼻腔、口、のど（咽頭）、副鼻腔および発生器（喉頭）が含まれる。呼吸器系は、粘液または体液を分泌する粘膜で覆われている。分泌された粘液および体液は、本明細書において「分泌物」と呼ばれる。前述の方法のいずれかにおいて、分泌物の試料は、中鼻道または篩骨漏斗を含む、副鼻腔から採取され得る。「副鼻腔」とは、前頭洞（額の中）、上顎洞（頬骨の後ろ）、篩骨洞（目の間）および蝶形骨洞（目の間）を指す。

## 【0031】

本発明はまた、対象の上気道のNTHI菌を低減もしくは除去するため、または対象の上気道のNTHI感染症を治療するための、薬物の調製のための治療用化合物の使用を提

50

供し、ここでNTHI菌の存在またはNTHI感染症は、対象の上気道のNTHI菌の存在を検出するかまたはNTHI感染症を診断する前述の方法のうちのいずれかにより判定される、OMP P2およびOMP P5から選択される少なくとも1つのバイオマーカーの存在により判定される。

【0032】

本発明はまた、対象の上気道のNTHI菌の低減もしくは除去のための、またはNTHI感染症の治療のための治療用組成物を提供し、ここでNTHI菌の存在またはNTHI感染症は、対象の上気道におけるNTHI菌の存在を検出するかまたはNTHI感染症を診断する、前述の方法のうちのいずれかにより判定される。

【0033】

前述の方法、使用または治療用組成物のうちのいずれかを、慢性副鼻腔炎を患う対象、または再発性の急性副鼻腔炎に罹りやすい対象において実施し得る。さらに、前述の方法のうちのいずれかを、中耳炎、気管支炎、咽頭炎、および非特異的上気道感染症を患う対象において実施し得る。

【0034】

本発明はまた、対象の上気道の慢性副鼻腔炎または病原菌感染症を治療するための方法、使用、または治療用組成物であって、前述の方法のうちのいずれかを使用して前記対象の上気道の病原菌を検出すること、および前記対象の上気道内で検出された特定の病原菌を効果的に処理することが知られる、適切な用量の治療用化合物を投与することを含む、方法、使用、または治療用組成物を提供する。慢性副鼻腔炎または病原菌感染症の治療は、病原菌に起因する症状を軽減もしくは緩和するか、または病原性の細菌を感染部位から除去する。例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えば、ペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム - スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフポドキシム、セフロキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬（副交感神経遮断薬）、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリンナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

【0035】

本発明はまた、対象の上気道の慢性副鼻腔炎または病原菌感染症のための治療方法、使用および治療用組成物であって、前述の方法のうちのいずれかを使用して、前記対象の上気道の病原菌感染症を診断する事、および前記対象の上気道内で検出された特定の病原菌を効果的に処理することが知られる、適切な用量の治療用化合物を投与することを含む、治療方法、使用および治療用組成物を提供する。例となる治療用化合物としては抗生物質、例えばペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム - スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフポドキシム、セフロキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬（副交感神経遮断薬）、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリンナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

【0036】

前述される、本発明の方法、使用、または治療用組成物のすべてにおいて、無菌スワブ、無菌ガーゼ、鼻洗浄液、吸引管、またはバルーンカテーテルを使用して、試料を採取し得る。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 3 7 】

前述される本発明の方法のすべての検出ステップにおいて、モノクローナル抗体を使用して、バイオマーカーを検出し得る。さらに、前述される本発明の方法のすべてにおいて、免疫測定法を使用して、目的のバイオマーカーを検出し得る。

## 【 0 0 3 8 】

前述される本発明の方法のすべてにおいて、目的のバイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する基質を含むデバイス、例えばバルーンカテーテルを用いて、試料を採取することができ、ここで基質は、カテーテルの吸引口へ挿通される。

## 【 0 0 3 9 】

本発明の別の態様は、対象の上気道における病原菌の存在を検出するための免疫測定法であって、前記免疫測定法が： a ) 前記対象の上気道における病原菌の存在と関連する少なくとも1つのバイオマーカーに対して特異的な抗体を含むデバイスを使用して、前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ； b ) 前記対象の上気道における病原菌の存在と関連する少なくとも1つのバイオマーカーの存在を検出して、タンパク質プロファイルを作成するステップ； c ) 前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルが病原菌を同定するステップ；および d ) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が、前記対象上気道における病原菌の存在を示すステップ；を含む、免疫測定法を提供する。

## 【 0 0 4 0 】

「免疫測定法」という用語は、抗原と抗体間の免疫学的反応を使用することにより、液体、例えば生体液中のタンパク質またはペプチドを、直接的または間接的に検出するための、試験方法である。

## 【 0 0 4 1 】

「抗体」という用語は、「免疫グロブリン」と同義であり、天然のヒト抗体、ポリクローナル抗体、およびモノクローナル抗体を含む。「抗体」という用語は、天然の抗体ならびに生物学的に活性および合成の抗体誘導体、例えば、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>またはFvならびに単ドメイン抗体および単鎖抗体などを含むことを意図する。生物学的に活性な抗体誘導体は、抗原と結合する能力を保持している。より詳細には、本発明は、目的のバイオマーカーに特異的な抗体、例えば、OMP P2およびOMP P5などの目的のバイオマーカーと特異的に結合するモノクローナル抗体を使用する、方法および免疫測定法を提供する。

## 【 0 0 4 2 】

さらに、上述される免疫測定法は、対象を細菌感染症と診断するステップをさらに含み得、ここで前記対象の上気道における病原菌の存在は、細菌感染症を示す。

## 【 0 0 4 3 】

本発明はまた、細菌感染症の治療に有効な量の治療用化合物を投与するステップをさらに含む、前述の免疫測定法のうちのいずれかを提供する。例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えば、ペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム - スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフトロキシム、セフトロキシム、セフトリニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬（副交感神経遮断薬）、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

## 【 0 0 4 4 】

前述の免疫測定法のすべてにおいて、検出される病原菌は、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎球菌 (*Streptococcus*

10

20

30

40

50

pneumoniae)、モラクセラ・カタリス(Moraxella catarrhalis)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)またはステノトロフォモナス・マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia)であり得る。

【0045】

本発明はまた、対象の上気道のNTHI菌を低減もしくは除去するため、または対象の上気道のNTHI感染症を治療するための、薬物の調製のための治療用化合物の使用を提供し、ここでNTHI菌の存在またはNTHI感染症は、前述のいずれかにより判定される、OMP P2およびOMP P5から選択される少なくとも1つのバイオマーカーの存在により判定される。

10

【0046】

さらに本発明は、対象の上気道のNTHI菌を低減もしくは除去するため、または対象の上気道のNTHI感染を治療するための治療用組成物を提供し、ここでNTHI菌の存在またはNTHI感染症は、前述される免疫測定法のうちのいずれかにより判定される、OMP P2およびOMP P5から選択される少なくとも1つのバイオマーカーの存在により判定される。

【0047】

本発明の別の態様において、本発明は、対象の上気道における分類不能型NTHI菌の存在を検出するための免疫測定法であって、前記免疫測定法が：a)前記対象の上気道におけるNTHI菌の存在と関連する少なくとも1つのバイオマーカーに対して特異的な抗体を含むデバイスを使用して、前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップであって、ここで少なくとも一つのバイオマーカーがOMP P2またはOMP P5であるステップ；b)前記対象の上気道におけるNTHI菌の存在と関連する少なくとも1つのバイオマーカーの存在を検出して、タンパク質プロファイルを作成するステップ；c)前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルがNTHI菌を同定するステップ；およびd)前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が、前記対象の上気道における前記NTHI菌の存在を示すステップ；を含む、免疫測定法を提供する。

20

30

【0048】

本発明はまた、上述される、対象の上気道におけるNTHI菌の存在を検出するための免疫測定法であって、前記対象をNTHI感染症と診断するステップをさらに含み、ここで前記対象の上気道におけるNTHI菌の存在が、NTHI感染症を示す、免疫測定法を提供する。

