

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6401702号
(P6401702)

(45) 発行日 平成30年10月10日(2018.10.10)

(24) 登録日 平成30年9月14日(2018.9.14)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68	Z N A
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	Z
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	P
GO 1 N 33/573	(2006.01)	GO 1 N 33/573	A
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

請求項の数 56 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-530512 (P2015-530512)	(73) 特許権者	515053243
(86) (22) 出願日	平成25年9月6日(2013.9.6)		ザ・ガバナーズ・オブ・ザ・ユニバーシテ
(65) 公表番号	特表2015-534636 (P2015-534636A)		ィー オブ・アルバータ
(43) 公表日	平成27年12月3日(2015.12.3)		カナダ国、アルバータ・ティー6ジー2ピ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2013/002611		ー7、エドモントン、マッケンジー・セン
(87) 国際公開番号	W02014/037811		ター、2ジェイ2.01
(87) 国際公開日	平成26年3月13日(2014.3.13)	(73) 特許権者	509034085
審査請求日	平成28年8月30日(2016.8.30)		メディツィニッシュ ホホシュール ハノ
(31) 優先権主張番号	61/698,412		ーバー
(32) 優先日	平成24年9月7日(2012.9.7)		ドイツ連邦共和国 30625 ハノーバ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ー, カールーノイベルク-シュトラーセ
(31) 優先権主張番号	61/718,134		1
(32) 優先日	平成24年10月24日(2012.10.24)	(74) 代理人	100114188
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性肝疾患の診断のための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象における自己免疫性肝炎(AIH)、原発性硬化性胆管炎(PSIC)、および原発性胆汁性肝硬変(PBC)のうち少なくとも1つの肝疾患の診断を促進する方法であって、

自己免疫性肝炎(AIH)、原発性硬化性胆管炎(PSIC)、および原発性胆汁性肝硬変(PBC)のうち少なくとも1つの肝疾患を有する疑いのある対象からの生体試料におけるエオタキシン 3(E3)のレベルを検出することを含む、方法。

【請求項2】

前記対象の生体試料におけるエオタキシン 1(E1)のレベルを検出することを含む、請求項1の方法。

【請求項3】

前記対象の生体試料におけるマクロファージ由来ケモカイン(MDC)のレベルを検出することを含む、請求項2の方法。

【請求項4】

前記対象の生体試料におけるインターロイキン 15(IL15)のレベルを検出することを含む、請求項3の方法。

【請求項5】

前記対象の生体試料におけるアルカリホスファターゼ(AP)のレベルを検出することを含む、請求項1から4のいずれか1つの方法。

10

20

【請求項 6】

対象における自己免疫性肝炎（A I H）、原発性硬化性胆管炎（P S C）、および原発性胆汁性肝硬変（P B C）のうち少なくとも1つの炎症性肝疾患の診断を促進する方法であって、

肝疾患を有する疑いのある対象からの生体試料におけるエオタキシン 3（E 3）のレベルを分析することと、

E 3のレベルを対照E 3レベルと比較することと、

前記E 3のレベルの前記対照E 3レベルに対する前記比較の結果に基づいて、前記対象における炎症性肝疾患の尤度を示すレポートを生成することとを含み、

前記対照E 3レベルより高いE 3レベルは、前記対象における自己免疫性肝炎（A I H）、原発性硬化性胆管炎（P S C）、および原発性胆汁性肝硬変（P B C）のうち少なくとも1つの炎症性肝疾患の増大した尤度を示す、方法。

10

【請求項 7】

前記対象からの生体試料におけるエオタキシン 1（E 1）のレベルを分析することと、

前記E 1のレベルおよび前記E 3のレベルを用いて、E 1とE 3レベルの比率を算出することと、

前記E 1とE 3レベルの比率をE 1とE 3レベルの対照の比率と比較することと、

前記対象からの生体試料におけるマクロファージ由来ケモカイン（M D C）のレベルを分析することと、

20

前記M D Cレベルを対照M D Cレベルと比較することと、

前記レポートに、前記E 1とE 3レベルの比率およびM D Cレベルを含み、前記E 3レベル、前記E 1とE 3レベルの比率、および前記M D Cレベルを用いて、前記対象におけるA I H、P S C、およびP B Cのうち少なくとも1つの前記肝疾患の前記尤度を示すこととを含み、

対照E 3レベルよりも高いE 3レベル、E 1とE 3レベルの対照の比率よりも高いE 1とE 3レベルの比率、および前記対照M D Cレベルよりも高いM D Cレベルが、前記対象におけるP S Cの増大した尤度を示す、請求項6の方法。

【請求項 8】

前記対象からの生体試料におけるインターロイキン 15（I L 15）のレベルを分析することと、

30

前記I L 15レベルを対照I L 15レベルと比較することと、

前記レポートに前記I L 15レベルを含み、前記I L 15レベルを用いて前記対象におけるA I Hの前記尤度を示すこととを含み、

対照E 3レベルよりも高いE 3レベル、E 1とE 3レベルの対照の比率よりも高いE 1とE 3レベルの比率、前記対照M D Cレベルよりも高いM D Cレベル、および前記対照I L 15レベルよりも高いI L 15レベルが、前記対象におけるA I Hの増大した尤度を示す、請求項7の方法。

【請求項 9】

前記対象が、P S Cを有する疑いがあり、

40

前記方法が、前記対象の生体試料におけるアルカリホスファターゼ（A P）のレベルを分析することと、

前記A Pレベルを対照A Pレベルと比較することとを含み、

P S Cを有する疑いのある対象における、対照E 3レベルよりも高いE 3レベルおよび/または対照A Pレベルよりも高いA Pレベルが、前記対象におけるP S Cの増大した尤度を示す、請求項6から8のいずれか1つの方法。

【請求項 10】

前記生体試料が、血液または血液製剤である、請求項6から9のいずれか1つの方法。

【請求項 11】

前記血液製剤が、血清または血漿である、請求項10の方法。

50

【請求項 1 2】

前記対照 E 3 レベルが、18 ~ 45 pg / ml の血清における E 3 のレベルである、請求項 6 から 9 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 1 3】

前記対照 E 3 レベルが、約 25 pg / ml 血清である、請求項 6 から 9 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 1 4】

前記対照 E 3 レベルが、約 28 pg / ml 血清である、請求項 6 から 9 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 1 5】

前記 E 1 と E 3 レベルの比率が、血清における E 1 および E 3 レベルに基づいて 10 ~ 20 の対照 E 1 / E 3 比率である、請求項 7 から 14 のいずれか 1 つの方法。

10

【請求項 1 6】

前記対照 E 1 / E 3 比率が、血清における E 1 および E 3 レベルに基づいて約 15 である、請求項 7 から 14 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 1 7】

前記対照 MDC レベルが、約 1870 ~ 3000 pg / ml 血清である、請求項 7 から 16 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 1 8】

前記対照 MDC レベルが、約 2800 pg / ml 血清である、請求項 7 から 16 のいずれか 1 つの方法。

20

【請求項 1 9】

前記対照 MDC レベルが、約 1870 pg / ml 血清である、請求項 7 から 16 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 2 0】

前記対照 IL 15 レベルが、約 2 ~ 3 pg / ml 血清である、請求項 8 から 19 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 2 1】

前記対照 IL 15 レベルが、約 2 . 4 pg / ml 血清である、請求項 8 から 19 のいずれか 1 つの方法。

30

【請求項 2 2】

前記対照 IL 15 レベルが、約 2 . 5 pg / ml 血清である、請求項 8 から 19 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 2 3】

原発性硬化性胆管炎 (P S C) を有する疑いのある対象の診断を促進する方法であって、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるエオタキシン 3 (E 3) のレベルを分析することと、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるアルカリホスファターゼ (A P) のレベルを分析することと、

40

前記対象が原発性硬化性胆管炎 (P S C) を有する尤度を決定するために、E 3 レベルおよび A P レベルを用いることとを含み、

前記決定は、

前記 E 3 レベルを対照 E 3 レベルと比較することと、

前記 A P レベルを対照 A P レベルと比較することとを含み、

前記対照 E 3 レベルよりも高い E 3 レベルおよび / または対照 A P レベルよりも高い A P レベルが、前記対象における P S C の増大した尤度を示し、

前記対象における前記 E 3 レベルおよび A P レベルのうちの少なくとも 1 つに基づいて、P S C を有する前記対象の尤度を示すレポートを生成することを含む、方法。

【請求項 2 4】

50

対象における自己免疫性肝炎（A I H）、原発性硬化性胆管炎（P S C）、および原発性胆汁性肝硬変（P B C）のうち少なくとも1つの肝疾患の診断を促進する方法であって、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるエオタキシン 3（E 3）のレベルを分析することと、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるエオタキシン 1（E 1）のレベルを分析することと、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるマクロファージ由来ケモカイン（M D C）のレベルを分析することと、

前記対象がA I H、P S C、およびP B Cのうちの少なくとも1つの肝疾患を有する前記尤度を決定することにおいて、前記E 3レベル、E 1レベル、およびM D Cレベルを用いることとを含み、

前記決定は、

前記E 3レベルを対照E 3レベルと比較することと、

前記E 1レベルとE 3レベルの比率（E 1 / E 3比率）を、対照E 1 / E 3比率と比較することと、

前記M D Cレベルを対照M D Cレベルと比較することとを含み、

i) 前記対照E 3レベルよりも高いE 3レベルが、前記対象におけるA I H、P S C、およびP B Cのうちの少なくとも1つの肝疾患の増大した尤度を示し、

i i) 前記対照E 3レベルよりも高いE 3レベル、E 1とE 3レベルの対照の比率と異なるE 1とE 3レベルの比率、および前記対照M D Cレベルよりも高いM D Cレベルが、前記対象におけるP S Cの増大した尤度を示し、

前記対象における前記E 3レベル、前記E 1とE 3レベルの比率、および前記M D Cレベルに基づいて、前記対象における、A I H、P S C、およびP B Cのうちの少なくとも1つの肝疾患の尤度、並びに / またはP S Cの尤度を示すレポートを生成することを含む、方法。

【請求項 2 5】

前記対照E 3レベルが、約1 8 p g / m l から4 5 p g / m l 血清である、請求項 2 3 または 2 4 の方法。

【請求項 2 6】

前記対照E 3レベルが、約2 5 p g / m l 血清である、請求項 2 3 または 2 4 の方法。

【請求項 2 7】

前記対照E 3レベルが、約2 8 p g / m l 血清である、請求項 2 3 または 2 4 の方法。

【請求項 2 8】

前記E 1とE 3レベルの比率が、血清におけるE 1およびE 3レベルに基づいて1 0 ~ 2 0 の対照E 1 / E 3比率である、請求項 2 4 から 2 7 のいずれか1つの方法。

【請求項 2 9】

前記対照E 1 / E 3比率が、血清におけるE 1およびE 3レベルに基づいて約1 5である、請求項 2 4 から 2 7 のいずれか1つの方法。

【請求項 3 0】

前記対照M D Cレベルが、約1 8 7 0 ~ 3 0 0 0 p g / m l 血清である、請求項 2 4 から 2 7 のいずれか1つの方法。

【請求項 3 1】

前記対照M D Cレベルが、約2 8 0 0 p g / m l 血清である、請求項 2 4 から 2 7 のいずれか1つの方法。

【請求項 3 2】

対象における肝疾患の診断を促進する方法であって、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるエオタキシン 3（E 3）のレベルを分析することと、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるエオタキシン 1（E 1）のレベルを分析

10

20

30

40

50

することと、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるマクロファージ由来ケモカイン (MDC) のレベルを分析することと、

前記対象から得られた血清サンプルにおけるインターロイキン 15 (IL 15) のレベルを分析することと、

前記対象が、自己免疫性肝炎 (AIH)、原発性硬化性胆管炎 (PSC)、および原発性胆汁性肝硬変 (PBC) のうちの少なくとも1つの肝疾患を有する前記尤度を決定することにおいて前記 E 3 レベル、E 1 レベル、MDC レベル、および IL 15 レベルを用いることとを含み、

前記決定は、

前記 E 3 レベルを対照 E 3 レベルと比較することと、

前記 E 1 レベルと E 3 レベルの比率 (E 1 / E 3 比率) を対照 E 1 / E 3 比率と比較することと、

前記 MDC レベルを対照 MDC レベルと比較することと、

前記 IL 15 レベルを対照 IL 15 レベルと比較することとを含み、

i) 前記対照 E 3 レベルよりも高い E 3 レベルが、前記対象における AIH、PSC、および PBC のうちの少なくとも1つの肝疾患の増大した尤度を示し、

ii) 前記対照 E 3 レベルよりも高い E 3 レベル、前記対照 E 1 / E 3 比率よりも高い E 1 / E 3 比率、前記対照 MDC レベルよりも高い MDC レベル、および前記対照 IL 15 レベルよりも高い IL 15 レベルが、前記対象における AIH の増大した尤度を示し、

前記対象における前記 E 3 レベル、前記 E 1 / E 3 比率、前記 MDC レベル、および前記 IL 15 レベルに基づいて、前記対象における、AIH、PSC、および PBC のうちの少なくとも1つの肝疾患の尤度並びに / または AIH の尤度を示すレポートを生成することを含む、方法。

【請求項 33】

前記対照 E 3 レベルが、約 18 pg / ml から 45 pg / ml 血清である、請求項 32 の方法。

【請求項 34】

前記対照 E 3 レベルが、約 25 pg / ml 血清である、請求項 32 の方法。

【請求項 35】

前記対照 E 3 レベルが、約 28 pg / ml 血清である、請求項 32 の方法。

【請求項 36】

前記 E 1 と E 3 レベルの比率が、血清における E 1 および E 3 レベルに基づいて 10 ~ 20 の対照 E 1 / E 3 比率である、請求項 32 から 35 のいずれか1つの方法。

【請求項 37】

前記対照 E 1 / E 3 比率が、血清における E 1 および E 3 レベルに基づいて約 15 である、請求項 32 から 35 のいずれか1つの方法。

【請求項 38】

前記対照 MDC レベルが、約 1870 ~ 3000 pg / ml 血清である、請求項 32 から 35 のいずれか1つの方法。

【請求項 39】

前記対照 MDC レベルが、約 2800 pg / ml 血清である、請求項 32 から 35 のいずれか1つの方法。

【請求項 40】

前記対照 MDC レベルが、約 1870 pg / ml 血清である、請求項 32 から 35 のいずれか1つの方法。

【請求項 41】

前記対照 IL 15 レベルが、約 2 ~ 3 pg / ml 血清である、請求項 32 から 40 のいずれか1つの方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

前記対照 I L 1 5 レベルが、約 2 . 4 p g / m l 血清である、請求項 3 2 から 4 0 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 4 3】

前記対照 I L 1 5 レベルが、約 2 . 5 p g / m l 血清である、請求項 3 2 から 4 0 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 4 4】

前記レポートが、前記肝疾患の前記尤度に基づき、前記対象のための治療の推奨に関する臨床医へのガイダンスを含む、請求項 6 から 4 3 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 4 5】

前記比較および算出のステップを行うためのアルゴリズムを実行するようにプログラムされたコンピューターに、前記 E 3 レベル、前記 E 1 レベル、前記 M D C レベル、および/または I L 1 5 レベルを入力することを含み、前記入力がレポートの結果を生成する、請求項 1 から 4 4 のいずれか 1 つの方法。

【請求項 4 6】

前記レポートを生成することがコンピューターにより行われる、請求項 4 5 の方法。

【請求項 4 7】

前記レポートが、前記コンピューターから離れた位置で出力装置に表示される、請求項 4 5 または 4 6 の方法。

【請求項 4 8】

エオタキシン (eotaxin) 3 (E 3) についての特異的結合剤と、
任意に、アルカリホスファターゼ (A P) の検出のための 1 またはそれ以上の特異的試薬と、

エオタキシン (eotaxin) 1 (E 1) についての特異的結合剤と、
マクロファージ由来ケモカイン (M D C) についての特異的結合剤と、
I L 1 5 (I L 1 5) についての特異的結合剤とを含む、自己免疫性肝炎 (A I H)、
原発性硬化性胆管炎 (P S C)、および原発性胆汁性肝硬変 (P B C) のうち少なくとも 1 つの肝疾患の診断用キット。

【請求項 4 9】

前記 E 3 についての結合剤、前記 E 1 についての結合剤、前記 M D C についての結合剤、
および前記 I L 1 5 についての結合剤が、抗体、または少なくともレセプターのリガ
ンド結合部分から独立して選択される、請求項 4 8 のキット。

【請求項 5 0】

前記キットが、対照分析物についての結合剤を含む、請求項 4 8 または 4 9 のキット。

【請求項 5 1】

プロセッサと、
前記プロセッサに動作可能に連結するメモリーとを含み、
前記メモリーが、肝疾患を有する疑いのある患者における肝疾患を診断するためにそ
こに保存された命令を含み、
前記プロセッサにより実行される場合に、前記命令が、前記プロセッサに、
患者の生体試料におけるエオタキシン 3 (E 3) のレベルを含む分析データを受信
させ、
前記 E 3 のレベルを対照 E 3 レベルと比較させ、
前記患者における、前記 E 3 レベルを含み、A I H、P S C、および P B C のうちの
少なくとも 1 つの肝疾患の尤度を示すレポートを生成させ、
前記対照 E 3 レベルよりも高い E 3 レベルが、前記患者における肝疾患の増大した尤
度を示す、コンピューターシステム。

【請求項 5 2】

前記肝疾患が、A I H、P S C、および P B C のうちの少なくとも 1 つである、請求
項 5 1 のコンピューターシステム。

10

20

30

40

50

【請求項 5 3】

前記命令が、さらに、前記プロセッサに、
患者の生体試料におけるアルカリホスファターゼ（ＡＰ）のレベルを含む分析データを受信させ、

前記ＡＰレベルを対照ＡＰレベルと比較させ、

ＰＳＣを有する疑いのある対象において、前記対照Ｅ３レベルよりも高いＥ３レベルおよび／または前記対照ＡＰレベルよりも高いＡＰレベルが、前記対象におけるＰＳＣの増大した尤度を示す、請求項５１または５２のコンピューターシステム。

【請求項 5 4】

前記命令が、さらに、前記プロセッサに、

患者の生体試料におけるマクロファージ由来ケモカイン（ＭＤＣ）のレベルおよびエオタキシン １（Ｅ１）のレベルを含む分析データを受信させ、

前記Ｅ１のレベルおよび前記Ｅ３のレベルを用いて、Ｅ１およびＥ３レベルの比率を算出させ、

前記Ｅ１とＥ３レベルの比率をＥ１とＥ３レベルの対照の比率と比較させ、

前記ＭＤＣレベルを対照ＭＤＣレベルと比較させ、

前記対照Ｅ３レベルよりも高いＥ３レベル、対照の比率よりも高いＥ１とＥ３レベルの比率、および前記対照ＭＤＣレベルよりも高いＭＤＣレベルが、前記対象におけるＰＳＣの増大した尤度を示す、請求項５１から５３のいずれかが１つのコンピューターシステム。

【請求項 5 5】

前記命令が、さらに、前記プロセッサに、

前記対象からの生体試料におけるインターロイキン １５（ＩＬ １５）のレベルを含む分析データを受信させ、

前記ＩＬ １５レベルを対照ＩＬ １５レベルと比較させ、

前記対照ＩＬ １５レベルよりも高いＩＬ １５レベル、前記対照ＭＤＣレベルよりも高いＭＤＣレベル、前記対照Ｅ３レベルよりも高いＥ３レベル、および対照の比率よりも高いＥ１とＥ３レベルの比率が、前記対象におけるＡＩＨの増大した尤度を示す、請求項５４のコンピューターシステム。

【請求項 5 6】

ネットワーク上で前記レポートを伝達するための通信モジュールを含み、前記通信モジュールが、動作可能に前記プロセッサに連結され、

前記プロセッサにより実行される場合に、前記プロセッサに、前記通信モジュールを介して前記レポートを伝達させる命令を、前記メモリーを含む、請求項５１から５５のいずれかが１つのコンピューターシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、２０１２年９月７日に出願された米国仮出願第６１／６９８，４１２号、および２０１２年１０月２４日に出願された米国仮出願第６１／７１８，１３４号の利益を主張し、これらの出願は、それらの全体において、参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

自己免疫性肝炎（ＡＩＨ）、原発性胆汁性肝硬変（ＰＢＣ）、および原発性硬化性胆管炎（ＰＳＣ）は、別個の慢性的な炎症性肝疾患である。これらの疾病の原因は知られていない。感染性の病因が少なくともそれらのいくつかについて可能性があるが、それらは概して自己免疫現象としてみられる。すべての３つの疾病の発症は、疲労、腹部痛、悪心、および／またはそう痒のような肝疾患についての非特異的症状で、線維症および硬変を有する疾病の後期のみで肝臓病の存在を確認する、肝臓酵素のレベルの変動とともに、呈さ

10

20

30

40

50

れる。また、このステージで、門脈圧亢進症の帰結に関連する症状および徴候が、報告されるであろう。

【0003】

A I Hの病状は、白血球の浸入とともに断片壊死および界面の(interface)肝炎をもたらす、肝細胞への損傷により始まり、最終的に線維症および硬変となる。P B CおよびP S Cでは、炎症は、通常、胆道系の近くまたは周囲で始まり、線維症および硬変を導く胆汁うっ滞性の疾病をもたらす。

【0004】

診断については、種々の自己抗体が、A I Hについてのバイオマーカーともなされている。これは、主に、抗核抗体(A N A)、抗平滑筋抗体(S M A)、および肝臓/腎臓ミクロソームI型(抗L K M 1)に対する抗体を含むが、可溶性の肝臓/膵臓抗原に対する抗体(抗S L A / L P)、核周囲型抗好中球細胞質抗体(p A N C A)、肝臓 特異的サイトゾル抗原I型に対する抗体(抗L C 1)、および抗アクチンのような他の抗体も同様に検出され得る(非特許文献1)。これらの自己抗体は、A I Hについて特異的ではなく、P B C、P S C、ウイルス性肝炎、薬物性肝炎、およびアルコール性肝炎を有する患者で検出され得るため、国際自己免疫性肝炎グループ(International Autoimmune Hepatitis Group)は、A I Hの診断についての診断アルゴリズムを提案している。このアルゴリズムの簡易なレポート(非特許文献2)が、異なる自己抗体のレベル、I g Gのレベル、肝臓組織構造、および既知のウイルス感染の不存在を含む、4つのパラメーターに基づいて、A I Hが明確にある、可能性がある、またはないことを示す。

【0005】

未知の病因による慢性的な非化膿性の破壊的な肉芽腫胆管炎として記述されるP B Cでは、病状は、肝細胞よりもむしろ中型の肝内胆管($< 100 \mu\text{m}$)に関連し、血清における高いレベルのアルカリホスファターゼ(A L P)を伴う、疾病の胆汁うっ滞性の特徴をもたらす(非特許文献3)。A N Aも、P B Cで検出され得るが、高い感度と特異性を有する、P B Cについての診断上の自己抗体がある(非特許文献3)。この抗ミトコンドリア抗体(A M A)は、主に、ピルビン酸デヒドロゲナーゼのE 2サブユニットへの標的とされ、ミトコンドリアの内膜から細胞表面(抗P D C E 2)への転位により胆汁上皮細胞の細胞表面に主に発現され、100%の特異性を有するP B C症例の95%で報告される。また、増加した免疫グロブリン、特にI g M、並びに胆管の損傷、胆管減少症(duct openia)、および肉芽腫性の門脈の炎症(granulomatous portal inflammation)のような特異的な組織学的特徴が、診断を補助し得る。A I Hと同様に、P B Cは女性においてより一般的であり、現在、シェーグレン症候群および甲状腺疾患のような、他の自己免疫疾患に関連する遺伝的に病気にかかりやすい個体で生じる肝臓特異的自己免疫疾患とみなされているが、他の自己免疫疾患とは異なり、P B Cは子供では報告されていない。

【0006】

P B Cと同様に、P S Cも慢性的な胆汁うっ滞性の状態であるが、全てのサイズの胆管に影響を及ぼし、最後に硬変をもたらす(非特許文献4)。P B Cとは対照的に、P S Cについての特異的自己抗体、免疫学的、生化学的、または血清学的な診断上のマーカーはない(非特許文献5)。診断は、内視鏡的逆行性胆管造影法(E R C)および磁気共鳴胆管造影(M R C)に基づき、肝内および肝外の胆管における典型的な狭窄および膨張を、典型的な多巣性の胆道狭窄および介在性の膨張の他の原因の排除とともに示している。この特徴は、タマネギ状の線維化とよばれる線維組織の同心円層を伴う、胆管周囲性線維化に起因し、P S Cについての別の典型的な顕著な特徴として、肝臓生検におけるP S C患者の14%でのみみられるが、特異的ではなく、虚血性胆管炎のような他の肝疾患で説明され得る(非特許文献6)。P S Cを有する患者は、また、A I HまたはI g G 4に関連する硬化性胆管炎を有し得、P S Cの診断をさらに複雑にするであろう。P B Cとは異なり、P S Cは、炎症性大腸疾患(I B D)、特に潰瘍性大腸炎(U C)と非常に関連しており、A I Hを有するまたは有しないP S C症例の80%以上で報告される(非特許文献7)。P S Cの診断は、通常、既存のI B D患者で、または、結腸切除後のI B D患者で

10

20

30

40

50

もなされるが、いくつかの場合には、IBD発症に長い年月先行する場合がある（非特許文献8）。クローン病（別のIBD）では、小腸へとより制限され、PSCは、通常、疾病が広範および重篤であり、結腸が関与する場合に発生し、IBDにおける大腸炎が、IBDによるPSCの併存症についての前提条件であることを示す。

【0007】

血清におけるアルカリホスファターゼ（AP）のレベルの測定は、ルーチンの医療スクリーニングに、または肝疾患の症状を示す患者についての最初の精密検査のパネルに含まれることが多い。上昇したAPのレベル（AP+）は、通常、PSCのような胆汁うっ滞型の肝疾患を指し示すものである。しかしながら、血清アルカリホスファターゼ（AP）は、PSCおよびPBCの両方で上昇するが、APのレベルは、疾病の経過中、一貫して大きな集団の患者で上昇したままではないかもしれず、正常なレベルでさえ検出され得る。また、上昇したAPのレベルは、母集団の最大20%において報告もされている。よって、アラニンアミノトランスアミナーゼ（ALT）/アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）に対してより低いまたはより高いALPの比率が感染性肝炎/AIHまたはPBC/PSCの診断のためにそれぞれ使用され得るが、この比率または各バイオマーカーの個々の値は、感染性肝炎をAIHと、またはPBCをPSCと区別することはできない。

10

【0008】

ビリルビンレベルも、PSC症例の15~40%のみで上昇し、他の肝疾患でも存在し、通常、進行した肝臓損傷に関連するため、十分な診断上のマーカーではない。肝細胞の損傷を主に指し示すALTおよびASTレベルは、PBCおよびPSCで中程度に上昇することが多く、または正常なレベルでさえ検出され得る。PSCの発症と胆管撮影法における診断上の特徴の出現との間に数年の遅れが通常はあるため、肝臓損傷がまだ回復可能である、早い段階で疾病が診断できれば、非常に価値があるであろう。さらに、イメージングは高価であり、スクリーニングについては好適ではなく（ERCおよびMRC）、最適以下（MRC）であり、膵炎、細菌性胆管炎、穿孔、および出血のような、潜在的な合併症による侵襲性がある。

20

【0009】

肝機能検査（LFT）は、肝疾患を検出するための最も一般的な方法であるが、それらは、特異的診断よりもむしろ一般的な肝臓病を指し示し、のLFTのうちの少なくとも1つは、母集団の20%以上で上昇する（非特許文献9）。さらに、ALPが非肝疾患において上昇する可能性が30%ある。グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）のレベルは、より高い感度でALPと相関するが、ほとんどの急性および慢性的な肝疾患で上昇するため、特異性が低い。また、ALPは、他の臓器から放出されるかもしれず、年齢および性別により変化するが、その上昇したレベルは、PBCのような肝内胆汁障害（intra-hepatic biliary disorder）とより相関する（非特許文献10）。

30

【0010】

よって、AIH、PBC、およびPSCの診断は、特に、患者がこれらの疾病の1以上の臨床的な症状を示す、オーバーラップ症候群がある場合に複雑である。このようなオーバーラップ症候群は、AIH、PSC、およびPBC間で30%という高率で一般的であり得る。AMAレベルは、AIHおよびPSCからのPBCの鑑別診断を促進し得るが、AIHとPSCとを区別するためのよりよいツールが必要とされる。ERCおよび肝臓生検の組織検査のような診断上のツールは、高価で侵襲性があり（付随する合併症のリスクを有する）、および/または広範な癒痕化および狭搾による後期でのみ疾病を診断することができる。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Manns et al., *Hepatology*, 2010. 51(6): p. 2193-213; Czaja et al. *Gastroenterology*, 2010. 139(1): p. 58-72 e4

50

- 【非特許文献 2】Lohse et al. Journal of Hepatology, 2011. 55(1): p. 171-82
- 【非特許文献 3】Kaplan et al. New Engl. J. Med., 2005. 353(12): p. 1261-73
- 【非特許文献 4】Angulo, et al. Clinics in Liver Disease, 1999. 3(3): p. 529-70;
Angulo, et al. Primary Sclerosing Cholangitis. Hepatology, 1999. 30(1): p. 325-32
- 【非特許文献 5】Boyer T., M.M., Sanyal A., Zakim and Boyer's Hepatology. Sixth edition. 2011, p. 1408
- 【非特許文献 6】Burak, K.W., P. Angulo, and K.D. Lindor, Is there a role for liver biopsy in primary sclerosing cholangitis? The American journal of gastroenterology, 2003. 98(5): p. 1155-8
- 【非特許文献 7】Ponsioen, et al., Gut, 2002. 51(4): p. 562-6; Tischendorf, et al., Am J. Gastroenterol. 2007. 102(1): p. 107-14
- 【非特許文献 8】Schumpff, et al. Scan. J. Gastroenterol. 1982. 17(1): p. 33-9
- 【非特許文献 9】Donnan, et al. Health Technology Assessment, 2009. 13(25): p. ii-i-iv, ix-xi, 1-134
- 【非特許文献 10】Donnan et al., supra; Whitehead, et al., Gut, 1999. 45(1): p. 129-33

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

よって、これらの慢性的な臨床症状の異なる診断を促進するための診断上のツールについての必要性がある。A I H、P B C、および P S C のより効率的で早期の鑑別診断を促進するための新たなパラメーターの発見が、当該分野における進歩を提供するであろう。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本開示は、対象における炎症性肝疾患の診断を促進することにおける使用をみいだす方法および組成物を提供する。方法および組成物は、概して、エオタキシン 3 (E3) レベルを単独で、またはエオタキシン 1 (E1) のレベルとともに、および任意にマクロファージ由来ケモカイン (MDC) のレベルとともに、およびさらに任意に I L 15 のレベルとともに、検出することを伴う。これらのレベルは、自己免疫性肝炎 (A I H)、原発性胆汁性肝硬変 (P B C)、および原発性硬化性胆管炎 (P S C) の肝疾患のうちの少なくとも 1 つの診断を促進するために、および / または A I H、P B C、および P S C 間の鑑別診断を促進するために使用され得る。例えば、本明細書で論証されるように、E3 レベルは、P S C、P B C、または A I H を有しない対象と比較して、P S C、P B C、および A I H 患者において非常に上昇する。従って、E3 単体は、これらの肝疾患のそれぞれについて診断上の有用性を有する。さらに、本明細書で論証されるように、E1 レベルは、P S C で上昇するが、P B C および A I H ではより低く、E1 / E3 の比率が、これらの 3 つの疾病を識別するために使用され得る。また、本明細書で論証されるのは、MDC レベルが、健康な対照と比較して、P S C、P B C、および A I H においてより低く、P B C と比較して、P S C および A I H においてより高く、MDC レベルに基づいて、P B C から P S C および A I H を識別することができることである。本開示は、I L 15 レベルが A I H においてより高く、4 つのサイトカイン全てのレベルが、P S C、P B C、および A I H の鑑別診断において補助するために使用され得ることをさらに論証する。また、本開示の方法および組成物は、対象についての治療の決定を促進することにおける使用を見出す。