【0049】

本発明はまた、細菌感染症を治療するために有効な量の治療用化合物を投与することをさらに含む、前述される免疫測定法のうちのいずれかを提供する。例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えば、ペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフポドキシム、セフロキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬(副交感神経遮断薬)、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータアゴニスト気管支拡張薬；非ステロイド性抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

40

【0050】

本発明の別の態様において、本発明は、対象の上気道のNTHI感染症を診断するため

50

の免疫測定法であって、前記免疫測定法が：a)前記対象の上気道におけるNTHI菌の存在と関連する少なくとも1つのバイオマーカに対して特異的な抗体を含むデバイスを使用して、前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップであって、前記少なくとも一つのバイオマーカがOMP P2またはOMP P5であるステップ；b)前記対象の上気道におけるNTHI菌の存在と関連する少なくとも1つのバイオマーカの存在を検出して、タンパク質プロファイルを作成するステップ；c)前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルがNTHI菌を同定するステップ；およびd)前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が前記対象の上気道のNTHI感染症を示すステップ；を含む、免疫測定法を提供する。

10

## 【0051】

本発明はまた、対象の上気道におけるNTHI菌の存在またはNTHI感染症を、前記対象に告知するステップをさらに含む、前述の免疫測定法うちのいずれかを提供する。例となる治療用化合物としては、抗生物質、例えばペニシリン、エリスロマイシン、アモキシシリン、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、ドキシサイクリン、セフトロキシム、セフトキシム、セフジニル、クラリスロマイシン、アジスロマイシン、レボフロキサシン、ガチフロキサシン、およびモキシフロキサシン；アルファアドレナリン作動薬、例えば塩酸オキシメタゾリン；抗コリン作動薬（副交感神経遮断薬）、例えば臭化イプラトロピウム；抗ヒスタミン薬、例えばマレイン酸クロルフェニラミン；ベータ-アゴニスト気管支拡張薬、非ステロイド系抗炎症薬、カンフル、メントール、エキナセア；肥満細胞安定剤、例えばクロモリンナトリウム；局所点鼻ステロイド剤、例えばプロピオン酸フルチカゾン、ブデノシド、モメタゾン、トリアムシノロン、およびデキサメタゾン；ならびに亜鉛塩類が挙げられる。

20

## 【0052】

さらに、無菌スワブ、無菌ガーゼ、吸引管またはバルーンカテーテルを使用して、前述の免疫測定法の中のいずれかにおいて使用される試料を取得し得る。

## 【0053】

本発明の別の態様において、本発明は、対象の上気道から分泌物の試料を得るためのデバイスであって、前記対象の上気道における病原菌の存在と関連する少なくとも1つのバイオマーカに対して特異的な抗体を提示する基質を含む、デバイスを提供する。

30

## 【0054】

本発明はまた、対象の上気道から分泌物の試料を得るために使用される、前述の本発明の方法の中のいずれかまたは前述の本発明の免疫測定法の中のいずれかを実施するためのデバイスであって、前記対象の上気道における病原菌の存在と関連するバイオマーカに対して特異的な抗体を提示する基質を含む、デバイスを提供する。

## 【0055】

前述のデバイスのすべてにおいて、例えばNTHI OMP P2と特異的に結合するモノクローナル抗体またはNTHI OMP P5と特異的に結合するモノクローナル抗体などのように、抗体は、OMP P2またはOMP P5に対して特異的であり得る。

40

## 【0056】

本発明の別の態様において、本発明は、前述の方法または免疫測定法の中のいずれかを実施するためのキットを提供する。一実施形態において、キットは、対象の上気道における病原菌の存在または細菌感染症と関連する、少なくとも1つのバイオマーカに対して特異的な抗体を提示する基質を含む。別の実施形態において、キットは、対象の上気道内の無菌の区画から試料を得るため、および前記対象の上気道の病原菌または細菌感染症と関連するタンパク質プロファイルを生成するための、デバイスを含む。キットはまた、目的のタンパク質バイオマーカと特異的に結合する抗体、およびこれらの抗体を使用して前記タンパク質バイオマーカを検出するための免疫測定法のための成分をも含む得る。

50

本発明は、例えば、以下の項目も提供する。

(項目1)

対象の上気道における病原菌の存在を検出する方法であって、

- a) 前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ；
- b) 前記試料のタンパク質プロファイルを作成するステップ；
- c) 前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルが病原菌を同定するステップ；および
- d) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が前記対象の上気道における前記病原菌の存在を示すステップ；を含む、前記方法。

10

(項目2)

前記対象の上気道の前記病原菌を低減または除去するための治療用化合物を投与するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記上気道における前記病原菌の存在の有無を、前記対象に告知するステップをさらに含む、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

前記対象を細菌感染症と診断するステップをさらに含み、前記対象の上気道における前記病原菌の存在が、細菌感染症を示す、項目1～3のいずれか1項に記載の方法。

20

(項目5)

対象の上気道の細菌感染症を診断する方法であって、

- a) 前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ；
- b) 前記試料のタンパク質プロファイルを作成するステップ；
- c) 前記試料のタンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルが、病原菌を同定するステップ；および
- d) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が、前記対象の上気道の細菌感染症を示すステップ；を含む、前記方法。

(項目6)

前記上気道の細菌感染症の診断を、前記対象に告知するステップをさらに含む、項目5に記載の方法。

30

(項目7)

前記細菌感染症を治療するために有効な量の治療用化合物を投与するステップをさらに含む、項目5および6に記載の方法。

(項目8)

前記病原菌が、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、モラクセラ・カタラリス (*Moraxella catarrhalis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、またはステノトロフォモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) である、項目1～7のいずれか1項に記載の方法。

40

(項目9)

対象の上気道の病原菌を低減もしくは除去するため、または対象の上気道の細菌感染症を治療するための、薬物の調製のための治療用化合物の使用であって、前記対象が基準のタンパク質プロファイルと関連するタンパク質プロファイルを有し、および前記関連が、項目1～8のいずれか1項に記載の方法により判定される、前記対象の上気道における前記病原菌の存在または細菌感染症を示す、前記使用。

(項目10)

対象の上気道における病原菌の低減または除去のため、または対象の上気道の細菌感染

50

症の治療のための治療用組成物であって、前記対象が、基準のタンパク質プロファイルと関連する、タンパク質プロファイルを有し、および前記関連が、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法により判定される、前記対象の上気道における前記病原菌の存在または細菌感染症を示す、前記治療用組成物。

(項目 1 1)

対象の上気道における分類不能型インフルエンザ ( N T H I ) 菌の存在を検出する方法であって、

a ) 前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ ; および  
b ) 前記試料において少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在を検出するステップであって、前記バイオマーカーが O M P P 2 または O M P P 5 であるステップ ; を含み、  
ここで前記少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在が、前記対象の上気道における N T H I 菌の存在を示す、前記方法。

10

(項目 1 2)

前記対象の上気道における N T H I 菌の存在の有無を、前記対象に告知するステップをさらに含む、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記対象を N T H I 感染症と診断するステップをさらに含み、前記対象の上気道における N T H I 菌の存在が、前記対象の上気道の N T H I 感染症を示す、項目 1 1 または 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記対象の上気道の前記 N T H I 菌を低減または除去するための治療用化合物を投与するステップをさらに含む、項目 1 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

(項目 1 5)

対象の上気道の分類不能型インフルエンザ菌 ( N T H I ) 感染症を診断する方法であって、

a ) 前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ ; および  
b ) 前記試料において、少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在を検出するステップであって、前記バイオマーカーが O M P P 2 および O M P P 5 から選択されるステップ ; を含み、ここで前記少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在が、前記対象の上気道の N T H I 感染症を示す、前記方法。

30

(項目 1 6)

前記対象の上気道の N T H I 感染症の診断を、前記対象に告知するステップをさらに含む、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記 N T H I 感染症を治療するために有効な量の治療用化合物を投与するステップをさらに含む、項目 1 5 または 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

対象の上気道の N T H I 菌を低減もしくは除去するため、または対象の上気道の N T H I 菌感染症を治療するための、薬物の調製のための治療用化合物の使用であって、 N T H I 菌の存在または N T H I 感染症が、項目 1 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法により判定される、 O M P P 2 および O M P P 5 から選択される少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在により判定される、前記使用。

40

(項目 1 9)

対象の上気道の N T H I 菌の低減もしくは除去または N T H I 感染症の治療のための治療用組成物であって、 N T H I 菌の存在または N T H I 感染症が、項目 1 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法により判定される、 O M P P 2 および O M P P 5 から選択される少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在により判定される、前記治療用組成物。

(項目 2 0)

前記試料が副鼻腔から採取される、項目 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法、使用または組成物。

50

(項目 2 1)

前記対象が慢性副鼻腔炎を患っている、項目 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法、使用または組成物。

(項目 2 2)

前記試料を、無菌スワブ、無菌ガーゼ、鼻洗浄液、吸引管またはバルーンカテテルを使用して採取する、項目 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法、使用または組成物。

(項目 2 3)

前記バイオマーカーを、モノクローナル抗体を使用して検出する、項目 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法、使用または組成物。

(項目 2 4)

前記バイオマーカーを検出するために、免疫測定法を使用する、項目 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法、使用または組成物。

(項目 2 5)

前記試料を、前記バイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する基質を含むデバイスを用いて採取する、項目 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法、使用または組成物。

(項目 2 6)

前記デバイスがバルーンカテテルであり、前記基質がカテテルの吸引口へ挿通される、項目 2 5 に記載の方法、使用または組成物。

(項目 2 7)

対象の上気道における病原菌の存在を検出するための免疫測定法であって、

a) 前記対象の上気道における病原菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーに対して特異的な抗体を含むデバイスを使用して、前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ；

b) 前記対象の上気道における病原菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在を検出して、タンパク質プロファイルを作成するステップ；

c) 前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルが病原菌を同定するステップ；および

d) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が前記対象の上気道における前記病原菌の存在を示すステップ；を含む、前記免疫測定法。

(項目 2 8)

前記対象を細菌感染症と診断するステップをさらに含み、前記対象の上気道における前記病原菌の存在が、細菌感染症を示す、項目 2 7 に記載の免疫測定法。

(項目 2 9)

対象の上気道の細菌感染症を診断するための免疫測定法であって、

a) 前記対象の上気道における病原菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーに対して特異的な抗体を含むデバイスを使用して、前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップ；

b) 前記対象の上気道における病原菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在を検出して、タンパク質プロファイルを作成するステップ；

c) 前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルが病原菌を同定するステップ；および

d) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が前記対象の上気道の細菌感染症を示すステップ；を含む、前記免疫測定法。

(項目 3 0)

前記対象に、前記対象の上気道における病原菌の存在または細菌感染症を告知するステップをさらに含み、項目 2 7 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法。

(項目 3 1)

前記細菌感染症を治療するために有効な量の治療用化合物を投与するステップをさらに

10

20

30

40

50

含む、項目 27 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法。

(項目 32)

前記病原菌が、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、モラクセラ・カタリス (*Moraxella catarrhalis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) またはステノトロフォモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) である、項目 27 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法。

(項目 33)

対象の上気道の病原菌を低減もしくは除去するため、または対象の上気道の細菌感染症を治療するための、薬物の調製のための治療用化合物の使用であって、前記対象が基準のタンパク質プロファイルと関連するタンパク質プロファイルを有し、および前記関連が、項目 27 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法により判定される、前記対象の上気道における前記病原菌の存在または細菌感染症を示す、前記使用。

(項目 34)

対象の上気道の病原菌の低減もしくは除去のため、または対象の上気道の細菌感染症の治療のための治療用組成物であって、前記対象が基準のタンパク質プロファイルと関連するタンパク質プロファイルを有し、および前記関連が、項目 27 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の免疫測定法により判定される、前記対象の上気道における前記病原菌の存在または細菌感染症を示す、前記治療用組成物。

(項目 35)

対象の上気道における分類不能型インフルエンザ (NTHI) 菌の存在を検出するための免疫測定法であって、

a) 前記対象の上気道における NTHI 菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーに対して特異的な抗体を含むデバイスを使用して、前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップであって、ここで少なくとも一つのバイオマーカーが OMP P2 または OMP P5 であるステップ；

b) 前記対象の上気道における NTHI 菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在を検出して、タンパク質プロファイルを作成するステップ；

c) 前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルが NTHI 菌を同定するステップ；および

d) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が前記対象の上気道における前記 NTHI 菌の存在を示すステップ；を含む、前記免疫測定法。

(項目 36)

前記対象を NTHI 感染症と診断するステップをさらに含む、項目 35 に記載の免疫測定法であって、前記対象の上気道における前記 NTHI 菌の存在が、NTHI 感染症を示す、前記免疫測定法。

(項目 37)

前記細菌感染症を治療するために有効な量の治療用化合物を投与するステップをさらに含む、項目 35 または 36 に記載の免疫測定法。

(項目 38)

対象の上気道の分類不能型インフルエンザ (NTHI) 感染症を診断するための免疫測定法であって、

a) 前記対象の上気道における NTHI 菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマーカーに対して特異的な抗体を含むデバイスを使用して、前記対象の上気道から分泌物の試料を得るステップであって、前記少なくとも一つのバイオマーカーが OMP P2 または OMP P5 であるステップ；

b) 前記対象の上気道における NTHI 菌の存在と関連する少なくとも 1 つのバイオマ

10

20

30

40

50

カーの存在を検出して、タンパク質プロファイルを作成するステップ；

c) 前記タンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップであって、前記基準のタンパク質プロファイルがNTHI菌を同定するステップ；および  
d) 前記試料のタンパク質プロファイルが、前記基準のタンパク質プロファイルと関連するかどうかを判定するステップであって、ここで関連が前記対象の上気道のNTHI感染症を示すステップ；を含む、前記免疫測定法。

(項目39)

前記対象に、前記対象の上気道におけるNTHI菌の存在またはNTHI感染症を告知するステップをさらに含む、項目35～38のいずれか1項に記載の免疫測定法。

(項目40)

前記細菌感染症を治療するために有効な量の治療用化合物を投与するステップをさらに含む、項目35～39のいずれか1項に記載の免疫測定法。

(項目41)

前記試料を、無菌スワブ、無菌ガーゼ、吸引管またはバルーンカテーテルを使用して取得する、項目35～40のいずれか1項に記載の免疫測定法。

(項目42)

対象の上気道のNTHI菌を低減もしくは除去するため、または対象の上気道のNTHI感染症を治療するための、薬物の調製のための治療用化合物の使用であって、NTHI菌の存在またはNTHI感染症が、項目35～40のいずれか1項に記載の免疫測定法により判定される、OMP P2およびOMP P5から選択される少なくとも1つのバイオマーカーの存在により判定される、前記使用。

(項目43)

対象の上気道のNTHI菌を低減もしくは除去するため、または対象の上気道のNTHI感染症を治療するための治療用組成物であって、NTHI菌の存在またはNTHI感染症が、項目29～35のいずれか1項に記載の免疫測定法により判定される、OMP P2およびOMP P5から選択される少なくとも1つのバイオマーカーの存在により判定される、前記治療用組成物。

(項目44)

対象の上気道から分泌物の試料を得るためのデバイスであって、前記対象の上気道における病原菌の存在と関連する、少なくとも1つのバイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する基質を含む、前記デバイス。

(項目45)

項目1～8、11～17および20～26に記載の方法、または項目27～31および35～41に記載の免疫測定法のうちのいずれかを実施するための、対象の上気道から分泌物の試料を得るためのデバイスであって、前記対象の上気道における病原菌の存在と関連するバイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する基質を含む、前記デバイス。

(項目46)

前記抗体がOMP P2 またはOMP P5に対して特異的である、項目44または45に記載のデバイス。

(項目47)

項目1～8、11～17および20～26のいずれか1項に記載の方法、または項目27～31および35～41のいずれか1項に記載の免疫測定法を実施するためのキットであって、前記対象の上気道における病原菌の存在または細菌感染症と関連する、少なくとも1つのバイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する基質を含む、前記キット。