【0014】

本開示は、対象における肝疾患の診断を促進するための方法を提供し、方法は、自己免疫性肝炎 (A I H)、原発性硬化性胆管炎 (P S C)、および原発性胆汁性肝硬変 (P B C) のうちの少なくとも 1 つの対象からの生体試料における (例えば、肝疾患を有する疑いのある対象、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な対象、検査下で不特定の病的

10

20

30

40

50

状態を有する対象、または他の関心対象)、エオタキシン 3 (E3) のレベルを検出することを含む。対照 E3 レベルと比較される、検出された E3 のレベルは、対象における肝疾患の診断を促進するために使用され得る。関連する方法において、対象における A I H、P B C、および P S C のうちの少なくとも 1 つの肝疾患の診断を促進するために方法が使用される。

【 0 0 1 5 】

本開示は、対象における肝疾患の診断を促進するための方法を提供し、方法は、A I H、P B C、および P S C のうちの少なくとも 1 つの、対象の生体試料における(例えば、肝疾患を有する疑いのある対象、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な対象、検査下で不特定の病的状態を有する対象、または他の関心対象)、E3 のレベルおよびエオタキシン 1 (E1) のレベルおよびマクロファージ由来ケモカイン (M D C) のレベルを検出することを含む。E3、E1、および M D C レベルは、A I H、P B C、および P S C 間からの P S C の鑑別診断を促進するために使用され得る。任意に、方法は、例えば対象が P S C を有する疑いのある場合に、対象の生体試料におけるアルカリホスファターゼ (A P) のレベルを検出することを含み得る。

10

【 0 0 1 6 】

本開示は、対象における肝疾患の診断を促進するための方法を提供し、方法は、A I H、P B C、および P S C のうちの少なくとも 1 つの対象の生体試料における(例えば、肝疾患を有する疑いのある対象、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な対象、検査下で不特定の病的状態を有する対象、または他の関心対象)、E3 のレベルおよびエオタキシン 1 (E1) のレベル、マクロファージ由来ケモカイン (M D C) のレベル、およびインターロイキン 15 (I L 15) を検出することを含む。E3、E1、M D C、および I L 15 レベルが、A I H、P B C、および P S C 間から A I H の鑑別診断を促進するために使用され得る。

20

【 0 0 1 7 】

本開示は、対象における肝疾患の診断を促進する方法を提供し、方法は、対象からの生体試料における(例えば、肝疾患を有する疑いのある対象、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な対象、検査下で不特定の病的状態を有する対象、または他の関心対象)、エオタキシン 3 (E3) のレベルを分析することと、E3 のレベルを対照 E3 レベルと比較することとを含み、対照 E3 レベルよりも高い E3 レベルが、対象における肝疾患の増大した尤度を示す。関連する方法では、方法は、対象における A I H、P B C、および P S C のうちの少なくとも 1 つの肝疾患の診断を促進するために使用される。任意に、方法は、E3 のレベルの対照 E3 レベルに対する比較の結果に基づいて、対象における肝疾患(例えば、A I H、P S C、および P B C のうちの少なくとも 1 つの肝疾患)の尤度を示すレポートを生成することを含み得る。任意に、レポートは、肝疾患の尤度に基づく、対象のための治療の推奨に関する臨床医へのガイダンスを含み得る。

30

【 0 0 1 8 】

本開示は、対象における肝疾患の診断を促進する方法を提供し、方法は、対象からの生体試料における(例えば、肝疾患を有する疑いのある対象、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な対象、検査下で不特定の病的状態を有する対象、または他の関心対象)、E3 のレベルを分析することと、E3 のレベルを対照 E3 レベルと比較することと、対象からの生体試料における、エオタキシン 1 (E1) のレベルを分析することと、E1 のレベルおよび E3 のレベルを用いて E1 と E3 レベルの比率を算出することと、E1 と E3 レベルの比率を E1 と E3 レベルの対照の比率と比較することと、対象からの生体試料における、マクロファージ由来ケモカイン (M D C) のレベルを分析することと、M D C レベルを対照 M D C レベルと比較することとを含み、それらのそれぞれの対照レベルよりも高い、E3 レベル、E1 と E3 レベルの比率、および M D C のレベルが、対象における P S C の増大した尤度を示す。方法は、任意に、E3 のレベルを対照 E3 レベルと比較することと、E1 と E3 の比率を対照の比率と比較することと、および M D C レベルを対照 M D C レベルと比較することとの結果に基づいて、対象における P S C の尤度を示すレポ

40

50

ートを生成することを含み得る。レポートは、さらに、任意に、E3レベルに基づいて、対象におけるA I H、P B C、およびP S Cのうちの少なくとも1つの尤度の表示を含み得る。レポートは、任意に、肝疾患の尤度に基づく、対象についての治療の推奨に関する臨床医へのガイダンスを含み得る。

【0019】

本開示は、対象における肝疾患の診断を促進する方法を提供し、方法は、対象からの生体試料における（例えば、肝疾患を有する疑いのある対象、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な対象、検査下で不特定の病的状態を有する対象、または他の関心対象）、E3のレベルを分析することと、E3のレベルを対照E3レベルと比較することと、対象からの生体試料における、エオタキシン 1 (E1)のレベルを分析することと、E1レベルを対照E1レベルと比較することと、E1のレベルおよびE3のレベルを用いてE1とE3レベルの比率を算出することと、E1とE3レベルの比率をE1とE3レベルの対照の比率と比較することと、対象からの生体試料における、M D Cのレベルを分析することと、M D Cレベルを対照M D Cレベルと比較することと、対象の生体試料における、インターロイキン 15 (I L 15)のレベルを分析することと、I L 15のレベルを対照I L 15レベルと比較することとを含み、それらのそれぞれの対照レベルよりも高い、E3レベル、E1とE3レベルの比率、M D Cのレベル、およびI L 15のレベルが、対象におけるA I Hの増大した尤度を示す。方法は、任意に、E3のレベルを対照E3レベルと比較することと、E1とE3レベルの比率を対照の比率と比較することと、M D Cレベルを対照M D Cレベルと比較することと、およびI L 15レベルを対照I L 15レベルと比較することとの結果に基づいて、対象におけるA I Hの尤度を示すレポートを生成することを含み得る。方法は、任意に、E3のレベルを対照E3レベルと比較することと、E1とE3の比率を対照の比率と比較することと、およびM D Cレベルを対照M D Cレベルと比較することとの結果に基づいて、対象におけるP S Cの尤度を示すレポートを生成することを含み得る。レポートは、さらに、任意に、E3レベルに基づいて、対象におけるA I H、P B C、およびP S Cのうちの少なくとも1つの尤度の表示を含み得る。レポートは、任意に、肝疾患の尤度に基づく、対象のための治療の推奨に関する臨床医へのガイダンスを含み得る。

【0020】

本開示は、P S Cを有する疑いのある対象において、P S Cの診断を促進する方法を提供し、方法は、肝疾患を有する疑いのある対象からの生体試料における、E3のレベルを分析することと、E3のレベルを対照E3レベルと比較することと、対象の生体試料における、アルカリホスファターゼ (A P)のレベルを分析することと、A Pレベルを対照A Pレベルと比較することとを含み、P S Cを有する疑いのある対象における（例えば、A I H陰性である、P B C陰性である、または両方）、それらのそれぞれの対照レベルよりも高いE3レベルまたはA Pレベルが、対象におけるP S Cの増大した尤度を示す。方法は、任意に、E3のレベルを対照E3レベルと比較すること、およびA Pレベルを対照A Pレベルと比較することの結果に基づいて、対象におけるP S Cの尤度を示す生成することを含み得る。レポートは、任意に、肝疾患の尤度に基づく、対象のための治療の推奨に関する臨床医へのガイダンスを含み得る。

【0021】

本開示は、対象における肝疾患の診断を促進する方法を提供し、方法は、対象からの生体試料における（例えば、肝疾患を有する疑いのある対象、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な対象、検査下で不特定の病的状態を有する対象、または他の関心対象）、E3のレベルを分析することと、E3のレベルを対照E3レベルと比較することと、対象からの生体試料における、エオタキシン 1 (E1)のレベルを分析することと、当該E1レベルを対照E1レベルと比較することと、E1のレベルおよびE3のレベルを用いてE1とE3レベルの比率を算出することと、E1とE3レベルの比率をE1とE3レベルの対照の比率を比較することと、対象からの生体試料における、M D Cのレベルを分析することと、M D Cレベルを対照M D Cレベルと比較することと、対象の生体試料における

10

20

30

40

50

、インターロイキン 15 (I L 15) のレベルを分析することと、 I L 15 のレベルを対照 I L 15 レベルと比較することと、対象の生体試料における、アルカリホスファターゼ (A P) のレベルを分析することと、 A P レベルを対照 A P レベルと比較することとを含み、それらのそれぞれの対照レベルよりも高い E 3 レベル、 E 1 と E 3 レベルの比率、 M D C のレベル、および I L 15 のレベルが、対象における A I H の増大した尤度を示す。方法は、任意に、 E 3 のレベルを対照 E 3 レベルと比較することと、 E 1 と E 3 の比率を対照の比率と比較することと、 M D C レベルを対照 M D C レベルと比較することと、および I L 15 レベルを対照 I L 15 レベルと比較することとの結果に基づいて、対象における A I H の尤度を示すレポートを生成することを含み得る。方法は、任意に、分析されたバイオマーカーの結果に基づいて、対象における肝疾患の尤度を示すレポートを生成することを含み得る。方法は、任意に、 E 3 のレベルを対照 E 3 レベルと比較することと、 E 1 と E 3 レベルの比率を対照の比率と比較することと、および M D C レベルを対照 M D C レベルと比較することとの結果に基づいて、対象における P S C の尤度を示すレポートを生成することを含み得る。レポートは、任意に、 E 3 レベルに基づいて、対象におけるなくとも 1 つの A I H 、 P B C 、および P S C の尤度の表示を含み得る。レポートは、任意に、対象が P S C を有する疑いがあるかどうかの表示 (例えば、 A I H 陰性および / または P B C 陰性である) 、対象における E 3 レベルまたは A P レベルに基づいて、対象における P S C の尤度の表示を含み得る。レポートは、任意に、肝疾患の尤度に基づく、対象のための治療の推奨に関する臨床医へのガイダンスを含み得る。

10

【 0 0 2 2 】

20

本開示の方法で使用される生体試料は、血液または血液製剤、例えば、血清または血漿であり得る。

【 0 0 2 3 】

本開示の方法は、肝疾患の尤度に基づいて、対象のための療法を選択することを含み得る。本開示の方法は、肝疾患の尤度に基づいて、対象のための療法を投与することを含み得る。対象が療法を受ける場合、本開示の方法は、分析の結果に基づいて、対象のための療法を変更することを含み得る。

【 0 0 2 4 】

本開示の方法は、比較および算出ステップを行うためのアルゴリズムを実行するようにプログラムされたコンピューターに、 E 3 レベル、 E 1 レベル、 M D C レベル、および / または I L 15 レベルを入力することを含み得、当該の入力が、レポートについての結果を生成する。レポートは、例えば、コンピューターから離れた位置で、出力装置に表示され得る。

30

【 0 0 2 5 】

本開示は、エオタキシン (eoxtain) 3 (E 3) についての結合剤、エオタキシン (eoxtain) 1 (E 1) についての結合剤、マクロファージ由来ケモカイン (M D C) についての結合剤、および I L 15 (I L 15) についての結合剤、並びに、任意にアルカリホスファターゼを検出するための 1 またはそれ以上の試薬を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットは、 E 3 のための結合剤、およびアルカリホスファターゼ (A P) を検出するための試薬を含む。いくつかの実施形態では、 A P を検出するための試薬は、 A P の酵素活性の検出のために提供し得る。 E 3 についての結合剤、 E 1 についての結合剤、 M D C についての結合剤、および I L 15 についての結合剤は、抗体、または少なくともレセプターのリガンド結合部分であり得る。キットは、対照分析物についての結合剤を含み得る。

40

【 0 0 2 6 】

本開示は、自己免疫性肝炎 (A I H) 、原発性硬化性胆管炎 (P S C) 、および原発性胆汁性肝硬変 (P B C) のうちの少なくとも 1 つの肝疾患を有する対象を治療する方法を提供し、方法は、有効量のエオタキシン 3 (E 3) のアンタゴニストを対象に投与することを含む。

【 0 0 2 7 】

50

本開示は、原発性硬化性胆管炎（PSC）を有する対象を治療する方法を提供し、方法は、有効量のエオタキシン 1（E1）のアンタゴニストを対象に投与することを含む。

【0028】

本開示は、患者における肝疾患の診断を促進する方法を提供し（例えば、肝疾患を有する疑いのある患者、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な患者、検査下で不特定の病的状態を有する患者、または他の関心患者）、方法は、対象の生体試料における、エオタキシン 3（E3）のレベルを含む分析データをプロセッサにより受信することと、プロセッサによりE3のレベルを対照E3レベルと比較することと、プロセッサにより、E3レベルを含み、対象における肝疾患の尤度を示すレポートを生成することとを含み、対照E3レベルよりも高いE3レベルが、患者における肝疾患の増大した尤度を示す。関連する方法において、方法は、患者におけるAIH、PBC、およびPSCのうち少なくとも1つの肝疾患の診断を促進するために使用される。

10

【0029】

方法は、さらに、対象の生体試料における、エオタキシン 1（E1）のレベルおよびマクロファージ由来ケモカイン（MDC）のレベルを含む分析データをプロセッサにより受信することと、E1のレベルおよびE3のレベルを用いてE1とE3レベルの比率を算出することと、E1とE3レベルの比率をE1とE3レベルの対照の比率と比較することと、MDCレベルを対照MDCレベルと比較することとを含み得、対照E3レベルよりも高いE3レベル、対照の比率よりも高いE1とE3レベルの比率、対照MDCレベルよりも高いMDCレベルが、対象におけるPSCの増大した尤度を示す。方法は、またさらに、対象からの生体試料における、インターロイキン 15（IL 15）のレベルを含む分析データをプロセッサにより受信することと、IL 15レベルを対照IL 15レベルと比較することとを含み得、対照IL 15レベルよりも高いIL 15レベル、対照MDCレベルよりも高いMDCレベル、対照E3レベルよりも高いE3レベル、および対照の比率よりも高いE1とE3レベルの比率が、対象におけるAIHの増大した尤度を示す。方法は、対象の生体試料における、E3のレベルを含む分析データをプロセッサにより受信することと、プロセッサによりE3のレベルを対照E3レベルと比較することと、分析データが対象の生体試料におけるアルカリホスファターゼ（AP）のレベルを含み、プロセッサによりAPのレベルを対照APレベルと比較することとを含み得、PSCを有する疑いのある対象において（例えば、AIH陰性および/またはPBC陰性である）、対照E3レベルよりも高いE3レベルおよび/または対照APレベルよりも高いAPレベルが、患者におけるPSCの増大した尤度を示す。関連する実施形態において、方法は、プロセッサに動作可能に連結された通信モジュールによりレポートを伝達することを含み得る。

20

30

【0030】

本開示は、プロセッサおよびプロセッサに動作可能に連結されたメモリーを含むコンピューターシステムを提供し、メモリーは、患者において（例えば、肝疾患を有する疑いのある患者、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な患者、検査下で不特定の病的状態を有する患者、または他の関心患者）肝疾患を診断するためにそこに保存された命令を含み、当該命令は、プロセッサにより実行される場合に、プロセッサに、患者の生体試料におけるエオタキシン 3（E3）のレベルを含む分析データを受信させ、E3のレベルを対照E3レベルと比較させ、および患者における肝疾患の尤度を示す、E3レベルを含むレポートを生成させ、対照E3レベルよりも高いE3レベルが、患者における肝疾患の増大した尤度を示す。関連するコンピューターシステムにおいて、肝疾患は、AIH、PSC、およびPBCのうち少なくとも1つである。コンピューターシステムの命令は、さらに、プロセッサに、患者の生体試料におけるエオタキシン 1（E1）のレベルおよびマクロファージ由来ケモカイン（MDC）のレベルを含む分析データを受信させ、E1のレベルおよびE3のレベルを用いてE1とE3レベルの比率を算出させ、E1とE3レベルの比率とE1とE3レベルの対照の比率を比較させ、MDCレベルを対照MDCレベルと比較させ得、対照E3レベルよりも高いE3レベル、対照の比率よりも高いE1とE3

40

50

レベルの比率、および対照MDCレベルよりも高いMDCレベルが、対象におけるPSCの増大した尤度を示す。コンピューターシステムの命令は、またさらに、プロセッサに、対象からの生体試料における、インターロイキン 15 (IL 15) のレベルを含む分析データを受信させ、IL 15レベルを対照IL 15レベルと比較させ得、対照IL 15レベルよりも高いIL 15レベル、対照MDCレベルよりも高いMDCレベル、対照E3レベルよりも高いE3レベル、および対照の比率よりも高いE1とE3レベルの比率が、対象におけるAIHの増大した尤度を示す。コンピューターシステムは、患者の生体試料におけるE3のレベルを含む分析データを受信し、E3レベルを対照E3レベルと比較し、患者の生体試料におけるアルカリホスファターゼ (AP) のレベルを含む分析データを受信し、APレベルを対照APレベルと比較し得、PSCを有する疑いのある対象において (例えば、AIH陰性であり、PBC陰性であり、または両方)、対照E3レベルよりも高いE3レベルおよび/または対照APレベルよりも高いAPレベルが、対象におけるPSCの増大した尤度を示す。

10

【0031】

本開示のコンピューターシステムは、ネットワーク上でレポートを伝達するための通信モジュールを含み得、通信モジュールはプロセッサに動作可能に連結され、メモリーは、プロセッサにより実行される場合に、プロセッサに通信モジュールを介してレポートを伝達させる命令を含む。

【0032】

本開示は、患者 (例えば、肝疾患を有する疑いのある患者、定期的な医療検査を受ける外観的には健康な患者、検査下で不特定の病的状態を有する患者、または他の関心患者) における肝疾患の診断を促進するコンピューター実施方法を提供し、患者の生体試料におけるエオタキシン 3 (E3) のレベルを含む分析データを受信することと、E3のレベルを対照E3レベルと比較することと、患者における肝疾患の尤度を示し、E3レベルを含むレポートを生成することとを含み、対照E3レベルよりも高いE3レベルが、患者における肝疾患の増大した尤度を示す。関連する方法において、肝疾患は、AIH、PSC、およびPBCのうちの少なくとも1つである。コンピューター実施方法は、患者の生体試料におけるエオタキシン 1 (E1) のレベルおよびマクロファージ由来ケモカイン (MDC) のレベルを含む分析データを受信することと、E1のレベルおよびE3のレベルを用いてE1とE3レベルの比率を算出することと、E1とE3レベルの比率をE1とE3レベルの対照の比率と比較することと、MDCレベルを対照MDCレベルと比較することとを含み得、対照E3レベルよりも高いE3レベル、対照の比率よりも高いE1とE3レベルの比率、および対照MDCレベルよりも高いMDCレベルが、対象におけるPSCの増大した尤度を示す。コンピューター実施方法は、またさらに、対象からの生体試料における、インターロイキン 15 (IL 15) のレベルを含む分析データを受信することと、IL 15レベルを対照IL 15レベルと比較することとを含み得、対照IL 15レベルよりも高いIL 15レベル、対照MDCレベルよりも高いMDCレベル、対照E3レベルよりも高いE3レベル、および対照の比率よりも高いE1とE3レベルの比率が、対象におけるAIHの増大した尤度を示す。コンピューター実施方法は、患者の生体試料におけるE3のレベルを含む分析データを受信することと、E3レベルを対照E3レベルと比較することと、患者の生体試料におけるアルカリホスファターゼ (AP) のレベルを含む分析データを受信することと、APレベルを対照APレベルと比較することとを含み得、PSCを有する疑いのある対象において (例えば、AIH陰性であり、PBC陰性であり、または両方)、対照E3レベルよりも高いE3レベルおよび/または対照APレベルよりも高いAPレベルが、対象におけるPSCの増大した尤度を示す。

20

30

40

【0033】

これらおよび他の特徴は、本明細書を考察した際に、当業者にとって明白であろう。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】本発明方法の使用のための、コンピューター化されたシステムの全体的な概略図

50

を示す。

【図2】対照、HCV、AIH、PBC、PSC単独およびPSC+/-IBD群の間の、血清エオタキシン-1（パネルa）、エオタキシン-3（パネルb）、CCL（パネルc）およびIL-15（パネルd）のレベルの比較を示す。PSC+/-IBDには、PSC単独、ならびに、UCを伴うPSC+CDを伴うPSCをすべて含み；AIHを有するPSCの任意の併存疾患は、PSC単独およびPSC+/-IBDから除外された。各マーカーの検出の検出下限（LLOD）は、すべての患者について、長い水平の点線として各検体に対し示されている。各群のマーカーに対するメジアン値は、短い水平線により示されている。

【図3】～

【図8】は、エオタキシン-1（E1）、エオタキシン-3（E3）、CCL22（MDC）、およびIL-15のレベルに基づいたアルゴリズムを示す表を提示し、AIH、PBCおよび/またはPSCを検出するために用いられた場合の結果、ならびに、健常者およびHCV-感染対象者からの鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果、ならびに、AIH、PBCおよびPSCの間の鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果を示す表を提示する。

【図3】エオタキシン-1（E1）、エオタキシン-3（E3）、CCL22（MDC）、およびIL-15のレベルに基づいたアルゴリズムを示す表を提示し、AIH、PBCおよび/またはPSCを検出するために用いられた場合の結果、ならびに、健常者およびHCV-感染対象者からの鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果、ならびに、AIH、PBCおよびPSCの間の鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果を示す表を提示する。

【図4】エオタキシン-1（E1）、エオタキシン-3（E3）、CCL22（MDC）、およびIL-15のレベルに基づいたアルゴリズムを示す表を提示し、AIH、PBCおよび/またはPSCを検出するために用いられた場合の結果、ならびに、健常者およびHCV-感染対象者からの鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果、ならびに、AIH、PBCおよびPSCの間の鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果を示す表を提示する。

【図5】エオタキシン-1（E1）、エオタキシン-3（E3）、CCL22（MDC）、およびIL-15のレベルに基づいたアルゴリズムを示す表を提示し、AIH、PBCおよび/またはPSCを検出するために用いられた場合の結果、ならびに、健常者およびHCV-感染対象者からの鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果、ならびに、AIH、PBCおよびPSCの間の鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果を示す表を提示する。

【図6】エオタキシン-1（E1）、エオタキシン-3（E3）、CCL22（MDC）、およびIL-15のレベルに基づいたアルゴリズムを示す表を提示し、AIH、PBCおよび/またはPSCを検出するために用いられた場合の結果、ならびに、健常者およびHCV-感染対象者からの鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果、ならびに、AIH、PBCおよびPSCの間の鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果を示す表を提示する。

【図7】エオタキシン-1（E1）、エオタキシン-3（E3）、CCL22（MDC）、およびIL-15のレベルに基づいたアルゴリズムを示す表を提示し、AIH、PBCおよび/またはPSCを検出するために用いられた場合の結果、ならびに、健常者およびHCV-感染対象者からの鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果、ならびに、AIH、PBCおよびPSCの間の鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果を示す表を提示する。

【図8】エオタキシン-1（E1）、エオタキシン-3（E3）、CCL22（MDC）、およびIL-15のレベルに基づいたアルゴリズムを示す表を提示し、AIH、PBCおよび/またはPSCを検出するために用いられた場合の結果、ならびに、健常者およびHCV-感染対象者からの鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果、ならびに、

10

20

30

40

50

A I H、P B CおよびP S Cの間の鑑別診断を提示するために用いられた場合の結果を示す表を提示する。

【図9】エオタキシン3 (E3) に対する、受信者 - 操作者特性 (ROC) 曲線を示す。

【図10】エオタキシン1 (Eotaxin (E1とも呼称される)) に対する、受信者 - 操作者特性 (ROC) 曲線を示す。

【図11】マクロファージ由来ケモカイン (MDC) に対する、受信者 - 操作者特性 (ROC) 曲線を示す。

【図12】インターロイキン - 15 (IL - 15) に対する、受信者 - 操作者特性 (ROC) 曲線を示す。

【図13】E1 / E3の比率に対する、受信者 - 操作者特性 (ROC) 曲線を示す。

【図14】本発明の診断アルゴリズムの精度評価の結果を示す表を提示する。

【図15】エオタキシン - 3 (E3) またはアルカリホスファターゼ (AP) の血清レベルの増加の検出により、P S Cと確認された患者の検出を示す、a) 概略図、および、b) 表、を提示する。

【発明を実施するための形態】

【0035】

本発明を詳述する前に、本発明は、記述される特定の実施形態に、当然のことながらそれらは変化しうるので、限定されないことを理解されたい。また、本明細書に使用される専門用語は、本発明の範囲は添付の請求項によってのみ限定されるので、特定の実施形態を記述する目的のためのみであり、限定の意図は無いこと、ことも理解されたい。

【0036】

値の範囲が提示される場合、当該範囲の上限および下限の間の、および、任意の他の既定範囲、または、その既定範囲の間の値の、それぞれ間の値は、他で明確に示されない限り、下限単位の10分の1まで、本発明の範囲内に包含される。これらの、より小さな範囲の上限値および下限値は、個々に、当該より小さな範囲に含まれても良く、および、本発明の範囲内にもまた含まれ、当該規定範囲の任意の特定の除外限界に依存する。既定範囲に上下限値のうちの1つ、または両方が含まれる場合、限界値に含まれるもののうちのいずれか、または両方を除外する範囲もまた、本発明の範囲内にある。

【0037】

他で定義されない限り、本明細書に用いられる全ての技術的な用語および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者に普遍的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記述されるものと類似、または均等である任意の方法および物質もまた、本発明の実施および試験に用いることができるが、以下に、好ましい方法および材料を記述する。本明細書に言及されるすべての公表文献は、当該公表文献が引用されるところに関連した方法および/または物質を開示および記述するために、参照により本明細書に援用される。

【0038】

本明細書および添付のクレームにおいて、単数形の「ひとつの ((a)、 (a n d) および、当該 ((t h e)) 」は、他で明確に示されない限り、複数形の指示対象を含む。ゆえに、たとえば、「一つの試料」という記載は、そのような試料の複数を含み、および、「当該ポリペプチド」という記載は、1以上のポリペプチド、および、当業者公知のその均等物を指すことが含まれる。

【0039】

本明細書において検討されている公表文献は、単に、本出願の優先日の前に公開されたものとして提示されている。本明細書において、いずれの記載も、先行発明であるという理由により、そのような公表文献に先行して本発明が権利付与されないということの承認とはみなされない。さらに、提示される公表文献の日付は、実際の公表日とは異なっている可能性があり、個々に確認する必要がある。

【0040】

実施例は、本発明の物品をどのように製造および使用するかを当業者に対して完全に開

10

20

30

40

50

示および記述するために提示されているものであり、発明者らが、自身の発明とする範囲を限定する意図はなく、および、以下の実施例が、行われた全ての実験を示している、または、それらのみが行われた実験であることを示していることが意図されてもいない。用いられている数値（たとえば、量、温度等）に関し、正確性を心掛けているが、いくらかの実験誤差および偏差を考慮するべきであることを留意されたい。別様に示されない限り、部分は、重量による部分であり、分子量は平均分子量であり、温度は、セ氏であり、圧力は、大気圧か、または大気圧に近いものである。

【0041】

明確性のために、別の実施形態の文脈で記述されている本発明のある特長が、単一の実施形態においてもまた、組み合わせで提示されうることを認識されたい。逆に、簡潔性のために単一の実施形態の中で記述されている本発明の様々な態様が、別々にも提示されうること、または、適切な任意の副組み合わせで提示されう得る。本発明に付随する実施形態の全ての組み合わせが、本発明により具体的に包含され、および、各組合せおよび全ての組み合わせが個々に明示的に開示されているものとして、そのような組み合わせが、たとえば、安定な化合物（すなわち、作製され、単離され、特徴付けられ、および生物学的活性に検証されることができ化合物）である化合物である、本発明物質を包含する範囲において、本明細書に開示される。さらに、様々な実施形態のすべての副組み合わせ、およびその構成要素（たとえば、そのような改変を記述する実施形態において列記される化学物質群の構成要素）もまた、本発明に具体的に包含され、そのような副組み合わせのそれぞれ、およびすべてが個々に明示的に本明細書に開示されているものとして、本明細書に開示される。

【0042】

定義

「自己免疫性肝炎」または「AIH」とは、肝組織の寛容が失われたことが推測され、身体の免疫システムが肝臓細胞を攻撃している状態にある、慢性炎症性肝臓疾患を指す。この異常な免疫応答により肝臓に炎症が生じ、たとえば肝硬変等のさらなる合併症が発症しうる。AIHの病理は、男性より女性に多く、肝細胞への損傷に始まり、肝炎が生じ、白血球浸潤による段階的なネクロシスが付随し、最終的には、線維症および肝硬変が発生する。AIHは、抗核抗体（ANA）、抗平滑筋抗体（SMA）、肝/腎I型ミクロソーム抗体（抗LKM1）、可溶性肝/膵抗原抗体（抗SLA/LP）、核周辺部抗好中球細胞質抗体（pANCA）、肝臓特異的サイトゾルI型抗原抗体（抗LC1）、および抗アクチン抗体と関連する可能性がある（Manns, et al. *Hepatology*, 2010. 51(6): p. 2193-213; Czaja, et al. *Gastroenterology*, 2010. 139(1): p. 58-72 e4）。これらの自己抗体は、AIH特異的ではなく、PBC、PSC、ウイルス性肝炎、薬物性肝炎、およびアルコール性肝炎を有する患者にも検出されうるため、国際自己免疫性肝炎研究グループは、以下のコード化されたパネルに示される、AIH診断のための診断アルゴリズムを提唱している。アルゴリズムは、4つのパラメーター（異なる自己抗体のレベル、IgGレベル、肝組織像、および公知のウイルスの非感染、を含む）に基づき、AIHを確定、AIHの疑い、またはAIHではないとの診断を容易にするものであり、以下に要約され、Lohse, et al. *J. Hepatol.* 2011. 55(1): p. 171-82に記述されている。

10

20

30

40

【表 1】

		Points	
自己抗体	ANA または SMA または	1	
	LKM > 1 : 40	2	
	ANA または SMA または		
	LKM > 1 : 80		
	SLA/LP陽性 (> 20単位)		10
IgG (または、ガンマグ ロブリン)	正常上限値	1	
	>正常限界の1.10倍	2	
肝臓組織像*	AIHと適合	1	
	AIHの典型	2	
ウイルス性肝炎が無い	はい	2	
	いいえ	0	20

自己免疫性肝炎 (AIH) 確定 : ≥ 7 ; AIH疑い : ≥ 6 . ANA、抗核

【0043】

「原発性胆汁性肝硬変」または「PBC」(慢性非化膿性破壊性胆管炎とも呼称されることが知られている)とは、原因不明の慢性的な、非化膿性の、破壊的な肉芽腫性胆管炎を指し、病的には、肝細胞よりもむしろ中型サイズの肝内胆管により関連し、高レベルの血清アルカリホスファターゼ(ALP)を伴う胆汁うっ滞の特徴を有する(Kaplan et al. The New England Journal of Medicine, 2005. 353(12): p. 1261-73)。炎症は通常、隣接する胆管システムから始まり、線維症をもたらす胆汁うっ滞性疾患が生じる。他の自己抗体(たとえば、ANA)がPBCにおいて検出されるが、ミトコンドリア内膜のアシルトランスフェラーゼに対する抗ミトコンドリア抗体(AMA)が、PBCに対して高い感度と特異度を有し(上述のKaplan)、PBCの症例の95%において報告されている。さらに、イムノグロブリン、特にIgMの上昇、ならびに、たとえば胆管損傷、胆管減少、肉芽腫性門脈炎等の、特異的な組織学的特徴が、PBC診断の指標である。AIHと同様、PBCは女性に多く、現在では、たとえば、シェーグレン症候群および甲状腺疾患等の他の自己免疫性疾患と関連し、遺伝的に素因のある個人に発生する、肝臓特異的な自己免疫性疾患と見なされている。PBCは通常、子供には報告されていない。本明細書において、「子供」とは、12歳未満の個人を指す。