(項目48)

項目1～8、11～17および20～26のいずれか1項に記載の方法、または項目27～31および35～41のいずれか1項に記載の免疫測定法を実施するためのキットであって、対象の上気道から分泌物の試料を得るため、および前記対象の上気道の病原菌または細菌感染症と関連するタンパク質プロファイルを作成するためのデバイスを含む、前記キット。

10

20

30

40

50



(項目49)

項目1～8、11～17および20～26のいずれか1項に記載の方法、または項目27～31および35～41のいずれか1項に記載の免疫測定法を実施するためのキットであって、前記対象の上気道の病原菌または細菌感染症と関連するタンパク質プロファイルを作成するために特異的な抗体を提示する基質を含む、前記キット。

(項目50)

前記デバイスが無菌スワブ、無菌ガーゼ、吸引管またはバルーンカテーテルである、項目49に記載のキット。

(項目51)

前記病原菌が、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、モラクセラ・カタラリス (*Moraxella catarrhalis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) またはステノトロフォモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) である、項目47～50のいずれか1項に記載のキット。

10

【図面の簡単な説明】【0057】

【図1】NTHI バイオフィルム上清において、時間経過に渡って保持された、特徴的なタンパク質プロファイルの銀染色を示す。

20

【図2】NTHI バイオフィルム上清中のNTHI OMPの存在を実証する、ウェスタンブロット解析を示す。

【図3】種々のNTHI株のバイオフィルム上清中のOMP P2およびOMP P5の存在を実証する、ウェスタンブロット解析を示す。

【発明を実施するための形態】【0058】

本発明は、細菌性副鼻腔炎の検出および診断のための改善された感度および特異度を有する方法を提供する。より詳細には、本発明の方法は、副鼻腔内に存在する病原性バイオフィルムの分泌物内のタンパク質の、抗体ベースの細菌検出を含む。これらの方法は、副鼻腔中の一般に無菌の部位からの、特定の病原性微生物を同定する微量のシグネチャータンパク質の検出を可能にする。本発明の方法は、高感度および高特異度で細菌性副鼻腔炎を診断することが困難なために、上気道ウイルス感染症を治療するためにしばしば不適切に投与される、広域性の、経験的な抗生物質を回避することを可能にする。一般的培養は、細菌性バイオフィルムの検出における非常に低い感度、および共生生物と病原性生物の識別における低い特異度を有するため、本発明の方法は、これらの培養に勝る改善である。

30

【0059】

本発明はまた、一般に無菌の副鼻腔にバルーンカテーテルを通してワイヤを送達すること；これらの部位から粘液を採取すること；およびこれらの一般に無菌の部位から特定の病原性微生物を同定する微量のシグネチャータンパク質の存在を迅速に検出すること；に

40

【0060】バイオマーカー

「バイオマーカー」という用語は、それにより特定の病理学的または生理的プロセス、疾患等を同定するかまたは特徴付することができる、天然分子、遺伝子、または特徴を指す。「バイオマーカー」という用語は、その濃度が、いくつかの疾患状態の重症度または存在を反映する、試料中で測定されるタンパク質を指す。病理学的または生理的なプロセス、疾患等の診断または進行に関するリスクを特定するために、バイオマーカーを測定し

50

得る。例となるバイオマーカーとしては、タンパク質、ホルモン、ホルモン前駆体、脂質、炭水化物、DNA、RNAおよびそれらの組み合わせが挙げられる。

【0061】

例えば、NTHI病原菌に対するバイオマーカーとしては、外膜タンパク質P2 (OMP P2; 配列番号1)、高分子量アドヘシン1 (HMW1A; 配列番号2)、推定周皮質キレート鉄結合タンパク質 (periplasmic chelated iron binding proteins) (配列番号3)、IgA-特異的セリンエンドペプチダーゼ (配列番号4)、外膜タンパク質P5 (OMP P5; 配列番号5)、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (配列番号6)、HMWA (配列番号7)、リン酸ABCトランスポーターリン酸結合タンパク質 (配列番号8)、推定アドヘシンB前駆体FimA (配列番号9)、高分子量アドヘシン2 (HMW2A; 配列番号10)、外膜タンパク質P5前駆体 (配列番号11) および外膜タンパク質P1 (OMP P1; 配列番号12) が挙げられる。

10

【0062】

本発明の方法は、病原菌のタンパク質プロファイルのうちの、少なくとも1つのバイオマーカー、少なくとも2つのバイオマーカー、少なくとも3つのバイオマーカー、少なくとも4つのバイオマーカー、少なくとも5つのバイオマーカーまたは6以上のバイオマーカーを検出することを含む。タンパク質バイオマーカーの検出には、完全長のタンパク質バイオマーカー、または免疫原性のもしくは生物学的に活性な断片を含む、タンパク質バイオマーカーの断片を検出することが含まれる。より詳細には、本発明の方法には、少なくともOMP P2およびOMP P5を検出して、NTHI菌のタンパク質プロファイルを作成することが含まれる。

20

【0063】

本発明はまた、本発明のアミノ酸配列の生物学的に活性なまたは免疫学的に活性な変異体; ならびに生物学的および/または免疫原性の活性を保持する、その「実質的等価物」(例えば、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、一般的には少なくとも約95%、96%、97%、より一般的には少なくとも約98%、または最も一般的には少なくとも約99%のアミノ酸同一性を有する)を提供する。対立遺伝子変異型によりコードされるポリペプチドは、天然のポリヌクレオチドにコードされたポリペプチドと比較して、類似した、増加した、または減少した活性を有し得る。

30

【0064】

本発明はさらに、核酸断片または核酸断片の変性変異体によりコードされた、単離されたポリペプチドまたはペプチドを提供する。「変性変異体」という用語は、天然の核酸断片(例えば、ORF)とヌクレオチド配列が異なるが、遺伝暗号の縮重に因り同一のポリペプチド配列をコードする、ヌクレオチド断片を指す。好ましい核酸断片は、タンパク質をコードするORFである。

【0065】

本発明はまた、ポリペプチドの生物学的および/または免疫原性の活性に影響を与えない、1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドを提供する。あるいは、ポリペプチドは、生物活性を変化させ得るかまたはさせ得ない保存的アミノ酸置換を有すると考えられる。「保存的アミノ酸置換」という用語は、その位置のアミノ酸残基の極性または電荷にほとんど影響がないかまたは全く影響がないような、天然のアミノ酸残基の、外来残基(自然起源および非自然起源のアミノ酸を含む)による置換を指す。例えば、保存的置換は、ポリペプチド中の非極性残基の、いずれかの他の非極性残基による置換により生じる。さらに、「アラニンスキヤニング変異誘発」法に従って、ポリペプチド中のいかなる天然残基をも、アラニンにより置換し得る。天然のアミノ酸は、以下のような、それらの側鎖に基づいて特徴づけられる: 塩基性: アルギニン、リジン、ヒスチジン; 酸性: グルタミン酸、アスパラギン酸; 非荷電極性: グルタミン、アスパラギン、セリン、

40

50

スレオニン、チロシン；および非極性：フェニルアラニン、トリプトファン、システイン、グリシン、アラニン、バリン、プロリン、メチオニン、ロイシン、ノルロイシン、イソロイシン。アミノ酸置換の一般的な規則を、以下の表 1 に示す。

表 1

アミノ酸置換

【表 1】

元の残基	例となる置換	好ましい置換
Ala	Val、Leu、Ile	Val
Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser、Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asn
Gly	Pro、Ala	Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe、 ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン、Ile、Val、Met、 Ala、Phe	Leu
Lys	Arg、1, 4 ジアミノ酪酸、Gln、 Asn	Arg
Met	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、Ty r	Arg
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr、Ala、Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr、Phe	Tyr
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val	Ile、Met、Leu、Phe、Ala、 ノルロイシン	Leu

## 【0066】

ポリペプチドは、ポリペプチドバイオマーカーをコードするポリヌクレオチドと実質的に同等なヌクレオチド配列によりコードされ得る。本発明のポリヌクレオチドは、天然のポリヌクレオチド配列と、例えば、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または 89%、より一般的には、少なくとも 90%、91%、92%、93%、または 94%、およびさらにより一般的には、少なくとも 95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を有し得る。

## 【0067】

本発明の核酸配列の範囲には、ストリンジेंटな条件下で、ポリペプチドバイオマーカーまたはその相補体をコードするヌクレオチド配列とハイブリダイズする核酸配列断片が含まれ、その断片は、約5ヌクレオチド、好ましくは7ヌクレオチドより大きく、より好ましくは9ヌクレオチドより大きく、および最も好ましくは17ヌクレオチドより大きい。例えば、15、17、または20ヌクレオチド以上の、選択的である（すなわち、本発明のポリヌクレオチドのうちのいずれかと特異的にハイブリダイズする）断片が意図される。ポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズ可能なプローブは、本発明のポリヌクレオチド配列を、同じファミリーの遺伝子の他のポリヌクレオチド配列と識別することができ、または遺伝子を、他の細菌遺伝子と識別することができ、および独自のヌクレオチド配列に基づくことが好ましい。

10

## 【0068】

「ストリンジेंटな」という用語は、当技術分野において、ストリンジेंटとして通常理解される条件を指す。ハイブリダイゼーションのストリンジエンスは、主に温度、イオン強度、および、例えばホルムアミドなどの変性剤の濃度により決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のためのストリンジेंटな条件の例は、65～68での、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、または42での、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および50% ホルムアミドである。Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. sup. ed. Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)を参照のこと。よりストリンジेंटな条件（例えばより高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた使用し得るが、ハイブリダイゼーションの速度に影響を与える。デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが関連する場合において、追加の、例となるストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件には、37（14塩基のオリゴ用）、48（17塩基のオリゴ用）、55（20塩基のオリゴ用）、および60（23塩基のオリゴ用）での、6x SSC 0.05% ピロリン酸ナトリウム中での洗浄が含まれる。

20

## 【0069】

非特異的なおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝剤中に、他の薬剤が含まれ得る。例は、0.1% ウシ血清アルブミン、0.1% ポリビニル-ピロリドン、0.1% ピロリン酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、NaDodSO<sub>4</sub>・sub<sub>4</sub>、(SDS)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子DNA（または他の非相補的DNA）、およびデキストラン硫酸であるが、他の好適な薬剤も使用することができる。ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンスに実質的に影響を与えることなく、これらの添加物の濃度および種類を、変更することができる。ハイブリダイゼーション実験は、通常pH6.8～7.4で実施されるが、一般的なイオン強度条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、ほぼpHに依存しない。Anderson et al., Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited (Oxford, England)を参照のこと。これらの変数を受け入れ、異なる配列関連性を有するDNAのハイブリッド形成を可能にするために、当業者がハイブリダイゼーション条件を調整することができる。

30

40

## 【0070】

本発明の範囲に含まれる配列は、これらの特定の配列に限定されず、それらの対立遺伝子変異および種の変異をも含む。2つの配列間の同一性および類似性を判定するための、好ましいコンピュータプログラム法としては、限定されないが、GAPを含むGCGプログラムパッケージ(Devereux et al., Nucl. Acid. Re

50

s., 12: 387, -1984; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, およびFASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410, 1990)が挙げられる。BLASTXプログラムは、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)および他のソース(BLAST Manual, Altschul et al., NCBI/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul et al., 上記)から、一般に利用可能である。公知のスミス・ウォーターマンアルゴリズムもまた、同一性を判定するために使用し得る。

【0071】

#### タンパク質プロファイルの作成方法

本発明の方法は、対象の上気道から得た分泌物試料のタンパク質プロファイルを作成すること、および病原菌バイオフィーム上清のタンパク質プロファイルを作成することを含む。本発明の方法における使用のために、公知の病原菌バイオフィームタンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルとして使用し得る。

【0072】

タンパク質プロファイルの他のメンバーからの、目的のタンパク質の分離は、いくつかの技術、例えばショ糖勾配遠心法、水性または有機分配(例えば、二相分配)、非変性ゲル電気泳動、等電点ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、等速電気泳動、質量分光法、クロマトグラフィー(例えば、HPLC)、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE、例えばSDS-PAGE)、ゲル浸透、イオン交換スピンカラム等によっても、達成し得る。これらの実施形態において、精製プロセスをモニタするために、SELDI、または他の迅速な解析技術を使用し得る。精製後、全ての可能性のあるバイオマーカーを、SDS-PAGEおよび質量分析法により特徴付けし、ペプチドマッピングおよび/またはアミノ酸配列解析により同定し得る。

【0073】

例えば、サイズ、または浮遊密度勾配分離法、例えば、試料の構成成分のポリペプチドを、それらが含まれる複合体のサイズにより分離する非連続的ショ糖勾配により、タンパク質バイオマーカーを分離し得る。タンパク質の分離のためのショ糖勾配は公知であり、必要に応じて変更し得る。このような変更には、非連続勾配ではなく連続勾配の使用、および異なる勾配条件(例えば、異なるショ糖濃度または異なる緩衝剤)の使用が含まれ得る。勾配の長さも変化させることができ、より長い勾配は、タンパク質とタンパク質複合体のより良い全体的な分離をもたらす、およびより多数の画分をもたらすことが期待され、画分は次いで変性系を使用してそれぞれ個別に解析される。

【0074】

個別のタンパク質バイオマーカーを、電気泳動により、サイズに基づいて分離し得る(例えば、SDS-PAGEまたはサイジングゲルにより)。他の分離技術には、水性二相分配および非変性アガロースゲル電気泳動分離が含まれ得る。他の実施形態において、分離には、変性系、例えば等電点(IEF)ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、または等速電気泳動を用いる。代替としてまたは付加的に、二次元の電気泳動解析を使用してもよい(例えば、Wilkins et al., Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, Springer-Verlag, Berlin, 1997)。当技術分野で公知の種々の染色のうちいずれか(例えば、Trypan BlueまたはSypro Ruby色素)を使用して、そのようなゲル上でタンパク質を可視化することができる。記載される系の成分画分中のタンパク質を分離するために、従来の緩衝系も、使用することができる。個々のゲルを泳動させる温度、電圧、およびアンペア数もまた、勾配平衡および遠心分離の速度および持続時間と同様、変更することができる。

【0075】

タンパク質バイオマーカーの精製は、従来のクロマトグラフィー技術を使用して実施し

10

20

30

40

50

得る。一実施形態においては、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用し得る。また、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）およびドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）の組み合わせを使用して、タンパク質を精製してもよい。次いで、SELDIまたは他の方法を使用して、目的のタンパク質に関して画分をアッセイし得る。

【0076】

例えば、ある特定のマトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）質量分析法、表面強化レーザー脱離/イオン化（SELDI）およびプロテインチップ質量分析法などの種々の方法を使用して、タンパク質プロファイルを作成することができる。

【0077】

方法には、タンパク質プロファイルを解析するステップが含まれ得る。一実施形態において、タンパク質プロファイルの解析は、統計解析および他のデータ操作技術（例えば、信号処理、ノイズの除去）を含む。いくつかの実施形態において、解析のための技術は、コンピュータ統計処理およびデータ処理ソフトウェアを含む。例えば、タンパク質プロファイルの解析は、試料中のタンパク質の、分子量（質量）、実効電荷、およびまたは量のうちの少なくとも1つの測定を含み得る。

【0078】

方法はまた、対象の試料のタンパク質プロファイルを、基準のタンパク質プロファイルと比較するステップを含み得る。既知の細菌株に関して作成されたバイオフィルムのタンパク質プロファイルに加え、基準のプロファイルは、目的の疾患の症状を示さない健康な対照の対象（すなわち、陰性対照）由来であってもよい。基準のプロファイルは、目的の疾患を有する対象（すなわち、陽性対照）由来であってもよい。また、試料のタンパク質プロファイルを、同一の対象由来であるが異なる時間点において単離された、基準のタンパク質プロファイルと比較してもよい（例えば、疾患の進行または緩解をモニタするため）。さらなる他の実施形態において、試料タンパク質プロファイルを、複数の基準のタンパク質プロファイル、例えば、特定の疾患または疾患サブタイプの診断指標として作成された、基準のプロファイルと比較してもよい。このようにして、試料タンパク質プロファイルが、いずれかの1つの疾患または疾患サブタイプの特色を示す特定のタンパク質または目的のタンパク質と一致するかどうかを、判定することが可能であり得る。