【0044】

「原発性硬化性胆管炎」または「PSC」とは、全てのサイズの胆管に侵襲がみられる慢性胆汁うっ滞性疾患を指す(Angulo, et al. Clinics in Liver Disease, 1999. 3(3): p. 529-70; Angulo, et al. Hepatology, 1999. 30(1): p. 325-32)。PBCと同様、PSCにおける炎症も通常、隣接する胆管系から始まり、胆汁うっ滞性疾患が生じ、線維症および緩効性もたらされる。PSCの症例の最大約80%が、炎症性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎と関連している。この疾患は、最大15%において、胆管癌の発症を合併する可能性がある。さらに、膵癌および結腸癌の発生も、侵襲を受けていない個人と比較し、上昇している。特異的な自己抗体、PSCに対する免疫学的診断マーカー、生化学的診断マーカー、または血清学的診断マーカーが、本発明より以前には利用可能な状態には無かったため、診断は通常、内視鏡的逆行性胆管造影(ERC)および/または磁気共鳴胆管造影(MRC)に基づいており、典型的な多病巣性の胆道狭窄および介在拡張の他の原因

30

40

50

の除外と共に、それらにより、肝内胆管および肝外胆管の典型的な狭窄および拡張が示される。肝生検で、タマネギ状の線維化と呼ばれる、線維組織の同心円層を伴う、胆管周囲性線維化が観察されうる。P S Cは、女性よりも男性に多い。

【0045】

「個人」、「対象」および「患者」という用語は、本明細書において相互交換可能に用いられ、ヒトを指す。

【0046】

本発明の診断方法に関する文脈において、「健常な個人」という用語は、検出できる疾患、特に肝臓疾患を罹患していない個人、特に、肝炎（たとえば、ウイルス性肝炎または自己免疫性肝炎）に罹患していない個人、より具体的には、A I H、P B CおよびP S Cのうちの1つ以上の肝臓疾患に罹患していない個人を指す。健常な個人には、調査時（任意選択的に直近1か月の間）、任意の疾患の症状、症候、または兆候が認められていない者；いずれの肝臓疾患の病歴も有していない者；疾患、特に肝臓疾患に対する治療を受けていない者；正常な全血球計算（C B C）差分テスト、ならびに、正常レベルの血清A L T（アラニンアミノトランスアミナーゼ）および血清G G T（ γ -グルタミルトランスフェラーゼ）を有している者；胆道疾患が陰性の者；ウイルス性肝炎（たとえば、H C V感染、H B V感染）の検査が陰性の者；H I V感染の検査が陰性の者；ならびに、非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）、アルコール誘導性肝炎、および、薬物性肝炎に対して陰性の者、が含まれる。

【0047】

本明細書において相互交換可能に用いられている、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指し、生化学的に修飾されたアミノ酸、または誘導体化されたアミノ酸、および、修飾ペプチド主鎖を有するポリペプチドを含有しても良い。当該用語には、融合タンパク質（限定されないが、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質を含む）、異種および同種リーダー配列（N末端メチオニン残基を含む、または含まない）；免疫学的にタグ化されたタンパク質等を有する融合物が含まれる。「N H₂」とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基を指し、「C O O H」とは、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離カルボキシル基を指す（標準的なポリペプチドの命名法に沿い、J. Biol. Chem., 243 (1969), 3552-59を用いている）。

【0048】

生体試料中に存在するポリペプチドに関する文脈において、「ポリペプチド」とは、試料を採取した個人に存在した天然型ポリペプチドを指す。

【0049】

「保存的アミノ酸置換」とは、1つのアミノ酸残基と、アミノ酸側鎖の化学的および物理的特性（たとえば、電荷、サイズ、疎水性/親水性）を共有する他のアミノ酸残基の置換を指す。「保存的置換」は、以下のアミノ酸残基内の置換を含むことが意図される：g l y、a l a；v a l、i l e、l e u；a s p、g l u；a s n、g l n；s e r、t h r；l y s、a r g；および、p h e、t y r。そのような置換に関するガイダンスは、ポリペプチドのアミノ酸配列のアライメントから引き出すことができる。

【0050】

本明細書において、「バイオマーカー」または「マーカー」とは、通常、1つの表現型（たとえば、疾患を有する）を有する対象から採取された試料中に、他の表現型（たとえば、当該疾患を有しない、または異なる疾患を有する）を有するものと比較して、差別的に存在する有機生体分子（たとえば、ポリペプチド）を指す。バイオマーカーは、第二の表現型に対する、第一の表現型におけるバイオマーカーの平均レベルまたはメジアンレベルを算出し、統計学的な有意差が示される場合、異なる表現型の間で、バイオマーカーは差別的に存在している。統計学的有意差に関する一般的なテストとしては、とりわけ、t検定、ANOVA、K r u s k a l - W a l l i s、W i l c o x o n、M a n n - W h i t n e yおよびオッズ比が挙げられる。バイオマーカーを、単独または組み合わせるこ

10

20

30

40

50

とにより、対象が、目的の表現型にある相対的な可能性の尺度を提供する。そのように、バイオマーカーは、たとえば、疾患（診断）、薬剤の治療有効性（テラノスティクス（theranostics））等に対するマーカーとしての用途が見出される。バイオマーカーは、診断、テラノスティクス等を容易にする分析における被分析物である。

【0051】

「生体試料」には、個人から採取された様々な試料が包含される。定義には、生体液（たとえば、血液（血液分画物（たとえば、血清、血漿）を含む））；および他の生物由来の液体試料（たとえば、唾液、尿、胆汁等）、ならびに、肝生検試料の形態にある固形組織が包含される。「血液試料」とは、対象の血液から得られる生体試料を指し、および、全血および本発明の分析に適した血液分画物（たとえば、血清または血漿）を含む。概して、凝固させることなく、血液試料中の細胞性成分と非細胞性成分を分離する（たとえば、遠心による）ことにより、血液血漿試料が得られ、凝固血液（凝血）の分離により、血液血清試料が得られる。血液の生体試料の例としては、末梢血、または、末梢血から得られた試料が挙げられる。定義には、たとえば、試料取得後に、試薬での処置、可溶化、またはある成分（たとえば、分析される1以上のポリペプチド）の富化等の操作が行われた試料が含まれる。たとえば、生体試料（たとえば、血液）は、対象の被分析物（複数含む）を含有する分画に関して富化されても良い。

10

【0052】

「単離された」とは、成分が天然に存在しうる環境から、異なる環境にある、対象の実体を指す。「単離された」とは、対象の成分に関して実質的に富化されている試料の内にある成分、および/または、対象の成分が部分的に、もしくは実質的に精製された試料の内にある成分を含むことを意味する。

20

【0053】

「精製された」とは、対象の成分（たとえば、ポリペプチド）が、自然では付随する成分から分離されていることを意味する。「精製された」とは、製造過程（たとえば、化学合成）において、付随しうる成分から分離された対象成分を指すために用いても良い。いくつかの実施形態において、成分は、自然に関連する有機分子、または、製造過程において関連する有機分子を含まず、少なくとも50～60重量%である場合に、実質的に純粋である。いくつかの実施形態において、調製物は、対象成分の少なくとも75重量%、少なくとも90重量%、少なくとも95重量%、または少なくとも99重量%である。実質的に純粋な成分は、たとえば、天然源（たとえば、細菌）から抽出することにより、成分を化学的に合成することにより、または、精製と化学修飾を組み合わせることにより、得ることができる。実質的に純粋な成分はまた、たとえば、当該成分を含有する試料を富化することにより、得ることができる。実質的に純粋な成分はまた、組換え合成、または化学的合成により得ることができる。純度は、任意の適切な方法（たとえば、クロマトグラフィー、質量分析、高速液体クロマトグラフィー分析等）により測定することができる。

30

【0054】

本明細書において、「決定する」、「評価する」、「分析する」、「測定する」、および「検出する」という用語は、定量的、および半定量的決定の両方を指し、ならびに、「決定する」という用語は、本明細書において、「分析する」、「計測する」等と相互交換可能に用いられる。定量的決定が意図される場合においては、被分析物の「量を決定すること」という表現が用いられる。定量的および半定量的決定が意図される場合においては、被分析物の「レベルを決定すること」、または、被分析物を「検出すること」という表現が用いられる。

40

【0055】

一般に、「定量的」分析によって、基準（対照）に対する、試料中の被分析物の量に関する情報が得られ、通常、数字として報告がなされる（「ゼロ」値は、被分析物が検出限界以下である場合に割り当てられうる）。「半定量」分析には、基準（たとえば、正常閾値または異常閾値等の閾値）に対して相対的である、検体中の被分析物の量の数値表現の提示が含まれ、「ゼロ」値は、被分析値が検出限界以下である場合に割り当てられうる。

50

通常、半定量分析の結果は、付随する基準範囲に対して比較され、結果の定量的な解釈を提示するものである。

【 0 0 5 6 】

「感度」とは、検査が正しく陽性と特定する疾患を有する人々の割合を指す。「特異度」とは、検査が正しく陰性と特定する疾患を有しない人々の割合を指す。感度および/または特異度に対する割合は、パーセンテージとして表されても良い。パーセンテージとして表される場合、特異度は、100から、誤診に対する感度の値を指し引くことにより、算出される。たとえば、PSCの診断に対するアルゴリズムを用いたテストが、AIHの症例の8%でPSCと誤診する場合、AIHに対するPSCの特異度は、92%である。

10

【 0 0 5 7 】

本明細書において、「抗体」とは、イムノグロブリン遺伝子、またはイムノグロブリン遺伝子の断片により遺伝的にコードされることができ、対象の抗原に結合する、1以上のポリペプチドを有する抗原結合タンパク質を指す。本明細書において、「抗体」とは、抗体全体、ならびに、全抗体の抗原結合断片を包含する。抗原結合抗体断片とは、たとえば、Fab'、(Fab')₂等が挙げられる。本明細書において、「Fab」とは、Fc部分を欠く、抗体の最小抗原結合部分を指す(たとえば、四量体抗体のVH/VL対のヘテロ二量体)。「(Fab')₂」とは、共有結合されているFab分子(通常、本来存在するように共有結合されている)を指し、Fc部分を欠いている。様々な抗体断片が、本来の抗体を消化する観点から定義されている一方で、当業者は、そのような断片が、化学的、または組換えDNA技術の利用のいずれかにより、de novo合成されることを認識していることに、注意されたい。

20

【 0 0 5 8 】

全抗体は、2対のポリペプチドから構成される抗体を指し、各対には、1つの「軽」鎖ポリペプチドおよび1つの「重」鎖ポリペプチドを含有している。可変軽鎖(VL)および可変重鎖(VH)という用語は、それぞれ、CDRを含有する軽鎖および重鎖の部分を指す。軽鎖は、その定常領域によって分類することができ、 κ 、 λ 、 μ 、 δ 、 α 、 β 、 γ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 ι 、 \jmath 、 κ 、 λ 、 μ 、 ν 、 ξ 、 \omicron 、 π 、 ρ 、 σ 、 τ 、 υ 、 ϕ 、 χ 、 ψ 、 ω 、または φ であり得る。重鎖は、その定常領域によって分類することができ、 μ 、 δ 、 α 、 β 、 γ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 、 ι 、 \jmath 、 κ 、 λ 、 μ 、 ν 、 ξ 、 \omicron 、 π 、 ρ 、 σ 、 τ 、 υ 、 ϕ 、 χ 、 ψ 、 ω 、または φ であり得、それらは順に、それぞれ、イムノグロブリンのクラス(IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE)を定義する。

30

【 0 0 5 9 】

「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を包含し、さらに、任意のクラス(たとえば、IgM、IgGおよびそれらのサブクラス)を包含する。「抗体」はまた、ハイブリッド抗体、二特異性抗体、ヘテロ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、および抗原結合能力を維持している、それらの機能的断片を包含する。「二特異性抗体」は、単一抗体(または抗体断片)と似ているが、2つの異なる抗原結合部位(可変領域)を有する。ヘテロ抗体は、共に連結された2以上の抗体、または、抗体結合断片(たとえば、Fab)を指し、各抗体または断片は、異なる特異性を有している。抗体は、他の部分に複合体化されていても良く、および/または、たとえば、ポリスチレンプレートまたはビーズ、テストストリップ等の支持体(たとえば、固形支持体)に結合されていても良い。

40

【 0 0 6 0 】

タンパク質に結合するタンパク質または結合パートナー(たとえば、抗原(たとえば、被分析物)に結合する抗体)に関する場合、「特異的結合」という表現は、タンパク質と結合パートナー(たとえば、抗体と非分析物)の間の結合反応を指し、タンパク質および他の生物種の異種群の存在下で、当該タンパク質の存在を決定づけるものである。ゆえに、指定された条件下で、特異的な結合パートナー(たとえば、抗体)は、特定のタンパク質に優先的に結合するが、試料中に存在する他のタンパク質には、有意な量では結合しない。

【 0 0 6 1 】

50

「治療」、「治療すること」等の用語は、所望される薬理学的および/または生理学的効果を得ることを指す。当該効果は、疾患もしくはその症状を完全に、または部分的に予防するという点で、予防的であっても良く、ならびに/または、疾患および/または当該疾患に起因する有害な影響を完全に、または部分的に治癒するという点で、治療的であっても良い。本明細書において、「治療」とは、哺乳類、特にヒトにおける任意の疾患の治療を含み、ならびに、以下を含む：(a) 疾患に罹りやすい可能性はあるが、まだ、発症していると診断されていない対象において、疾患が発症することを予防すること；(b) 疾患を阻害すること、すなわち、発症を止めること；および(c) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退縮をもたらすこと。

【0062】

炎症性肝疾患の診断を容易にする方法

本発明により、自己免疫性肝炎(AIH)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、および原発性硬化性胆管炎(PSC)のうちの1以上の肝疾患の診断を容易にする方法が提示される。診断には、対象が、AIH、PBCおよびPSCのうちの1以上の肝疾患を有しているかどうかを評価し、健常者から対象を鑑別することが含まれ得る。診断には、対象が、AIH、PBCおよびPSCのうちの1以上の肝疾患を有しているかどうかを評価し、HCVに感染した者から対象を鑑別することが含まれ得る。診断には、非PSC罹患者であることを対照として、および/または、AIHもしくはPBCのうちの1つ、または両方を有するものを対照として、個人がPSCを有しているかどうかを分析することが含まれ得る。診断には、非AIH罹患者であることを対照として、および/または、PBCもしくはPSCのうちの1つ、または両方の罹患者であることを対照として、個人がAIHを有しているかどうかを分析することが含まれ得る。

【0063】

概して、本発明方法には、対象、特に、肝疾患(たとえば、AIH、PBCまたはPSCのうちの少なくとも1つの肝疾患)を有することが推測される対象の生体試料中のエオタキシン3(E3)のレベルを検出することが含まれる。E3のレベルを検出することに加え、本発明方法には、任意選択的に、対象由来の生体試料中のエオタキシン1(E1)のレベル、およびマクロファージ由来ケモカイン(MDC)のレベルを検出することが含まれる。E1、E3およびMDCのレベルを検出することに加え、本発明方法にはさらに、任意選択的に、インターロイキン15(IL15)のレベルを検出することが含まれる。これらのレベルを用いることにより、自己免疫性肝炎(AIH)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、および原発性硬化性胆管炎(PSC)のうちの少なくとも1つの肝疾患の診断が容易になり、および/または、AIH、PBCおよびPSCの間の鑑別診断が容易になる。本発明方法および、本発明の組成物はまた、対象に対する治療方針決定の促進における用途が見出される。

【0064】

本発明の態様において、肝疾患以外の疾患に関し、対象を診断する方法が含まれる。ある特定の態様において、当該方法には、対象(たとえば、肝疾患を有することが推測される対象、標準的なメディカルスクリーニングを受けている、明らかに健常な対象、詳細不明の病的状態を有する、調査中の対象、または他の目的の対象)由来の生体試料中のE3のレベルを検出することが含まれる。当該方法にはさらに、E3関連疾患(たとえば、水泡性類天疱瘡(Kagami et al., J Invest Dermatol. (2012) 132(1):249-51)、チャージ-ストラウス症候群における、肉芽腫性脈管炎性の器官損傷(Polzer et al. Rheumatology 2008 47(6):804-8)および、胃食道逆流症から鑑別診断するための診断バイオマーカーとして提唱されている、好酸球性食道炎(Bhattacharya et al. Hum Pathol. 2007 38(12):1744-53))を有する個人を診断することが含まれる。CCR1、CCR2、CCR5およびCX3CR1を含む、異なる受容体を介したE3の多機能性により、多様な免疫細胞の浸潤を伴う、アレルギー型疾患(Th2)から、自己免疫様肝疾患(Th1)にわたる、異なる疾患とE3のレベル増加との相関関係が説明付けられる。これにより、血清中のE3レベル等の測定は、肝疾患が推測される個人、医学底配慮を探索中の詳細不明な

10

20

30

40

50

病的状態を有する個人、および、さらに、標準的なメディカルスクリーニングを受けている健常者に対する、初期実験室要求パネルに対する、価値ある補強となる。これにより、自己免疫様管疾患（PSC、PBCおよびAIH）、アレルギー性疾患、水泡性類天疱瘡、チャグ-ストラウス症候群、および好酸球性食道炎と、診断されない症例の数が減少するであろう。

【0065】

本発明方法において用いられるバイオマーカー（被分析物）、ならびに、検出および分析の方法を、以下に詳述する。

【0066】

検出のためのバイオマーカー

本発明には、患者の生体試料中のバイオマーカー（被分析物ともまた呼称される）の検出が含まれる。本発明には、生体試料中のエオタキシン3（E3；CCL26としても知られる）の検出が含まれる。本発明方法には、任意選択的に、E3の検出に加え、生体試料中のエオタキシン1（E1；CCL11としても知られる）の検出が含まれる。本発明方法にはさらに、任意選択的に、E3、E1および、マクロファージ由来ケモカイン（MDC；CCL22としても知られる）およびインターロイキン15（IL15）のうちの1つ、または両方の検出が含まれる。本発明方法にはさらに、他のバイオマーカーの検出が含まれ得る。

【0067】

エオタキシンE3およびE1

E3

「エオタキシンE3」または「E3」は、「Chemokine, CC Motif, Ligand 26」（CCL26）；および、Small Inducible Cytokine Subfamily A、メンバー26（SCYA26）、としても知られるポリペプチドを指す。E3は、成熟型ポリペプチドを産生するために開裂されるシグナルペプチドを含有するプレポリペプチドとして、生成される。ヒトE3の例としては、アクセッション番号AB016542.1；NP_006063；Q9Y258；および、BAA84579のアミノ酸配列を含有するもの、ならびに、それらの天然型変異体が挙げられる。たとえば、AB016542.1のアミノ酸配列は、以下である（1～23残基に、シグナルペプチドを有する）：MMGLSLASAV LLASLLSLHL GTATRGS DIS KTCCFQYSHK PLPWTWVRSY EFTSNSCSQR AVIFTTKR GK KVCTHPRKKW VQKYISLLKT PKQL（配列番号1）。

【0068】

たとえば、NP_006063のアミノ酸配列は、以下である（1～23残基に、シグナルペプチドを有する）：MMGLSLASAV LLASLLSLHL GTATRGS DIS KTCCFQYSHK PLPWTWVRSY EFTSNSCSQR AVIFTTKR GK KVCTHPRKKW VQKYISLLKT PKQL（配列番号2）。

【0069】

たとえば、Q9Y258のアミノ酸配列は、以下である（1～23残基に、シグナルペプチドを有する）：MMGLSLASAV LLASLLSLHL GTATRGS DIS KTCCFQYSHK PLPWTWVRSY EFTSNSCSQR AVIFTTKR GK KVCTHPRKKW VQKYISLLKT PKQL（配列番号3）。

【0070】

たとえば、BAA84579のアミノ酸配列は、以下である（1～23残基に、シグナルペプチドを有する）：MMGLSLASAV LLASLLSLHL GTATRGS DIS KTCCFQYSHK PLPWTWVRSY EFTSNSCSQR AVIFTTKR GK KVCTHPRKKW VQKYISLLKT PKQL（配列番号4）。

10

20

30

40

50

【0071】

E3の検出には、全長E3の検出、ならびに、自然に発生する断片、または生体試料中に存在する他のE3代謝産物の検出、および、生体試料の処理により生成された断片または他の誘導体の検出が包含される(ただし、そのような断片、代謝産物、または誘導体の検出が、E3の検出に特異的である場合に限る)。E3断片は通常、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60アミノ酸か、それ以上の長さである。E3の検出はまた、E3をコードする核酸(たとえば、E3をコードするRNA、またはそのようなE3をコードするRNAから、たとえば逆転写PCR(RT-PCR)を用いて作製されたDNA)の検出により行われても良い。E3の検出には、E3、または生体試料中に存在するその断片の直接的な検出、または間接的な検出(たとえば、抗E3抗体等の抗E3結合パートナーの結合の検出による)が含まれる。

10

【0072】

ある特定の実施形態によると、E3の検出(たとえば、血清E3検出)には、E3に対する抗E3抗体の結合が含まれる。これらの実施形態においては、E3に対する、検出可能な標識抗E3抗体の結合が含まれても良く、それによって、E3の検出には、E3に結合した抗E3抗体の検出可能な標識を検出することが含まれる。これらの実施形態の他の態様においては、E3に抗E3抗体が結合し、次いで、検出可能な標識第二抗体の抗E3抗体への結合が含まれてもよく、それにより、E3の検出には、第二抗体の検出可能な標識の検出が含まれる。抗E3抗体は、E3に特異的に結合する任意の抗体であっても良い。ある特定の態様によると、抗E3抗体は、市販されている抗E3抗体である(たとえば、Abcam(登録商標)、Abnova、Abgent、Santa Cruz Biotechnology(登録商標)、United States Biological、ProSci、R&D Systems(登録商標)、Fitzgerald、Meso Scale Discovery(登録商標)から入手可能なモノクローナル抗E3抗体もしくはポリクローナル抗E3抗体、または、任意の他の市販抗体)。ある特定の態様において、抗E3抗体は、キットの一部として市販されており、たとえば、固相(たとえば、ELISA)ベースの、E3単独、または、任意の他の目的のバイオマーカー(たとえば、エオタキシン1(E1)、マクロファージ由来ケモカイン(MDC)、インターロイキン15(IL15)、アルカリホスファターゼ(AP)、またはそれらの任意の組み合わせ)と組み合わせた検出のためのキットがある。

20

30

【0073】

ある特定の態様において、対象の試料中に存在するE3は、表面に間接的に、または直接的に固定され、次いで、検出可能な標識一次抗E3抗体とE3の結合、または、非標識一次抗体によるE3の結合と、次いで、検出可能な標識二次抗体による結合が行われる。表面へのE3の固定化のために、任意の適切な方法を用いてもよい。ある特定の態様においては、表面に付着された抗E3「捕捉」抗体が、対象の試料中に存在するE3に結合し、それによって、E3が表面上に間接的に固定される。他の態様においては、表面に付着されたE3に特異的な受容体が、対象の試料中に存在するE3に結合し、それにより、E3が表面上に間接的に固定される。固定されると、続いて、E3は、任意の簡便な方法(たとえば、検出可能な標識抗E3一次抗体、または非標識抗E3一次抗体と当該一次抗体に結合する検出可能な標識二次抗体を用いた、固相抗体ベースの検出)を用いて、検出される。

40

【0074】

E1

「エオタキシン1」または「E1」は、Chemokine, CC Motif, Ligand 11(CCL11); Small Inducible Cytokine Subfamily A, Member 11(SCYA11); および、Small Inducible Cytokine A11としてもまた知られるポリペプチドを指す。E1は、成熟型ポリペプチドを産生するために開裂されるシグナルペプチドを含有するプレポリペプチドとして産生される。ヒトE1の例としては、アクセッション番号P

50

51671; CAG33702.1; NP_002977、およびそれらの天然型変異体の酸配列を含有するものが挙げられる。

【0075】

たとえば、P51671のアミノ酸配列は、以下である(1~23残基にシグナルペプチドを有する): MKVSAALLWL LLIAAAFSPQ GLAGPASVPT TCCFNLANRK IPLQRLESYR RITSGKCPQK AVIFKTKLAK DICADPKKKW VQDSMKYLDQ KSPTPKP (配列番号5)。

【0076】

たとえば、CAG33702.1のアミノ酸配列は、以下である(1~23残基にシグナルペプチドを有する): MKVSAALLWL LLIAAAFSPQ GLAGPASVPT TCCFNLANRK IPLQRLESYR RITSGKCPQK AVIFKTKLAK DICADPKKKW VQDSMKYLDQ KSPTPKP (配列番号6)。

【0077】

たとえば、NP_002977のアミノ酸配列は、以下である(1~23残基にシグナルペプチドを有する): MKVSAALLWL LLIAAAFSPQ GLAGPASVPT TCCFNLANRK IPLQRLESYR RITSGKCPQK AVIFKTKLAK DICADPKKKW VQDSMKYLDQ KSPTPKP (配列番号7)。

【0078】

E1の検出には、全長E1の検出、ならびに、自然に発生する断片、または生体試料中に存在する他のE1代謝産物の検出、および、生体試料の処理により生成された断片または他の誘導体の検出が包含される(ただし、そのような断片、代謝産物、または誘導体の検出が、E1の検出に特異的である場合に限る)。E1断片は通常、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60アミノ酸か、それ以上の長さである。E1の検出はまた、E1をコードする核酸(たとえば、E3をコードするRNA、またはそのようなE1をコードするRNAから、たとえばRT-PCRを用いて作製されたDNA)の検出により行われても良い。E1の検出には、E1、または生体試料中に存在するその断片の直接的な検出、または間接的な検出(たとえば、抗E1抗体等の抗E1結合パートナーの結合の検出による)が含まれる。

【0079】

ある特定の実施形態において、E1の検出(たとえば、血清E1検出)には、E1に対する抗E1抗体の結合が含まれる。これらの実施形態の態様においては、E1に対する、検出可能な標識抗E1抗体の結合が含まれ、それによって、E1の検出には、E1に結合した抗E1抗体の検出可能な標識を検出することが含まれる。これらの実施形態の他の態様においては、E1に抗E1抗体が結合し、次いで、検出可能な標識第二抗体の抗E1抗体への結合が含まれてもよく、それにより、E1の検出には、第二抗体の検出可能な標識の検出が含まれる。抗E1抗体は、E1に特異的に結合する任意の抗体であって良い。ある特定の態様において、抗E1抗体は、市販されている抗E1抗体である(たとえば、Abcam(登録商標)、Abnova、Abgent、Santa Cruz Biotechnology(登録商標)、United States Biological、ProSci、R&D Systems(登録商標)、Fitzgerald、Meso Scale Discovery(登録商標)から入手可能なモノクローナル抗E1抗体もしくはポリクローナル抗E1抗体、または、任意の他の市販抗体)。ある特定の態様において、抗E1抗体は、キットの一部として市販されており、たとえば、液相、または、固相(たとえば、ELISA)ベースの、E1単独、または、任意の他の目的のバイオマーカー(たとえば、エオタキシン3(E3)、マクロファージ由来ケモカイン(MDC)、インターロイキン15(IL15)、アルカリホスファターゼ(AP)、またはそれらの任意の組み合わせ)と組み合わせた検出のためのキットがある。

10

20

30

40

50

【0080】

ある特定の態様において、対象の試料中に存在するE1は、表面に間接的に、または直接的に固定され、次いで、検出可能な標識一次抗E1抗体とE1の結合、または、非標識一次抗体によるE1の結合と、次いで、検出可能な標識二次抗体による結合が行われる。表面へのE1の固定化のために、任意の適切な方法を用いてもよい。ある特定の態様においては、表面に付着された抗E1「捕捉」抗体が、対象の試料中に存在するE1に結合し、それによって、E1が表面上に間接的に固定される。他の態様においては、表面に付着されたE1に特異的な受容体が、対象の試料中に存在するE1に結合し、それにより、E1が表面上に間接的に固定される。固定されると、続いて、E1は、任意の簡便な方法（たとえば、検出可能な標識抗E1一次抗体、または非標識抗E1一次抗体と当該一次抗体に結合する検出可能な標識二次抗体を用いた、固相抗体ベースの検出）を用いて、検出されてもよい。

10

【0081】

MDC (CCL22)

「マクロファージ由来ケモカイン」または「MDC」とは、Chemokine, CCMotif, Ligand 22 (CCL22) および Small Inducible Cytokine Subfamily A, Member 22 (SCYA22) としてもまた知られるポリペプチドを指す。MDCは、開裂されて成熟型ポリペプチドを産生するシグナルペプチドを含有するプレポリペプチドとして産生される。ヒトMDCの例としては、アクセッション番号NP_002981; O00626; EAW82918、およびそれらの天然変異型の酸配列を含有するものが挙げられる。

20

【0082】

たとえば、NP_002981のアミノ酸配列は、以下である（1～24残基にシグナルペプチドを有する）：MDRLQTALLV VLVLLAVALQ ATEAGPYGAN MEDSVCCRDY VRYRLPLRVV KHFYWTSDSC PRPGVLLTF RDKEICADPR VPWVKMILNK LSQ（配列番号8）。

【0083】

たとえば、EAW82918のアミノ酸配列は、以下である（1～24残基にシグナルペプチドを有する）：

30

MARLQTALLV VLVLLAVALQ ATEAGPYGAN MEDSVCCRDY VRYRLPLRVV KHFYWTSDSC PRPGVLLTF RDKEICADPR VPWVKMILNK LSQ（配列番号9）。

【0084】

たとえば、O00626のアミノ酸配列は、以下である（1～24残基にシグナルペプチドを有する）：MDRLQTALLV VLVLLAVALQ ATEAGPYGAN MEDSVCCRDY VRYRLPLRVV KHFYWTSDSC PRPGVLLTF RDKEICADPR VPWVKMILNK LSQ（配列番号10）。

【0085】

MDCの検出には、全長MDCの検出、ならびに、自然に発生する断片、または生体試料中に存在する他のMDC代謝産物の検出、および、生体試料の処理により生成された断片または他の誘導体の検出が包含される（ただし、そのような断片、代謝産物、または誘導体の検出が、MDCの検出に特異的である場合に限る）。MDC断片は通常、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60アミノ酸か、それ以上の長さである。MDCの検出はまた、MDCをコードする核酸（たとえば、MDCをコードするRNA、またはそのようなMDCをコードするRNAから、たとえばRT-PCRを用いて作製されたDNA）の検出により行われても良い。MDCの検出には、MDC、または生体試料中に存在するその断片の直接的な検出、または間接的な検出（たとえば、抗MDC抗体等の抗MDC結合パートナーの結合の検出による）が含まれる。