【0079】

本発明の方法を実施するためのキットおよびデバイス

本発明は、本発明の方法および免疫測定法を実施するためのキットを提供する。一実施形態において、キットは、対象の上気道内の無菌の区画から分泌物試料を得るためのデバイスを含む。キットはまた、目的のタンパク質バイオマーカーと特異的に結合する抗体、およびこれらの抗体を使用して前記タンパク質バイオマーカーを検出するための免疫測定法のための成分を含み得る。さらに、キットは、目的のタンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する基質を含み得る。さらに、キットは、本発明の方法または免疫測定法のうちのいずれかを実施するための、使用説明書を含み得る。

【0080】

一実施形態においては、無菌のスワブまたはガーゼを使用して、上気道由来の分泌物を取得し得る。本発明の別の実施形態においては、鼻洗浄法を使用して、分泌物試料を採取し得る。あるいは、電気ポンプに接続された吸引管および対象の上咽頭中に挿入されたカテーテルを使用して、分泌物試料を採取してもよい。

【0081】

別の実施形態において、分泌物試料を得るためのデバイスは、対象の上気道内の無菌の区画からの分泌物の採取を可能にする、セルディング法を用いる改良バルーンカテーテルである。バルーンカテーテルは、カテーテル中へ挿通された、目的のタンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する基質を有し得る。さらなる実施形態においては、目的のタンパク質バイオマーカーに対して特異的な抗体を提示する基質が、デバイスの吸引口中へ挿通された、改良末梢チップ気管支食道鏡（modified distal

10

20

30

40

50

chip bronchoscope) または経鼻食道鏡を使用し得る。

【0082】

本発明は、病原菌のバイオフィルムのタンパク質プロファイルに対して特異的な、少なくとも1つのバイオマーカーを検出するための免疫測定法を提供する。例えば、タンパク質プロファイル内の2つ以上のバイオマーカーに対して特異的な抗体を、固体基質に提示または吸収させ、対象の気道の上気道から得た分泌物試料を、固体基質と接触させ、抗体の基質との結合を検出する。

【0083】

タンパク質プロファイルのバイオマーカーを検出するために、当技術分野で公知のいかなる種類の免疫測定システムを使用してもよい。例となる方法としては、限定されないが：放射性免疫測定法、ELISA法、サンドイッチ法、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散法、凝集法、蛍光免疫測定法、プロテインA免疫測定法および免疫電気泳動法、ならびに本明細書に記載される、タンパク質プロファイルを生成するためのいずれかの他の方法が挙げられる。免疫測定法は、標的検体(目的のバイオマーカー)が、標識された抗体と固体基質上に固定化された抗体との間に「サンドイッチされる」、サンドイッチ法であってもよい。免疫測定法は、固定化された抗体に結合した、抗原-標識抗体複合体の存在および量を観察することにより、読み取られる。別の免疫測定法は、固体表面上に固定化された抗体を、未知の量の抗原検体(目的のバイオマーカー)および同じ種類の標識された抗原の両方を含む試料(例えば、上気道由来の分泌物)と接触させる、「競合」型免疫測定法であってもよい。次いで、固体基質上に結合した標識された抗原の量を測定して、試料中の抗原検体(目的のバイオマーカー)の量の間接的測定値を得る。このような免疫測定法は、「ディップスティック」または都合の良い使用のための他の試験デバイス型(例えば、フロースルーもしくは移動ディップスティック(migratory dipstick)または他の試験デバイス設計)において、容易に実施される。例えば、多くの種類のディップスティック型免疫測定法が、米国特許第5,656,448号に記載されている。

【0084】

例えばニトロセルロースまたは二フッ化ポリビニリデン(PVDH)の条片もしくはシートなどのシート上、または他の膜、ディップスティック、ウェル、例えば96-ウェルのプラスチック皿上、または管中で、免疫測定法を実施し得る。

【0085】

本発明の方法および免疫測定法において使用されるデバイスは、例えば、目的のバイオマーカーが対象の上気道由来の分泌物試料内にある場合、色彩表示を提供することができる。デバイスを臨床環境において使用して、対象が上気道に病原性細菌または細菌感染症を有するかどうかを迅速に判定することができる。あるいは、濃度計、または一般的に、アッセイ結果の尺度として、光強度、透過度、反射または屈折を測定するためのデバイス、または光の波長を測定するためのデバイスと、本発明の方法および免疫測定法を組み合わせ使用してもよい。濃度計または他のデバイスは、分泌物試料と接触させたデバイス内の基質の吸光度の、迅速な測定を提供することができる。一実施形態においては、色、密度、または他のパラメータにおける変化を、裸眼で読み取ることができる。

【0086】

解析用試料を抽出するためのアッセイ内のデバイス、および目的の病原菌のタンパク質プロファイル内のタンパク質に対して特異的な抗体を含む、側方流動免疫測定法(lateral-flow immunoassay)を使用して、本発明を実施することもできる。本発明はまた、例えば、米国特許第5,415,994号および同5,763,262号に記載されるものなどの免疫測定デバイスを提供し、これには、本発明の方法のうちのいずれかを使用して特定の病原菌に関して同定された、タンパク質プロファイルが含まれる。より詳細には、本発明は、分泌物試料内の目的のバイオマーカーの視覚的検出を可能にする、比色分析免疫測定法を提供する。視覚的検出は、感染症の治療計画に組み込

10

20

30

40

50

むことができる、迅速な結果を可能にする。

【0087】

本発明の方法、免疫測定法またはキットにより作成された試料のタンパク質プロファイルと比較するために、本発明の方法において、基準のまたは標準のタンパク質プロファイルを使用することができる。基準のまたは標準のタンパク質プロファイルは、感染の間に、上気道内の病原菌のバイオフィルム分泌物中に存在することが知られる、バイオマーカーの濃度を提供する。「キャリブレーター」とは、未知の生体液中のバイオマーカーの濃度を定量化するための検量線を作成するために、既知の量の目的のバイオマーカーを検出する、免疫測定法を指す。

【0088】

「標準の」または「基準の」という用語は、上気道の細菌感染症を有する対象から採取されたことが知られる生体液から、本発明の免疫測定法キットに含まれる試薬の品質を制御するために好適な定量的形態で、目的のバイオマーカーを測定する、免疫測定法を指す。本発明の他の態様および優位性は、例証となる以下の実施例を考慮することにより、理解される。

【実施例】

【0089】

実施例 1

病原菌のシグネチャータンパク質プロファイルの決定

分類不能型インフルエンザ菌 (NTHI) バイオフィルム由来の上清を分析して、NTHI のシグネチャータンパク質プロファイルを決定した。NTHI 株 86 - 028 NP を、8 ウェルのチャンバースライド中で 10 日間培養し、得られた上清を 24 時間間隔で収集した。NTHI バイオフィルム培養物から収集した上清中のタンパク質を SDS - PAGE により分離し、および銀染色によって、図 1 に示す通り、時間経過に渡って保持された特徴的なタンパク質プロファイルが明らかになった。

【0090】

NTHI バイオフィルム上清から単離されたタンパク質を、ナノ液体クロマトグラフィー / タンデム質量分析法 (LC - MS / MS) により解析した。同定されたタンパク質の分子量を、NTHI 株 86 - 028 NP の既知のタンパク質プロファイルの分子量と比較し ( ( Bakaletz et al. Infection and Immunity, 56 (2) : 331 - 335, 1988 )、それらの 86 - 028 NP タンパク質プロファイルとの関連に基づき、Mascot (マトリックスサイエンス社 (Matrix Science)、マサチューセッツ州、ボストン) を製造者の指示に従って使用して、同定されたタンパク質をスコア化した。この比較の結果を、以下の表 2 に示す。いくつかの NTHI 外膜タンパク質 (OMP) を、主要な OMP (太字のイタリック) : 高分子量アドヘシン 1 および 2 (HMW1 / HMW2)、OMP P5、OMP P2、OMP P1、および IgA - プロテアーゼの優勢により、同定した (太字で示す)。

【0091】

NTHI バイオフィルム上清中の NTHI OMP の存在を実証するために、全 OMP、OMP P5 および OMP P2 (チンチラポリクローナル抗体)、ならびに HMW1 および HMW2 タンパク質 (モノクローナル抗体) に対する抗血清を用いて、ウェスタンブロット解析を実施した。この解析により、バイオフィルム上清中の複数の NTHI 特異的 OMP の存在が実証された (図 2 を参照のこと)。

表 2 :

10

20

30

40



【表 2】

同定されたタンパク質	スコア	質量 (kDa)	受託番号	配列 番号
外膜タンパク質 P 2	1227	39.9	gi 68248747	1
HMW 1 A、高分子量アドヘシン 1	1205	154.5	gi 68250281	2
推定周辺質キレート鉄結合タンパク質 (periplasmic chelated iron binding proteins)	1089	32.4	gi 301169065	3
I g A-特異的セリンエンドペプチダーゼ	948	197.5	gi 68249575	4
外膜タンパク質 P 5	886	38.4	gi 68249712	5
ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ	791	34.0	gi 145640927	6
HMWA	720	160.5	gi 68249817	7
リン酸 ABC トランスポーターリン酸結合タンパク質	703	36.6	gi 16273649	8
推定アドヘシン B 前駆体 F i m A	402	35.0	gi 3003012	9
HMW 2 A、高分子量アドヘシン 2	326	160.7	gi 68249817	10
HMWA	321	160.5	gi 5929966	11
外膜タンパク質 P 5 ; 前駆体	283	37.7	gi 585614	12
外膜タンパク質 P 1	215	49.7	gi 9716607	13

10

20

## 【 0 0 9 2 】

病原性 N T H I バイオフィルムのシグネチャータンパク質プロファイルの一例は、O M P P 5、O M P P 2、H M W 1 および H M W 2 である。従って、上気道から得た分泌物試料における、これらのタンパク質バイオマーカーの検出は、N T H I 感染を示す。上気道感染症を有する患者における、病原菌感染症、例えば N T H I 感染症の正確な診断は、患者の早期の回復を達成するため、および地域社会における抗生物質耐性感染症の出現を減少させるための、適切な治療の選択を助け、かつ抗生物質の賢明な処方を促進する。

30

## 【 0 0 9 3 】

## 実施例 2

副鼻腔感染症における N T H I バイオフィルム特異的タンパク質の検出

副鼻腔炎を患うヒト患者のタンパク質プロファイルを決定するために、患者の上気道から分泌物試料を得る。これらの試料を、O M P P 5、O M P P 2、H M W 1 および H M W 2 の存在に関して、実施例 1 に記載される通りに解析する。患者のタンパク質プロファイルを、上述される *in vitro* の N T H I バイオフィルムの上清から作成された基準のタンパク質プロファイルと比較する。

40

## 【 0 0 9 4 】

## 実施例 3

他の細菌種と関連するタンパク質バイオマーカーの同定

実施例 1 に記載される方法を、他の病原菌の種類、例えば肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、モラクセラ・カタリス (*Moraxella catarrhalis*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) およびステノトロフォモナス・マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*)

50

)のバイオフィルム由来の上清を用いて実施する。

【0095】

#### 実施例4

病原菌のシグネチャータンパク質プロファイル決定の更なる解析

複数株の分類不能型インフルエンザ菌(NTHI)から得たバイオフィルムの上清を解析して、NTHIのシグネチャータンパク質プロファイルを定義した。NTHI株86-028NP、1128MEE、1714、1748、1885MEEおよび2019を、8ウェルのチャンバースライド中で10日間培養し、得られた上清を、24時間間隔で収集した。NTHIバイオフィルム培養物から収集した上清中のタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、および銀染色によって、時間経過に渡って保持された特徴的なタンパク質プロファイルが明らかになった。図3は、チンチラ抗-OMP P2または抗-OMP P5抗体を使用するウェスタンブロットを示し、これは、全ての試験されたNTHI株のバイオフィルムにおいて、OMP P2およびOMP P5が高レベルで存在することを示す。

10

【0096】

NTHIバイオフィルム上清から単離されたタンパク質を、ナノ液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC-MS/MS)により解析した。同定されたタンパク質の分子量を、NTHI株86-028NPの既知のタンパク質プロファイルの分子量と比較し(Bakaletz et al. Infection and Immunity, 56(2): 331-335, 1988)、それらの86-028NPタン

20

パク質プロファイルとの関連に基づき、Mascot(マトリクスサイエンス社(Matrix Science)、マサチューセッツ州、ボストン)を製造者の指示に従って使用して、同定されたタンパク質をスコア化した。

この比較の結果を、以下の表3に示す。これらの実験は、好ましいNTHIバイオフィルムタンパク質プロファイルが、OMP P2およびOMP P5を含むことを示す。

表3:

P2断片

【表3a】

スコア	説明	生物
2927	外膜タンパク質P2	インフルエンザ菌
771	外膜タンパク質P5	インフルエンザ菌
688	スペルミジン/プトレシン結合周辺質タンパク質1	インフルエンザ菌
352	ケラチン、II型細胞骨格2表皮(type II cytoskeletal 2 epidermal)	ホモサピエンス
335	トリプシン	イノシシ(Sus scrofa)
292	タンパク質mrpホモログ	インフルエンザ菌
165	3-デヒドロキナ酸デヒドラターゼシンターゼ	インフルエンザ菌
143	フェニルアラニル-tRNAシンセターゼアルファ鎖	インフルエンザ菌
105	グルタメート5-キナーゼ	インフルエンザ菌
100	アスパルテート-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ	インフルエンザ菌

30

40

P5断片

【表 3 b】

スコア	説明	生物
1512	リポタンパク質E	インフルエンザ菌
1105	外膜タンパク質P2	インフルエンザ菌
718	ハイブリッド・ペルオキシレドキシシ・hyPrx5	インフルエンザ菌
361	外膜タンパク質P5	インフルエンザ菌
354	トリプシンOS=イノシシ (Sus scrofa)	イノシシ (Sus scrofa)
255	2, 3, 4, 5-テトラヒドロピリジン-2, 6-ジカルボキシレート N-スクシニルトランスフェラーゼ	インフルエンザ菌
168	推定グルタミン・アミドトランスフェラーゼ HI_1037	インフルエンザ菌
167	ホスフェート輸送ATP-結合タンパク質 PstB	インフルエンザ菌
124	ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ	インフルエンザ菌
118	Igκ鎖C領域	ハツカネズミ (M. musculus)

10

20

## 【0097】

単離されたタンパク質はまた、カチオン性クロマトグラフィーおよびゲルクロマトグラフィーにより精製された。精製されたOMP P2およびOMP P5タンパク質は、本発明の方法、免疫測定法およびデバイスにおける使用のための、モノクローナル抗体を生成するために使用される。本発明の方法、免疫測定法およびデバイスにおいて使用される抗体が高度に特異的であることが、重要である。現在入手可能なチンチラポリクローナル抗体は、本発明の方法を実施するために必要な特異性を示さない。

## 【0098】

## 実施例5

30

## モノクローナル抗体の生成

実施例4に記載の、精製されたOMP P2およびOMP P5タンパク質を使用し、当技術分野で公知の標準的技術を使用して、本発明の方法、免疫測定法およびデバイスにおける使用のためのモノクローナル抗体を作製する。