40

【0086】

50

ある特定の実施形態において、MDCの検出(たとえば、血清MDC検出)には、MDCに対する抗MDC抗体の結合が含まれる。これらの実施形態においては、MDCに対する、検出可能な標識抗MDC抗体の結合が含まれ、それによって、MDCの検出には、MDCに結合した抗MDC抗体の検出可能な標識を検出することが含まれる。これらの実施形態の他の態様においては、MDCに抗MDC抗体が結合し、次いで、検出可能な標識第二抗体の抗MDC抗体への結合が含まれてもよく、それにより、MDCの検出には、第二抗体の検出可能な標識の検出が含まれる。抗MDC抗体は、MDCに特異的に結合する任意の抗体であっても良い。ある特定の態様によれば、抗MDC抗体は、市販されている抗MDC抗体である(たとえば、Abcam(登録商標)、Santa Cruz Biotechnology(登録商標)、United States Biological、ProSci、R&D Systems(登録商標)、Lifespan Biosciences、Meso Scale Discovery(登録商標)から入手可能なモノクローナル抗MDC抗体もしくはポリクローナル抗MDC抗体、または、任意の他の市販抗体)。ある特定の態様において、抗MDC抗体は、キットの一部として市販されており、たとえば、液相、または、固相(たとえば、ELISA)ベースの、MDC単独、または、任意の他の目的のバイオマーカー(たとえば、エオタキシン1(E1)、エオタキシン3(E3)、インターロイキン15(IL15)、アルカリホスファターゼ(AP)、またはそれらの任意の組み合わせ)と組み合わせた検出のためのキットがある。

【0087】

ある特定の態様において、対象の試料中に存在するMDCは、表面に間接的に、または直接的に固定され、次いで、検出可能な標識一次抗MDC抗体とMDCの結合、または、非標識一次抗体によるMDCの結合と、次いで、検出可能な標識二次抗体による結合が行われる。表面へのMDCの固定化のために、任意の適切な方法を用いてもよい。ある特定の態様においては、表面に付着された抗MDC「捕捉」抗体が、対象の試料中に存在するMDCに結合し、それによって、MDCが表面上に間接的に固定される。他の態様においては、表面に付着されたMDCに特異的な受容体が、対象の試料中に存在するMDCに結合し、それにより、MDCが表面上に間接的に固定される。固定されると、続いて、MDCは、任意の簡便な方法(たとえば、検出可能な標識抗MDC一次抗体、または非標識抗MDC一次抗体と当該一次抗体に結合する検出可能な標識二次抗体を用いた、固相抗体ベースの検出)を用いて、検出されてもよい。

【0088】

IL-15

「インターロイキン15」または「IL-15」とは、インターロイキンファミリーのポリペプチドを指す。IL-15は、開裂されて成熟型ポリペプチドを産生するシグナルペプチドを含有するプレポリペプチドとして産生される。ヒトIL-15の例としては、アクセッション番号No. P40933; NP_000576; NP_751915、およびそれらの天然変異型の酸配列を含有するものが挙げられる。

【0089】

たとえば、P40933のアミノ酸配列は、以下である(1~23残基にシグナルペプチドを有する): MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCFSA GLPKTEANW VNVISDLKKI EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILANN SLSSNGNVTE SGCKECEEL E EKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS(配列番号11)。

【0090】

たとえば、NP_000576のアミノ酸配列は、以下である(1~29残基にシグナルペプチドを有する): MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLT EAG IHVFILGCFSA GLPKTEANW VNVISDLKKI EDLIQSMHID ATLYTESDVH PSCKVTAMKC FLLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILANN SLSSNGNVTE SGCKEC

E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S (配列番号 1 2) 。

【 0 0 9 1 】

たとえば、NP__751915のアミノ酸配列は、以下である(1~23残基にシグナルペプチドを有する)：M V L G T I D L C S C F S A G L P K T E A N W V N V I S D L K K I E D L I Q S M H I D A T L Y T E S D V H P S C K V T A M K C F L L E L Q V I S L E S G D A S I H D T V E N L I I L A N N S L S S N G N V T E S G C K E C E E L E E K N I K E F L Q S F V H I V Q M F I N T S (配列番号 1 3) 。

【 0 0 9 2 】

IL-15の検出には、全長IL-15の検出、ならびに、自然に発生する断片、または生体試料中に存在する他のIL-15代謝産物の検出、および、生体試料の処理により生成された断片または他の誘導体の検出が包含される(ただし、そのような断片、代謝産物、または誘導体の検出が、IL-15の検出に特異的である場合に限る)。IL-15断片は通常、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、または70アミノ酸が、それ以上の長さである。IL-15の検出はまた、IL-15をコードする核酸(たとえば、E3をコードするRNA、またはそのようなIL-15をコードするRNAから、たとえばRT-PCRを用いて作製されたDNA)の検出により行われても良い。IL-15の検出には、IL-15、または生体試料中に存在するその断片の直接的な検出、または間接的な検出(たとえば、抗IL-15抗体等の抗IL-15結合パートナーの結合の検出による)が含まれる。

【 0 0 9 3 】

ある特定の実施形態において、IL-15の検出(たとえば、血清IL-15検出)には、IL-15に対する抗IL-15抗体の結合が含まれる。これらの実施形態においては、IL-15に対する、検出可能な標識抗IL-15抗体の結合が含まれ、それによって、IL-15の検出には、IL-15に結合した抗IL-15抗体の検出可能な標識を検出することが含まれる。これらの実施形態の他の態様においては、IL-15に抗IL-15抗体が結合し、次いで、検出可能な標識第二抗体の抗IL-15抗体への結合が含まれてもよく、それにより、IL-15の検出には、第二抗体の検出可能な標識の検出が含まれる。抗IL-15抗体は、IL-15に特異的に結合する任意の抗体であっても良い。ある特定の態様において、抗IL-15抗体は、市販されている抗IL-15抗体である(たとえば、Abcam(登録商標)、Abnova、Abgent、Santa Cruz Biotechnology(登録商標)、United States Biological、ProSci、R&D Systems(登録商標)、Fitzgerald、Lifespan Biosciences、Meso Scale Discovery(登録商標)から入手可能なモノクローナル抗IL-15抗体もしくはポリクローナル抗IL-15抗体、または、任意の他の市販抗体)。ある特定の態様において、抗IL-15抗体は、キットの一部として市販されており、たとえば、液相、または、固相(たとえば、ELISA)ベースの、IL-15単独、または、任意の他の目的のバイオマーカー(たとえば、エオタキシン1(E1)、エオタキシン3(E3)、マクロファージ由来ケモカイン(MDC)、アルカリホスファターゼ(AP)、またはそれらの任意の組み合わせ)と組み合わせた検出のためのキットがある。

【 0 0 9 4 】

ある特定の態様において、対象の試料中に存在するIL-15は、表面に間接的に、または直接的に固定され、次いで、検出可能な標識一次抗IL-15抗体とIL-15の結合、または、非標識一次抗体によるIL-15の結合と、次いで、検出可能な標識二次抗体による結合が行われる。表面へのIL-15の固定化のために、任意の適切な方法を用いてもよい。ある特定の態様においては、表面に付着された抗IL-15「捕捉」抗体が、対象の試料中に存在するIL-15に結合し、それによって、IL-15が表面上に間接的に固定される。他の態様においては、表面に付着されたIL-15に特異的な受容体が、対象の試料中に存在するIL-15に結合し、それにより、IL-15が表面上に間

10

20

30

40

50

接的に固定される。固定されると、続いて、IL-15は、任意の簡便な方法（たとえば、検出可能な標識抗IL-15一次抗体、または非標識抗IL-15一次抗体と当該一次抗体に結合する検出可能な標識二次抗体を用いた、固相抗体ベースの検出）を用いて、検出されてもよい。

【0095】

アルカリホスファターゼ（AP）

「アルカリホスファターゼ」（または、「AP」もしくは「ALP」）は、ヒト身体全体にわたり、全ての組織に存在している（ただし、特に、肝臓、胆管、腎臓、骨、および胎盤に集中している）酵素を指す。ヒトは、以下のアルカリホスファターゼアイソザイムを含有している：ALPI（腸管に存在するアイソザイム）；ALPL（主に肝臓、骨、および腎臓に存在する、組織非特異的なアイソザイム）；および、ALPP（主に胎盤に存在するアイソザイム）。

10

【0096】

AP検出には、生体試料中に存在するAP、もしくはその断片の直接検出、または、間接的検出（たとえば、試料中のAP酵素活性を検出することによる、または、抗AP抗体等の抗AP結合パートナーの結合による）が含まれる。生体試料が血液試料（たとえば、全血、血液分画（たとえば、血清、血漿））である場合、たとえば、市販の分析方法および試薬を用いたAPの酵素活性の分析によるAPレベルの検出が特に対象となる。

【0097】

APの直接検出には、全長APの検出、ならびに、自然に発生する断片、または生体試料中に存在する他のAP代謝産物の検出、および、生体試料の処理により生成された断片または他の誘導体の検出が包含される（ただし、そのような断片、代謝産物、または誘導体の検出が、APの検出に特異的である場合に限る）。AP断片は通常、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、または60アミノ酸か、それ以上の長さである。APの検出はまた、APをコードする核酸（たとえば、APをコードするRNA、またはそのようなAPをコードするRNAから、たとえば逆転写PCR（RT-PCR）を用いて作製されたDNA）の検出により行われても良い。

20

【0098】

ある特定の実施形態において、APの検出（たとえば、血清AP検出）には、APに対する抗AP抗体の結合が含まれる。これらの実施形態の態様においては、APに対する、検出可能な標識抗AP抗体の結合が含まれ、それによって、APの検出には、APに結合した抗AP抗体の検出可能な標識を検出することが含まれる。これらの実施形態の他の態様においては、APに抗AP抗体が結合し、次いで、検出可能な標識第二抗体の抗AP抗体への結合が含まれてもよく、それにより、APの検出には、第二抗体の検出可能な標識の検出が含まれる。抗AP抗体は、APに特異的に結合する任意の抗体であっても良い。ある特定の態様によれば、抗AP抗体は、市販されている抗AP抗体である（たとえば、Abcam（登録商標）、Abnova、Abgent、Santa Cruz Biotechnology（登録商標）、ProSci、Fitzgerald、Lifespan Biosciences、Meso Scale Discovery（登録商標）から入手可能なモノクローナル抗AP抗体もしくはポリクローナル抗AP抗体、または、任意の他の市販抗体）。ある特定の態様において、抗AP抗体は、キットの一部として市販されており、たとえば、液相、または、固相（たとえば、ELISA）ベースの、AP単独、または、任意の他の目的のバイオマーカー（たとえば、エオタキシン1（E1）、エオタキシン3（E3）、マクロファージ由来ケモカイン（MDC）、インターロイキン15（IL-15）、またはそれらの任意の組み合わせ）と組み合わせた検出のためのキットがある。

30

40

【0099】

ある特定の態様において、APの検出には、表面へのAPの固定、次いで、検出可能な標識一次抗AP抗体とAPの結合、または、非標識一次抗体によるAPの結合と、次いで、検出可能な標識二次抗体による結合が含まれる。表面へのAPの直接的、または間接的

50

な固定化のために、任意の適切な方法を用いてもよい。ある特定の態様においては、表面に付着されたA P「捕捉」抗体が、対象の試料中に存在するA Pに結合し、それによって、A Pが表面上に間接的に固定される。他の態様においては、表面に付着されたA Pに特異的な受容体が、対象の試料中に存在するA Pに結合し、それにより、A Pが表面上に間接的に固定される。固定されると、続いて、A Pは、任意の簡便な方法（たとえば、検出可能な標識抗A P一次抗体、または非標識抗A P一次抗体と当該一次抗体に結合する検出可能な標識二次抗体を用いた、固相抗体ベースの検出）を用いて、検出されてもよい。

【0100】

ある特定の実施形態において、A Pの検出は、A Pの酵素活性の検出に基づいている。たとえば、対象の生物学的液体中に、または組織中に存在するA Pのホスファターゼ活性は、適切なA P基質（たとえば、p - ニトロフェニルホスフェート、または他の適切な基質）とA Pを接触させ、次いで、基質のA P介在性脱リン酸化から生じた検出可能な変化（たとえば、用いられたアッセイが比色アッセイである場合には、色相変化）を検出/定量することにより、分析されてもよい。

10

【0101】

対象

本開示方法を用いて、任意の適切な対象における、肝臓疾患（たとえば、炎症性肝臓疾患（たとえば、A I H、P B C、およびP S Cのうちの1以上））の診断を容易に行うことができる。ある特定の態様において、対象は、炎症性肝臓疾患を有している、または、炎症性肝臓疾患を有すると推測されている、または炎症性肝臓疾患を有するリスクがあり、A I H、P B C、およびP S Cのうちの1以上の肝疾患を有する、または有すると推測されている、または有するリスクがある対象が含まれる。そのような対象としては、療法を受けている患者（たとえば、疑わしい炎症性肝臓疾患を治療するための療法、または診断された炎症性肝疾患を治療するための療法、または、炎症性肝疾患（たとえば、A I H、P B C、およびP S Cのうちの1以上の肝疾患）のリスクがある対象を判別する療法を受けている患者）が含まれる。

20

【0102】

ある特定の実施形態において、本発明方法を用いて検証される対象には、肝疾患（たとえば、炎症性肝疾患）の症状を1以上示す、または示している個人が含まれ、および、A I H、P B CおよびP S Cのうちの1以上に関連した症状（A I H、P B CおよびP S Cのうちの1以上の重複症候群の症状を含む）を示す、または示している個人が含まれる。そのような症状の例としては、たとえば、疲労、右上腹部（R U Q）の腹痛、吐き気、掻痒、黄疸および/または、肝酵素の任意の異常レベル等の肝疾患の任意の症状の指標が挙げられる。

30

【0103】

A I H、P B CおよびP S Cのうちの1以上の肝疾患のリスクがある対象としては、I B Dを有する者、または、I B D、自己免疫性疾患、A I H、P B Cおよび/またはP S Cの家族歴を有するものが挙げられる。

【0104】

対象は、男性または女性であっても良く、および、肝疾患のいずれかの前症歴があってもなくても良い。いくつかの例において、対象は、ウイルス性肝炎（たとえば、H C V）を有していても、有していなくても良く、または、ウイルス性肝炎（たとえば、H C V）を有すると推測されていてもよい。一部の例において、対象は、病原体誘導性肝炎に対して、陰性の診断（たとえば、ウイルス性肝炎（たとえば、A、B、C、DまたはE型肝炎；E p s t e i n - B a r r ウイルス（E B V）、サイトメガロウイルス（C M V）による感染により生じる肝炎）に対して、陰性の診断）、アルコール性肝疾患に対して陰性の診断、および/または、薬物性肝疾患に対して陰性の診断を有するものである。

40

【0105】

ある特定の態様において、本発明方法を用いて、肝疾患を有すると推測されていない対象における、肝疾患（たとえば、A I H、P B CおよびP S Cのうちの1以上当の炎症性

50

肝疾患)の診断が行われる。たとえば、本発明方法を用いて、肝疾患の明らかな臨床症状を示していない対象(たとえば、明らかに健常な対象)における、肝疾患の診断が行われても良い。そのような対象は、病的状態をまったく示していても良い(たとえば、標準的なメディカルスクリーニング(または「検査」)を受けている対象)。したがって、ある特定の態様において、本発明方法には、対象が肝疾患の外観上の兆候を示す前に、肝疾患を有する対象を診断する用途が見出される。他の態様において、本発明方法は、詳細不明な病的状態(たとえば、多くの病因に起因しうる病的状態であり、肝疾患はそのような病因のうちのたった1つに過ぎない場合等)を表す対象において、肝疾患を診断するために用いられる。

【0106】

生体試料

本発明方法の使用に適した生体試料には、生体液(たとえば、血液試料(たとえば、全血、血液分画(たとえば、血清、血漿)))および他の生物学的起源の液体試料、ならびに、たとえば肝生検試料等の固形組織試料が含まれる。生体試料が血液試料である場合、当該血液試料は、採血されたばかりの血液、または保存血液(たとえば、血液バンクで保存)から得られたものであり得る。生体試料は、明確に本発明方法の分析のために得られた血液試料であっても良く、または、本発明方法の分析のために副次的に採取された、他の目的のために得られた血液試料であっても良い。

【0107】

ある特定の態様において、生体試料は、組織切片(たとえば、肝生検切片または、他の対象の切片)であり、E3、E1、MDC、IL-15およびAPのうちの1以上が、免疫組織学的(たとえば、免疫蛍光)染色において、またはバイオマーカー*in situ*酵素活性(たとえば、APのホスファターゼ活性)に基づいて、検出される。他の態様において、生体試料は、対象のバイオマーカー(複数含む)が検出される、組織ホモジネートである。

【0108】

試料は、たとえば、分析される被分析物(複数含む)に対する、試薬での処置、可溶性、および/または、ある成分の富化等、採取後に処理を受けていても良い。試料は、必要に応じて、適切な緩衝溶液での希釈により前処理がなされていてもよく、所望であれば、濃縮され、または、限定されないが、超遠心、高速液体クロマトグラフィー(FPLC)による分画化、または沈殿を含む、様々な方法により分画化されても良い。様々な緩衝剤(たとえば、リン酸塩、トリス等)のうちの1つを用いた、生理学的なpHにある、任意の多くの標準的な水性緩衝溶液を用いても良い。一般的に、単離された後、試料(たとえば、血液試料)は、分析されるまで、-80 で保存される。

【0109】

アッセイフォーマットおよび検出法

本発明方法と関連した分析のためのバイオマーカー(たとえば、E3、E1、MDC、IL-15および/またはAP)は、と特に関連深い定量分析および半定量分析に適切な方法で、様々な方法を用いて検出されても良い。分析は、検証されるバイオマーカーの形態に従い、選択されても良い(たとえば、核酸に対するポリペプチド等)。検出法の例としては、限定されないが、特定の結合パートナー(たとえば、抗体)への結合による、バイオマーカーポリペプチドの検出方法(たとえば、ELISA(たとえば、非マルチプレックス、マルチプレックス(たとえば、LUMINEX(登録商標)、MESO DISCOVERY(登録商標)))、フローサイトメトリー等)、質量分光法、質量分光光度法、HPLC、ガスクロマトグラフィー、サイトカイン/ケモカインアレイ(たとえば、核酸またはサイトカイン/ケモカイン結合パートナーを用いる)、NMR、TMAアッセイ、および、RNAの逆転写、核酸増幅(たとえば、PCR, 定量リアルタイムPCR, 核酸マイクロアレイ等)を包含する様々なアッセイが挙げられる。

【0110】

以下は、本発明方法における使用のための、物質およびアッセイフォーマットの例であ

10

20

30

40

50

る。

【0111】

バイオマーカー結合試薬を用いた、ポリペプチド検出の方法

本発明方法は、本発明方法は、バイオマーカーポリペプチド（たとえば、抗バイオマーカー抗体）に結合する結合試薬；バイオマーカーポリペプチドに対する受容体のリガンド結合部分を含有する結合試薬等を用いて実施されても良い。抗体が用いられる場合、そのような方法は通常、イムノアッセイと呼称され、様々な異なるフォーマットで実施することができ、その一部を以下の実施例に提示する。

【0112】

当業者であれば、任意の適切な結合試薬を本発明のバイオマーカーポリペプチドの検出方法に用いることが出来ることを認識するであろう。たとえば、バイオマーカーポリペプチドに対する受容体、または受容体の少なくともリガンド結合部分を含有する結合試薬を、イムノアッセイにおいて抗体の代わりに用いることができる。バイオマーカーに対する受容体および受容体のリガンド結合部分は入手可能であり、当分野に公知である。たとえば、E1に結合する受容体としては、CCR1、CCR2、CCR3、およびCCR5が挙げられ；E3に結合する受容体としては、CCR1、CCR2、CCR5、およびCX3CR1が挙げられ；MDCはCCR4受容体に結合し；ならびに、IL-15はIL-15受容体（たとえば、IL-15R）に結合する。バイオマーカーポリペプチド検出方法は、抗体および「イムノアッセイ」を参照して本明細書において記述されうるが、しかし、そのような参照は単に簡潔性と明確性の目的のためのみであり、限定の意図は無い。

10

20

【0113】

任意の適切な結合パートナーを、当分野で利用可能な免疫学的方法における抗体の代わりに用いることができることを認識されたい（ただし、アッセイデザインが、バイオマーカーの検出の所望される特異度を適切に保持している場合に限る）。たとえば、受容体、またはそのリガンド結合部分の形態での結合パートナーは、捕捉試薬として用いることができる。そのような実施形態において、結合パートナーに対するバイオマーカーの結合は、たとえば、結合パートナー-バイオマーカー複合体の検出に対して、バイオマーカーに特異的な抗体を用いて検出することができる。他の例において、受容体またはそのリガンド結合部分の形態の結合パートナーは、たとえば、特異的な抗バイオマーカー抗体/バイオマーカー複合体と複合したバイオマーカーを検出するための検出試薬として用いることができる。

30

【0114】

バイオマーカーポリペプチドおよび結合試薬の使用を含むアッセイは通常、患者から得た生体試料中の、結合試薬（たとえば、抗バイオマーカー抗体（たとえば、それぞれの標的抗原に特異的に結合する、抗E3、抗E1、抗MDC、抗IL-15および/またはAP抗体））と、その標的バイオマーカーポリペプチド（たとえば、それぞれ、E3、E1、MDC、IL-15およびAP）の間の結合の検出を含む。

【0115】

本発明方法に従う、本開示方法における使用に適した抗体としては、バイオマーカーの任意の適切な領域に結合するものが挙げられる。バイオマーカー検出方法に有用な抗体は、ポリクローナル抗体、またはモノクローナル抗体であっても良い。たとえば、アッセイは、捕捉試薬としてポリクローナル抗体を、そして、検出試薬としてモノクローナル抗体を用いることができる（逆もまた然りである）。抗体は、任意の起源のものであっても良く（たとえば、哺乳類（マウス、ヤギ、ラット等）、非哺乳類（たとえば、ニワトリ等の鳥類））および、任意の方法または方法の組み合わせ（たとえば、宿主（たとえば、非ヒト動物）の免疫化、ポリクローナル血清としての単離、ハイブリドーマ発現モノクローナル抗体、組換え産生等）により産生されてもよい。

40

【0116】

アッセイは、任意の様々なフォーマットで行うことができ、および、定量的に、または

50

半定量的に行われても良い。通常、アッセイは、バイオマーカー結合試薬（たとえば、抗バイオマーカー抗体）と患者試料の間の特異的結合を、抗バイオマーカー結合試薬（たとえば、抗体）と当該バイオマーカーの複合体の存在の有無を検出することにより、測定する。免疫学的方法の例としては、たとえば、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、放射性免疫分析（RIA）等が挙げられる。そのような免疫学的方法は、バイオマーカー受容体の少なくともリガンド結合部分を含有するポリペプチドとの使用に、容易に適合させることができる。

【0117】

アッセイは、テスト試料からのタンパク質、または抗バイオマーカー結合試薬（たとえば、抗バイオマーカー抗体）のいずれかを、不溶性の支持体の表面上に最初に固定することにより行われても良い。適切な支持体は当分野に公知であり、たとえば、免疫アフィニティカラム物質、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、磁性ビーズ、コロイド金属粒子、ガラスおよび/またはシリコンチップならびに表面、ニトロセルロースストリップ、ナイロン膜、アッセイプレート（たとえば、マルチウェルプレート）のウェル、テストストリップ、プラスチックチューブ等が挙げられる。不溶性支持体は、様々な物質（たとえば、ガラス、ポリスチレン、塩化ポリビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然型セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、ならびにアガロース等を含む）のうちの任意のものを含んでも良い。

【0118】

支持体への結合は、当該表面の性質に依存して、直接的に、または間接的にのいずれかで、任意の適切な手段により行われても良く、および、共有結合または非共有結合（たとえば、イオン性、疎水性および/または共有結合性相互作用による結合）のいずれかで合っても良い。結合の特定の様式は、試薬および検出方法全体との適合性がある限りは、重要ではない。抗バイオマーカー結合試薬（たとえば、抗体）が支持体に結合され、アッセイが、1つの試薬混合物において、試料中の2以上のバイオマーカーを検出するものである場合、異なる位置にあるバイオマーカー結合試薬（たとえば抗原-抗体）複合体の存在の有無が、試料中の対応するバイオマーカーの存在の有無と相関することができるように、支持体上の個別の離れた位置に対して検出されるよう、異なるバイオマーカーに対する結合試薬（たとえば、抗バイオマーカー抗体）に結合することが望ましい。2以上のバイオマーカーが1つの反応混合物中の同じ試料から検出されるアッセイは、多くの場合、「マルチプレックスアッセイ」と呼称される。

【0119】

不溶性の支持体は、可溶性物質から容易に分離され、また、試料中のバイオマーカーを検出する方法全体との適合性を有する、任意の適切な物質のものであっても良い。そのような支持体の表面は、固形または多孔性であっても良く、および、任意の適当な形状のものであっても良い。受容体が結合する適切な不溶性の支持体の例としては、ビーズ（たとえば、磁性ビーズ）、ラテックス粒子、膜およびマイクロタイターウェル表面が挙げられる。

【0120】

アッセイ支持体に、試料またはその分画を接触させる前に、ポリペプチドまたは抗体により満たされることのない支持体上の部位への、試料または他の反応混合物成分の非特異的結合を減少させるために、不溶性支持体の非特異的結合部位をブロックすることが望ましい。ブロッキング剤の例としては、たとえばウシ血清アルブミン、カゼイン（または他のミルクタンパク質）、ゼラチン等の非干渉性のタンパク質が挙げられる。あるいは、たとえば、Tween、NP40、TX100等の、非干渉濃度のいくつかの界面活性剤を用いても良い。

【0121】

試料、その分画物または分注物を、別々の支持体に添加しても良く、または、抗バイオマーカー抗体が結合する位置が別々で、離れて分析することが可能な1つの支持体（たと

10

20

30

40

50

えば、アレイにおいて)へと添加しても良い。分析には、既知量の1以上のバイオマーカーを含有する、別々に分析された試料等である、一連の適切な標準物(たとえば、内部対照(内部対照は、対照から得た生体試料中に存在しても良く、または、既知量の対照を含有するために混合されてもよい)として用いることができるバイオマーカー検出のための試薬等)を含んでも良い。対照は、陽性対照であっても、陰性対照であってもよい。所望の場合、それぞれに対する平均値が得られるように、複数の試料および対照を分析しても良い。

【0122】

固定検証試料(または、固定抗バイオマーカー結合試薬)を有する支持体は、抗バイオマーカー結合試薬と(または、支持体が固定抗バイオマーカー結合試薬を有する場合には、検証試料と)、特有のバイオマーカー結合試薬複合体(たとえば、抗原抗体複合体)の形成に十分な時間、インキュベートされる。インキュベートの後、不溶性の支持体は、非結合成分を洗い流してもよい。たとえば、支持体は、適切なpH(通常、7~8)で、希釈非イオン性洗剤メディウムを用いて洗浄されても良い。所望の場合には、非特異的結合タンパク質の除去が、受容可能なレベルになるまで、洗浄を繰り返しても良い。

【0123】

洗浄の後、特定のバイオマーカー結合試薬(たとえば、抗原抗体複合体(「特定の免疫複合体」または「特定のイムノ複合体」とも呼称される))の存在の有無を検出する。検証試料が支持体に固定されている場合、特定の複合体の存在の有無は、たとえば、抗バイオマーカー結合試薬の検出可能な標識の検出により、直接検出される。結合試薬が、検出可能な程度に標識されておらず、および、アッセイに固定検証試料が含まれる場合、特定の複合体は、検出試薬(たとえば、固定検証タンパク質(たとえば、二次抗体(すなわち、抗抗体))に結合した抗体を検出するための、抗体特異的検出試薬)を含有する溶液と試料を接触させることにより検出することができる。検出試薬は、十分な特異度で結合試薬(たとえば、抗体)に結合する任意の化合物であってもよく、それにより、固定結合試薬は、他に存在する成分から識別される。たとえば、検出試薬は、抗バイオマーカー結合試薬(たとえば、バイオマーカー受容体、抗体)に対して特異的な抗体であっても良い。検出試薬が抗体である場合、当該抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル血清(たとえば、ヤギ抗マウス抗体、ウサギ抗マウス抗体等)であっても良い。

【0124】

検出試薬を標識して、直接的な、または間接的な結合検出を容易にすることができる。適切な検出可能な標識としては、分光法、光化学的方法、生化学的方法、免疫化学的方法、電気的方法、光学的方法または化学的方法により検出可能な任意の組成物が挙げられる。例としては、限定されないが、磁性ビーズ、蛍光色素(たとえば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質等)、放射性標識(たとえば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または、 ^{32}P)、酵素(たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、およびその他、酵素結合免疫吸着分析法(ELISA)において通常用いられているもの)、および、たとえば金コロイドまたは着色ガラスまたはプラスチック(たとえば、マルチスチレン、マルチプロピレン、ラテックス等)ビーズ等の非色分析用標識が挙げられる。結合の間接的な測定を可能とする標識の例としては、基質が、着色された産物、または蛍光産物をもたらす酵素が挙げられる。たとえば、検出試薬は、適切な基質の添加の後に、検出可能な産物シグナルを発することができる、共有結合された酵素で標識された抗体であっても良い。複合体における使用に適した酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、リンゴ酸脱水素酵素等が挙げられる。市販されていない場合は、そのような抗体-酵素複合体は、当分野公知の技術により容易に作製することができる。

【0125】

あるいは、検出試薬は、標識されていなくても良い。この場合、第一の検出試薬に特異的な、標識された第二の検出試薬が用いられ、当該第二の検出試薬は、上述の方法のい

10

20

30

40

50

れかで標識することができる。複数の化合物が、結合された第二の受容体の各分子に結合するように、そのような化合物が選択されても良い。第二の検出試薬 / 第一の検出試薬の特異的なペアの例としては、抗体 / 抗抗体および、アビジン（またはストレプトアビジン） / ビオチンが挙げられる。得られたシグナルは増幅されるため、本技術は、少量のバイオマーカーのみが存在する可能性がある場合、または、バックグラウンドの数値（たとえば、非特異的結合）が受容できないほどに高い場合に、特に用途がある。実施例は、第一の検出試薬に特異的な標識抗体を用いている。

【0126】

抗バイオマーカー結合試薬（たとえば、抗体）が支持体に固定されている場合、特定の複合体の形成は、特定のバイオマーカー結合試薬複合体の存在の有無を検出するための抗体を用いて行うことができる。検出抗体は、固定された抗体と同じであっても、異なっても良い（ただし、検出抗体が結合するエピトープが、固定抗バイオマーカー結合試薬との複合体中にバイオマーカーがある場合に、検出抗体の結合に利用可能である場合に限る）。上述のように、検出抗体は、標識されていても、標識されていなくてもよく、および、固定抗バイオマーカー結合試薬 バイオマーカー - 検出抗体の特定の複合体の形成は、直接的に（たとえば、検出抗体上の検出可能な標識により）、または間接的に（たとえば、複合体中の検出抗体を検出する第三の試薬の使用により）、検出されても良い。

【0127】

特定の複合体の結合が可能となるのに十分な時間、試薬とインキュベートした後、非特異的に結合した検出試薬（複数含む）を減少させるため、不溶性の支持体を、再度、洗浄しても良い。洗浄の後、固定複合体により産生されたシグナルを、当該アッセイのフォーマットに適合している任意の適切な手段により検出する。たとえば、酵素複合体を用いている場合、検出可能な産物を形成させるために、適切な酵素基質を投入する。たとえば、酵素複合体中のペルオキシダーゼが検出物中に含まれている場合、基質は通常、過酸化水素と *o*-フェニレンジアミンの組み合わせであり、それらにより、適切な反応条件下で、着色された産物が生じる。他の酵素複合体（たとえば、上述のもの）に対する適切な基質は当分野の当業者に公知である。適切な反応条件、ならびに、様々な有用複合体またはその産物の検出のための手段もまた、当分野の当業者に公知である。

【0128】

抗バイオマーカー結合試薬（たとえば、抗体）の結合の有無は、用いられている検出可能な標識と適合性のある様々な方法により測定されても良い（たとえば、顕微鏡、ラジオグラフィ、シンチレーション計測等）。一般的に、特定の結合試薬 - バイオマーカー複合体のレベルは、1以上の対照試料のレベルと比較され、結果を評価して、診断を行う。対照試料を並行して処理し、比較目的のための標準値として提示される、対照レベル、または、対照レベル中の特定の複合体のレベルを提示する。

【0129】

本明細書に記述されるアッセイは、様々な形態で行われても良い。例示的な形態としては、限定されないが、競合結合アッセイ（抗バイオマーカー結合試薬（たとえば、抗体）との結合が競合する、競合タンパク質が異なる量で存在する中で、複合体の形成が行われる）が挙げられる。競合分子が標識され、前述のように検出されてもよく、競合結合の減少は、試料中に存在するバイオマーカーのレベルに比例する。

【0130】

検出アッセイは、溶液中で行われても良い。たとえば、抗バイオマーカー結合試薬（複数含む）は、検証試料（たとえば、血清または他の任意の目的の検証試料）と混合され、抗バイオマーカー抗体（複数含む）およびバイオマーカー（複数含む）の免疫複合体が検出されても良い。

【0131】

質量分光法

本発明の方法は、他の検出技術により行われても良い。たとえば、質量分光アッセイを、生体試料中のバイオマーカー（複数含む）の検出に適用させても良い。質量分光法に基

10

20

30

40

50

づいた方法は、バイオマーカの質量における差異を活用し、検出を容易にするものである。質量分光法は、免疫アッセイと組み合わせても良く、たとえば、最初に特異的なバイオマーカ抗体免疫複合体を形成させ、質量分光法により特異的免疫複合体の有無を検出する。たとえば、抗バイオマーカ抗体を用いて、目的のバイオマーカ（たとえば、E3、E1、MDC、および/または、IL-15）を捕捉しても良い。抗バイオマーカ抗体は、たとえば、ビーズ、プレート、膜またはチップ等の支持体に固定されても良い。固定されなかった物質を洗い流した後、捕捉されたバイオマーカを、質量分光法により検出しても良い。質量分光法の例としては、飛行時間、磁気セクタ、四重極型フィルター、イオントラップ、イオンサイクロトロン共鳴、静電セクタ分析器、およびこれらの組み合わせがある。

10

【0132】

質量分光法データの分析は、入手可能な方法により行うことができる。たとえば、飛行時間質量分光法による非分析物の分析により、飛行時間(TOF)スペクトルが生成される。通常通りに最終的に分析されたTOFスペクトルは、試料に対するイオン化エネルギーの単一パルス由来のシグナルを示さず、むしろ、多くのパルスからのシグナルの総計を示す。これによりノイズが減少し、ダイナミックレンジが増加する。このTOFデータを、ついで、データ処理に供してもよい。たとえば、CiphergenのPROTEINCHIP(登録商標)のソフトウェアにおいて、データ処理は通常、質量スペクトルを生成するためのTOF-to-M/Zの変換、機器補正値を排除するためのベースラインの差引、および、高周波ノイズを減少させるための高周波ノイズフィルタリングを含む。

20

【0133】

質量分光法により生成されたデータは、プログラム制御されたコンピューターを使用して分析されても良い。コンピュータープログラムにより、検出されたバイオマーカの数、シグナルの強度(バイオマーカ量の指標)、および検出された各バイオマーカに対する決定分子量を示すためのデータ分析プログラムが実行される。データ分析には、バイオマーカのシグナル強度を測定するステップ、および、前もって測定された統計的分布から逸脱しているデータを除去するステップが含まれ得る。たとえば、観察されたピークは、いくつかの基準に対して、各ピークの高さを算出することにより、正規化されても良い。

【0134】

コンピューターは、得られたデータを、表示のために様々なフォーマットへと転換させることができる。標準的なスペクトルを表示させても良いが、1つの便利なフォーマットでは、ピークの高さおよび質量の情報のみをスペクトルビューに留めることにより、綺麗な画像が得られ、ほとんど同一の分子量を有するバイオマーカがより見やすくなる。他の便利なフォーマットでは2以上のスペクトルが比較され、一意のバイオマーカ、および試料間で上方制御または下方制御されているバイオマーカが便宜的に強調されている。これらのフォーマットのうちの任意のものを用いることにより、特定のバイオマーカが試料中に存在しているか否かを容易に決定することができる。

30

【0135】

一般的に、分析には、被分析物からのシグナルを表すスペクトル中のピークの特定が含まれる。ピーク選択は視覚的に行われても良いが、CiphergenのPROTEINCHIP(登録商標)ソフトウェアパッケージの一部としてソフトウェアが利用可能であり、ピークの検出が自動的になされる。概して、このソフトウェアは、選択された閾値より上にあるシグナルとノイズの比率を有するシグナルを特定し、ピークシグナルの重心でのピーク質量を標識することにより機能する。このソフトウェアの1つのバージョンでは、既定質量範囲内にある様々なスペクトル中に現れる全てのピークをクラスター化し、質量(M/Z)クラスターの中間点に近いすべてのピークに対して質量(M/Z)を割り与える。

40

【0136】

データを分析するために用いられるソフトウェアは、シグナルが、本発明によるバイオ

50

マーカーに対応するシグナルのピークを表しているかどうかを決定するために、アルゴリズムをシグナル分析に適用するコードを含んでも良い。また、ソフトウェアは、観察されたバイオマーカーのピークに関するデータを分類ツリーまたはANN分析に供し、検査中の特定の臨床パラメーターの状態を示すバイオマーカーのピークまたはバイオマーカーのピークの組み合わせが存在しているか否かを決定することができる。データの分析は、得られた様々なパラメーターに対し、直接的または間接的のいずれかで、試料の質量分光分析から「適合化」されていても良い。これらのパラメーターとしては、限定されないが、1以上のピークの存在の有無、ピークまたはピーク群の形状、1以上のピークの高さ、1以上のピークの高さのログ(対数)、および他の、ピーク高データの計算操作が挙げられる。

10

【0137】

バイオマーカーをコードする核酸の検出

バイオマーカーの検出はまた、バイオマーカーをコードする核酸の検出を行い、バイオマーカーの発現レベルを評価することにより行われても良い。対象の標的配列の発現レベルの検出方法は当分野に公知であり、E1、E3、MDC、IL-15および/またはAPの検出發現レベルに、本発明方法に容易に適用することができる。

【0138】

たとえば、生体試料から単離されたmRNAをハイブリダイゼーションアッセイまたは増幅アッセイ(限定されないが、サザン分析、またはノーザン分析、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)分析およびプローブアレイを含む)において用いることができる。mRNAレベルの検出の1つの方法としては、単離されたmRNAを、バイオマーカーをコードする核酸にハイブリダイズすることができる核酸分子(たとえば、そのようなmRNAからPCR増幅することにより作製されたmRNAまたはDNA)と接触させることが含まれる。核酸プローブはたとえば、全長cDNAまたはその一部であっても良く、たとえば、少なくとも7、15、30、50、100、250または500ヌクレオチドの長さであり、ストリンジェントな条件下で、バイオマーカーをコードする核酸に十分に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドである。

20

【0139】

1つの実施形態において、生体試料由来のmRNAは、固体表面に固定され、プローブに接触される。別の実施形態において、プローブ(複数含む)は固体表面に固定され、生体試料から単離されたmRNAが、当該プローブ(複数含む)と接触する(たとえば、アレイフォーマット等)。

30

【0140】

試料中のバイオマーカーの発現レベルの検出方法には、任意の適切な核酸増幅法(たとえば、RT-PCR、リガーゼ鎖反応、または他の任意の核酸増幅法)が含まれても良く、次いで、当分野の当業者公知の技術を用いて増幅した分子の検出が行われる。1つの例において、バイオマーカーの発現は、定量的蛍光性RT-PCR(たとえば、TaqMan(登録商標)を用いる)により評価される。そのような方法では通常、バイオマーカーをコードする核酸に特異的なオリゴヌクレオチド対が用いられる。公知の配列に特異的なオリゴヌクレオチド対を設計する方法は当分野に公知である。

40

【0141】

マイクロアレイを用いて、バイオマーカーの発現を検出してもよい。そのような実施形態において、固定された捕捉プローブを有するマイクロアレイが、アドレス可能な位置でアレイ表面に提示される。生体試料由来のRNA(または、RNAの増幅により作製されたDNA)は、アレイ上の相補的なプローブにハイブリダイズし、ハイブリダイズされた複合体が検出される。アレイ上の各プローブに対するハイブリダイゼーションの強度が測定され、相対遺伝子発現レベルを表す値へと転換されても良い。

【0142】

組成物

本発明により、たとえば本発明方法の実施における使用の用途が見出される組成物が提

50

示される。ある特定の態様において、組成物には、対照のバイオマーカーを検出するための剤（たとえば、E3、E1、MDC、IL-15またはAP検出剤）が含まれる。E3に関しては、たとえば、検出剤は、対照の試料中のE3検出に有用な任意の剤であっても良く、限定されないが、抗E3抗体、（たとえば、定量的PCRアッセイにおいて）E3をコードする核酸を増幅させるためのプライマー対、E3にハイブリダイズする検出可能な剤（たとえば、プローブ）等が挙げられる。ある特定の態様において、組成物には、対象の生体試料から抽出された核酸（たとえば、肝生検試料、末梢血単核細胞（PBMC）、末梢血リンパ球（PBL）、全血試料、血清または血漿からの核酸抽出物）が含まれる。そのような組成物には、たとえば、PCRアッセイ（たとえば、qPCRアッセイ）、転写調節増幅（TMA）アッセイ、または他の簡便な核酸増幅を基にしたバイオマーカー検出アッセイ、ならびに、液相または固相核酸ハイブリダイゼーションアッセイ（たとえば、核酸アレイを用いて）等の核酸増幅における用途が見いだされる。E3検出剤に加え、本発明の組成物には、対象の1以上の追加のバイオマーカーの検出に有用な1以上の検出剤が含まれ得る。そのような追加の検出剤に、限定されないが、エオタキシン1（E1）、マクロファージ由来ケモカイン（MDC）、インターロイキン15（IL-15）、アルカリホスファターゼ（AP）またはそれらの任意の組み合わせの検出のための1以上の剤（たとえば、抗体またはプライマー対）が含まれ得る。たとえば、組成物は、E3検出剤およびE1検出剤；または、E3検出剤、E1検出剤およびMDC検出剤；または、E3検出剤、E1検出剤、MDC検出剤およびIL-15検出剤；または、E3検出剤、E1検出剤、MDC検出剤、IL-15検出剤およびAP検出剤が含まれ得る。

10

20

【0143】

ある特定の実施形態によれば、組成物は、任意選択的に、E3検出剤；または、E3検出剤およびE1検出剤；または、E3検出剤、E1検出剤およびMDC検出剤；または、E3検出剤、E1検出剤、MDC検出剤およびIL-15検出剤；または、E3検出剤、E1検出剤、MDC検出剤、IL-15検出剤およびAP検出剤に加えて、バイオマーカーシグナルの定量を促進および制御するために、対照（たとえば、ハウスキーピング）タンパク質または核酸のための検出剤以外のいかなる検出剤をも含まない。

【0144】

本発明の組成物は、対象（たとえば、肝疾患を有すると推測されている対象、標準的なメディカルスクリーニングを受けている明らかに健常な対象、調査中の詳細不明の病的状態を有する対象、対照の対象、または他の対象）、または対照試料（たとえば、アッセイで検出される各バイオマーカーを混入された、健常者由来の血清を含む基準対照等の、対照を提示する目的のために1以上の対象のバイオマーカーが存在している（たとえば、添加されている）血清、緩衝液等）由来の生体試料が含まれ得る。たとえば、ある特定の態様において、組成物には、E3検出試薬（たとえば、抗E3抗体）および、肝疾患（たとえば、自己免疫性肝炎（AIH）、原発性硬化性胆管炎（PSC）、原発性胆汁性肝硬変（PBC）またはそれらの任意の組み合わせ等の疾患）を有していると推測されている対象由来の、血清試料、血漿試料、または全血試料が含まれる。上述のように、組成物にはさらに、たとえば、E1、MDC、IL-15、APまたはそれらの任意の組み合わせに有用な検出剤等の、追加の対象バイオマーカーを検出するための1以上の剤を含んでも良い。

30

40

【0145】

ある特定の態様において、本発明の組成物は、たとえば保管容器および/またはアッセイ容器等の容器内に存在している。当該容器は、たとえば、E3検出剤（たとえば、E1、MDC、IL-15、APまたはそれらの任意の組み合わせのための1以上の検出剤との組み合わせでの）の補完のための、簡便な任意の容器、または、E3および対象の任意の追加のバイオマーカー（たとえば、E1、MDC、IL-15、APまたはそれらの任意の組み合わせ）を検出するための検出アッセイ（たとえば、液相ベースのアッセイまたは固相ベースのアッセイ）を実行するための簡便な任意の容器であっても良い。対象の容器は、チューブ（たとえば、任意のサイズ（たとえば、0.2ml~15mlの範囲にあ

50

る、たとえば、0.2 ml、0.5 ml、1.0 ml、1.5 ml、2.0 ml、5 ml、10 ml、15 ml等)のチューブ)、および物質(たとえば、ポリプロピレンまたは、当該組成物の保存または使用に適した任意の他の物質)を含む。ある特定の態様において、組成物は、たとえば、チューブの1次元アレイまたは2次元アレイ等の、一連のチューブである容器中に存在する(たとえば、チューブのストリップ、または、「プレート」形式中のチューブ(たとえば、24ウェル、48ウェル、96ウェル、384ウェル、または他の簡便なプレート形式))。

【0146】

ある特定の実施形態において、組成物は、平面基盤上に配置されている(たとえば、ウェル、チップ(たとえば、マイクロ流体チップ)等の底面)。組成物が基盤上に配置される場合、組成物中に存在する任意の検出剤(たとえば、任意選択的に、E1、MDC、IL-15および/またはAP検出剤のうちの任意の1つ以上と組み合わせた、E3検出剤)は、基板上に配置された溶液または懸濁液中に存在していてもよく、または、基盤に付着されていても良い(たとえば、基盤表面への直接的な付着、または、リンカー部分(たとえば、抗体(たとえば、抗種抗体)または他の適したリンカー部分)を介した付着)。そのような組成物には、たとえば、対象の1以上のバイオマーカーの検出のための固相アッセイ(たとえば、ELISAベースの固相タンパク質検出アッセイ、または非酵素ベースの固相タンパク質検出アッセイ、固相核酸増幅等)の実施における用途が見出される。

【0147】

炎症性肝疾患の診断方法

本開示方法により、自己免疫性肝炎(AIH)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、原発性硬化性胆管炎(PSC)のうちの1以上の肝疾患の診断を容易にするための方法が提示される。以下に詳述されるように、診断には、1)対象がAIH、PBCおよびPSCのうちの1以上の肝疾患を有しているかどうかを評価すること、および、健常者またはHCV感染者から対象を鑑別すること; 2)個人がPSCを有しているかどうかを評価すること(たとえば、AIHまたはPBCのうちの1つまたは両方の対照として); および/または3)個人がAIHを有しているかどうかを評価すること(たとえば、PBCまたはPSCのうちの1つまたは両方の対照として)、のうちの1以上が包含される。これらの方法を以下に詳述する。

【0148】

概して、当該方法には、患者由来の生体試料中のバイオマーカー(たとえば、E3、E1、MDCおよび/またはIL-15、ならびに、任意選択的に、AP)のレベルを分析すること、および、対照バイオマーカーのレベルと、検証バイオマーカーのレベルを比較することが含まれる。「対照バイオマーカーレベル」(本明細書において、「カットオフ値」または「バイオマーカー閾値」とも呼称される)は、試料中のバイオマーカーレベルが対照レベルを超えると、個人における第二の状態の可能性が増加することを示すように、第一の状態および第二の状態の間(たとえば、AIH、PBCおよびPSCのうちの少なくとも1つの肝疾患を有しない個人と、そのような肝疾患を有する個人の間)を識別するために用いられるバイオマーカーのレベルを指す。ゆえに、「対照バイオマーカーレベル」または「バイオマーカー閾値」は、前もって選択された特異度および/または感度で、検証された個人に存在する疾患の可能性を、検証された個人に存在しない疾患の可能性から識別する、近似値であるアッセイ値(たとえば、バイオマーカーの量、バイオマーカー量の比(たとえば、E1/E3比)等)を指す。

【0149】

以下の実施例に解説されるように、HCV感染は、必ずしも、または著しく本発明のアッセイの感度および/または特異度を損ねるものではないため、対照バイオマーカーレベルを既定するために用いられた個人は、健常者、HCV感染者、またはその組み合わせであっても良い。

【0150】

たとえば、対照バイオマーカーレベルは、健常者のバイオマーカーレベルであっても良

10

20

30

40

50

く、または、アッセイが、A I H、P B CおよびP S C間の診断を容易にするものである場合には、対照バイオマーカーレベルは、肝疾患に関連したバイオマーカーレベルであっても良い（たとえば、A I H、P B Cおよび/またはP S Cに関連したE 3のレベル；肝疾患（たとえば、P S Cを有する）に関連したA Pのレベル；P S CとA I HまたはP B Cの間の鑑別診断を容易にするための、P B Cに関連したM D Cのレベル；または、A I HとP B CまたはP S Cの間の鑑別診断を容易にするためのP S Cに関連したI L - 1 5のレベル）。

【 0 1 5 1 】

たとえば、バイオマーカーの閾値は、所望の感度で罹患した対象を検出するバイオマーカーの近似レベルを表してもよい（たとえば、少なくとも5 5 %、少なくとも約6 0 %、少なくとも7 0 %、または少なくとも8 0 %かそれ以上）。ゆえに、たとえば、閾値よりも高いバイオマーカーレベルを有する個人は、その疾患に対する診断が陽性となる可能性が、少なくとも約6 0 %またはそれ以上である。

10

【 0 1 5 2 】

対照または閾値に関する正確な数値は、バイオマーカーの検出に用いられたアッセイのタイプおよび試薬で変化する。たとえば、本明細書に記述されるE 3、E 1とE 3の比率、M D C、I L - 1 5、およびA Pに対する対照値は、M e s o S c a l e D i s c o v e r y C o m p a n y社のマルチプレックスE L I S Aキットおよび血清試料を用いて得られたアッセイ値に基づいている。しかしながら、用いたアッセイおよび試薬に関わらず、バイオマーカーの閾値または対照値と、疾患状態の可能性（たとえば、A I H、P B CおよびP S Cのうちの1以上；A I HおよびP B Cに対するP S Cの鑑別診断；P S CおよびP B Cに対するA I Hの鑑別診断）の間の相関は、用いたアッセイおよび試薬に関わらず、存在する。ゆえに、検証試料が、同じ一般型のアッセイプラットフォームおよび試薬（たとえば、ポリペプチドアッセイ、核酸アッセイ）を用いてバイオマーカー（たとえば、E 1、E 3、M D C、I L - 1 5、A P）を分析する限りにおいては、および、通常好ましくは、バイオマーカー（それぞれ、E 1、E 3、M D C、I L - 1 5、A P）の対照値/閾値を測定するために用いたアッセイプラットフォームおよび試薬と同じ感度のアッセイプラットフォームおよび試薬（たとえば、ポリペプチドアッセイ、核酸アッセイ）を用いてバイオマーカー（たとえば、E 1、E 3、M D C、I L - 1 5、A P）を分析する限りにおいては、本発明方法が基づく実験結果は、維持されている。

20

30

【 0 1 5 3 】

A I H、P B CおよびP S Cのうちの1以上の肝疾患の診断

本発明により、対照が、A I H、P B CおよびP S Cのうちの1以上の肝疾患を有しているかどうかを評価する方法が提示される。概して、本方法には、患者由来の生体試料中のE 3レベルの検出が含まれる。

【 0 1 5 4 】

次いで、E 3レベルを用いて、対照E 3レベルに対して当該E 3レベルを比較することにより、A I H、P B CおよびP S Cのうちの1以上の診断を行う。試料中のE 3レベルが対照E 3レベルよりも高ければ、患者に、A I H、P B CおよびP S Cのうちの少なくとも1つの肝疾患が存在する可能性が高い。E 3レベルの分析を含む方法を用いて、たとえば、可能性のある肝疾患の1以上の症状を示しうる対象における診断を容易に行うことができる。

40

【 0 1 5 5 】

対照E 3レベル（E 3閾値またはE 3カットオフ値とも呼称される）は、本明細書に記述されるように測定されてもよく（たとえば、統計分析の適用を介して、対照群におけるE 3レベルを分析することによる）、それにより、A I H、P B Cおよび/またはP S Cのうちの少なくとも1つの肝疾患を有する患者の少なくとも5 5 %、少なくとも約6 0 %、少なくとも7 0 %、少なくとも8 0 %、または少なくとも9 0 %またはそれ以上で現れるE 3のレベルが特定される。

【 0 1 5 6 】

50

対照 E 3 レベルの値は、当分野公知の試薬および方法を用いて容易に決定することができ、および、用いたアッセイおよび用いた生体試料で変化しうる。たとえば、アッセイがイムノアッセイであり、生体試料が血清である場合、対照 E 3 レベルは、約 18 ~ 45 pg/ml 血清、約 18 ~ 40 pg/ml 血清、約 18 ~ 35 pg/ml 血清、約 18 ~ 28 pg/ml 血清、約 20 ~ 45 pg/ml 血清、約 20 ~ 40 pg/ml 血清、約 20 ~ 35 pg/ml 血清、約 20 ~ 28 pg/ml 血清、約 23 ~ 45 pg/ml 血清、約 23 ~ 40 pg/ml 血清、約 23 ~ 35 pg/ml 血清、約 23 ~ 28 pg/ml 血清、約 25 ~ 45 pg/ml 血清、約 25 ~ 40 pg/ml 血清、約 25 ~ 35 pg/ml 血清、約 25 ~ 28 pg/ml 血清、約 18 pg/ml 血清、約 20 pg/ml 血清、約 23 pg/ml 血清、約 25 pg/ml 血清、約 28 pg/ml 血清、約 30 pg/ml 血清、約 35 pg/ml 血清、約 40 pg/ml 血清、または、約 45 pg/ml 血清であっても良く、高い検証 E 3 レベルが対照 E 3 レベルよりも高ければ、A I H、P S C または P B C のうちの少なくとも 1 つの肝疾患の診断となる。

10

【 0 1 5 7 】

所望される感度（たとえば、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれ以上）および所望される特異度（たとえば、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、またはそれ以上）で、A I H、P S C または P B C のうちの少なくとも 1 つの肝疾患の診断を容易にするための、本発明に従う E 3 レベルを用いたアッセイおよびアルゴリズム。

20

【 0 1 5 8 】

P S C の診断

本発明方法により、対象（たとえば、肝疾患を有すると推測される対象、標準的なメディカルスクリーニングを受けている、明らかに健常な対象、調査中の詳細不明な病的状態を有する対象、または、他の目的の対象）が、たとえば、A I H および P B C に対する鑑別診断として、対象由来の生体試料中の E 3、E 1、M D C および I L - 1 5 のレベルを評価することにより、P S C を有するかどうかを評価する方法が提示される。本発明方法はまた、対象由来の生体試料中の E 3 およびアルカリホスファターゼ（A P）のレベルを評価することにより、P S C（たとえば、A I H の診断および P B C の診断がすでに除外されている場合）を有していると推測されている対象における、P S C の診断を容易にするための方法が提示される。これらの方法を、以下に詳述する。

30

【 0 1 5 9 】

P S C を診断する方法

本発明方法により、対象（たとえば、肝疾患を有すると推測される対象、標準的なメディカルスクリーニングを受けている、明らかに健常な対象、調査中の詳細不明な病的状態を有する対象、または、他の目的の対象）が、P S C を有しているかどうか（たとえば、A I H および P B C に対する鑑別診断として）を、対象由来の生体試料中の E 3、E 1 および M D C のレベルを評価することにより、評価する方法が提示される。そのような方法において、肝疾患を有すると推測されている対象における P S C の診断は、対象由来の生体試料中の E 3 のレベル、E 1 のレベル、および M D C のレベルを検出することによりなされる。E 1 および E 3 のレベルを用いて、E 1 と E 3 のレベルの比率を算出しても良い。アルゴリズムにおいて用いられる E 1 および E 3 のレベルの比率は、E 1 / E 3 比、または (E 3 / E 1 × 1 0 0) として算出されても良い。E 3 レベル、E 1 と E 3 のレベルの比率 (E 1 / E 3 比率、または (E 3 / E 1 × 1 0 0))、および、M D C のレベルを用いて、本方法により、P S C の診断が容易となる。本方法は、A I H および P B C の両方に対する P S C の鑑別診断、ならびに、H C V 感染者および健常対照からの P S C の鑑別診断の実施に特に有用である。E 3 レベルが対象 E 3 レベルよりも高く、および、E 1 / E 3 の比率が E 1 と E 3 の対照比率 (対照 E 1 / E 3、または対照 (E 3 / E 1 × 1 0 0) 値) よりも高く、および、M D C レベルが対照 M D C レベルよりも高い場合には、肝疾患が P S C である (P B C、A I H、H C V 感染または健常者ではない) 可能性が高い

40

50

ことが示唆される。検証 E 1 および E 3 の値が $E 3 / E 1$ として E 1 と E 3 の比率を算出するために用いられる場合、用いられる対照値は、対照 $E 3 / E 1$ であり、検証 E 1 および E 3 の値が $(E 3 / E 1 \times 100)$ として E 1 と E 3 の比率を算出するために用いられる場合、用いられる対照値は、対照 $(E 3 / E 1 \times 100)$ 値であることを理解されたい。参照しやすいように、 $E 3 / E 1$ 比率または対照 $E 3 / E 1$ 比率に対する基準は、限定を意図しておらず、むしろ、 $(E 3 / E 1 \times 100)$ または対照 $(E 3 / E 1 \times 100)$ 値の別の用途を予期させるものであることを理解されたい。ゆえに、たとえば、 $E 3 / E 1$ の比率に対する明細書の記載全体にわたる基準は、 $(E 3 / E 1 \times 100)$ 値の別の用途もまた予期するものである。

【0160】

P S C の診断を容易にするために用いられる対照 E 3 のレベルは、A I H、P B C および P S C のうちの少なくとも 1 つの肝疾患の診断を容易に行うためのアッセイの文脈における、上述の対照 E 3 レベルであっても良い。

【0161】

E 1 および E 3 のレベルの対照比率

E 1 および E 3 レベルの対照比の値 ($E 3 / E 1$ 比閾値 ($(E 1 / E 3 \times 100)$ 閾値) または $E 3 / E 1$ カットオフ値 ($(E 1 / E 3 \times 100)$ カットオフ値) とも呼称される) は、本明細書に記述されるように、たとえば、統計分析を適用し、患者群における E 3 レベルと E 1 レベルを分析することにより測定されてもよく、それによって、対照 E 1 レベルと対照 M D C レベルとともにアルゴリズムに適用された際に、群内の P S C 患者の少なくとも 55%、少なくとも約 60%、少なくとも 70%、または少なくとも 80% がそれ以上を特定する E 1 と E 3 のレベルの比率を特定することができる。

【0162】

E 1 および E 3 の対照比に対する値は、当分野公知の試薬および方法を用いて容易に決定することができ、用いられるアッセイ、および用いられる生体試料により変化しうる。たとえば、アッセイがイムノアッセイであり、生体試料が血清である場合、対照の $E 1 / E 3$ の比率は、約 10 ~ 25、約 10 ~ 20、約 15 ~ 20、約 15 ~ 25、約 10、約 15、約 20、または約 25 であり得る。たとえば、アッセイがイムノアッセイであり、生体試料が血清である場合、対照 $(E 1 / E 3 \times 100)$ 値は、約 5 ~ 8、約 5 ~ 7、または約 5、6 もしくは 7 であり得る。

【0163】

対照 M D C レベル

対照 M D C レベルは、M D C 閾値であっても良い。M D C 閾値は、本明細書に記述されるように、たとえば、統計分析を適用し、患者群における M D C のレベルを分析することにより、決定することができ、それによって、A I H または P B C ではなく、P S C を有する患者の少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、または少なくとも 90% がそれ以上に現れる M D C のレベルを特定することができる。たとえば、アッセイがイムノアッセイであり、生体試料が血清である場合 M D C の閾値は、約 2, 500 ~ 3, 000 p g / m l 血清、または約 2, 800 p g / m l 血清であっても良い。

【0164】

対照 M D C レベルの値は、本明細書に記述されるように、たとえば、統計分析を適用し、患者群における M D C のレベルを分析することにより測定することができ、それによって、対照 E 1 レベル、および、対照 E 1 と対照 E 3 レベルの比率と共にアルゴリズムに適用した場合に、所望される感度 (たとえば、少なくとも 55%、少なくとも約 60%、少なくとも 70% または少なくとも 80% がそれ以上) で、群内の P S C 患者を特定する、M D C のレベルを特定することができる。

【0165】

対照 M D C のレベルの値は、当分野公知の試薬および方法を用いて容易に決定することができ、および、用いられるアッセイおよび用いられる生体試料で変化しうる。たとえば、アッセイがイムノアッセイであり、生体試料が血清である場合、対照 M D C のレベルは

10

20

30

40

50

、約2000 pg/ml ~ 3000 pg/ml血清、約2500 pg/ml ~ 3000 pg/ml、約2800 pg/ml、または約3000 pg/mlであっても良い。

【0166】

E3レベル、E1とE3レベルの比率、およびMDCレベルを用いた、本発明に従うアッセイならびにアルゴリズムは、HCV感染対照、健常対照、AIH罹患者およびPBC罹患者と比較して、所望される感度（たとえば、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも70%、少なくとも75%、または少なくとも80%かそれ以上）、または、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%かそれ以上の特異度で、PSCの診断を容易に行うことができる。E3レベル、E1とE3レベルの比率、およびMDCレベルを用いた、本発明に従うアッセイは、所望される感度（たとえば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%かそれ以上）で、AIHに対する、PSCの鑑別診断を容易に行うことができる。E3レベル、E1とE3レベルの比率、およびMDCレベルを用いた、本発明に従うアッセイは、所望される特異度（たとえば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%かそれ以上）で、PBCに対する、PSCの鑑別診断を容易に行うことができる。

10

【0167】

PSC、PBCおよびAIHのうちの1つ以上の肝疾患を有すると推測されている対照における、E3、E1およびMDCのレベルを用いた、PSC検出のためのアルゴリズム

E3、E1およびMDCの検証値の分析のためのアルゴリズムは、上述の対照値のいずれかを用いてもよく、以下に概略的に記述されうる：

20

【0168】

$(E3 > X) + (E1 / E3 > Y) + (MDC > Z)$ (アルゴリズムI)

【0169】

または、

【0170】

$(E3 > X) + ((E3 / E1) \times 100) < Y' + (MDC > Z)$ (アルゴリズムI')

【0171】

ここで、

30

【0172】

Xは、E3対照値であり；

【0173】

Yは、対照E1/E3比の値であり；

【0174】

Y'は、対照 $((E3 / E1) \times 100)$ の値であり；および、

【0175】

Zは、対照MDCの値であり、

【0176】

E3、E1およびMDCの検証値が、アルゴリズムIまたはアルゴリズムI'のすべての因子を満たす場合、対象におけるPSCの可能性は高まり、さらに、対象が、AIHまたはPBCではなく、PSCを有する可能性も高まる。

40

【0177】

1つの実施形態において、E3、E1およびMDCの検証血清値の分析のためのアルゴリズムは、以下に概略的に記述されうる：

【0178】

$(E3 > 18 \sim 45 \text{ pg/ml}) + (E1 / E3 > 10 \sim 20) + (MDC > 200 \sim 3000 \text{ pg/ml})$ (アルゴリズムIa)

【0179】

または、

50

【0180】

($E3 > 18 \sim 45 \text{ pg/ml}$) + ($(E3/E1) \times 100 < 6 \sim 7$) + ($MDC > 2000 \sim 3000 \text{ pg/ml}$) (アルゴリズムI a')

【0181】

E3、E1およびMDCの検証値が、アルゴリズムIまたはアルゴリズムI'のすべての因子を満たす場合、対象におけるPSCの可能性は高まり、さらに、対象が、AIHまたはPBCではなく、PSCを有する可能性も高まる。

【0182】

1つの実施形態において、E3レベル、E1/E3比率およびMDCレベルをアルゴリズムに適用することが方法に含まれ：

【0183】

($E3 > 28$) + ($E1/E3 > 15$) + ($MDC > 2800$) (アルゴリズムI b)

)となる場合に、

【0184】

対象におけるPSCの可能性が増加し、および、さらに、対象がAIHまたはPBCではなく、PSCを有する可能性が増加する(値は、pg/ml血清として算出される)。以下に記述されるように、E3、E1およびMDCアッセイの値をアルゴリズムI bにおいて用いることにより、対照(HCVおよび健常対照を含む)、PBCおよびAIHから、65~67%の感度、および92~98%の特異度で、PSCが識別される。

【0185】

1つの実施形態において、E3レベル、E1/E3比率およびMDCレベルを以下のアルゴリズムに適用することが方法に含まれ(値は、pg/ml血清として算出される)：

【0186】

($E3 > 25$) + ($E1/E3 > 15$) + ($MDC > 2800$) (アルゴリズムI c)

【0187】

対照における(AIHまたはPBCではなく)PSCの可能性が増加する(値は、pg/ml血清として算出される)。以下に記述されるように、E3、E1およびMDCアッセイの値をアルゴリズムI cにおいて用いることにより、対照(HCVおよび健常対照を含む)、PBCおよびAIHから、72~75%の感度、および92~96%の特異度で、PSCが識別される。

【0188】

PSCを有すると推測される対象におけるPSC診断方法

本発明により、PSCを有すると推測される対象におけるPSCの診断を容易にする方法が提示される。そのような対象とは、ウイルス性肝炎の診断、AIHの診断およびPBCの診断が除外されている者である。そのような診断方法には、対象由来の生体試料中のE3のレベルおよびアルカリホスファターゼ(AP)のレベルを評価することが含まれる。概して、対象が、対照E3レベルを超えるE3を有する、または対照APレベルを超えるAPレベルを有している場合、肝疾患がPSCである可能性が高くなる。

【0189】

E3レベルおよびAPレベルが関与する本方法を用いた評価法に適した対象とは、PSCが推測される対象である。そのような対象としては、たとえば、AIHは、対象に影響を与えている可能性のある肝疾患から除外されている(AIH陰性)、および/または、PBCは、対象に影響を与えている可能性のある肝疾患から除外されている(PBC陰性)ものが挙げられる。対象は、たとえば、対象が、抗核抗体(ANA)、抗肝/腎ミクロソームI型抗体(抗LKM1)、および抗可溶性肝/膵抗原(抗SLA/LP)から選択されるマーカー等のAIHマーカーが陰性である場合に、AIH陰性と診断されてもよく；および/または、以下に記述される本方法に従い、対象が、(PSCまたはPBCではないものとして)AIHを有している可能性が高くないと決定されることにより、AIH陰性と診断されても良い。対象は、対象が、抗ミトコンドリア抗体(AMA)が陰性であ

10

20

30

40

50

る場合に、PBC陰性と診断されても良い。

【0190】

PSCを有していると推測される対象における、PSCの診断を容易にするために用いられる対照E3のレベルは、AIH、PBCおよびPSCのうちの少なくとも1つの肝疾患の診断を容易にするアッセイに関する文脈において、上述される対称E3レベルであっても良い。

【0191】

対照APレベル

本発明方法における用途のためのAPレベルは、市販されているキットを用いて分析されても良く、および、AP酵素活性のレベルを分析することにより間接的に、または、APタンパク質の検出により直接的に、APのレベルを分析することを含んでも良い。たとえば、APレベルが血清中のAP酵素活性の検出により測定される場合、対照APレベル（すなわち、正常APレベル）は、約30～130IU/血清リットルであり、約40～129IU/リットルの範囲にあるAPレベルは、男性の正常範囲と見なされ、および、約35～104IU/リットルの範囲にあるAPレベルは、女性の正常範囲と見なされる。ゆえに、たとえば、約129IU/血清リットルを超えるAP酵素活性レベル。

10

【0192】

E3レベルおよびAPレベルを用いた、PSCを疑われる診断を容易に行うためのアルゴリズム

E3、E1およびMDCの検証値の分析のためのアルゴリズムは、上述の対照値のうちの任意のものを用いても良く、以下に概略的に記述される：

20

【0193】

($E3 > X$) または ($AP > K$) (アルゴリズムIV)

【0194】

ここで、

【0195】

Xは、E3対照値であり；

【0196】

Kは、対照AP値であり；

【0197】

E3またはAPの検証値がアルゴリズムIVを満たす場合、対象におけるPSCの可能性が高まる。試料が血清の場合、E3対照値Xは、たとえば、28pg/ml、25pg/ml、または23pg/mlであっても良い。試料が血清であり、APアッセイが、酵素活性に対するアッセイである場合、Kは、約30～130IU/血清リットルの値であっても良い。対象が男性である場合、Kは、約40～129IU/リットルであっても良く；対象が女性である場合、Kは、約35～104IU/リットルであっても良い。

30

【0198】

AIHの診断

本発明方法には、対象がAIHを有しているかどうかを評価する方法が含まれる。そのような方法には通常、対象由来の生体試料中のE3のレベルを検出すること、E1のレベルを検出すること、MDCのレベルを検出すること、および、IL-15のレベルを検出すること、が含まれる。次いで、E3レベル、E1/E3比（または、対照($E3/E1 \times 100$)値)、MDCレベルおよびIL-15レベルを用いて、PSC、PBC、ならびに、HCV感染者および健常者に対する、AIHの鑑別診断を容易に行うことができる。そのような方法を以下に詳述する。

40

【0199】

対照E3レベル、対照E1/E3比（または、対照($E3/E1 \times 100$)値）、および対照MDCレベルは、AIHの診断を容易にするためのアッセイに関する文脈において上述されているものであっても良い。

【0200】

50

対照 I L - 1 5 レベル (I L - 1 5 閾値または I L - 1 5 カットオフ値とも呼称される) は、本明細書に記述されるように、たとえば、統計分析を適用し、患者群における I L - 1 5 レベルを分析することにより測定されてもよく、それによって、対照 E 1 レベルおよび、対照 E 1 と対照 E 3 レベルの比とともにアルゴリズムに適用された際に、所望の感度 (たとえば、少なくとも 5 0 %、少なくとも 5 5 %、少なくとも 6 5 % かそれ以上) および所望の特異度を呈することができる、 I L - 1 5 のレベルを特定することができる。

【 0 2 0 1 】

対照 I L - 1 5 レベルの値は、当分野公知の試薬および方法を用いて容易に決定することができ、および、用いられるアッセイおよび用いられる生体試料で変化しうる。たとえば、アッセイがイムノアッセイであり、生体試料が血清である場合、対照 I L - 1 5 レベルは、約 2 ~ 3 p g / m l 血清、約 2 . 2 ~ 2 . 8 p g / m l 血清、または約 2 . 4 ~ 2 . 5 p g / m l 血清、約 2 . 4 p g / m l 血清、または約 2 . 5 p g / m l 血清であっても良い。

10

【 0 2 0 2 】

E 3、E 1 および M D C の検証値の分析のためのアルゴリズムは、上述の対照値のうちの任意のものを用いても良く、および、以下に概略的に記述される：

【 0 2 0 3 】

(E 3 > X) + (E 1 / E 3 > Y) + (M D C > Z) + (I L - 1 5 > B) (アルゴリズム I I)

【 0 2 0 4 】

または、

【 0 2 0 5 】

(E 3 > X) + ((E 3 / E 1) × 1 0 0) < Y ') + (M D C > Z) + (I L - 1 5 > B) (アルゴリズム I I ')

20

【 0 2 0 6 】

ここで、

【 0 2 0 7 】

X は、E 3 対照値であり；

【 0 2 0 8 】

Y は、対照 E 1 / E 3 比の値であり；

30

【 0 2 0 9 】

Y ' は、対照 ((E 3 / E 1) × 1 0 0) の値であり；

【 0 2 1 0 】

Z は、対照 M D C の値であり、および、

【 0 2 1 1 】

B は、対照 I L - 1 5 の値であり、

【 0 2 1 2 】

E 3、E 1、M D C および I L - 1 5 の検証値がアルゴリズム I I またはアルゴリズム I I ' のすべての因子を満たす場合、対象における A I H の可能性は高く、さらに、対象が、P S C または P B C ではなく、A I H を有している可能性も高い。

40

【 0 2 1 3 】

1 つの実施形態における、E 3、E 1 および M D C の検証血清値の分析のためのアルゴリズムを、以下に概略的に記述する：

【 0 2 1 4 】

(E 3 > 1 8 ~ 4 5 p g / m l) + (E 1 / E 3 > 1 0 ~ 2 0) + (M D C > 1 8 7 0 ~ 3 0 0 0 p g / m l) + (I L - 1 5 > 2 ~ 3) (アルゴリズム I I a)

【 0 2 1 5 】

または、

【 0 2 1 6 】

(E 3 > 1 8 ~ 4 5 p g / m l) + ((E 3 / E 1) × 1 0 0) < 6 ~ 7) + (M D

50

$C > 1870 \sim 3000 \text{ pg/ml}$) + ($IL-15 > 2 \sim 3$) (アルゴリズム I I a')

【0217】

E3、E1、MDCおよびIL-15の検証値が、アルゴリズム I Iまたはアルゴリズム I I'のすべての因子を満たす場合、対象におけるAIHの可能性は高く、さらに、対象が、PSCまたはPBCではなく、AIHを有している可能性も高い。

【0218】

1つの実施形態において、方法には、E3レベル、E1/E3比、MDCレベルおよびIL-15レベルを以下のアルゴリズムに適用することが含まれる(値は、pg/ml血清として算出される)：

【0219】

($E3 > 25$) + ($E1/E3 < 15$) + ($MDC > 1870$) + ($IL-15 > 2.4$) (アルゴリズム I I I a)

【0220】

または、

【0221】

($E3 > 25$) + ($E1/E3 < 15$) + ($MDC > 1870$) + ($IL-15 > 2.5$) (アルゴリズム I I I b)

【0222】

対象における、(PSCまたはPBCではなく)AIHの可能性が高い(pg/ml血清として値は算出される)。

【0223】

マーカーの方法およびパネル

概して、本発明の方法には、対象の生体試料中のE3、E1、MDC、IL-15およびAPのうちの1、2、3、4またはそれ以上を検出することが含まれる。一般に、当該方法には、E3を検出すること、ならびに、E1、MDC、およびAPの内の少なくとも1、2、3またはそれ以上を検出することが含まれる。従って、本発明により、E3の検出のためのバイオマーカーのパネル、ならびに、E1、MDCおよびAPのうちの少なくとも1、2、3またはそれ以上に対するバイオマーカーのパネルを用いた方法が予期され、ならびに、そのようなマーカーの検出に有用な組成物(たとえば、マーカーポリペプチドの検出のためのアレイ；マーカーポリペプチドの検出のための試薬を備えたキット等)が予期される。

【0224】

以下の表に、E3ならびに、E1、MDC、IL-15および/またはAPを備えたバイオマーカーのパネルをどのように用いて肝疾患の診断を容易に行うことができるかを示す例を提示する。「+」は、その縦列が満足されている条件を示す。バイオマーカーの対照レベルは、本明細書に記述される対照レベルを指す。「NN」は、当該マーカーが、一番左の縦列に示される診断を容易に行うために、必ずしも必要ではないと評価していることを示す。

10

20

30

【表 2】

容易化される診断	E 3 レベル>対照E 3 レベル	E 1 / E 3 比>または、<対照E 1 / E 3 比	MDCレベル>対照MDCレベル*	I L - 1 5 レベル>対照I L - 1 5 レベル	A P レベル>対照A P レベル
この状態であれば、P S C、P B CまたはA I Hが存在する可能性がある	+	NN	NN	NN	NN
この状態であれば、P S C存在する可能性がある	+	+ (>)	+	NN	NN
この状態であれば、A I Hが存在する可能性がある	+	+ (<)	+	+	NN
この状態であれば、P S Cが存在する可能性がある	+ (または、A P +)	NN	NN	NN	+ (または、E 3 +)

*MDC対照レベルは、本明細書において、健常者におけるMDCのレベルではなく、本明細書に別記される（たとえば、図5～8および14）カットオフレベルを指すものであり、本明細書に記述されるP S Cの可能性評価およびA I Hの可能性評価によって異なる。

【0225】

報告書

本発明方法は、本方法の結果を示す報告書を作成すること、および、対象のケアに対して、どのように結果を適用すべきかのガイダンスを提示すること、が含まれ得る。本明細書において、「報告書」とは通常、電子的書面またはファイル（たとえば、p d fファイル、モニターディスプレイ等）、ならびに、有形書面（たとえば、紙の報告書）を指す。当該報告書は、完全に電子的に、または部分的に電子的に作成されてもよい（たとえば、コンピューターモニター等の電子的ディスプレイ上に表示される）。

【0226】

報告書中の当該方法の結果には、たとえば、分析したバイオマーカー（複数含む）のうちの1以上（たとえば、E 3 レベル、E 1 レベル、M D Cレベル、および/またはI L - 1 5 レベル）を含んでも良い。当該レベルは、定量的スコア（たとえば、p g / 血清m l 等の濃度）および/または、半定量的スコア（たとえば、対照レベルまたは選択された閾値に対する、バイオマーカー量を反映するスコア等）として報告されても良い。当該方法の結果には、任意選択的に、対照バイオマーカーに対するアッセイ結果を含んでも良い。

【0227】

報告書には、たとえば、患者がA I H、P B Cおよび/またはP S Cの肝疾患を有する、もしくは発症する予測リスク；A I Hを有する、もしくは発症する予測リスク；P B Cを有するもしくは発症する予測リスク；ならびに/または、P S Cを有する、もしくは発症する予測リスク等の情報が含まれ得る。

【0228】

報告書には、A I H、P B CおよびP S Cのうちの少なくとも1つの肝疾患の存在の有無の可能性；および、肝疾患のタイプ（たとえば、A I H、P B Cおよび/またはP S C）に基づいた、患者に対する推奨治療法に関する、臨床医向けのガイダンスが含まれ得る

。たとえば、報告者には、さらなる評価に関する推奨、および/または高価で侵襲的な評価を避けることに関する推奨、および/または治療的介入（たとえば、薬物の投与、推奨される外科的介入等）、治療レジメンの改変（たとえば、薬物投与量の調節（たとえば、投与量の増減）、投与レジメンの調製（たとえば、投与頻度および/または投与量の増減）等）に関する推奨が含まれ得る。

【0229】

報告書にはさらに、1)患者情報（たとえば、氏名、医学的情報（たとえば、年齢、性別、症状（たとえば、炎症性肝疾患の診断に関する可能性がある症状）、ウイルス感染の状態（たとえば、ウイルス性肝炎の存在の有無））等）、2)生体試料に関する情報（たとえば、種類、得られた時間）、3)アッセイが行われた場所および方法に関する情報（たとえば、検査機関、アッセイフォーマット）、4)サービスパロバイダーの情報、および/または、5)解釈に関する報告書（臨床医による診断を容易にするために、結果の少なくとも部分的な解釈を示す、散文を提示するものであってもよい）、のうちの1以上を含んでも良い。

10

【0230】

従って、本発明方法はさらに、本方法の結果、および任意選択的に、他の情報（たとえば、本明細書に記述される治療ガイダンス）を提示する報告書を作成するステップ、または出力するステップを含有しても良い。報告書は、電子的媒体の形態（たとえば、コンピューターモニター上の電子的ディスプレイ等）で提示されても良く、または、有形媒体（たとえば、紙または他の有形媒体に印刷された報告書）の形態で提示されても良い。可能性に関する評価は、「リスク報告書」または単に、「診断結果」と呼称されても良い。報告書を作成する人、または実体（報告書作成者）はまた、たとえばサンプル収集、サンプル処理等のステップを実行しても良い。あるいは、報告書作製者以外の実体が、たとえばサンプル収集、サンプル処理等のステップを実行しても良い。報告書は、ユーザーに提示されても良い。「ユーザー」は、たとえば、健常なプロフェッショナル（たとえば、臨床医、実験技術者、医師等）であっても良い。

20

【0231】

コンピューターによって行われる方法、システムおよびデバイス

本発明方法は、コンピューターにより行われても良く、それにより、方法のステップ（たとえば、分析、比較、算出等）が、全体的に、または部分的に自動化される。従って、本発明により、AIH、PBCおよびPSCのうちの少なくとも1つの肝疾患の診断を容易にする、コンピューターにより行われる方法に関連した、方法、コンピューターシステム、デバイス等が提示される。

30

【0232】

たとえば、バイオマーカーレベルの値を得ること、対照レベルとバイオマーカーレベルを比較すること、E1/E3比を算出すること、報告書を作成すること等を含む、当該方法のステップは、コンピュータープログラム製品により完全に、または部分的に行われても良い。得られた値は、（たとえば、データベースに）電子的に保存されても良く、および、プログラム化されたコンピューターにより実行されるアルゴリズムに供されても良い。

40

【0233】

たとえば、本発明方法は、バイオマーカーレベル（たとえば、E3レベル、E1レベル、MDCレベル、および/または、IL-15レベル）を、本明細書に記述される比較および算出ステップ（複数含む）を実施するためのアルゴリズムを実行し、たとえば、コンピューターに近い、または離れた位置のアウトプットデバイスへ、ディスプレイまたは報告書を印刷することにより、本明細書に記述される報告書を作成する、プログラム化されたコンピューターへとインプットすることを含んでも良い。

【0234】

ゆえに、本発明により、コンピューターに保存されたコンピュータープログラムを有する、コンピューター読み取り可能な記憶媒体を含む、コンピュータープログラム製品が提

50

示される。ある特定の態様において、記憶媒体は、一時的なものではない（たとえば、一時的な波長またはシグナルではない記憶媒体）。コンピューターにより読み取られた際、プログラムは、対象由来の1以上の生体試料の分析から得られた値に基づいて、関連計算を実行することができる。コンピュータープログラム製品は、その中に、計算（複数含む）を実行するためのコンピュータープログラムが保存されている。

【0235】

本発明により、上述のプログラムを実行するためのシステムが提示され、当該システムには通常、a)中央コンピューター環境、b)インプットデバイス（操作可能にコンピューター環境に接続され、患者データを受け取り、ここで、当該患者データには、たとえば、上述の患者由来の生体試料を用いたアッセイから得られたバイオマーカーレベルまたは他の値が含まれ得る）、c)アウトプットデバイス（コンピューター環境に接続され、ユーザー（たとえば、医療従事者）に情報を提示する）、および、d)中央コンピューター環境（たとえば、プロセッサ）により実行されるアルゴリズム（当該アルゴリズムはインプットデバイスから受け取ったデータに基づいて実行され、ここで、当該アルゴリズムが値を算出し、当該値は、対象が本明細書に記述されるAIH、PBCおよびPSCのうちの少なくとも1つの肝疾患を有する可能性の指標である）、を含む。

【0236】**コンピューターシステム**

本発明方法の実行を促進するためのプログラムが実行されうるコンピューター化された環境の一般的な例を図1に示し、当該図は、バスまたはバス群110を介して連結されている、少なくとも1つのプロセッサ102、またはプロセッシングユニットもしくは複数のプロセッサ、メモリー104、少なくとも1つのインプットデバイス106、および、少なくとも1つのアウトプットデバイス108、を通常含有するプロセッシングシステム100を図示する。ある特定の実施形態において、インプットデバイス106およびアウトプットデバイス108は、同じデバイスであっても良い。また、インターフェース112が、プロセッシングシステム100を1以上の末端デバイスへの連結のために備えられていても良く、たとえば、インターフェース112は、PCIカードまたはPCカードであっても良い。少なくとも1つのデータベース116を収めている少なくとも1つの保存デバイス114が備えられていても良い。

【0237】

メモリー104は、たとえば揮発性メモリーまたは非揮発性メモリー、固体記憶デバイス、磁性デバイス等のうち任意の形態であってもよい。ある特定の態様において、メモリーには、非一時的記憶媒体（たとえば、一時的な波長またはシグナルではない、記憶媒体等）が含まれる。プロセッサ102は、たとえば、プロセッシングシステム100内の異なる機能を実行するための、2以上の異なるプロセッシングデバイスを含む。インプットデバイス106は、は、インプットデータ118を受け取り、たとえば、キーボード、ペン様デバイスまたはマウス等のポインターデバイス、たとえばマイクロホン等の音声制御有効化のためのオーディオ受信デバイス、たとえばモデムもしくはワイヤレスデータアダプター等のデータ受信機またはアンテナ、データ取得カード等を含む。インプットデータ118は、たとえば、ネットワークを介して受け取ったデータと連動しているキーボード指示等の、異なる源由来であっても良い。

【0238】

アウトプットデバイス108は、アウトプットデータ120を提示または作成し、たとえばディスプレイデバイスもしくはモニター（この場合には、アウトプットデータ120は目で見ることができる）、プリンター（この場合には、アウトプットデータ120はプリントアウトされる）、ポート（たとえば、USBポート）、周辺構成要素アダプター、データ送信器またはアンテナ（たとえば、モデムまたはワイヤレスネットワークアダプター）等を含む。アウトプットデータ120は、異なっても良く、たとえば、ネットワークへと送信されたデータと連動したモニター上の光学ディスプレイ等の異なるアウトプットデバイス由来であっても良い。ユーザーは、データアウトプットを見るこ

とができ、または、たとえば、モニター上で、またはプリンターを用いて、データアウトプットの解釈を見ることができる。保存デバイス 114 は、データまたは情報の記憶方法のうちの任意の形態であっても良く、たとえば、たとえば揮発性メモリーまたは非揮発性メモリー、固体記憶デバイス、磁性デバイス等がある。

【0239】

使用する際、プロセッシングシステム 100 を適合させ、データまたは情報が、有線または無線の通信装置を介して、少なくとも 1 つのデータベース 116 から読みだされる、および/または、少なくとも 1 つのデータベース 116 に保存されるようにする。インターフェース 112 は、プロセッシングユニット 102 と、特殊化された目的に供されうる末端構成要素の間の有線および/または無線通信を可能とさせてもよい。概して、プロセッサ 102 は、インプットデバイス 106 を介して、インプットデータ 118 として指示を受け取ってもよく、および、アウトプットデバイス 108 を利用して、ユーザーに対し、処理結果または他のアウトプットを表示してもよい。2 以上のインプットデバイス 106 および/またはアウトプットデバイス 108 が、備えられても良い。プロセッシングシステム 100 は、末端ハードウェア、サーバーハードウェア、特殊化されたハードウェア等の、任意の適した形態であっても良い。

【0240】

プロセッシングシステム 100 は、ネットワーク化された通信システムの一部であっても良い。プロセッシングシステム 100 は、ネットワーク（たとえば、インターネットまたは WAN 等）に接続しても良い。インプットデータ 118 およびアウトプットデータ 120 は、ネットワークを介して、他のデバイスと通信されても良い。ネットワーク上での情報および/またはデータの移転は、有線の通信手段または無線の通信手段を用いて行われても良い。サーバーは、ネットワークと 1 以上のデータベースの間のデータの移転を促進することができる。サーバーおよび 1 以上のデータベースが、情報源の一例を提示する。

【0241】

ゆえに、図 3 に図示されるプロセッシングコンピューターシステム環境 100 は、1 以上のリモートコンピューターへの論理的接続を用いて、ネットワーク化された環境中で操作しても良い。リモートコンピューターは、パーソナルコンピューター、サーバー、ルーター、ネットワーク PC、ピアデバイス、または他の一般のネットワークノードであっても良く、および、通常は、上述の多く、またはすべての構成要素を含む。

【0242】

図 3 に示される論理的接続には、ローカルエリアネットワーク（LAN）および広域エリアネットワーク（WAN）を含み得るが、たとえばパーソナルエリアネットワーク（PAN）等の他のネットワークも含み得る。そのようなネットワーク環境は、オフィス、企業規模のコンピューターネットワーク、イントラネット、および Internet において通常のものである。たとえば、LAN ネットワーク環境において用いられる場合、コンピューターシステム環境 100 は、ネットワークインターフェースまたはアダプターを通して LAN に接続される。WAN ネットワーク環境において用いられる場合、コンピューターシステム環境は、通常、たとえばインターネット等の WAN 上の通信を確立させるためのモデムまたは他の手段を含む。モデム（内部的または外部的であってもよい）は、ユーザーインプットインターフェースを介して、または、他の適切な機器を介して、システムバスへと接続されてもよい。ネットワーク化された環境において、コンピューターシステム環境 100 に関連して示されるプログラムモジュールまたはその一部は、リモートメモリー保存デバイスに保存されても良い。図 3 に図示されたネットワーク接続は例であり、複数のコンピューター間の通信リンクを確立する他の手段を用いても良いことを認識されたい。

【0243】

図 3 は、本明細書に開示される方法の実施形態が予期されうる、コンピューター環境の実例的な、および/または、適切な例の、簡潔で、一般的な記述を提示することを意図し

10

20

30

40

50

ている。図3は、適切な環境の一例であり、本発明実施形態の構造、使用範囲、機能性のいかなる限定を提示するものではない。特定の実施形態は、例示の操作環境において図示される構成要素の任意の1つ、または組み合わせに関連する任意の従属性または要求性を有するものと解釈されたい。たとえば、ある特定場合において、環境の1以上の要素は、必要ではなく、省略されても良い。他の例において、1以上の他の要素は、必要であり、付加されてもよい。

【0244】

ある特定の実施形態は、たとえば図3のコンピューターシステム環境100等の1以上のコンピューターデバイスにより行われる動作および操作の象徴に関連して記述されうる。ゆえに、そのような動作および操作（時折、コンピューターが実行するものとして言及される）には、構造化された形態において、データを示す電子的シグナルのコンピューターのプロセッサによる操作が含まれる。この操作は、コンピューターのメモリーシステム中の位置で、データを変換または維持し、当業者周知の方法でコンピューターの操作を再構成または変更する。データが維持されているデータ構造は、データのフォーマットにより既定される特定の性質を有するメモリーの物理的な位置である。しかしながら、実施形態は前述の文脈において記述されているが、限定の意図は無く、当業者は、以下に記述される動作および操作が、ハードウェア中においてもまた実行されうることを理解するであろう。

【0245】

実施形態は、多くの他の汎用コンピューターデバイスまたは特殊用途のコンピューターデバイス、およびコンピューターシステム環境または構成で実行されてもよい。実施形態での用途に適し得る、良く知られたコンピューターシステム、環境および構成の例としては、限定されないが、パーソナルコンピューター、ノートパソコンまたはラップトップデバイス、携帯端末、マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサベースのシステム、プログラム化可能な家庭用電化製品、ネットワーク、ミニコンピューター、サーバコンピューター、ウェブサーバコンピューター、大型汎用コンピューター、および、上述のシステムまたはデバイスのうちの任意のものを含む分散型コンピューター環境が挙げられる。

【0246】

実施形態は、たとえばプログラムモジュール等の、コンピューターにより実現される、コンピューターで実行可能な指示の一般的な文脈で記述され得る。一般的に、プログラムモジュールには、ルーチン、プログラム、オブジェクト、コンポーネント、データ構造物等が含まれ、それらは特定のタスクを実行、または特定の抽象データ型を実行する。また、実施形態は、分散型コンピューター環境において実行されてもよく、そこで、タスクは、通信ネットワークを通して連結されたりリモートプロセッシングデバイスにより実行される。分散型コンピューター環境において、プログラムモジュールは、ローカルおよびリモートコンピューター記憶媒体（たとえば、媒体が、一時的な波長またはシグナルではない、非一時的な記憶媒体）の両方に位置づけられてもよい。

【0247】

コンピュータープログラム製品

本発明により、たとえば図3に関連して上に記載したプログラム化可能なコンピューター上で実行された際に、本発明方法を実行することができるコンピュータープログラム製品が開示される。上述のように、本明細書に記述される主題は、所望される構成に依存するシステム、装置、方法、および/または、品物において具現化され得る。これらの様々な実現形態には、少なくとも1つのプログラム化可能なプロセッサ（それらは、特殊用途または汎用用途であっても良く、ならびに、少なくとも1つのインプットデバイス（たとえば、ビデオカメラ、マイクロホン、ジョイスティック、キーボードおよび/またはマウス）、および少なくとも1つのアウトプットデバイス（たとえば、ディスプレイモニター、プリンター等）での、保存システムからのデータおよび指示の受け取り、およびデータおよび指示を移転するために連結されてもよい）を含む、プログラム化可能なシステム上での実行および/または解釈が可能である、1つ以上のコンピュータープログラムにお

10

20

30

40

50

る実現形態が含まれ得る。

【0248】

コンピュータプログラム（プログラム、ソフトウェア、ソフトウェアアプリケーション、アプリケーション、コンポーネントまたコードとしても知られる）には、プログラム化可能なプロセッサに対する指示が含まれ、ならびに、抗レベルの手続き型および/またはオブジェクト指向性のプログラム言語、および/または、アセンブリ/マシン語で実現され得る。本明細書において、「機器読み取り可能な媒体」という用語（たとえば、「コンピュータ読み取り可能な媒体」）は、機器読み取り可能なシグナルとして機器の命令を受け取る、機器読み取り可能な媒体を含む、プログラム化可能なプロセッサに機器の命令および/またはデータを提示するために用いられる、任意のコンピュータプログラム製品、装置および/またはデバイス（たとえば、磁気ディスク、光学ディスク、メモリー等）を指す。ある特定の実施形態によれば、機器読み取り可能な媒体は、非一時的なものである（たとえば、一時的な波長またはシグナルではない、機器読み取り可能な媒体等）。

10

【0249】

本発明の態様は、少なくとも部分的に、ソフトウェア、ハードウェア、ファームウェア、またはそれらの任意の組み合わせにおいて具現化されても良いことが、この説明から明らかとなるであろう。ゆえに、本明細書に記述される技術は、ハードウェア回路および/またはソフトウェアの任意の特定の組み合わせに限定されず、または、コンピュータもしくは他のデータプロセッシングシステムにより実行される指示の任意の特定の源に限定されない。むしろ、これらの技術は、たとえば、マイクロプロセッサ等の、メモリーまたは他のコンピュータ読み取り可能な媒体（たとえば、非一時的なコンピュータ読み取り可能な媒体）（ROM、RAM、キャッシュメモリー、ネットワークメモリー、フロッピーディスク、ハードドライブディスク（HDD）、固体素子（SSD）、光学ディスク、CD-ROMおよび磁性光学ディスク、EPROM、EEPROM、フラッシュメモリー、または電子的フォーマットでの指示の保存に適した他の任意のタイプの媒体を含む）において保存された一連の指示を実行するプロセッサの1つ以上に応答して、コンピュータシステムまたは他のデータプロセッシングシステムにおいて実行されても良い。

20

【0250】

さらに、プロセッサ（複数含む）は、1以上のプログラム化可能な汎用マイクロプロセッサまたは特種用途のマイクロプロセッサ、デジタルシグナルプロセッサ（DSP）、プログラム化可能なコントローラー、アプリケーション特定の集積回路（ASIC）、プログラム化可能な論理デバイス（PLD）、トラステッドプラットフォームモジュール（TPM）等、またはそのようなデバイスの組み合わせを含んでも良い。別の実施形態において、たとえば論理回路または他の配線電気回路等の、特殊用途のハードウェアをソフトウェアの指示と組み合わせ使用し、本明細書に記述される技術を実現しても良い。

30

【0251】

方法結果のアプリケーションの例

本発明方法により、対照のケアに関しての決定を促進するために適用することができる、結果が提示される。以下に例を示す。

40

【0252】

アッセイにより誘導される治療および、治療のモニタリング

本発明方法は、臨床医による対象の治療方針の決定（たとえば、本方法の結果が、対象がAIH、PSC、またはPBCの炎症性肝疾患の治療に対する治療的介入から利益を得られるかどうか）を容易にさせることができる。たとえば、本方法の結果に基づき、対象が、AIH、PBCおよびPSCのうちの1つ以上の炎症性肝疾患を有しているか、もしくはリスクがあるか、または、AIH、PBCおよびPSCのうちの1以上の肝疾患を有しているか、もしくはリスクがあるか、または、AIHを有しているか、もしくはリスクがあるか、または、PBCを有しているか、もしくはリスクがあるか、または、PSCを有しているか、もしくはリスクがあるか、の可能性に基づいて、当該対象に対する治療を

50

選択することができる。臨床兆候、症状、および、たとえばウイルス性肝炎（たとえば、HVC）の有無等の他の因子もまた、治療選択を容易にするとみなされうる。

【0253】

本方法結果は、炎症性肝疾患の治療のための、任意の両方を行うべきか否かに関して、臨床医を導くことができる。

【0254】

本発明方法は、治療を受けている対象の療法のモニタリングを容易にすることができる。たとえば、対象がすでに治療を受けている場合において、本方法は、療法をモニタリングする方法を提示する。この場合において、本方法結果は、患者が治療による適切な利益を得ていない場合（たとえば、患者が療法に应答していない等）の、療法の調節（たとえば、療法を継続するか否か（再発防止に関して））、投与量の増減、治療レジメンの変更（たとえば、単剤療法から併用療法へ、または、非外科的療法から外科的療法へ）において、臨床医を導くことができる。療法をモニタリングするそのような方法は、たとえば、指示された薬剤レジメンの継続投与を行うか否か、また、患者が肝移植を受けるべきか否か当の、さらなる治療方針の決定の誘導に有用である。本発明のアルゴリズムを用いた療法のモニタリング方法は、対象が療法に应答するか否か（対象が「レスポnder」であるか否か）、または、十分な治療上の有益な应答を示すことが無いか否か、を分析する他の方法と組み合わせて用いても良い。たとえば、患者がPBCと診断されている場合、ウルソデオキシコール酸（UDCA）に应答する患者は、治療の初年後、アルカリホスファターゼ（AP）が十分に減少する。

10

20

【0255】

本発明方法は、PBCの診断が示されている場合の療法の選択において有用でありうる。PBCに対する標準的なケアは、UDCAの投与である。肝移植は、対象が肝不全のリスクがある場合に、適応される。本発明方法を用いて、PBC患者に対し、非外科的療法の有効性をモニターしてもよい。PBCの診断が持続する場合、臨床医は、患者を外科的に治療する決定を行うことを含む、療法（たとえば、一回投与量、用量および/または療法のタイプ（たとえば、併用療法か、単剤療法か））を修正することについて、誘導されうる。

【0256】

本発明方法は、PSCの診断が示されている場合の療法の選択において有用でありうる。近年は、少なくとも部分的には治療エンドポイントの欠落により、有効性が証明されている利用可能な非外科的治療的療法が無く、同様に、本発明方法まで、診断方法が無い状態である。ゆえに、PSCの診断が示されている場合、臨床医は、たとえば患者の他の兆候および症状の重篤度当の他の因子により、患者を外科的に治療することについて、誘導されうる。一般的に、PSC患者の肝臓が機能している限りにおいて、一時的緩和と対症療法が行われる（抗生物質治療および一時的緩和のための外科的胆道ドレナージ、内視鏡的拡張術およびステント留置を含む）。あるいは、またはさらに、臨床医は、患者の非外科的な治療を選択し、本発明方法を用いて治療有効性をモニターしても良い。非外科的治療には、症状（たとえば、掻痒等）緩和のためのUDCA、コレスチラミン、および/または、ヒドロキシジン HCLの投与が含まれうる。抗生物質の投与は、感染性胆管炎が疑われる場合において、指示されても良い。しかしながら、患者が肝不全のリスクがあるような疾患の進行がある場合には、肝移植が指示される。

30

40

【0257】

AIHにおいては、たとえば、アザチオプリンと共に、またはアザチオプリン無しで、コルチコステロイド（たとえば、プレドニゾンまたはプレドニゾン等）等の免疫抑制剤を投与し、疾患を制御することができる。肝硬変を伴わない場合においては、局所ステロイドブデソニドが投与されても良い。免疫抑制治療に関連した副作用があるため、治療前に確定診断が為されることが望ましい。患者の約40%が、完全寛解（6～12か月の間、正常血清トランスアミナーゼ（ALTおよびAST）および正常IgGレベルを意味する）に達する。治療的チャレンジは、いわゆる、プレドニゾン+/-アザチオプリンで

50

の標準的な治療に対して非応答性のA I Hである。治療は、少なくとも2～3年、寛解期に継続されなければならない、組織学的検査により疾患の活動が抑えられていることを確認するために、肝生検を行わなければならない；さもなければ、患者は、治療の中断後、再発する。患者の80%までが再発を経験しており、その後、免疫抑制治療を再び開始しなければならない。ゆえに、本発明方法には、治療に対する応答性をモニターし、再発リスクを減少させる用途が見いだされる。もし患者が、本明細書に開示される診断方法のアルゴリズムの使用により示唆される再発のリスクがある場合、臨床医は、治療を再開するよう誘導され、外科的介入（たとえば、肝移植）を指示しても良い。

【0258】

臨床試験群対象の特定

本発明方法には、対象が、A I H、P B CまたはP S Cのうちの1以上を有する可能性に基づいた、臨床試験への参加または除外に適した対象の特定における用途が見出される。たとえば、本発明方法を用いて、P S C、P B CまたはA I Hのうちの1以上の治療に対する薬剤の有効性を評価するための臨床試験への参加に適した対象を特定してもよく、それにより、これらの疾患を1つも有していない対象が除外される。他の例において、本発明方法を用いて、P S C、P B CまたはA I Hのうちの1つ以上を有する対象を特定し、そのような対象を臨床試験から除外しても良い（たとえば、臨床試験がP S C、P B CまたはA I H以外の疾患に対する薬剤の有効性を評価するためのものである場合）。他の例において、本発明方法を用いて、P B Cの治療に対する薬剤の有効性を評価するための臨床試験への参加に適した対象を特定してもよく、それにより、A I HまたはP S Cを有する対象が除外される。後者の実施形態において、P B Cの診断は、他の方法によりさらに確認されてもよい（たとえば、患者群がP B Cを有していない可能性が高い、他の炎症性肝疾患の除外等による）。そのような方法により、A I H、P S CまたはP B Cのうちの1以上の治療に対する薬剤または他の療法の特定が促進されうる。

【0259】

キット

本発明のキットには、E 3、E 1、M D Cおよび/またはI L - 1 5のそれぞれに対する1以上、2以上、3以上の結合試薬（複数含む）が含まれ得る。結合試薬は、たとえば、バイオマーカーに特異的に結合する抗体（たとえば、抗E 3抗体、抗E 1抗体、および抗M D C抗体、抗I L - 1 5抗体）であっても良い。いくつかの実施形態において、キットには、E 3に対する結合試薬およびA Pの検出のための試薬（複数含む）が含まれる。A Pの検出のための試薬（複数含む）は、A Pの酵素活性、または結合試薬（たとえば、抗A P抗体）を検出するための試薬（複数含む）であっても良い。本明細書において「結合試薬」とは、捕捉試薬および検出試薬の療法を包含する。「捕捉試薬」とは、たとえば、各バイオマーカーに対する試料の富化における使用に適したバイオマーカーに対する結合パートナーを指す（たとえば、抗バイオマーカー抗体）。捕捉試薬に抗体が含有される場合、当該抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であっても良い。「検出試薬」とは、固定されたバイオマーカーの検出における使用に適したバイオマーカーに対する結合パートナーを指し（たとえば、抗バイオマーカー抗体）、任意選択的に、検出可能に標識される。検出試薬に抗体が含有される場合、当該抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であっても良い。キットはさらに、検出試薬の結合の検出のための1以上の試薬を含んでも良い（たとえば、抗バイオマーカー結合試薬/バイオマーカー複合体に結合する場合等の、抗バイオマーカー抗体の検出）。

【0260】

キットに、A Pの検出のための試薬（複数含む）が含まれる場合、当該キットには、試料中のA Pの酵素活性の検出（たとえば、有機リン酸エステル基質（たとえば、ニトロフェニルホスフェート）等のA P基質の開裂の検出による）を容易にするための1以上の試薬が含まれ得る。A P酵素活性の検出のためのキットは市販されている。たとえば、S Y N C H R O N（登録商標）S y s t e mと共に用いられるA l k a l i n e P h o s p h a t a s e R e a g e n t（C a t # R E F 4 4 2 6 7 0）（B e c k m a n

10

20

30

40

50

C o u l t e rより販売)には、A P酵素活性の検出のための、有機リン酸エステル基質、p - ニトロフェニルホスフェートが含まれている。無色のp - ニトロフェニルホスフェート基質の開裂により、リン酸および黄色の産物、p - ニトロフェノールが産生される。たとえば、市販されているA Pアッセイキットには、A P酵素反応の産物の比色分析検出に基づいたものがある。A Pの検出のためのキットには、抗A P抗体(たとえば、抗A Pモノクローナル抗体)が含まれても良く、生体試料中のA Pポリペプチドの検出(たとえば、生体試料のA Pと、特異的抗A P抗体の結合により形成される免疫複合体の検出による)にそれらを用いても良い。抗A P抗体は、試料中のA Pポリペプチドの固定のための捕捉試薬としても用いられても良く、免疫複合体中のA Pは、二次抗抗A P抗体を用いて検出され、または、たとえば比色アッセイを用いたA P活性の検出により検出される。

10

【0261】

キットの例としては、E 3に対する結合試薬(たとえば、抗E 3抗体)、およびE 1に対する結合試薬(たとえば、抗E 1抗体); E 3に対する結合試薬(たとえば、抗E 3抗体)、E 1に対する結合試薬(たとえば、抗E 1抗体)、およびM D Cに対する結合試薬(たとえば、抗M D C抗体); ならびに、E 3に対する結合試薬(たとえば、抗E 3抗体)、E 1に対する結合試薬(たとえば、抗E 1抗体)およびM D Cに対する結合試薬(たとえば、抗M D C抗体)およびI L - 1 5に対する結合試薬(たとえば、抗I L - 1 5抗体)、を有するものが含まれる。対照分析物に対する結合試薬(たとえば、対照バイオマーカー)もまた、含まれ得る。

20

【0262】

本発明のキットに備えられる捕捉試薬は、不溶性の支持体(たとえば、アレイ、ビーズおよび本明細書に記述されるもの等のアッセイ基盤)上に固定されていても良い。検出試薬には、検出可能な標識が含まれ得る。検出試薬が検出可能に標識されていない場合、キットは、検出試薬の検出のための試薬(たとえば、抗体)を含んでも良い。たとえば、キットが、E 1、E 3、M D Cおよび/または、I L - 1 5のうち2以上に対する検出試薬(たとえば、抗E 3抗体、抗E 1抗体、抗M D C抗体、および/または、抗I L - 1 5抗体)を含む場合、キットは、各抗体が結合する検出試薬に対する特異性に従って抗体が別々に標識されている、検出試薬のそれぞれに特異的な抗体を含んでも良い。キットの様々な成分は別々の容器にあっても良く、または、ある相溶性の成分は、所望の場合、1つの容器内に前もって混合されていても良い。

30

【0263】

キットは、本発明方法の実施のための、キットの構成要素を用いることに対する説明書を含んでも良い。当該説明書は通常、適切な記録媒体(たとえば、紙、プラスチック、電子記憶媒体等)に記録されている。たとえば、当該説明書は、添付文書としてキット内に、キットまたはその部品の容器(パッケージまたはサブパッケージに関連した)のラベル等で存在しても良い。他の実施形態において、当該説明書は、適切なコンピューター読み取り可能な記憶媒体(たとえば、コンパクトディスク読み取り専用メモリー(C D - R O M)、デジタル多用途ディスク(D V D)、ディスク等)上に存在する電子的保存データファイルとして存在しても良い。他の例においては、備えられる説明書は、アッセイの詳細の多く、または全ては含まないが、たとえばインターネット等を介して、詳細な説明書を得るための遠隔源に関する指示を提示するものである。

40

【0264】

治療方法

本発明は、E 3のアンタゴニストおよび/またはE 3受容体のアンタゴニストの有効量を、その必要のある対象に対し投与することによる、A I H、P B CおよびP S Cを治療する方法を提示する。また、E 1のアンタゴニストおよび/またはE 1受容体のアンタゴニストの有効量を(任意選択的に、E 3のアンタゴニストおよび/またはE 3受容体のアンタゴニストと組み合わせる)、その必要のある対象に投与することによる、P S Cの治療方法が提示される。本発明はまた、I L - 1 5のアンタゴニストおよび/またはI L -

50

15 受容体のアンタゴニストの有効量を（任意選択的に、E3のアンタゴニストおよび/またはE3受容体のアンタゴニストと組み合わせる）、その必要のある対象に投与することによる、AIHの治療方法が提示される。

【0265】

本明細書において、「アンタゴニスト」とは、標的の活性を減少または阻害する薬剤（たとえば、抗体）を指す。代表的なアンタゴニストとしては、限定されないが、抗体（抗原結合抗体を含む）、核酸（たとえば、リボザイムおよびRNA干渉剤等のアンチセンス分子）、免疫複合体（たとえば、治療剤と複合体化した抗体）、小分子薬剤阻害物質、融合タンパク質、アプタマー等が挙げられる。標的（たとえば、E1および/またはE3）の活性の減少は、たとえば、血流中、または対象のE3産生組織もしくはE1産生組織に存在する活性標的の量の減少、および/または、標的の活性の減少により達成されうる。

10

【0266】

1つの実施形態において、アンタゴニストは、E1（たとえば、米国特許第6,946,546号）、E3、E1受容体および/またはE3受容体に特異的に結合し、作用を阻害する抗体、または抗体の抗原結合断片である。

【0267】

他の実施形態において、E1、E3、E1受容体および/またはE3受容体アンタゴニストは小分子である。本明細書において、「小分子」とは、たとえば、750ダルトン未満（700ダルトン未満の分子を含む）の、約1000ダルトン未満の分子量であり、E1またはE3の活性を阻害する、合成化学分子を指す。

20

【0268】

他の実施形態において、E1またはE3アンタゴニストは、E1またはE3をコードするmRNA、またはそのmRNAの一部に対して相補的なアンチセンス核酸分子（たとえば、アンチセンスRNA、サイレンシングRNA（siRNA）、短ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、または他の対象の核酸分子）、または、そのような核酸分子をコードする組換え発現ベクターである。本明細書において、「アンチセンス」RNA、siRNA、shRNAまたはmiRNA核酸は、E3またはE1をコードする遺伝子および/またはmRNAに特異的な核酸配列を含有する。

【0269】

アンチセンス核酸は、ワトソンおよびクリックの塩基対の法則に従って設計されても良い。アンチセンス核酸分子は、E1またはE3 mRNAの全コード領域に対して相補的であっても良く、または、BMP9またはBMP10 mRNAのコード領域または非コード領域の一部のみに対して相補的であっても良い。たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、E1またはE3のmRNAの翻訳開始部位の周辺領域に対して相補的であっても良い。アンチセンスヌクレオチドは、たとえば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または、50の長さのヌクレオチドであっても良い。アンチセンス核酸は、当分野公知の方法を用いて、化学合成および酵素ライゲーション反応により構成されても良い。たとえば、アンチセンス核酸（たとえば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然型ヌクレオチド、または、アンチセンスとセンス核酸の間に形成される二本鎖の物理的安定性を増加させるため、もしくは、分子の生物学的安定性を増加させるために設計された、様々な修飾ヌクレオチドを用いて化学的に合成されても良い（たとえば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを用いても良い）。アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクロニングされている発現ベクターを用いて生物学的に産生されても良い（挿入核酸から転写されたRNAが、対象の標的核酸のアンチセンス方向になるように）。

30

40

【0270】

E1またはE3のアンタゴニストには、RNA干渉剤（RNAi）が含まれ、それらには、限定されないが、E1またはE3に相同なRNA分子を含む核酸分子、「低分子干渉RNA」（siRNA）、「短ヘアピンRNA」（shRNA）、およびRNA干渉（RNAi）により標的遺伝子の発現に干渉、または阻害する小分子が含まれる。RNA干渉

50

は、二本鎖RNA (dsRNA) を用いて、dsRNAと同じ配列を含有するメッセンジャーRNA (mRNA) を分解する、翻訳後の標的遺伝子サイレンシング技術である。

【0271】

概して、本治療方法には、AIH、PBCまたはPSCのうちの1つ以上を有する対象を特定すること、および、E1アンタゴニスト、E3アンタゴニスト、またはその両方を、患者に対し治療利益をもたらす量を投与することが含まれる。「治療利益」、「治療する」、「治療」には、少なくとも、疾患の1つ以上の症状の緩和、重篤度の減少が含まれる。治療は、任意選択的に、必要に応じてAIH、PBCまたはPSCに対する他の療法と組み合わせても良い。E1およびE3アンタゴニストは、任意の適切な経路で投与することができ、投与される剤により選択される。投与は通常、非経口投与であり、静脈内経路による注射、ならびに、組織（たとえば、対象の関連肝組織）への注射が含まれる。1つの実施形態において、E1またはE3アンタゴニストは、静脈内注射により投与され、および、肝臓への送達のために、（たとえば、肝動脈を介して）注射により投与されても良い。

10

【実施例】

【0272】

以下の実施例は、本発明をどのように作製し、および使用するかについて、当業者に完全に開示および記述するために示されるものであり、発明者らが自らの発明であるとみなす範囲を限定する意図はなく、以下の実験は、行われた全ての実験を示す、またはそれらのみが行われた実験であることを示すことを意図しているものでもない。用いられた数字（たとえば、量、温度等）に関して、正確性を心掛けているが、いくらかの実験誤差および偏差を考慮するべきである。他で示さない限り、部分は、重量による部分であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度はセ氏であり、圧力は、大気圧か、または大気圧に近いものである。

20

【0273】

実施例1：サイトカイン/ケモカインの分析

血清試料は、健常者およびHCV、AIH、PBCまたはPSCと診断された患者から採取し、サイトカイン/ケモカインのレベルに対して評価した。

【0274】

各群の患者数は、50人の健常対照、54人のHCV感染患者、80人のPSC患者（PSCのみを有する20人の患者と、潰瘍性結腸炎（UC）とPSCを有する22人の患者、PSCおよびCD（クローン病）を有する16人の患者、PSC+AIHを有する13人の患者、ならびに、PSC、UCおよびAIHを有する9人の患者）、PBCを有する50人の患者、AIHを有する40人の患者であった。HCVの診断は、血清学的、およびPCRに基づいた。PSC、UC、CDおよびAIHの診断は、診察およびパラクリニカル検査（PBCに対するAMAの検査、およびAIHに対する他の自己抗体の検査、ならびに、PSCに対するERC/MRCの検査、ならびに、一部の例においては、肝病理を含んでも良い）により為された。すべてのHCV患者は、治療に対し不応性、または治療適応ではない、のいずれかである、慢性HCV患者であった。PSCは、実験群の80%までの症例でUCを併発しているため、IBDを伴うPSC患者およびIBDを伴わないPSC患者を、1つの患者群として含めたが、AIHを伴う患者は除外した。26のサイトカインおよびケモカインを検証し、すべての試料は二重で用いた。

30

40

【0275】

試料は、高い検出感度、広いダイナミックレンジ、ならびに、期待濃度領域内での直線的な標準曲線をもたらす、マルチプレックスELISAキット（Meso Scale Discovery Company（MSD；Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA））を用いて分析した。全ての実験は、メーカーの説明書に従い、最小限の改変と最適化により行った。

【0276】

簡潔に述べると、ブロッキング溶液Diluent 2（MSD）で、Multiple

50

×プレート(MSD)をインキュベートした後、標準物および試料を、96ウェルプレート内に分注し、室温で3時間、継続的に振とうしながらインキュベートした。プレートを洗浄し、Anti-cytokine Antibodies Cocktail Labeled with SULFO-TAG(MSD)とさらに3時間インキュベートし、次いで、洗浄し、2X Read Buffer T(MSD)を加えた。次いで、プレートを、SECTOR Imager 6000 Reader(MSD)によりスキャンし、結果を分析して、得られた濃度を希釈に対して修正した。

【0277】

分析の後、結果を比較し、健常対照、HCV、AIH、PBCおよびPSC群の間で統計的有意差を示すサイトカイン/ケモカインを特定した。有意差が、エオタキシン1(E1、CCL11としてもまた知られる)、エオタキシン3(E3、CCL26としてもまた知られる)、マクロファージ由来ケモカイン(MDC、CCL22としてもまた知られる)およびインターロイキン-15の結成レベルに対して特定された。結果をそれぞれ、図2のパネルA~Dに示す。

【0278】

すべてのサイトカインおよびケモカインに関するHCV患者の結果は、文献において従前に報告されたものとほとんど矛盾しておらず、ゆえに、本アッセイの有効性および再現性が確認された。

【0279】

実施例2: E3、E1、MDCおよびIL-15の血清レベルの分析

実施例1から得られたデータを、統計分析に供した。選択された条件間(たとえば、対照(たとえば、健常者またはHCV感染者)と少なくともAIH、PBCおよび/またはPSCである肝疾患の間)を区別するために、異なる閾値を選択した。

【0280】

図3~8において、本分析結果を要約した表を示す。パーセンテージの値は、縦列の一番上で設定された基準に合致する、行の群の個々のパーセンテージを示す。パーセンテージの左に隣接する列の値は、検証した総数(一番下の値)のうちの陽性(一番上の値)であった各群中の個々の数を示す。「対照/HCV」は、健常対照群およびHCV感染群中の患者が組み合わされたことを示す。「PSC、PBCまたはAIH」は、AIH、PBC、およびPSCを有するすべての患者の組み合わせを指す。「PSC+/IBD+/AIH」には、PSCのみを有する、IBDを伴う、または伴わないPSC、および、AIHを伴う、または伴わないPSC患者を含めた。「PSCのみ」には、PSCのみの診断を受けたが、他の肝疾患の併存が無い患者を含めた。「PSC+/IBD、AIH無し」は、PSCのみ、ならびに、UCを伴うPSCを有するもの、または、CDを伴うが、AIHの併存疾患が無いPSCを含めた。「PSC+AIH、IBD無し」は、AIHが併発しているが、IBDは伴わないPSC患者を含めた。

【0281】

E1およびE3の血清濃度は、検証したすべての患者群の間で著しく異なっていた。ゆえに、E1およびE3は、1)健常対照およびHCV患者から、AIH、PBCおよびPSCを識別すること、および、2)AIHおよびPBCからPSCを区別すること、に対する診断バイオマーカーとして有用である。

【0282】

図3の表に示されるように、E3に対し、25pg/ml血清を超えるカットオフ値の場合には、感度89%、特異度93%で、健常対照およびHCV患者から、AIH、PBCおよびPSCが識別される。E3に対し28pg/ml血清を超えるカットオフ値の場合には、感度85%、特異度95%で健常対照およびHCV患者から、AIH、PBCおよびPSCが識別される。

【0283】

図3に示されるように、以下のアルゴリズムを用いることにより、PSCは、AIHおよびPBCから識別されうる：

10

20

30

40

50

【0284】

$E3 > 25 + E1 / E3 > 15 + MDC > 2800$

【0285】

(25 pg/ml 血清を超える E3 血清濃度、15 を超える、E1 血清濃度と E3 濃度の比率 (E1 / E3 比)、および、2800 pg/ml 血清を超える MDC 血清濃度)。このアルゴリズムは、HCV および健常対照から PSC を識別し、および、AIH および PBC から識別した (それぞれ、72 ~ 75 % の管度、および 92 ~ 96 % の特異度)。

【0286】

図3に示されるように、以下のアルゴリズムにデータを適用することにより、AIHは、対照およびPBCから識別されうる：

【0287】

$E3 > 25 + E1 / E3 < 15 + MDC > 1870 + IL - 15 > 2.4 \text{ pg/ml}$

【0288】

(25 pg/ml を超える E3 血清濃度、15 未満の E1 / E3 血清濃度の比、1870 pg/ml を超える MDC 血清濃度、および、2.4 pg/ml を超える IL - 15 血清濃度)。このアルゴリズムにより、健常対照、HCV および PSC に対し、95 ~ 100 % の高い特異度、ならびに、PBC に対し 90 % の特異度で、AIH に対し 60 % の感度を示した。

【0289】

図4において、対照 (健常者およびHCV感染者を含む) に対する、AIH、PBC および / または PSC の肝疾患の診断を容易にするために、異なるカットオフ (または閾値) E3 血清濃度を用いた分析結果の要約を示す。図4の一番上のパネルは、 $E3 > 18$ 、 $E3 > 20$ 、 $E3 > 23$ 、 $E3 > 25$ 、 $E3 > 28$ 、 $E3 > 30$ 、 $E3 > 35$ 、 $E3 > 40$ 、および、 $E3 > 45$ の E3 対照値を用いた結果を示す。図4の一番下のパネルは、図4の一番上のパネルの結果のより詳細な分析を示す。

【0290】

図5は、様々な対照 E1 / E3 比の値での、様々な E3 対照値を用いた、分析結果の要約を示す。

【0291】

図6は、様々な E3 対照値、様々な対照 E1 / E3 比の値、および、様々な MDC 対照値を用いた分析結果の要約を示す。

【0292】

図7は、 $(E3 / E1 \times 100)$ 値を用いた分析結果の要約を示す。

【0293】

図8は、1870 pg/ml の MDC 値と併せた、様々な E3 対照値、様々な対照 E1 / E3 比の値、および、様々な IL - 15 対照値を用いた分析結果の要約を示す。

【0294】

さらに、以下のアルゴリズム：

【0295】

$(E3 > 29) + (E1 / E3 \text{ 比} < 15) + (IL - 15 > 1.7)$

【0296】

は、健常対照および PSC から、AIH を、感度 75 %、および特異度はそれぞれ 100 % および 98 % で識別した。このアルゴリズムは AIH に対する感度を上げたが、AIH に対する他のアルゴリズムよりも単純である一方、PBC および慢性 C 型肝炎に対する特異度はやや低く、しかし、AMA テストを行い、たとえば HAV、HBV、HCV、HDV、HEV、EBV および CMV 等のウイルスに対する標準的な診断を用いてウイルス性肝炎が除外される場合には、実用的でありうる。

【0297】

実施例 3 : ROC 曲線分析

10

20

30

40

50

実施例 1 から得たデータを、Prism (GraphPad Prism Version 5.00, Prism Software Corporation, Irvine, CA, USA) を用いた分析に供し、受信者 - 操作者曲線 (ROC) を作成した。ROC 曲線は、特定のテストに対する感度と特異度の間の関連性を示す標準的な方法であり、たとえば、正常と異常由来の値を比較する際等の、所望される感度および特異度の値に関するガイダンスを提示する。Prism を用いて、健常対照 (図 9 ~ 13 のそれぞれの左側) に対する、PBC および AIH の様々なカットオフでの、ならびに、HCV (図 9 ~ 13 のそれぞれの右側) に対する、PSC、PBC および AIH の様々なカットオフでの、HCV、PSC、E3、E1、MDC および IL-15 のそれぞれの感度および特異度に対する ROC 曲線を作成した。Prism は、カットオフ値としてのデータ表中の各値を用いて、感度および特異度の多くの対を自動的に算出する。我々の計算における、可能性のある各カットオフに対する信頼区間は 95% である。

【0298】

ROC 曲線の曲線下面積 (AUC) は、疾患を有する者および有しない者の間を識別する本テストの全体的な能力を定量し、有用ではないテストは、0.5 の AUC となり、「完璧」な場合には、AUC は 1 となる。たとえば、AUC が 0.90 の場合、患者は、対照の 90% よりもより以上なテスト結果を有するということになる。Prism ソフトウェアでは、もし面積が 0.50 未満と最初に算出された場合には、異常の定義を最も高いテスト値から最も低いテスト値へと反転させるため、ROC 曲線の AUC は、0.50 未満となることは無い。これらの結果は、非パラメトリックの手法 (患者群および対照群におけるテスト結果の分散に関する過程は何も作成されない) によりコンピューターで計算される (Hanley, J.A., and McNeil, B. J. 1982. Radiology 143:29-36)。

【0299】

ROC に対する AUC は、0.5 よりも大きく、AUC の値は、グラフの中心に示されている。健常対照 (対照) に対する HCV 感染者 (HCV) の比較を行った ROC の AUC は、比較目的で、対照として示されている。

【0300】

実施例 4 : アッセイ精度の評価

診断テストの精度の評価は、本テストの質および実用性を表すことができる特性のうちの 1 つである。本目的に対するまさに普遍的な 2 つのツールとしての感度と特異度に加え、精度を、陽性予測値および陰性予測値 (PPV および NPV)、または、陽性診断および陰性診断の尤度比 (PDLR および NDLR、または短く PLR および NLR) を通して、表すことができる。これらのツールは、新しい診断が提供された際に、臨床医が尋ねうる普遍的な疑問に答えることができるものである。それらの疑問は、1) 陽性または陰性テストの場合において、疾患の存在の有無の可能性はそれぞれどのくらいか? ; および、2) 本テストが、どのようにして、さらなる診断評価を減らすために、診療または他のテストに基づいた診断のテスト前確率を上げるか、である。

【0301】

テストの PPV は、個人に陽性結果が見られた際の疾患の存在の確率を表し、テストの NPV は、個人に陰性結果が見られた際の疾患の非存在の確率を表す。本質的に、PPV および NPV は、疾患の有病率に依存している ; DLR の使用は、疾患の有病率から独立しており、特に稀な疾患のケースにおいて重要であるため、DLR の使用はより関連したツールとなりうる。

【0302】

DLR は、診断テスト性能の評価基準である。テストの感度および特異度から算出され、度数で表現され、個人における診断のオッズ比は、テスト結果により修正される。たとえば、PLR は、所与の個人における疾患のオッズ比を増加させるテストの検出力を表し ; 一方で、NLR は、当該個人における疾患のオッズ比を減少させるテストの検出力を表す。PLR は、1 ~ + 無限大の範囲にあり、NLR は、0 ~ 1 の範囲にある。臨床的に有用ではないテストは、1 の PLR および NLR を有し、テストを実施しても、疾患のテス

10

20

30

40

50

ト前のオッズ比をその結果が有意に変えることは無いため、疾患診断の助けとはならないことを意味する。

【0303】

概して、テストの P L R 値が 10 を超える場合、当該テストは、陽性結果の後、臨床医に対して受容可能な値にまで疾患の存在のテスト前オッズを効率的に増加させる。つまり、当該テストは、診断が所望される疾患を有するとして、健常者を検出することが無いことを意味する。対照的に、0.2 またはそれより小さい N L R の値は、健常者群中の疾患の存在の可能性を有意に減少させる。テストが高い P L R を有する場合、さらなる介入を実施する患者として確信をもって個人を分類し、および、健常者を確実に治療しないようにするため、臨床医は、N L R よりも P L R のほうがより重要であると考えらるであろう。高い P L R のテストはまた、さらなる診断評価（高価で、より侵襲的でありうる）を必要とする個人の数を減少させうる。

10

【0304】

以下に、本実施例において記述される診断アルゴリズムの例に関して、P P V、N P V、P L R および N L R を検証した。感度、特異度、P R V、N P V、P L R、および N L R に対する値は、図 14 の表に詳述する。そこで算出されているように、E 3 に対する陽性結果（E 3 > 28；縦列 1）は、個人が P S C、P B C、または A I H のうちの 1 つを有していることを、98% の高い可能性（P P V；縦列 4；行 1～3）で示している。同様に、陰性のテスト結果（E 3 < 28）は、個人が P S C、P B C、または A I H のうちの任意のものを有していることを、それぞれ、80%、86% または 100% の可能性で示している。ゆえに、健常または A I H 症例でありうる個人の結成における E 3 の測定を行った後、もし E 3 > 28 であれば、臨床医は、確信をもって患者が A I H を有していると結論付けることができ、もし E 3 < 28 であれば、A I H を有している可能性は全くないと結論づけることができる。

20

【0305】

A I H に対する診断としての E 3 濃度の分析により、P L R に対しては 50 の値（縦列 6；行 3）および N L R に対してはゼロ（縦列 8；行 3）の値が示された。これは、A I H に対するテスト前オッズ比が、陽性テスト結果（E 3 > 28）に対し 50 倍、および陰性テスト結果（E 3 < 28）に対しゼロ倍することを意味する。どのように本テストに実施により A I H の可能性が増加するかを理解するために、これを可能性の値へと転換するために、1：1 のテスト前オッズ比（50% の可能性と等しい）を例として用いた。テスト実施の後、陽性テスト結果（E 3 < 28）に対しては、テスト後オッズ比は 50：1 にまで増加し、これは、98% の可能性と等しい（縦列 7；行 3）。同様に、陰性テスト結果（E 3 > 28）に対しては、テスト後のオッズ比は、0：1 にまで減少し、これは、0% の可能性の値に等しい（縦列 9；行 3）。

30

【0306】

縦列 7 および 9 の他の値もまた、1：1 の出過ぎたテスト前オッズ比による、他のアルゴリズムに対するテスト後の可能性の値を示す（50% のテスト前可能性値に等しい）。簡潔に述べると、我々のすべての診断アルゴリズムは、50% の診断前可能性値を、陽性テスト結果に対しては 95% から 100% の値へと増加させることができ、および、陰性テスト結果に対しては、0%～29% へと減少させることができる。この分析により、健常者よりも患者を特異的に検出するための、これらの診断テスト/アルゴリズムの重要さが裏付けられる（陽性結果が見られた場合；P L R）。これにより、患者と識別された者を治療することに対する確実性がもたらされ、さらなる診断評価（一部は侵襲的で高価である）の必要性のある個人の数が大幅に減少される。

40

【0307】

実施例 5：E 3 およびアルカリホスファターゼ（A P）の分析

血清中のアルカリホスファターゼ（A P）のレベルの測定は、多くの場合、肝疾患の症状を示す患者に対する初期精密検査パネルに含まれている。A P レベルは、疾患全体で一定して上昇しているわけではないが、A P レベルは通常、肝疾患の胆汁うっ滞型の指標で

50

ある。ゆえに、APレベルの単独検出は通常、たとえばPSC等の疾患の確定診断には不十分である。E3レベルが、慢性C型肝炎(CHC)患者および健常対照(HCs)と比較して、PSC患者において有意に上昇していることが示されたことから、実験は、E3およびAPの検出が、PSCの診断をさらに促進するかどうかを決定するために行われた。

【0308】

本実験において、総APレベルおよびE3レベルを、PSCを有する患者由来の血清試料中で測定した。APレベルは、AP酵素活性の検出のための酵素アッセイを用いて、総APとして分析した。APの正常(対照)範囲は、男性で40~129 IU/リットルであり、女性で35~104 IU/リットルである。正常レベルを超えて上昇した血清APを有する患者は、AP陽性(AP+)と表された。E3は、上述のように検出された。対照E3レベルを超える血清E3レベルは、E3陽性(E3+)と呼称される。APレベルは、4回にわたる外来診療で、患者において測定された。外来診療の間隔は、数か月から数年の間で変化した。

10

【0309】

結果を図15に示す。PSC患者の55%が、4回全ての時点でAP+であった。PSC患者の88%が、4回の時点のうち少なくとも1回で、AP+であり、4回全ての時点の平均陽性率は70%であった(図15、下のパネル)。

【0310】

対照的に、もし、 $E3 > 28 \text{ pg/ml}$ 、 $E3 > 25 \text{ pg/ml}$ 、または、 $E3 > 23 \text{ pg/ml}$ である場合、それぞれ、PSC患者の79%、84%、または88%が、高E3血清レベルにより検出された。PSC患者の97%が高いE3($E3 > 28 \text{ pg/ml}$)を有し、または、4つ全ての時点でAPが上昇しており、および、PSC患者の98%が、高いE3または少なくとも1つの時点でAPが増加していた($E3+$ または、いずれかのAP+) (図15の上のパネルおよび下のパネル)。E3は、PSCに対し高い特異度を有し、CHCおよびHCの症例における偽陽性が、それぞれたった7%および2%である。このことは、E3レベルおよびAPレベルをモニタリングすることにより、PSC患者の診断が容易になることを示唆している。本実験は、肝疾患の診断を容易にするための、標準的なマーカーセットの一部として、APと共に肝臓パネル中にE3を含めることの価値を証明している。さらに、E3が肝疾患を疑われる場合の一連の診断における、初期マーカーパネルの一部ではない場合、APレベルと共にE3レベルを評価することにより、AP単独を用いては正確な診断を逃してしまう、PSCを有する患者を特定することができる。別の言い方をすれば、AIHに対して陰性、およびPBCに対して陰性の患者において、対照E3レベルよりも高いE3レベル、および/または、対照APレベルよりも高いAPレベルは、PSC診断の指標となる。

20

30

【0311】

要約すると、E3の測定を行うことにより、健常対照およびHCV患者から、PSC、PBCおよびAIHを識別することができる。血清中のE3に対する分析、ならびに、E1血清濃度の分析、およびMDC血清レベルに加えてE1/E3比を用いることにより、さらに、PBCおよび/またはAIHからPSCを識別することができる。E3レベル、E1/E3比、およびMDCレベルに加えるパラメーターとして、IL-15血清濃度を含めることにより、PBCおよびAIHを、互いに識別することができる。最後に、PSCの診断が疑われる場合、APおよびE3のレベルを分析することにより、対照におけるPSCの正確な診断を行う可能性が高くなりうる。

40

【0312】

ケモカインおよびサイトカインのレベルにおける変化は通常、肝臓への損傷を引き起こす白血球の浸潤よりも先んずるため、これらの診断を行うことにより、より速く診断を行うことができ、それによって、患者の治療および管理に役立てることができる。さらに、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルスおよびE型肝炎ウイルスならびにEBVおよびCMVウイルスのようなウイルスに対して利用可能な

50

標準的な診断を用いて、公知のウイルスによるウイルス性肝炎が最初に除外されていれば、PBCおよびAIHからのPSCの鑑別診断は、MDCに対するカットオフ値と組み合わせたE1/E3比を用いることにより行うことができ、次いで、IL-15をアルゴリズムに加えることにより、AIHからPBCの鑑別が行われる。

【0313】

本発明は、その特定の実施形態に準拠して記述されているが、本発明の真の主旨および範囲から逸脱することなく、様々な変更を行いうること、および、均等物により置換されることが、当業者には理解される。さらに、多くの改変を行い、特定の状況、物質、組成物、プロセス、プロセスのステップ（1つまたは複数）を、本発明の目的、精神、および範囲に適合させることができる。そのようなすべての改変は、本明細書に添付される請求項の範囲内にあることが意図される。

【図1】

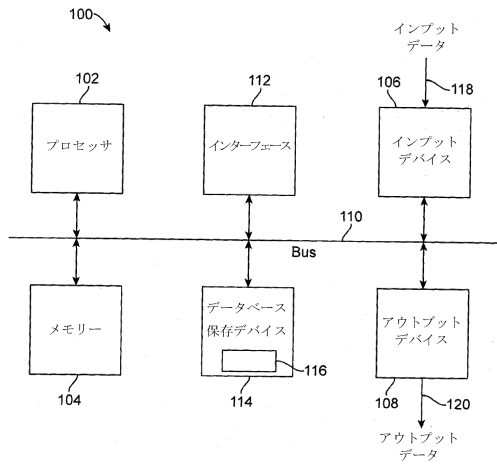


図1

【図2-1】

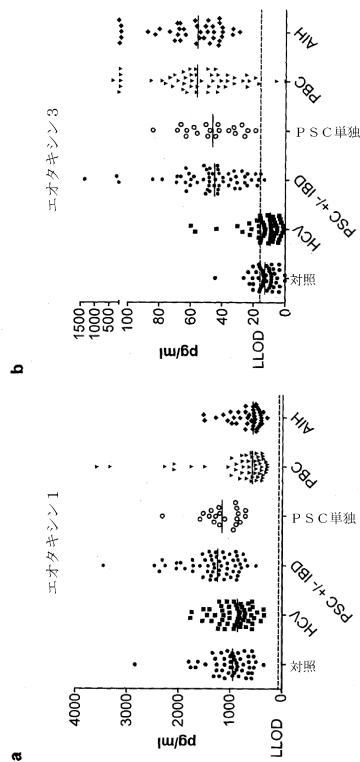


図2

【 図 2 - 2 】

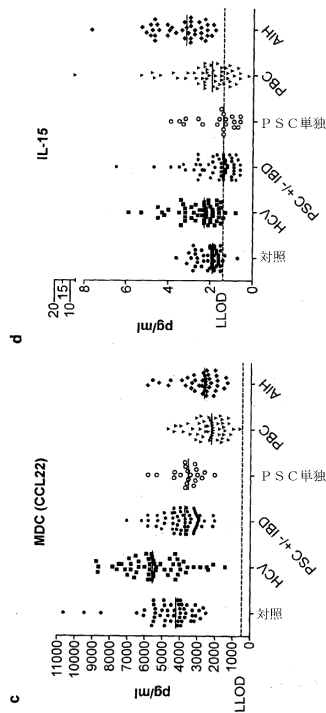


図 2 (続き)

【 図 4 】

条件	E3 > 18	E3 > 20	E3 > 23	E3 > 25	E3 > 28	E3 > 30	E3 > 35	E3 > 40	E3 > 45
対照	17	15	8	7	5	4	4	4	2
HCV	104	104	104	104	104	104	104	104	104
PSC +/- IBD +/- AIH									
PSC単独	161	145	145	152	149	140	129	121	99
PSC+AIH (IBD無)	95%	94%	85%	89%	88%	82%	76%	71%	58%
PSC+AIH +/- AIH									
PBC	170	170	170	170	170	170	170	170	170
AIH									
条件	E3 > 18	E3 > 20	E3 > 23	E3 > 25	E3 > 28	E3 > 30	E3 > 35	E3 > 40	E3 > 45
対照	50	50	50	50	50	50	50	50	50
HCV	8	8	8	8	8	8	8	8	8
PSC +/- IBD +/- AIH	74	73	72	69	63	59	52	47	37
PSC単独	100%	95%	90%	86%	79%	74%	65%	59%	46%
PSC+AIH (IBD無)	20	19	19	18	16	14	13	10	10
PSC+AIH +/- AIH	58	58	58	58	58	58	58	58	58
PSC+AIH (IBD有)	21	21	21	21	22	22	22	22	22
PSC+AIH +/- AIH	95%	92%	92%	92%	92%	84%	77%	71%	50%
PBC	40	40	40	40	40	40	40	40	40
AIH	40	40	40	40	40	40	40	40	40

図 4

【 図 3 】

条件	E3 > 28 + E1/E3 > 15 + MDC > 2800		E3 > 25 + E1/E3 > 15 + MDC > 2800		E3 > 25 + E1/E3 > 15 + MDC > 1870 + IL-15 > 2.4	
	件数	割合	件数	割合	件数	割合
対照	1	2%	1	2%	2	4%
HCV	50	50%	50	50%	50	50%
PSC +/- IBD +/- AIH	4	7%	4	7%	5	9%
PSC単独	63	79%	63	79%	69	86%
PSC+AIH (IBD無)	20	80%	20	80%	20	75%
PSC+AIH +/- AIH	16	80%	13	65%	15	75%
PSC+AIH (IBD有)	46	79%	39	67%	49	72%
PSC+AIH +/- AIH	58	79%	58	79%	58	72%
PBC	17	77%	22	41%	22	45%
AIH	10	77%	13	38%	5	38%
条件	件数	割合	件数	割合	件数	割合
対照/HCV	5	5%	7	7%	5	5%
PSC/HCV	104	104%	104	104%	104	104%
PSC群	145	85%	152	89%	145	85%
PBC	170	170%	170	170%	170	170%
AIH	40	40%	40	40%	40	40%

図 3

【 図 5 - 1 】

条件	E3 > 23 + E1/E3 > 10 + MDC > 2800		E3 > 23 + E1/E3 > 15 + MDC > 2800		E3 > 25 + E1/E3 > 10 + MDC > 2800	
	件数	割合	件数	割合	件数	割合
対照	3	6%	3	6%	2	4%
HCV	50	50%	50	50%	50	50%
PSC +/- IBD +/- AIH	56	70%	55	69%	53	66%
PSC単独	16	80%	16	80%	15	75%
PSC+AIH (IBD無)	45	78%	44	76%	43	74%
PSC+AIH +/- AIH	58	78%	58	76%	58	74%
PBC	11	50%	22	41%	10	45%
AIH	3	23%	4	31%	5	38%
条件	件数	割合	件数	割合	件数	割合
対照/HCV	3	3%	3	3%	3	3%
PSC/HCV	56	56%	55	55%	53	53%
PSC群	80	80%	80	80%	80	80%
PBC	50	50%	50	50%	50	50%
AIH	40	40%	40	40%	40	40%

図 5

【 図 5 - 2 】

条件	E3 > 25 + E1/E3 > 10 + MDC > 3000		E3 > 25 + E1/E3 > 15 + MDC > 2800		E3 > 28 + E1/E3 > 10 + MDC > 2800		E3 > 28 + E1/E3 > 15 + MDC > 2800		E3 > 28 + E1/E3 > 20 + MDC > 2800	
	2	50	2	50	1	50	1	50	1	50
対照	50	4%	50	4%	50	2%	50	2%	50	2%
HCV	54	6%	54	6%	54	4%	54	4%	54	2%
PSC +/- IBD +/- AIH	80	0%	80	65%	80	61%	80	60%	80	49%
PSC 単独	13	75%	15	75%	12	60%	13	65%	10	50%
PSC +/- IBD (AIH 無し)	39	67%	42	72%	35	60%	40	69%	32	55%
PSC+AIH +/- IBD	58	45%	58	45%	58	36%	58	36%	58	32%
PSC+AIH (IBD 無し)	5	38%	5	38%	5	31%	5	38%	4	31%
PBC	3	6%	3	6%	3	4%	3	6%	3	4%
AIH	7	18%	7	18%	7	0%	7	8%	7	0%
	40		40		40		40		40	

図 5 (続き)

【 図 6 - 1 】

条件	E3 > 23 + E1/E3 > 10 + MDC > 2800		E3 > 23 + E1/E3 > 10 + MDC > 3000		E3 > 23 + E1/E3 > 15 + MDC > 2800		E3 > 23 + E1/E3 > 15 + MDC > 3000		E3 > 25 + E1/E3 > 10 + MDC > 2800	
	3	50	3	50	3	50	3	50	2	50
対照	50	6%	50	6%	50	6%	50	6%	50	4%
HCV	54	6%	54	6%	54	6%	54	6%	54	6%
PSC +/- IBD +/- AIH	80	70%	80	70%	80	69%	80	63%	80	66%
PSC 単独	16	80%	16	75%	16	80%	15	75%	15	75%
PSC +/- IBD (AIH 無し)	20	78%	20	78%	20	69%	20	67%	20	74%
PSC+AIH +/- IBD	58	50%	58	50%	58	50%	58	50%	58	45%
PSC+AIH (IBD 無し)	3	23%	3	23%	3	23%	3	38%	5	38%
PBC	5	10%	5	10%	5	10%	5	10%	3	6%
AIH	7	18%	7	18%	7	8%	7	8%	7	18%
	40		40		40		40		40	

図 6

【 図 6 - 2 】

条件	E3 > 25 + E1/E3 > 10 + MDC > 3000		E3 > 25 + E1/E3 > 15 + MDC > 2800		E3 > 28 + E1/E3 > 15 + MDC > 2800		E3 > 28 + E1/E3 > 15 + MDC > 3000	
	2	50	2	50	1	50	1	50
対照	50	4%	50	4%	50	2%	50	2%
HCV	54	6%	54	6%	54	4%	54	4%
PSC +/- IBD +/- AIH	80	0%	80	60%	80	55%	80	55%
PSC 単独	13	75%	13	65%	13	65%	13	65%
PSC +/- IBD (AIH 無し)	39	67%	42	72%	35	60%	35	60%
PSC+AIH +/- IBD	58	45%	58	45%	58	41%	58	41%
PSC+AIH (IBD 無し)	5	38%	5	38%	3	23%	3	23%
PBC	3	6%	3	6%	3	6%	3	6%
AIH	7	18%	7	18%	7	8%	7	8%
	40		40		40		40	

図 6 (続き)

【 図 7 】

条件	E3 > 25 + (E3/E1)*100 < 7 + MDC > 2800		E3 > 25 + (E3/E1)*100 < 6 + MDC > 2800	
	2	50	2	50
対照	50	4%	50	4%
HCV	54	6%	54	4%
PSC +/- IBD +/- AIH	80	65%	80	63%
PSC 単独	15	75%	14	70%
PSC +/- IBD (AIH 無し)	42	72%	41	71%
PSC+AIH +/- IBD	10	45%	9	41%
PSC+AIH (IBD 無し)	5	38%	4	31%
PBC	3	6%	3	6%
AIH	7	18%	7	18%
	40		40	

図 7

【 図 8 】

条件	E3 > 28 + E1/E3 < 15 + MDC > 1870+IL-15 > 2.4		E3 > 28 + E1/E3 < 20 + MDC > 1870+IL-15 > 2.4		E3 > 28 + E1/E3 < 20 + MDC > 1870+IL-15 > 2.5	
	0	50	0	50	0	50
対照	0	50	0	50	0	50
HCV	0	54	1	54	1	54
PSC +/- IBD +/- AIH	1	80	6	80	6	80
PSC 単独	0	20	2	20	2	20
PSC +/- IBD (AIH 無し)	0	58	3	58	3	58
PSC+AIH +/- IBD	1	22	2	22	2	22
PSC+AIH (IBD 無し)	0	13	2	13	2	13
PBC	5	50	5	50	5	50
AIH	24	40	26	40	25	40

図 8

【 図 9 】

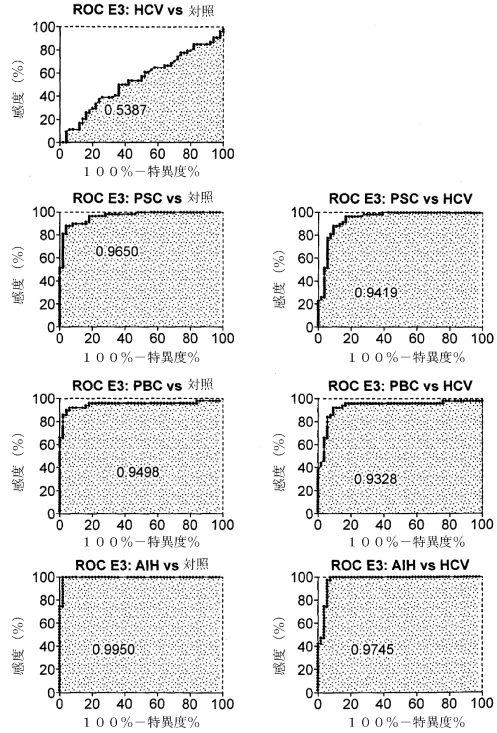


図 9

【 図 10 】

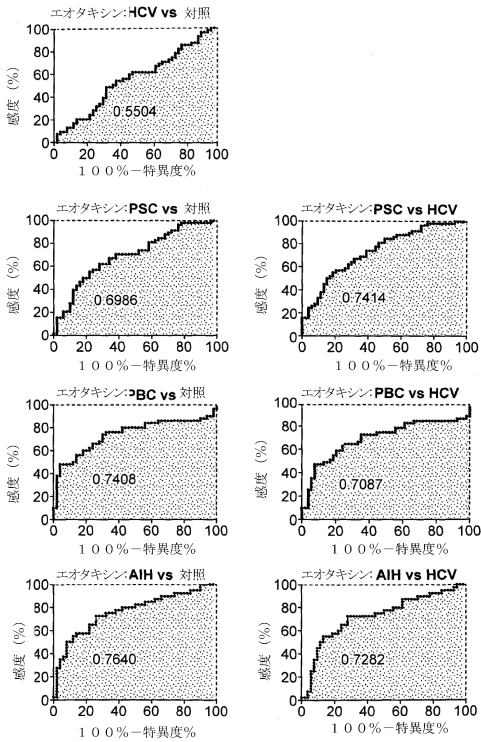


図 10

【 図 11 】

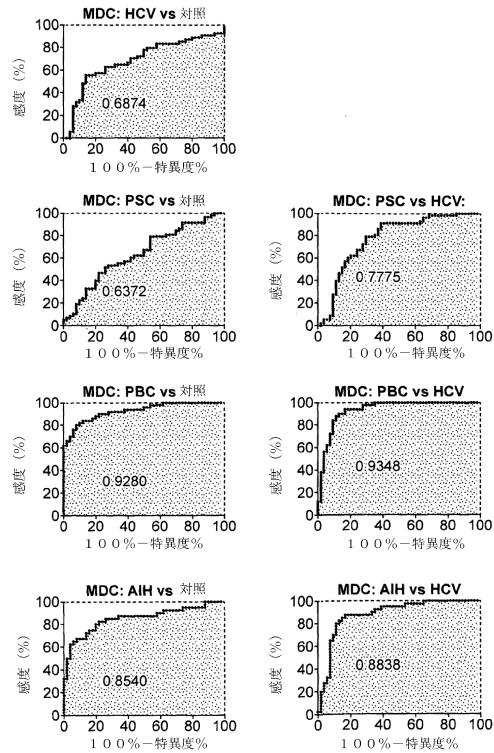


図 11

【 図 1 2 】

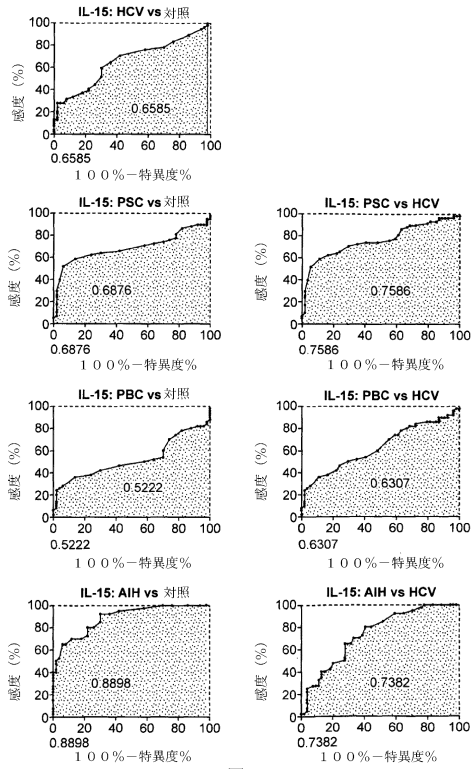


図 1 2

【 図 1 3 】

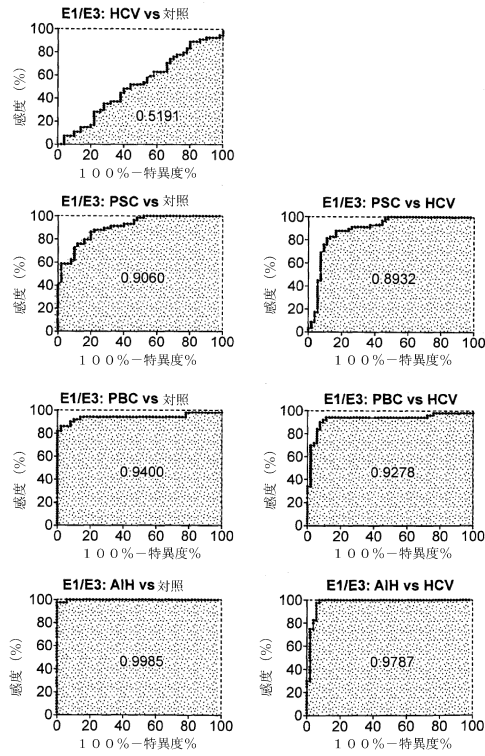


図 1 3

【 図 1 4 】

行 番号	#	診断 バイオマーカー (複数含む)	1		2		3		4		5		6		7		8		9			
			感度 (%)	特異度 (%)	PPV (%)	NPV (%)	PLR (%)	PLR (1→)	NLR (0→1)	NPV (%)	PLR (%)	PLR (1→)	NLR (0→1)	NPV (%)	PLR (%)	PLR (1→)	NLR (0→1)	NPV (%)	PLR (%)	PLR (1→)	NLR (0→1)	NPV (%)
1	PSC	E3>28	79	98	98	80	40	98	0.21	17												
2	PBC	E3>28	84	98	98	86	42	98	0.16	14												
3	AIH	E3>28	100	98	98	100	50	98	0	0												
4	PSC-1	E3>28 + E1/E3>15 + MDC>2800	67	98	98	72	34	97	0.33	25												
5	PSC-2	E3>25 + E1/E3>15 + MDC>2800	72	96	95	75	18	95	0.29	22												
6	AIH	E3>25 + E1/E3>15 + MDC>1870 + IL-15>2.4	60	100	100	76	∞	100	0.4	29												

図 1 4

【 図 1 5 】

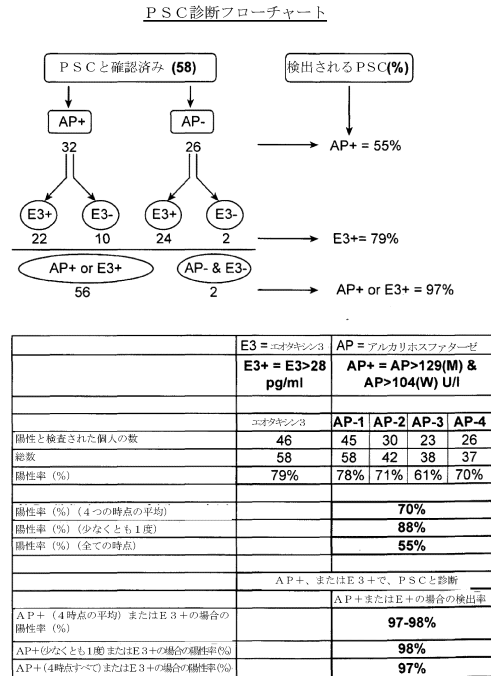


図 1 5

【配列表】

0006401702000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 1/16 (2006.01)		A 6 1 P 1/16
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00

- (74)代理人 100119253
弁理士 金山 賢教
- (74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
- (74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝
- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
- (74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
- (74)代理人 100196483
弁理士 川寄 洋祐
- (74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 ランディ, アブドラミール
カナダ国、アルバータ・ティー5ケイ・0ワイ8、エドモントン、ワンハンドレッドフォース・ストリート・ノースウエスト・ナンバー305-9819
- (72)発明者 ホートン, マイケル
カナダ国、アルバータ・ティー5ケイ・2ピー8、エドモントン、ワンハンドレッドシックス・ストリート・ノースウエスト・9740、アパートメント・1508
- (72)発明者 ティレル, ローン, ディー
カナダ国、アルバータ・ティー5アール・3エム7、エドモントン、セント・ジョージズ・クレセント・94
- (72)発明者 ランキシユ, ティム
ドイツ国、30625・ハノーバー、カール・ノイベルク・シュトラッセ・1
- (72)発明者 ベイスミュラー, トビアス
ドイツ国、ローワー・サクソニー、30625・ハノーバー、カール・ノイベルク・シュトラッセ・1
- (72)発明者 マンス, ミヒャエル
ドイツ国、ローワー・サクソニー、30916・イーザーンハーゲン、ソンネンアレー・23

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特表2013-511030(JP, A)
特表2010-505420(JP, A)
LIN ZY et al., Biomed Pharmacother., 2012年10月, 66(7), 525-529

JARUGA B et al. , J Immunol , 2 0 0 3年 , 171 , 3233-3244

TACKE F et al. , Journal of Gastroenterology and Hepatology , 2 0 0 7年 , 22 , 1256-1264

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

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 / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	用于诊断炎性肝病的方法和组合物		
公开(公告)号	JP6401702B2	公开(公告)日	2018-10-10
申请号	JP2015530512	申请日	2013-09-06
申请(专利权)人(译)	阿尔伯塔大学的州长 MEDI梓丹麦Hohoshuru汉诺威		
当前申请(专利权)人(译)	阿尔伯塔大学的州长 MEDI梓丹麦Hohoshuru汉诺威		
[标]发明人	ランディアブドラミール ホートンマイケル ティレルローンディー ランキシユティム ベイスミューラートビアス マンズミハヤエル		
发明人	ランディ,アブドラミール ホートン,マイケル ティレル,ローン,ディー ランキシユ,ティム ベイスミューラー,トビアス マンズ,ミハヤエル		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/573 C12Q1/02 A61P1/16 A61K45/00		
CPC分类号	A61P1/16 G01N33/6893 G01N2333/523 G01N2800/085 G16B40/00 G16H50/20 G16H50/30 Y02A90/22 Y02A90/24 Y02A90/26 A61K45/00 G01N33/6827 G01N2333/521 G01N2333/5443 G01N2333/916		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/48.Z G01N33/53.P G01N33/573.A C12Q1/02 A61P1/16 A61K45/00		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 安藤健二 市川英彦 青木孝弘 近藤俊		
优先权	61/698412 2012-09-07 US 61/718134 2012-10-24 US		
其他公开文献	JP2015534636A JP2015534636A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开提供了可用于促进受试者中炎性肝病的诊断的方法和组合物。所述方法和组合物通常涉及单独或与嗜酸性粒细胞活化趋化因子-1 (E1) 水平一起检测嗜酸性粒细胞趋化因子-3 (E3) 水平, 并且任选地, 检测CCL22水平, 并且进一步任选地检测IL15水平。这些水平可用于促进自身免疫性肝炎 (AIH), 原发性胆汁性肝硬化 (PBC) 和原发性硬化性胆管炎 (PSC) 中的至少一种的肝病的诊断, 和/或促进AIH之间的鉴别诊断, PBC和PSC。本公开的方法和组合物还可用于促进受试者的治疗决定。

(45) 発行日 平成30年10月10日 (2018.10.10)

(24) 登録日 平成30年9月14日 (2018.9.14)

(51) Int. Cl.

			F I		
GO 1 N	33/68	(2006.01)	GO 1 N	33/68	Z N A
GO 1 N	33/48	(2006.01)	GO 1 N	33/48	Z
GO 1 N	33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	P
GO 1 N	33/573	(2006.01)	GO 1 N	33/573	A
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	

請求項の数 56 (全 72 頁) 最終頁に続く

- (21) 出願番号 特願2015-530512 (P2015-530512)
- (86) (22) 出願日 平成25年9月6日 (2013.9.6)
- (65) 公表番号 特表2015-534636 (P2015-534636A)
- (43) 公表日 平成27年12月3日 (2015.12.3)
- (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/002611
- (87) 国際公開番号 W02014/037811
- (87) 国際公開日 平成26年3月13日 (2014.3.13)
- 審査請求日 平成28年8月30日 (2016.8.30)
- (31) 優先権主張番号 61/688,412
- (32) 優先日 平成24年9月7日 (2012.9.7)
- (33) 優先権主張国 米国 (US)
- (31) 優先権主張番号 61/718,134
- (32) 優先日 平成24年10月24日 (2012.10.24)
- (33) 優先権主張国 米国 (US)

- (73) 特許権者 515053243
ザ・ガバナーズ・オブ・ザ・ユニバーシティー
オブ・アルバータ
カナダ国、アルバータ・ティ-6ジ-2ビ
ー7、エドモントン、マッケンジー・セン
ター、2ジェイ2、O1
- (73) 特許権者 509034085
メディツィニッシュ ホホシュール ハノ
ーバー
ドイツ連邦共和国 30625 ハノーバ
ー、カール-ノイバルク-シュトラッ
セ
1
- (74) 代理人 100114188
弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性肝疾患の診断のための方法および組成物