## 【0099】

例えば、精製されたOMP P2タンパク質または精製されたOMP P5タンパク質により、マウスを腹腔内で免疫化する。4日後、マウスを屠殺し、当技術分野で標準的な方法を使用して、脾臓細胞をマウスの骨髄腫細胞と融合させる。例えば、ハイブリドーマ技術は、Kohler et al., Nature 256: 495に記載され、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術は、Kozbor et al., Immunol. Today 4, 72 (1983)に記載され、ヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術は、Cole et al. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy (1985) Allen R. Bliss, Inc., pages 77-96に記載され、および組み合わせ抗体ライブラリのスクリーニング法はHuse et al., Science 246, 1275 (1989)に記載される。

40

## 【0100】

融合した細胞を、単一コロニー選択のために、96ウェルプレート中でクローニングする。融合の7~10日後、コロニーを有する各ウェルからの培養上清を、抗OMP P2または抗OMP P5抗体の存在に関してアッセイする。クローニングの2~4週間後、

50

単細胞コロニーからの上清を、抗OMP P2または抗OMP P5抗体の存在について、再度スクリーニングする。さらなる試験のためにより多くの上清を収集するため、陽性反応を有するウェルを、より大きなウェル中へさらに拡張し、最終的にはフラスコ中に拡張する。

【0101】

陽性のクローン由来のハイブリドーマ細胞を、腹水を産生させるために、未処置のマウスに注入する。腹水からモノクローナル抗体を精製し、当技術分野で公知の標準のアッセイを使用して、精製されたモノクローナル抗体の特異性を試験する。

【0102】

実施例6

本発明の免疫測定法

副鼻腔炎を患うヒト患者のタンパク質プロファイルを決定するために、実施例5に記載される抗OMP P2およびOPM P5モノクローナル抗体を使用する。分泌物試料を患者の上気道から取得する。これらの試料を、少なくともOMP P5、OMP P2、HMW1またはHMW2の存在に関して、実施例1に記載される通りに解析する。患者のタンパク質プロファイルを、上述される *in vitro* のNTHIバイオフィルム上清から作成された、基準のタンパク質プロファイルと比較する。

【0103】

実施例5に記載される、抗OMP P2および抗OPM P5モノクローナル抗体の使用のための感度および特異度のパラメータを、分類不能型インフルエンザ菌 (*nontypeable Haemophilus influenzae*) の検出のための、*hpd* をプライマーとして使用するゴールドスタンダードのリアルタイムPCRアッセイに対して決定する；該アッセイはNTHI株86-028NP、1128MEE、1714、1748、1885MEEおよび2019、ならびにモラクセラ・カタラリス (*Moraxella catarrhalis*) のいくつかの臨床的単離物の検出において、100%の特異度および感度を示している。

【0104】

現在好ましいその実施形態を考慮する際、本発明の実践における多くの改変および変更を、当業者が思いつくことが予想される。従って、本発明の範囲に適用される唯一の限定は、添付される請求の範囲に記載されるものである。

10

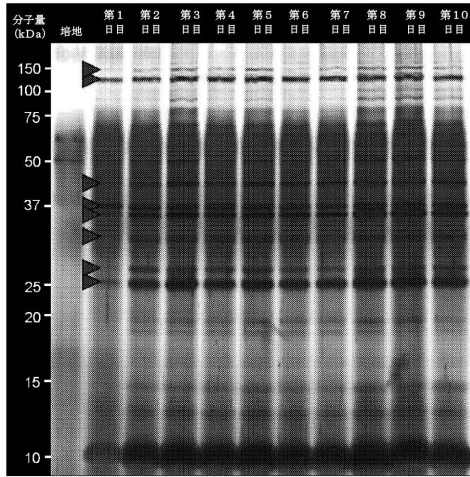
20

30

【 図 1 】

【 図 1 】

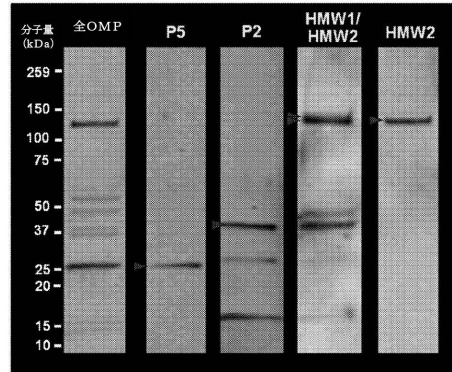
図 1



【 図 2 】

【 図 2 】

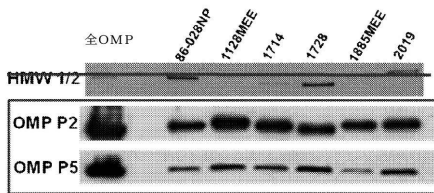
図 2



【 図 3 】

【 図 3 】

図 3



**【配列表】**

0006050337000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 0 7 K 16/12 (2006.01) C 0 7 K 16/12

(72)発明者 ダス, スピノイ  
アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 1 2, コロンバス, キニアー ロード 1 2 1 6, ザ  
オハイオ ステイト ユニバーシティ 気付  
(72)発明者 バカレッツ, ローレン オー.  
アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 0 2 6, ヒルヤード, キャンターウッド コート 4 8 2 5

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開昭62-148859(JP,A)  
国際公開第2010/079739(WO,A1)  
米国特許出願公開第2012/0276145(US,A1)  
国際公開第2005/090972(WO,A1)  
ALBERTO VILLASENOR-SIERRA AND JOSE IGNACIO SANTOS, OUTER MEMBRANE PROTEIN PROFILES OF PAIRED NASOPHARYNGEAL AND MIDDLE EAR ISOLATES OF NONTYPABLE HAEMOPHILUS INFLUENZAE FROM MEXICAN CHILDREN WITH ACUTE OTITIS MEDIA, CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, 1999年, Vol.28, Page.267-73  
B DUIM, L D BOWLER, P P EIJK, H M JANSEN, J DANKERT, L VAN ALPHEN, MOLECULAR VARIATION IN THE MAJOR OUTER MEMBRANE PROTEIN P5 GENE OF NONENCAPSULATED HAEMOPHILUS INFLUENZAE DURING CHRONIC INFECTIONS, INFECT IMMUN., 1997年, Vol.65, No.4, Page.1351-1356  
ESMAILY FARHAD, EFFICACY OF IMMUNIZATION WITH OUTER MEMBRANE PROTEINS FOR INDUCTION OF PULMONARY CLEARANCE OF NONTYPEABLE HAEMOPHILUS INFLUENZAE IN A RAT RESPIRATORY MODEL, RANIAN JOURNAL OF ALLERGY, ASTHMA, AND IMMUNOLOGY, 2006年, VOL.5, NO. 2, PP. 57-61  
ISHIDA YOSHIYA, EFFECTS OF MACROLIDES ON ANTIGEN PRESENTATION AND CYTOKINE PRODUCTION BY DENDRITIC CELLS AND T LYMPHOCYTES, INTERNATIONAL JOURNAL OF PEDIATRIC OTORHINOLARYNGOLOGY, 2007年, VOL.71, NO. 2, PP. 297-305  
荻野仁, 慢性副鼻こう炎における起炎菌の現状, 耳鼻咽喉科, 1983年, Vol.55 No.5, Page. 347-353  
KRASAN GP, ADHESIN EXPRESSION IN MATCHED NASOPHARYNGEAL AND MIDDLE EAR ISOLATES OF NON TYPEABLE HAEMOPHILUS INFLUENZAE FROM CHILDREN WITH ACUTE OTITIS MEDIA, INFECTION AND IMMUNITY, 1999年, V67 N1, P449-454  
LAURA A. NOVOTNY, DETECTION AND CHARACTERIZATION OF PEDIATRIC SERUM ANTIBODY TO THE OM P P5-HOMOLOGOUS ADHESIN OF NONTYPEABLE HAEMOPHILUS INFLUENZAE DURING ACUTE OTITIS MEDIA, VACCINE, 2002年, Vol.20, Page.3590-3597

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 6 8  
A 6 1 K 4 5 / 0 0  
A 6 1 P 3 1 / 0 4  
C 1 2 Q 1 / 0 4  
G 0 1 N 3 3 / 5 6 9  
C 0 7 K 1 6 / 1 2  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )