

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-519018

(P2014-519018A)

(43) 公表日 平成26年8月7日(2014. 8. 7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/53 V	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/569 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/569 F	4 C O 8 4
<b>GO 1 N 33/68 (2006. 01)</b>	GO 1 N 33/68	4 C O 8 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 K 38/00 (2006. 01)</b>	A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-508608 (P2014-508608)  
 (86) (22) 出願日 平成24年4月27日 (2012. 4. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月20日 (2013. 12. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/035495  
 (87) 国際公開番号 W02012/149351  
 (87) 国際公開日 平成24年11月1日 (2012. 11. 1)  
 (31) 優先権主張番号 13/457, 064  
 (32) 優先日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 13/457, 049  
 (32) 優先日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/480, 616  
 (32) 優先日 平成23年4月29日 (2011. 4. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513273030  
 テックラブ, インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国バージニア州24060,  
 ブラックスバーグ, クラフト・ドライブ  
 2001  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100101373  
 弁理士 竹内 茂雄  
 (74) 代理人 100118902  
 弁理士 山本 修  
 (74) 代理人 100187540  
 弁理士 國枝 由紀子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロストリジウム・ディフィシル疾患を有する患者において疾患の重症度を決定するための、および感染を監視するためのバイオマーカーとしての糞便中のラクトフェリン

(57) 【要約】

クロストリジウム・ディフィシル疾患は、軽症の～自己限定的な下痢から生命を危うくする偽膜性大腸炎および巨大結腸症までに及ぶ、ある範囲の臨床像を含む。C. ディフィシルの症例は、疾患の重症度に応じて異なる方法で処置される。軽症および中程度の症例はメトロニダゾールを用いて処置することができ、一方で中程度～重症の、および再燃性の症例はしばしばバンコマイシンまたはフィダキソマイシンで処置される。C. ディフィシル疾患の存在は、C. ディフィシル抗原 (GDH)、毒素AおよびB、ならびに糞便中ラクトフェリンが含まれるバイオマーカーの一群を用いて検出される。C. ディフィシル疾患が疑われる患者において、GDHが検出された場合、それはC. ディフィシルの存在を示しており、次いで毒素産生性C. ディフィシルを示すために、およびC. ディフィシル関連疾患の診断を支持するために毒素Aおよび/またはBが検出され、腸炎症の量を示すことによりその疾患の重症度を決定するために糞便中ラクトフェリン濃度が測定される。

【選択図】 図 1 B

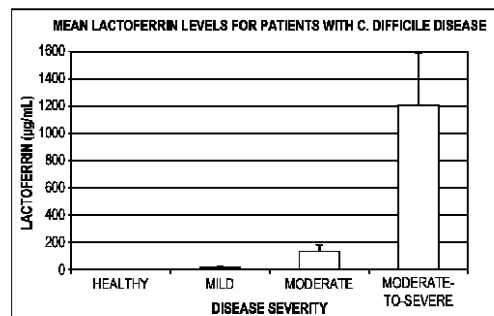


FIG. 1B

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

C．ディフィシル疾患を有する患者を処置する方法であって、該方法が中程度～重症のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を、重症の腸炎症を示す糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の高められたレベルに関して検査結果が陽性であった患者に投与することを含む、前記方法。

**【請求項 2】**

糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルが定量的酵素免疫アッセイ（EIA）の使用により決定される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

ラクトフェリンの高められたレベルが糞便試料中で100 μg/mL以上である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

療法上有効な処置がグリコペプチド系抗生物質または大環状抗生物質の1種類以上である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

療法的処置が天然細菌叢移植である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

C．ディフィシル疾患を有する患者を処置する方法であって、該方法が中程度のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を、中程度の腸炎症を示す糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の高められたレベルに関して検査結果が陽性であった患者に投与することを含む、前記方法。

**【請求項 7】**

糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルが定量的酵素免疫アッセイ（EIA）の使用により決定される、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

ラクトフェリンの高められたレベルが糞便試料中で7.25 μg/mL～99.99 μg/mLである、請求項6に記載の方法。

**【請求項 9】**

療法上有効な処置が1種類以上のニトロイミダゾール系抗生物質である、請求項6に記載の方法。

**【請求項 10】**

療法上有効な処置が天然細菌叢移植である、請求項6に記載の方法。

**【請求項 11】**

クロストリジウム・ディフィシル疾患の重症度により患者を診断する方法であって、該方法がC．ディフィシル疾患を有すると診断されている人から糞便試料を得て；該糞便試料中にラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の高められたレベルが存在するかどうかを決定し；そして該糞便試料中にラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の高められたレベルが存在することが決定されたら、該糞便試料中に存在するラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルに基づいて該C．ディフィシル疾患の重症度を同定することを含む、前記方法。

**【請求項 12】**

糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルが定量的酵素免疫アッセイ（EIA）の使用により決定される、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

ラクトフェリンの高められたレベルが糞便試料中で100 μg/mL以上であり、C．ディフィシル疾患の重症度が中程度～重症であると考えられる、請求項11に記載の方法。

**【請求項 14】**

療法上有効な処置がグリコペプチド系抗生物質または大環状抗生物質の1種類以上である、請求項13に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

療法上有効な処置が天然細菌叢移植である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 16】

ラクトフェリンの高められたレベルが糞便試料中で  $7.25 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 99.99 \mu\text{g}/\text{mL}$  であり、C. ディフィシル疾患の重症度が中程度であると考えられる、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 17】

療法上有効な処置が 1 種類以上のニトロイミダゾール系抗生物質である、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

ラクトフェリンの高められたレベルが糞便試料中で  $7.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  未満であり、C. ディフィシル疾患の重症度が軽症であると考えられ、療法上有効な処置が無処置である、請求項 11 に記載の方法。

10

## 【請求項 19】

請求項 11 に記載の方法であって、C. ディフィシルを有すると診断された患者において疾患の重症度を決定するために用いられるラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上のレベルが以下：1 日あたりの形を成さない便の数、発熱の存在、腹痛、および嘔吐の 1 種類以上を含む臨床症状、ならびに C 反応性タンパク質 (CRP)、白血球数 (WBC)、血清アルブミン、およびクレアチニンの 1 種類以上を含む実験室パラメーターの 1 種類以上と組み合わせられる、前記方法。

20

## 【請求項 20】

C. ディフィシルの診断が毒素産生性 C. ディフィシルの存在を示すバイオマーカーの存在に基づいて結論付けられる、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 21】

C. ディフィシル疾患を有する患者を監視する方法であって、該方法が第 1 の時点において患者から第 1 の糞便試料を得て；第 1 の時点よりも後の第 2 の時点において同じ患者から第 2 の糞便試料を得て；第 1 の糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上の第 1 の量を第 2 の糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上の第 2 の量と比較して第 1 の時点および第 2 の時点の間のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上のレベルにおける変化を同定し；ラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上のレベルにおける変化に基づいて、患者の C. ディフィシル疾患の重症度における変化を同定し；そして患者の C. ディフィシル疾患の重症度における変化の同定に基づいて、C. ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を該患者に投与することを含む、前記方法。

30

## 【請求項 22】

療法上有効量の処置が、ラクトフェリンのレベルが患者の第 2 の糞便試料に関して  $7.25 \mu\text{g}/\text{mL}$  未満に低下していた場合、処置を停止することである、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 23】

療法上有効量の処置が、ラクトフェリンのレベルが患者の第 2 の糞便試料に関して  $7.25 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 99.99 \mu\text{g}/\text{mL}$  である場合、中程度の C. ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を投与することである、請求項 21 に記載の方法。

40

## 【請求項 24】

中程度の C. ディフィシルの処置において有効であることが示された処置がニトロイミダゾール系抗生物質の 1 種類以上を含む、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 25】

療法上有効量の処置が、ラクトフェリンのレベルが患者の第 2 の糞便試料に関して  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上である場合、中程度～重症の C. ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を投与することであり、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上のラク

50

トフェリンのレベルが重症の腸炎症を示す、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

中程度～重症の C . ディフィシルの処置において有効であることが示された処置がグリコペプチド系抗生物質または大環状抗生物質の 1 種類以上を用いた処置を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

中程度～重症の C . ディフィシルの処置において有効であることが示された処置が天然細菌叢移植を用いた処置を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

C . ディフィシル疾患を有する患者を監視する方法であって、該方法が第 1 の時点において患者から第 1 の糞便試料を得て；第 1 の時点よりも後の第 2 の時点において同じ患者から第 2 の糞便試料を得て；第 1 の糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上の第 1 の量を第 2 の糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上の第 2 の量と比較して第 1 の時点および第 2 の時点の間のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上のレベルにおける変化を同定し；ラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上のレベルにおける変化に基づいて、患者の C . ディフィシル疾患の重症度における変化を同定し；そして C . ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を、第 2 の糞便試料を得た後に該患者に投与することを含み、該患者が第 1 の時点において C . ディフィシルの軽症の症例を、第 2 の時点において増大した量のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの 1 種類以上を有し、第 1 の試料における第 1 の量および第 2 の試料における第 2 の量の比較が増大した腸炎症および C . ディフィシル疾患の悪化を示す、前記方法。

10

20

【請求項 2 9】

療法上有効量の処置が、ラクトフェリンのレベルが患者の第 2 の糞便試料に関して  $7.25 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 99.99 \mu\text{g}/\text{mL}$  である場合、中程度の C . ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を投与することである、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

中程度の C . ディフィシルの処置において有効であることが示された処置がニトロイミダゾール系抗生物質の 1 種類以上を用いた処置を含む、請求項 2 9 に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

療法上有効量の処置が、ラクトフェリンのレベルが患者の第 2 の糞便試料に関して  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上である場合、中程度～重症の C . ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を投与することである、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

中程度～重症の C . ディフィシルの処置において有効であることが示された処置がグリコペプチド系抗生物質または大環状抗生物質の 1 種類以上を用いた処置を含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

中程度～重症の C . ディフィシルの処置において有効であることが示された処置が天然細菌叢移植を用いた処置を含む、請求項 3 1 に記載の方法。

40

【請求項 3 4】

C . ディフィシル疾患の存在および C . ディフィシル疾患の重症度を決定する診断法であって、該方法が患者から糞便試料を得て；同じ患者の糞便試料から第 1 のバイオマーカーの存在を決定し、第 1 のバイオマーカーの存在が C . ディフィシル疾患の存在を示し；そして同じ患者の糞便試料から第 2 のバイオマーカーのレベルを決定することを含み、第 2 のバイオマーカーのレベルが C . ディフィシル疾患の重症度を示す、前記方法。

【請求項 3 5】

第 1 のバイオマーカーが C . ディフィシルのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ ( GDH ) を含む、請求項 3 4 に記載の方法。

50

## 【請求項 36】

第1のバイオマーカーがC.ディフィシルの毒素Aを含む、請求項34に記載の方法。

## 【請求項 37】

第1のバイオマーカーがC.ディフィシルの毒素Bを含む、請求項34に記載の方法。

## 【請求項 38】

第1のバイオマーカーがC.ディフィシルの毒素A遺伝子(tcdA)またはC.ディフィシルの毒素B遺伝子(tcdB)の1以上を含む、請求項34に記載の方法。

## 【請求項 39】

第2のバイオマーカーが患者の糞便試料中のラクトフェリンのレベルを含む、請求項34に記載の方法。

10

## 【請求項 40】

第2のバイオマーカーが患者の糞便試料中のカルプロテクチンのレベルを含む、請求項34に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2012年4月26日出願された米国特許出願一連番号13/457,064および2012年4月26日出願された米国特許出願一連番号13/457,049に対する優先権を主張し、その両方が2011年4月29日出願された米国仮出願一連番号61/480,616に対する優先権を主張し、その全てを明確に本明細書にそのまま援用する。

20

## 【背景技術】

## 【0002】

クロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)感染症(CDI)は、軽症の~自己限定的な(*self-limiting*)下痢から生命を危うくする偽膜性大腸炎および巨大結腸症までが含まれる、ある範囲の臨床像を含む。多くの健康な人(例えば乳児)がクロストリジウム・ディフィシル(C.ディフィシル)を保菌しており、多くの患者が病院への入院後に無症候性保菌者になる。ほとんどの症例は、臨床評価、抗生物質使用の履歴、ならびに便中のその生物および/または毒素AおよびB(すなわちそれぞれTcdAおよびTcdB)の存在に基づいて診断される。酵素結合免疫アッセイ(EIA)試験は、便標本中の毒素を測定するための最も頻繁に用いられる試験形式であり、特異的な中和と組み合わせられた組織培養は便中の毒素を検出するための至適基準(*gold standard*)である。最近、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)試験がC.ディフィシル毒素AおよびB遺伝子(tcdAおよびtcdB)の存在を決定するために利用可能であり、これらは独立した試験として、およびC.ディフィシル陰性の患者を除外するためにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)の検出との組み合わせで用いられる。これらのアッセイの全てが診断の助けとしてC.ディフィシルの存在を検出するのに適しているが、疾患の重症度に関する情報は提供しない。

30

## 【0003】

その疾患の重症度は、適切な一連の処置を勧めるための重要な要因である。一般に、C.ディフィシル疾患を有する患者はしばしば発熱を示し、わずかに上昇した白血球(白血球増加)を有し、そして軽症の腹痛を経験する。軽症の症例は刺激している(*inciting*)抗生物質の中断によく応答するが、中程度および/または中程度~重症のC.ディフィシル疾患の症例はしばしば抗生物質介入を必要とする。現在、医学的および/または外科的処置を最適化するためにCDADの重症度に基づいて患者を層別化するためにルーチン的に用いられている単一の実験室パラメーターはない。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0004】

本発明の説明的な態様を、添付された図面への参照により下記で詳細に記述し、ここで

50

【図 1 A】図 1 A は、本発明の態様に従う C . ディフィシル疾患を有すると診断された患者に関する患者の特徴を示し；

【図 1 B】図 1 B は、本発明の態様に従う重症度により層別化された臨床的に定義された C . ディフィシル疾患の症例を有する患者に関する平均ラクトフェリンレベル (  $\mu\text{g} / \text{mL} \pm$  標準誤差 ) を示し；

【図 2】図 2 は、本発明の態様に従う A R L 0 2 7 対他のリボタイプの C . ディフィシル感染症により層別化された患者に関する平均ラクトフェリンレベル (  $\mu\text{g} / \text{mL} \pm$  標準誤差 ) を示し；

【図 3】図 3 は、本発明の態様に従う C . ディフィシル疾患を有する患者における抗生物質処置の間および後のラクトフェリンレベルの毎日の監視を示し；

【図 4 A】図 4 A は、本発明の態様に従う臨床的治癒 ( 最初の処置の間および / または後に症状がなく、且つ C . ディフィシルがない ) を有する患者に関するバイオマーカーの結果の要約を示し；

【図 4 B】図 4 B は、本発明の態様に従う細菌の再感染 ( 最初の処置の間および / または後の、症状の非存在下での C . ディフィシルの再出現 ( r e t u r n ) ) を有する患者に関するバイオマーカーの結果の要約を示し；そして

【図 4 C】図 4 C は、本発明の態様に従う臨床的再発または非治癒 ( 最初の処置の間および / または後の、症状および C . ディフィシルの再出現 ) を有する患者に関するバイオマーカーの結果の要約を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 5 】

本発明は、C . ディフィシル疾患の重症度に基づく患者の層別化を助けるための試験法に向けられている。バイオマーカーの一団 ( p a n e l ) を用いた疾患を有する患者の重症度に基づく層別化は、発生率の増大および頻繁な重症の症状および抗生物質の使い過ぎのため、決定的に必要とされている新規の概念である。より多くの毒素および芽胞を産生する大流行株リボタイプ A R L 0 2 7 の出現は、より重症の C . ディフィシル疾患およびより大きな再燃の機会と結びついてきた。加えて、抗生物質フィダキシマイシン ( f i d a x o m i c i n ) ( D i f i c i d ) のようなより新しい薬物療法が C . ディフィシル疾患に関する追加の処置選択肢を与える。L. Kyneらにより 1 9 9 9 年に公開された研究において、著者はアイルランド、ダブリンにおける C D A D の大流行に関する疾患状態の詳細な特性付けを実施した。この特定の大流行には、便中細胞毒素陽性であるが無症候性である 1 4 人の患者が含まれていた。症候性の患者の中で、2 5 % は抗生物質処置なしの軽症の自己限定的疾患を有し、3 5 % は抗生物質処置に応答する中程度に重症の C . ディフィシル疾患を有し、そして 4 0 % は 1 1 ~ 3 6 日間続く長期化した症状を有する重症の疾患を発現した。C . ディフィシル疾患を有する患者の合計 8 % が、偽膜および中毒性巨大結腸症を伴う重症の大腸炎へと進行した。著者は、医師は C . ディフィシル疾患の症例に関する罹患率および死亡率を低下させるために疾患重症度の早期の指標に気を付けるべきであると特筆した。

【 0 0 0 6 】

臨床像および様々な実験室パラメーターの組み合わせが、患者を疾患活動性 ( 例えば軽症、中程度、および中程度 ~ 重症 ) により層別化するために評価されてきた。白血球数 ( W B C ) 、血清アルブミンレベル ( 腸中への漏出の指標 ) 、および腎不全を監視するためのクレアチニンレベルが、C . ディフィシルに関する疾患活動性に関する最も一般的に用いられる実験室指標である。C . ディフィシルの軽症 ~ 中程度の症例は、通常は 1 5 , 0 0 0 /  $\mu\text{L}$  以下の W B C 、正常な血清クレアチニン ( 2 . 0 m g / d L 未満 ) およびアルブミンレベル ( 2 . 5 g / d L 以上 ) を示す。症状には、1 日あたり血液を含まない 1 0 未満の水様便を有すること、および平均 4 日までの間続く軽症の痙攣が含まれる。軽症 ~ 中程度の C . ディフィシル疾患の初期のエピソードを有する患者に関する一般的な処置は、ニトロイミダゾールクラスの抗生物質のメンバーを用いた処置である。例えば、軽症 ~ 中程度の C . ディフィシル疾患は、5 0 0 m g メトロニダゾールで 1 日 3 回 1 0 日間処置

10

20

30

40

50

することができる。ほとんどの症例はさらなる合併症なしで消散する ( r e s o l v e ) が、これらの症例の 25% に至るまでが複数回再燃して第 2 ラウンドの抗生物質を必要とする可能性があり、それには歴史的にバンコマイシンのようなグリコペプチドクラスの抗生物質のメンバーを用いた処置が含まれてきた。しかし、今日ではそのような第 2 ラウンドの抗生物質にはフィダキソマイシン ( D i f i c i d ) のような大環状クラスの抗生物質のメンバーが含まれる。

【 0 0 0 7 】

65 歳を超える多数の共存症を有する患者は C . デイフィシル疾患に関するより高い危険にさらされており、多数回の再燃につながるより重症の疾患を患う頻度がより高い。重症の劇症型 C . デイフィシル疾患は、10 日より長い間の 1 日あたり 11 以上の液状便を有することを特徴とする。便標本はしばしば粘膜を含有し、血性である可能性がある。劇症型 C . デイフィシル大腸炎に関する定義された実験室パラメーターは、15,000 /  $\mu$  L 以上の W B C、乏しい腎機能を示す上昇している血清クレアチニン ( 50% の増大および 2 . 0 m g / d L 以上のレベル )、および血清の腸中への滲出のためのタンパク質の喪失を示す 2 . 5 g / d L 未満に低下したアルブミンレベルである。臨床像には、内視鏡検査の際の偽膜、重症の腹痛および痙攣、ならびに C T スキャンにより観察される大腸の肥厚が含まれる可能性がある。腸閉塞に由来する中毒性巨大結腸症が起こる可能性があり、それは吐き気、嘔吐、重症の脱水、および極度の嗜眠を引き起こす。C . デイフィシル疾患の重症および再燃性の症例に関する処置には、通常 10 日間の 1 日あたり 4 回の 125 m g バンコマイシンが含まれる。

10

20

【 0 0 0 8 】

C . デイフィシル感染症を有する患者に関する疾患活動性の同定は、適切な処置ならびに罹患率および死亡率が低下したよりよい転帰に必須である。本発明の 1 態様は、糞便中ラクトフェリンを測定し、その糞便中ラクトフェリンの測定値を C . デイフィシルにより引き起こされる腸炎症に関する指標として用いることにより、C . デイフィシル疾患における重症度を評価するための診断パラメーターを提供する。

【 0 0 0 9 】

C . デイフィシル疾患は、活性化された好中球の粘膜を越える管腔中への浸潤を含む炎症性疾患であり、それは大腸炎を、そして重症の症例では偽膜の形成を引き起こす。ヒトラクトフェリンはほとんどの粘膜分泌中に存在する糖タンパク質であり、活性化された好中球の顆粒の主な構成要素である。C . デイフィシルからの腸炎症の発症の間、活性化された好中球が腸管腔に浸潤し、糞便中ラクトフェリンの増大を引き起こす。

30

【 0 0 1 0 】

糞便標本は C . デイフィシル検査 ( 抗原および毒素 ) に関してルーチンの収集される。従って、疾患の重症度の指標としての腸炎症の量を決定するために、糞便中ラクトフェリンのレベルを測定するための追加の検査を行うことができる。加えて、抗原の存在ならびに毒素 A および B のレベルを糞便中ラクトフェリン濃度と組み合わせることは、最適な医学的処置のための患者が真の軽症 ~ 重症の感染症を有する患者からの保菌者であるかどうかの決定において医師を助けることができる。

【 0 0 1 1 】

本発明の 1 態様において、糞便中ラクトフェリンレベルを用いて C . デイフィシル疾患を有する患者において疾患の重症度を評価するための方法が提供される。毒素 A は、I L - 8 の放出および活性化された好中球の腸粘膜中への浸潤を引き起こす、走化性の強いタンパク質である。実際、毒素 B の濃度の 100 倍未満の毒素 A 濃度が I L - 8 の放出を刺激することが示されている。毒素 A は、I L - 1 および腫瘍壊死因子アルファ ( T N F - ) が含まれる他の炎症促進性サイトカイン類も刺激する。毒素 B は組織損傷および炎症を引き起こす細胞毒素であり、体液の蓄積を引き起こす毒素 A と共に疾患に寄与する。腸毒性および走化性の毒素 A ならびに毒素 B の細胞毒性作用の複合作用は、疾患の重症度に強く寄与する。Kuehneらによる研究において、ノックアウト変異体は、A + B - および A - B + 変異体の両方がハムスターモデルにおいて細胞毒性であり、疾患を引き起こすこ

40

50

とを示した。t c d Bが挿入により不活性化された場合、結果としてもたらされるA + B - 変異体は細胞培養において増大した毒素Aの細胞毒性を示したことは、興味深い発見であった。その増大した細胞毒性は、抗毒素A特異的抗体により完全には中和されなかった。t c d Bの不活性化後の細胞毒性の増大に関する理由は決定されなかったが、増大した発現によるものであると考えられた。二重ノックアウト変異体A - B - はハムスターにおいて疾患を引き起こさなかった。これらの結果は、T c d AおよびT c d Bの両方が、組み合わせで、および独立して疾患を引き起こすことを確証した。別の研究において、A - B + 分離株の分析は、マウスにおいて通常の毒素Bよりも有意に致死性である変異体毒素Bを示した。これらの研究は、その疾患における両方の毒素の役割を支持する。便中の毒素の存在との組み合わせでの腸炎症の存在を決定するための方法は、C . ディフィシル感染症を有する患者に関する疾患状態に関する追加の情報を与えることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0012】

本発明の1態様は、例としてC . ディフィシル抗原 (GDH)、毒素A (t c d AまたはT c d A) およびB (t c d BまたはT c d B) が含まれる毒素産生性C . ディフィシルの存在を決定するためのバイオマーカーの一群を用いるC . ディフィシル疾患の存在の決定を提供する。理解されるであろうように、本発明のさらなる態様は、C . ディフィシル感染に関する追加のバイオマーカーを利用する。C . ディフィシル疾患の診断が結論付けられた場合、糞便中ラクトフェリン濃度を用いて疾患の重症度を決定することができる。C . ディフィシルによる感染が疑われる患者において、GDHが存在する場合、それはC . ディフィシルの存在を示しており、毒素Aおよび/またはB (遺伝子および/またはタンパク質) を検出して毒素産生性C . ディフィシルの存在を示し、続いて腸炎症の指標としての糞便中ラクトフェリンレベルを測定する。毒素産生性C . ディフィシルが存在するかどうかをラクトフェリン濃度との組み合わせで知ることが、処置を最適化するために疾患重症度を決定するのに助けるであろう。

#### 【0013】

複数の態様において、一連のC . ディフィシル感染に関するバイオマーカーの測定が利用される。例えば、ラクトフェリン、GDH、毒素A、および/または毒素Bレベルを分析および/または処置の間に規則的な間隔で監視することができる。複数の態様において、1種類以上のバイオマーカー (例えばGDH、毒素Aおよび/またはB) の存在の一連の分析はその細菌の指標を提供し、それを患者の処置への応答を決定するために用いることができる。

#### 【0014】

複数の態様において、糞便試料中のラクトフェリンのレベルはC . ディフィシルの重症度の指標を提供する。例えば、“軽症の”C . ディフィシル疾患は、 $7.25 \mu\text{g} / \text{mL}$ 未満のラクトフェリンを含む試料で示され得る。複数の態様において、軽症のC . ディフィシル疾患の診断は、その軽症の疾患を定義するための臨床指標と組み合わせられた、 $7.25 \mu\text{g} / \text{mL}$ 未満のラクトフェリンを含む試料で示される。例えば、1日あたりの形を成さない便の数、発熱の存在、腹痛、および嘔吐のような臨床指標を軽症のC . ディフィシル疾患の診断を示すものとして特性付ける、および/または決定することができ、それを $7.25 \mu\text{g} / \text{mL}$ 未満のラクトフェリンの測定値と一緒に分析して疾患の重症度を決定することができる。複数の態様において、軽症のC . ディフィシルの診断のための臨床指標には、1日あたり3 ~ 5の便を有することおよび $15,000 / \text{mm}^3$ 以下の白血球数が含まれる。さらなる態様において、C反応性タンパク質 (CRP)、白血球数 (WBC)、血清アルブミン、および/またはクレアチニンのような実験室パラメーターをラクトフェリンのレベル、カルプロテクチンのレベル、および/または臨床指標 (単数または複数) と組み合わせ、軽症のC . ディフィシルを有すると診断された患者における疾患の重症度を決定することができる。

#### 【0015】

別の例において、“中程度の”C . ディフィシル疾患は、 $7.25 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 99.99 \mu\text{g} / \text{mL}$ のラクトフェリンを含む試料で示され得る。一部の態様において、中程度

のC．ディフィシル疾患の診断は、その中程度の疾患を定義するための臨床指標と組み合わせられた、 $7.25 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 99.99 \mu\text{g}/\text{mL}$ のラクトフェリンを含む試料で示される。例えば、1日あたりの形を成さない便の数、発熱の存在、腹痛、および嘔吐のような臨床指標を中程度のC．ディフィシル疾患の診断を示すものとして特性付ける、および/または決定することができ、それを $7.25 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 99.99 \mu\text{g}/\text{mL}$ のラクトフェリンの測定値と一緒に分析して疾患の重症度を決定することができる。複数の態様において、中程度のC．ディフィシルの診断のための臨床指標には、1日あたり6～9の便を有すること、 $15,001/\text{mm}^3$ から $20,000/\text{mm}^3$ までの白血球数、および中程度の腹痛が含まれる。さらなる態様において、C反応性タンパク質(CRP)、白血球数(WBC)、血清アルブミン、および/またはクレアチニンのような実験室パラメーターをラクトフェリンのレベル、カルプロテクチンのレベル、および/または臨床指標(単数または複数)と組み合わせ、中程度のC．ディフィシルを有すると診断された患者における疾患の重症度を決定することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0016】

さらなる例において、“中程度～重症の”C．ディフィシル疾患は、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のラクトフェリンを含む試料で示され得る。一部の態様において、中程度～重症のC．ディフィシル疾患の診断は、その中程度～重症の疾患を定義するための臨床指標と組み合わせられた、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のラクトフェリンを含む試料で示される。例えば、1日あたりの形を成さない便の数、発熱の存在、腹痛、および嘔吐のような臨床指標を中程度～重症のC．ディフィシル疾患の診断を示すものとして特性付ける、および/または決定することができ、それを $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のラクトフェリンの測定値と一緒に分析して疾患の重症度を決定することができる。複数の態様において、中程度～重症のC．ディフィシルの診断のための臨床指標には、1日あたり10以上の便を有すること、 $20,001/\text{mm}^3$ 以上の白血球数、および重症の腹痛が含まれる。さらなる態様において、C反応性タンパク質(CRP)、白血球数(WBC)、血清アルブミン、および/またはクレアチニンのような実験室パラメーターをラクトフェリンのレベル、カルプロテクチンのレベル、および/または臨床指標(単数または複数)と組み合わせ、中程度～重症のC．ディフィシルを有すると診断された患者における疾患の重症度を決定することができる。

#### 【0017】

C．ディフィシルGDHバイオマーカーの存在に関する検査の1つの典型的な方法はC．DIFF CHEK(商標)-60検査を用いることであり、それはC．ディフィシルGDHに特異的な抗体を用いる。Microassay PlateはGDH抗原に対する固定されたポリクローナル抗体を含有し、一方でConjugateはホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートされた高度に特異的なモノクローナル抗体からなる。GDH抗原が標本中に存在する場合、そのアッセイにおいて形成される酵素-抗体-抗原複合体により、呈色が検出される。

#### 【0018】

毒素Aおよび毒素Bの存在に関する検査の1つの典型的な方法はC．DIFFICILE TOX A/B II(商標)検査を用いることであり、それはC．ディフィシル毒素AおよびBに対する抗体を用いる。その検査は毒素AおよびBに対する固定された親和性精製されたポリクローナル抗体を利用し、検出抗体はホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートされた毒素Aモノクローナル抗体およびホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートされた毒素Bポリクローナル抗体の混合物からなる。毒素AおよびBが標本中に存在する場合、そのアッセイにおいて形成される酵素-抗体-抗原複合体により、呈色が検出される。

#### 【0019】

GDH、毒素Aおよび毒素Bの存在に関する検査の1つの典型的な方法はQUICK CHEK COMPLETE(商標)検査を用いることであり、それはC．ディフィシルのGDHおよび毒素AおよびBに特異的な抗体を用いる。その装置は固定された抗体の3本

の縦線を含有し、抗原検査の線はC．ディフィシルのGDHに対する抗体を含有し、対照の線は抗ホースラディッシュペルオキシダーゼ抗体を含有する点線である。毒素AおよびB検査の線はC．ディフィシル毒素AおよびBに対する抗体を含有し、Conjugateはホースラディッシュペルオキシダーゼに連結されたGDHに対する抗体ならびに毒素AおよびBに対する抗体からなる。GDH反応は縦の青い線の出現に関して視覚的に調べられ、それは陽性の検査を示し、一方で青い線は毒素AおよびBに関する陽性の検査も示す。

#### 【0020】

C．ディフィシル毒素の存在に関する検査の1つの典型的な方法はC．DIFFICILE TOX - B TEST (商標)であり、それは組織培養形式を用いて糞便標本中の細胞毒性活性の存在を検出し、特異的抗毒素を用いるC．ディフィシル毒素の同定を確認する。その試験は、その細胞毒性活性を特異的な抗毒素である試薬を用いて中和することによりC．ディフィシル毒素の存在を確認する。そのアッセイにおいて、C．ディフィシル毒素が存在する場合、PBSを有するウェル中の細胞は丸くなり、それは細胞毒性活性の存在を実証し、一方でC．ディフィシル毒素の存在は抗毒素を含有するウェルにおいてその細胞毒性活性が中和された場合に確認される。

10

#### 【0021】

C．ディフィシルを処置する1つの典型的な方法は、天然細菌叢移植による。糞便(または糞便(Faecal))微生物叢移植(FMT)とも呼ばれるこのプロセスは、健康なヒトの提供者から得られた健康な細菌叢を例えば浣腸による便の注入により導入することによる大腸内細菌叢の修復である。天然細菌叢移植は、その患者が飲む液体として投与することもできる。

20

#### 【0022】

本発明の1観点は、C．ディフィシル疾患を有する患者を処置する方法に向けられている。その方法は、中程度～重症のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を、重症の腸炎症を示す糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の高められたレベルに関して検査結果が陽性であった患者に投与することを含む。糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルは、定量的酵素免疫アッセイ(EIA)の使用により決定される。ラクトフェリンの高められたレベルは、糞便試料中で100ug/mL以上であってよい。この場合、その療法上有効な処置は、グリコペプチド系抗生物質または大環状抗生物質の1種類以上であってよい。その療法上有効な処置は天然細菌叢移植であってよい。

30

#### 【0023】

本発明の別の観点は、C．ディフィシル疾患を有する患者を処置する方法に向けられている。その方法は、中程度のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を、中程度の腸炎症を示す糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の高められたレベルに関して検査結果が陽性であった患者に投与することを含む。糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルは、定量的酵素免疫アッセイ(EIA)の使用により決定されてよい。ラクトフェリンの高められたレベルは、糞便試料中で7.25ug/mL～99.99ug/mLであってよい。この場合における療法上有効な処置は、1種類以上のニトロイミダゾール系抗生物質であってよい。加えて、その療法上有効な処置は天然細菌叢移植であってよい。

40

#### 【0024】

本発明の別の観点は、クロストリジウム・ディフィシル疾患の重症度により患者を診断する方法に向けられている。その方法は、C．ディフィシル疾患を有すると診断されている人から糞便試料を得て；その糞便試料中にラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の高められたレベルが存在するかどうかを決定し；そしてその糞便試料中にラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の高められたレベルが存在することが決定されたら、その糞便試料中に存在するラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルに基づいてそのC．ディフィシル疾患の重症度を同定することを含む。糞便

50

試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルは、定量的酵素免疫アッセイ（EIA）の使用により決定されてよい。ラクトフェリンの高められたレベルがその糞便試料中で100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である場合、C.ディフィシル疾患の重症度は中程度～重症であると考えてよい。この場合、その療法上有効な処置は、グリコペプチド系抗生物質または大環状抗生物質の1種類以上であってよい。その療法上有効な処置は天然細菌叢移植であってよい。ラクトフェリンの高められたレベルがその糞便試料中で7.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～99.99  $\mu\text{g}/\text{mL}$ である場合、C.ディフィシル疾患の重症度は中程度であると考えられる。この場合、その療法上有効な処置は1種類以上のニトロイミダゾール系抗生物質であってよい。ラクトフェリンの高められたレベルがその糞便試料中で7.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満である場合、C.ディフィシル疾患の重症度は軽症であると考えられ、その療法上有効な処置は無処置であってよい。C.ディフィシル疾患を有すると診断された患者において疾患の重症度を決定するために用いられるラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルは、以下の1種類以上と組み合わせることができる：1日あたりの形を成さない便の数、発熱の存在、腹痛、および嘔吐の1種類以上を含む臨床症状、ならびにC反応性タンパク質（CRP）、白血球数（WBC）、血清アルブミン、およびクレアチニンの1種類以上を含む実験室パラメーター。C.ディフィシルの診断は、毒素産生性C.ディフィシルの存在を示すバイオマーカーの存在に基づいて結論付けることができる。

10

#### 【0025】

本発明のさらに別の観点は、C.ディフィシル疾患を有する患者を監視する方法に向けられている。その方法は、第1の時点において患者から第1の糞便試料を得て；第1の時点よりも後の第2の時点において同じ患者から第2の糞便試料を得て；第1の糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の第1の量を第2の糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の第2の量と比較して第1の時点および第2の時点の間のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルにおける変化を同定し；ラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルにおける変化に基づいて、患者のC.ディフィシル疾患の重症度における変化を同定し；そして患者のC.ディフィシル疾患の重症度における変化の同定に基づいて、C.ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置をその患者に投与することを含む。療法上有効量の処置は、ラクトフェリンのレベルがその患者の第2の糞便試料に関して7.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満に低下していた場合、処置の停止であってよい。療法上有効量の処置は、ラクトフェリンのレベルがその患者の第2の糞便試料に関して7.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ～99.99  $\mu\text{g}/\text{mL}$ である場合、中程度のC.ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を投与することであってよい。この場合、その中程度のC.ディフィシルの処置において有効であることが示された処置は、ニトロイミダゾール系抗生物質の1種類以上を含む。療法上有効量の処置は、ラクトフェリンのレベルがその患者の第2の糞便試料に関して100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である場合、中程度～重症のC.ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を投与することであってよく、ここで100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上のラクトフェリンのレベルは重症の腸炎症を示す。中程度～重症のC.ディフィシルの処置において有効であることが示された処置は、グリコペプチド系抗生物質または大環状抗生物質の1種類以上を用いた処置を含む。中程度～重症のC.ディフィシルの処置において有効であることが示された別の処置は、天然細菌叢移植を用いた処置を含む。

20

30

40

#### 【0026】

本発明のさらに別の観点は、C.ディフィシル疾患を有する患者を監視する方法に向けられている。その方法は、第1の時点において患者から第1の糞便試料を得て；第1の時点よりも後の第2の時点において同じ患者から第2の糞便試料を得て；第1の糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の第1の量を第2の糞便試料中のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上の第2の量と比較して第1の時点および第2の時点の間のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルにお

50

ける変化を同定し；ラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上のレベルにおける変化に基づいて、患者のC．ディフィシル疾患の重症度における変化を同定し；そしてC．ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を、第2の糞便試料を得た後にその患者に投与することを含み、ここでその患者は第1の時点においてC．ディフィシルの軽症の症例を、第2の時点において増大した量のラクトフェリンまたはカルプロテクチンの1種類以上を有し、ここで第1の試料における第1の量および第2の試料における第2の量の比較は増大した腸炎症およびC．ディフィシル疾患の悪化を示す。療法上有効量の処置は、ラクトフェリンのレベルがその患者の第2の糞便試料に関して7．25 μg/mL～99．99 μg/mLである場合、中程度のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を投与することによってよい。中程度のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された処置は、ニトロイミダゾール系抗生物質の1種類以上を用いた処置を含む。療法上有効量の処置は、ラクトフェリンのレベルがその患者の第2の糞便試料に関して100 μg/mL以上である場合、中程度～重症のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された療法上有効量の処置を投与することによってよい。中程度～重症のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された処置は、グリコペプチド系抗生物質または大環状抗生物質の1種類以上を用いた処置を含む。中程度～重症のC．ディフィシルの処置において有効であることが示された処置は、天然細菌叢移植を用いた処置を含む。

10

#### 【0027】

本発明の別の観点は、C．ディフィシル疾患の存在およびC．ディフィシル疾患の重症度を決定する診断法に向けられている。その方法は、患者から糞便試料を得て；同じ患者の糞便試料から第1のバイオマーカーの存在を決定し、ここでその第1のバイオマーカーの存在はC．ディフィシル疾患の存在を示し；そして同じ患者の糞便試料から第2のバイオマーカーのレベルを決定することを含み、ここでその第2のバイオマーカーのレベルはC．ディフィシル疾患の重症度を示す。第1のバイオマーカーは、C．ディフィシルのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）を含む。別の第1のバイオマーカーは、C．ディフィシルの毒素Aを含む。別の第1のバイオマーカーは、C．ディフィシルの毒素Bを含む。第1のバイオマーカーは、C．ディフィシルの毒素A遺伝子（tcdA）またはC．ディフィシルの毒素B遺伝子（tcdB）の1つ以上を含んでいてよい。第2のバイオマーカーは、その患者の糞便試料中のラクトフェリンのレベルを含む。第2のバイオマーカーは、その患者の糞便試料中のカルプロテクチンのレベルも含んでいてよい。

20

30

#### 【0028】

以下は本発明に従って好ましいアッセイを確立するために利用されてきた手順の実施例である。以下の実施例は単に典型的なものであり、限定として与えられているわけではない。

#### 【実施例】

#### 【0029】

##### 実施例1

糞便中ラクトフェリンレベルを、軽症から中程度～重症の疾患までの範囲の臨床的に定義されたC．ディフィシル疾患を有する患者において評価した。簡潔には、ある範囲の重症度を示す臨床的に確認されたC．ディフィシル疾患を有する患者を、腸の病気を有しないと定められた14人の年齢性別を合わせた健康な対象と共に募集した。疾患活動性は、医師の評価により、ならびに症状、血清アルブミン、WBC数および共存症に基づいて定められた。糞便中ラクトフェリンを定量的酵素免疫アッセイ（EIA）を用いて測定した。便中のC．ディフィシルのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（GDH）ならびに毒素AおよびBを、膜に基づくEIAを用いて検出した。毒素産生培養を芽胞濃縮（enrichment）を用いて行い、分離株および便標本の両方を組織培養アッセイにより細胞毒性に関して試験した。

40

#### 【0030】

##### 結果

50

39件の臨床的に確証されたC.ディフィシル疾患の症例(15件は中程度~重症、21件は中程度、および3件は軽症)を、6ヶ月の期間の間検査した。年齢は32から89歳までの範囲に及び、50パーセントが女性であった。主な共存症は、糖尿病(31%)、癌(23%)および腎不全(23%)であった。全ての患者がGDH陽性であり、4人を除く全ての患者から毒素産生性C.ディフィシルが分離された。平均ラクトフェリンレベル( $\mu\text{g}/\text{mL} \pm$ 標準誤差)は、中程度~重症の対象に関して $1198 \pm 404$ 、中程度の対象に関して $132 \pm 50$ 、軽症の対象に関して $12 \pm 5$ 、そして健康な対象に関して $2 \pm 0.3$ であった。便中の毒素は、組織培養により、中程度~重症の疾患の87%( $13/15$ )、中程度の疾患の71%( $15/21$ )、そして軽症の疾患に関して33%( $1/3$ )で検出された。最も低いラクトフェリンレベル( $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下)を有する中程度~重症の患者の2人および4人の最も低いラクトフェリンレベル( $12 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以下)を有する中程度の患者の3人も、組織培養陰性であった。これらの患者の中で、重症の患者および4人の中程度の患者の2人は陰性の糞便培養を有していた。これらの患者の全てがその臨床評価に寄与する共存症を有していた。我々の結論は、臨床設定において、共存症はC.ディフィシル感染に関する臨床評価を複雑にし得ることである。我々の結果は、糞便中ラクトフェリンがC.ディフィシル感染症を有する患者において疾患の重症度を示すために有用であることを示している。

10

20

30

40

50

#### 【0031】

従って、図1Aは、臨床的に確証されたC.ディフィシル疾患の症例に関する患者の特徴を詳述する。ほとんどの患者は64歳より高い年齢であり、痛みを経験し、液状便を有し、糖尿病、癌、腎不全および肺炎が含まれる共存症を患っていた。図1Bは、C.ディフィシル疾患の軽症、中程度、および中程度~重症の症例の間でラクトフェリンレベルが有意により高く、中程度~重症の群に関してより高い傾向があったことを示している。

#### 【0032】

図2は、リボタイプにより分類された臨床的に確証されたC.ディフィシル疾患を有する患者に関する平均ラクトフェリンレベルを示す。ARL 027に感染した患者は、他のリボタイプに感染した患者よりも有意に高いラクトフェリンのレベルを有していた。研究は、ARL 027に感染した患者は便中毒素を有し、より重症の疾患を示す傾向があることを示してきた。

#### 【0033】

##### 実施例2

糞便中C.ディフィシルGDH、毒素AおよびB、ならびにヒトラクトフェリンレベルを、C.ディフィシル疾患を有する数人の対象において抗生物質処置の間に測定した。臨床的に確証されたC.ディフィシル疾患を有する両方の対象を、GDH、毒素AおよびB、ならびに糞便中ラクトフェリンの存在に関して、酵素結合免疫アッセイ(EIA)により監視した。標本の収集は抗生物質処置の開始時に開始され、可能である場合は毎日~毎週継続された。症状の記録はそれぞれの患者により保たれ、試験期間の間全ての処置が記録された。両方の患者が抗生物質処置に対して急速な応答を示し、糞便中GDH、毒素AおよびB、ならびに糞便中ラクトフェリンは24時間以内にベースラインに達した。抗原、毒素、および糞便中ラクトフェリンは、抗生物質療法の間陰性のままであった。処置の後、両方の患者が臨床的再燃を経験し、全てのパラメーターに関して急速な増大を示した。抗生物質の第2過程の後、全てのパラメーターがベースラインに戻った。抗生物質の第2過程の完了時に、全てのパラメーターが臨床症状の非存在下で急速に増大した。GDHおよび毒素は両方とも3~4週間存在したままであったが、糞便中ラクトフェリンは迅速にベースラインに戻った。臨床症状が存在せず、患者は健康なままであったため、抗生物質は投与されなかった。

#### 【0034】

##### 結果

この評価において、C.ディフィシルGDH、毒素、および糞便中ラクトフェリンレベルは、ベースライン(陰性)に戻るにより抗生物質療法に迅速に応答した。より興味

深いことに、GDHおよび毒素の両方が、臨床症状を伴わずに、且つベースラインのラクトフェリンにより決定されるように腸炎症を伴わずに存在していた。これらの結果は、どのC.ディフィシル疾患の症例が抗生物質によるそれ以上の処置を必要としない可能性があるかの決定に関する、抗原および毒素の測定との組み合わせでの糞便中ラクトフェリンの役割を示している。加えて、我々の発明は、C.ディフィシル疾患の監視における糞便中ラクトフェリンの役割を提供する。C.ディフィシル疾患の患者において臨床評価と共にラクトフェリンを用いて腸炎症の量を決定することにより、患者の疾患の重症度に関する同定は、処置を最適化し、よりよい患者の転帰をもたらすために有用であることが判明する可能性がある。

#### 【0035】

処置は、様々な重症度のレベルが異なる処置の推奨を必要とするため、C.ディフィシル疾患に関して最適化されてよい。例えば、C.ディフィシル疾患の軽症の症例はしばしば抗生物質処置を受けない。対照的に、中程度の重症度の症例はメトロニダゾールのような抗生物質を必要とする可能性があり、一方でC.ディフィシル疾患の中程度～重症の症例は、バンコマイシンおよびフィダキソマイシン(Difcid)のような抗生物質を用いて処置される可能性がある。

#### 【0036】

図3は、C.ディフィシル感染の初期のエピソードからの、抗生物質処置の間および後の日々のラクトフェリンレベルを図説する。ラクトフェリンは初期のエピソードの間および両方の再燃の期間の間高められた(7.25 μg/mL以上)。レベルは一度処置が開始されると急速に低下し、症状が戻るにつれて増大した。

#### 【0037】

##### 実施例3

下痢および陽性便中毒素(TcdAおよびTcdB)および/またはグルタミン酸デヒドロゲナーゼ(GDH)を有する患者(pts)を募集して、インフォームドコンセントを得た。便標本を、入院時(T=0)に開始して経過観察(T=F)まで収集した。GDH、毒素、およびラクトフェリン(LF:中央値μg/g)を便標本中で免疫アッセイにより測定した。細菌培養および計数(中央値CFU#/g)をエタノール濃縮を用いて行い、分離株のリボタイプを決定した。合計18人の入院患者を募集し、T=0からT=Fまで21日の期間(中央値)の間追跡した。年齢の中央値は75歳であり、男性:女性比率は1:3.5であった。Ptsを以下の3つの群に層別化した:(i)処置され、再発を示さなかったpts(N=9)、(ii)処置され、症状が完全に消散したが、CDIを有していたpts(N=5)、および(iii)最初は処置に応答したが再燃したpts(N=4)。

#### 【0038】

##### 結果

群(i)中の患者は、T=0においてGDH、毒素に関して強い陽性および $10^4$ の芽胞計数からT=Fにおいて全てのバイオマーカーに関して陰性まで至った。LFはこの期間の間406から4までの範囲に入った(表1a)。群(ii)中の5人のptsの4人は、T=0においてGDH、毒素に関して陽性であり、 $10^4$ の芽胞計数を有していた。T=Fにおいて、その5人のptsの3人は毒素陰性であり、3人のptsはGDH陽性のままであり、全てのptsは芽胞を有していた( $10^3$ )。これらのptsに関するLFは、症状の消散と関係して85から2まで低下した(表1b)。群(iii)に関して、4人のptsは全て症候性のままであり、GDH、毒素に関して強い陽性のままであり、 $10^4$ の芽胞計数を有していた。この群に関するLFレベルはT=0およびT=Fの両方において類似していた(それぞれ362および315)(表1c)。合計5人(28%)のptsはT=0において027 CDIを有していた。群(ii)において、5人のptsの3人は027に保菌者として再感染していた。群(iii)において、1人の患者が027に転換された(converted)。\*\*027分離株の全てがフルオロキノロン耐性であった。我々の研究において、T=Fにおいて、ptsの50%がCDIを

10

20

30

40

50

有さず、28%が保菌者になり、22%が病気のままであった。GDH、毒素およびLFレベルは全て臨床疾患の存在と相関していた。C.ディフィシルは複雑な感染症であり続け、疾患の正確な診断はその生物に関する、および炎症に関するバイオマーカーと合わせて用いられる病歴に頼っている。

【0039】

図4Aは、C.ディフィシル疾患に関する抗生物質処置の前および後のCDIバイオマーカーの結果を示す。この群中の患者の全てが、最初の抗生物質処置の間および後に、無症状およびC.ディフィシルが検出されないことを意味する臨床的治癒を有していた。

【0040】

図4Bは、C.ディフィシル疾患に関する抗生物質処置の前および後のCDIバイオマーカーの結果を示す。この群中の全ての患者が、最初の抗生物質処置の間および/または後に、症状の非存在下でC.ディフィシル生物が検出されることを意味するC.ディフィシルの再感染を有していた。

10

【0041】

図4Cは、C.ディフィシル疾患に関する抗生物質処置の前および後のCDIバイオマーカーの結果を示す。この群中の全ての患者が、最初の抗生物質処置の間および/または後に、症状およびC.ディフィシル生物が維持されている、または戻ったことを意味する臨床的再発または非治癒を有していた。

【0042】

代替の態様において、糞便中ラクトフェリンではなく、またはそれに加えて、糞便中カルプロテクチンを腸炎症を測定するための非侵襲的マーカーとして利用することができる。例えば、C.ディフィシル疾患を有すると診断された人において、糞便中カルプロテクチンの定量的レベルを測定することができ、その定量的レベルを軽症、中程度、および中程度～重症が含まれる疾患の重症度と関係付けることができる。さらに、糞便中カルプロテクチンを処置に続いて測定して医学的処置に対する人の応答またはその疾患の活動性レベルを監視することができる。

20

【0043】

要約すると、本発明は、C.ディフィシル疾患を有すると診断された人におけるC.ディフィシル疾患の重症度をラクトフェリンを用いて同定するための非侵襲的方法に向けられている。同定された疾患の重症度を、その人に関する好ましい一連の処置を勧めるために用いることができる。本発明はさらに、ラクトフェリンレベルにおける変化を利用して人の疾患活動性および/または処置に対する応答を監視することに向けられている。

30

【0044】

本発明の免疫アッセイは、腸炎症の指標の役目を果たす安定なタンパク質であるラクトフェリンを検出し、疾患重症度をC.ディフィシル疾患に関係付けるための、および疾患活動性を監視するための定量的な糞便中ラクトフェリンレベルを提供する。本発明を特定の態様に関して記述してきたが、それは全ての点で限定的ではなく説明的であることを意図している。代替の態様が本発明が属する技術分野の当業者にその範囲から逸脱することなく明らかになるであろう。

【0045】

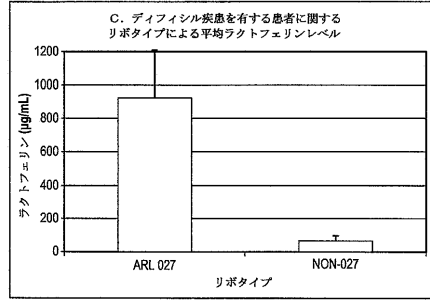
前記のことから、この発明は本明細書において上記で明らかでありその方法に本来備わっている他の利点と一緒に述べた全ての目標および目的を達成するために十分に適合されたものであることが分かるであろう。特定の特徴および部分的組合せは有用なものであり、他の特徴および部分的組合せと関係なく用いることができることは理解されるであろう。これは特許請求の範囲により意図されており、特許請求の範囲内である。

40

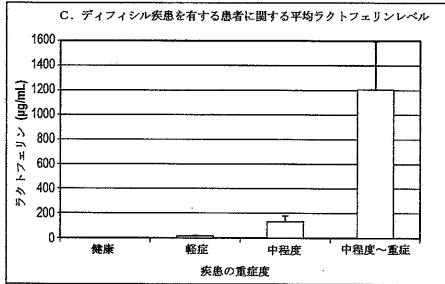
【 図 1 A 】

患者の特徴		全体のパーセント N=39	中程度～重症のパーセント N=15	中程度のパーセント N=21	軽症のパーセント N=3
性別	男性 女性	41 59	60 40	29 71	33 67
年齢	<65歳 >64歳	44 56	40 60	48 52	33 67
痛み	有り 無し	67 33	60 40	71 29	67 33
共存症	糖尿病 痛 腎不全 肺炎	30 23 23 18	13 13 20 27	29 29 29 10	33 33 33 0
便の軟度 (CONSISTENCY)	固体 半固体 液体	3 44 54	0 33 67	5 43 52	0 100 0
臨床評価	重症 中程度 軽症	38 54 8	100 0 0	0 100 0	0 0 100

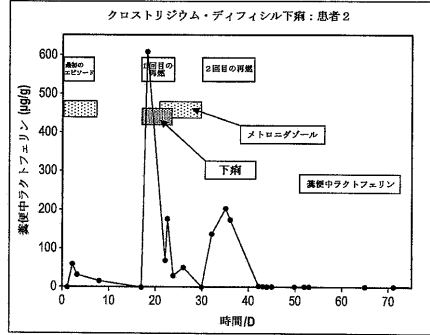
【 図 2 】



【 図 1 B 】



【 図 3 】



【 図 4 A 】

N=9 ID	年齢 (YR)	性別	T=0				T=4				
			LAC (µg/g)	GDH	ABI	PCR リボタイプ	LAC (µg/g)	GDH	ABI	PCR リボタイプ	
1	76	F	448	4.104	3.986	1.90E+04	ARL 027	0	0	0	N/A
3	76	F	48	3.902	4.126	3.00E+03	ARL 027	22	0	0	N/A
5	82	F	35	4.307	3.838	1.60E+04	ARL 027	0	0	0	N/A
7	83	M	406	4.307	3.838	1.60E+04	ARL 027	0	0	0	N/A
11	24	F	151	4.101	0.656	7.00E+02	ARL 027	1	0	0	N/A
12	55	M	14	4.687	1.787	4.00E+02	ARL 027	12	0	0	N/A
14	79	F	515	4.327	3.889	3.50E+03	ARL 027	4	0	0	N/A
17	77	F	1291	4.304	4.215	8.00E+03	ARL 027	2	0	0	N/A
19	72	F	826	4.125	4.110	4.50E+03	ARL 027	72	0.058	0	0
中央値	72		406	4.304	3.986	1.90E+04	35% 027	4	0	0	N/A

【 図 4 B 】

N=5 ID	年齢 (YR)	性別	T=0				T=4				
			LAC (µg/g)	GDH	ABI	PCR リボタイプ	LAC (µg/g)	GDH	ABI	PCR リボタイプ	
2	80	F	75	4.180	3.130	3.20E+03	ARL 027	17	5.000	0.478	4.00E+03
8	35	F	403	4.225	4.097	1.30E+05	ARL 027	0	0.833	0.943	5.80E+03
10	79	F	10	0.038	0	3.00E+04	ARL 014	2	0	0	1.00E+02
15	82	F	85	4.434	3.695	5.00+03	ARL 126	57	0	0	1.00E+02
16	49	F	164	5	1.512	1.90E+05	ARL 089	0.4	4.151	0	4.20E+04
中央値	79		85	4.225	3.130	3.00E+04	40% 027	2	0.833	0	4.00E+03

【 4 C 】

N=4 ID	性別 (Y/N)	M/F	T=0				T=1				表初の新着履歴						
			LAC (999)	GDH	ABLI	源数計算 リボタイプ	PCR リボタイプ	LAC (999)	GDH	ABLI	源数計算 リボタイプ	PCR リボタイプ	LAC (999)	GDH	ABLI	源数計算 リボタイプ	PCR リボタイプ
18	M	M	453	4,032	0.884	2,02E+04	ARL 054	453	3,839	0.742	1,00E+05	ARL 055	453	3,839	0.742	1,00E+05	ARL 055
19	M	M	381	4,225	4.076	1.50E+05	ARL 055	381	4,153	3.663	2.20E+04	ARL 057	381	4,153	3.663	2.20E+04	ARL 057
20	F	F	1841	4,503	2.268	1.00E+04	ARL 058	1841	4,157	3.900	2.20E+04	ARL 058	1841	4,157	3.900	2.20E+04	ARL 058
中央値	75		362	4,364	3.188	1.00E+05	NO.027	315	4,085	2.867	3.00E+04		315	4,085	2.867	3.00E+04	259.027

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/35495
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12P 21/04; G01N 33/00 (2012.01) USPC - 435/71.3, 7.92 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/71.3, 7.92 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/71.3, 7.92; 424/158.1, 173.1, 239.1 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (USPT, EPAB, JPAB, PGPB); Google Scholar Search term: fecal lactoferrin, Clostridium difficile (C. difficile of C. DIFF), disease stratification, inflammatory diarrhea, immunoassay, quantitative immunoassay (EIA), treatment regimen, therapeutic, antibiotic, vancomycin, metronidazole, native flora transplantation		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	OPPENHEIM. Scientific Symposium on New Approaches to Clostridium difficile Testing [online] 23 October 2010 [retrieved 6 July 2012]. Available on the internet: <URL: <a href="http://www.alere.co.uk/pdf/150411101655-Alere_Barcelona_FINAL1.pdf">http://www.alere.co.uk/pdf/150411101655-Alere_Barcelona_FINAL1.pdf</a> >. Especially pg 2 col 2 para 2-4, pg 2 table 2, pg 3 col 1 para 1-3 and col 2 para 1.	34-39 ----- 1-33, 40
Y	New York-Presbyterian. Guidelines for the Management of Clostridium difficile-Associated Disease (CDAD) in Adult Patients [online] 28 August 2008 [retrieved on 6 July 2012]. Available on the internet: <URL: <a href="http://www.id.hs.columbia.edu/documents/Guidelines-Clostridiumdifficile-8-28-08.pdf">http://www.id.hs.columbia.edu/documents/Guidelines-Clostridiumdifficile-8-28-08.pdf</a> >. Especially pg 1 para 2, pg 2 table.	1-33
Y	SHASTRI et al. Prospective multicenter study evaluating fecal calprotectin in adult acute bacterial diarrhea. Am J Med December 2008 Vol 121 No 12 Pages 1099-1106. Especially abstract.	40
Y	YOON et al. Treatment of Refractory/Recurrent C. difficile-associated Disease by Donated Stool Transplanted Via Colonoscopy. J Clin Gastroenterol September 2010 Vol 44 No 8 Pages 562-566. Especially abstract.	5,10,15,27,33
Y	US 2009/0253155 A1 (BOONE et al.) 8 October 2009 (08.10.2009). Especially para [0007], claim 8.	21-33
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 July 2012 (06.07.2012)		Date of mailing of the international search report <b>27 JUL 2012</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 31/7048 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7048	
<b>A 6 1 P 1/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/12	
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	

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

(72) 発明者 ブーン, ジェームズ・ハンター  
 アメリカ合衆国バージニア州 2 4 0 7 3, クリスチャンズバーグ, アローヘッド・トレイル 5 4  
 5

(72) 発明者 リヤリー, デヴィッド・エム  
 アメリカ合衆国バージニア州 2 4 1 4 2, ラドフォード, マックアーサー・アベニュー 2 0 4

(72) 発明者 ウィルキンズ, トレーシー・ディー  
 アメリカ合衆国バージニア州 2 4 1 4 9, ライナー, チェスナット・リッジ・ロード 6 2 5 4

(72) 発明者 カーマン, ロバート・ジェイ  
 アメリカ合衆国バージニア州, クリスチャンズバーグ, ノース・フォーク・ロード 1 7 0 0

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB04 DA20 DA36 DA38 DA42  
 4C084 AA02 AA17 BA25 DA44 NA14 ZA732 ZB352  
 4C086 AA01 EA12 MA01 MA04 NA14 ZA73 ZB35

专利名称(译)	粪便乳铁蛋白作为确定艰难梭菌病患者疾病严重程度和监测感染的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014519018A</a>	公开(公告)日	2014-08-07
申请号	JP2014508608	申请日	2012-04-27
申请(专利权)人(译)	Tekkurabu公司		
[标]发明人	ブーンジェームズハンター リヤリーデヴィッドエム ウィルキンズトレーシーディー カーマンロバートジェイ		
发明人	ブーン,ジェームズ・ハンター リヤリー,デヴィッド・エム ウィルキンズ,トレーシー・ディー カーマン,ロバート・ジェイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68 A61K45/00 A61K38/00 A61K31/7048 A61P1/12 A61P31/04 A61K35/74		
CPC分类号	A61K31/4164 A61K31/7034 A61K35/74 A61K38/14 A61P1/00 A61P1/12 A61P31/04 G01N33/56911 G01N2333/33 G01N2333/79 G01N2800/52 G01N2800/56 A61K45/06		
FI分类号	G01N33/53.V G01N33/569.F G01N33/68 A61K45/00 A61K37/02 A61K31/7048 A61P1/12 A61P31/04		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB04 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA38 2G045/DA42 4C084/AA02 4C084 /AA17 4C084/BA25 4C084/DA44 4C084/NA14 4C084/ZA732 4C084/ZB352 4C086/AA01 4C086/EA12 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA73 4C086/ZB35		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 國枝 由紀子		
优先权	13/457064 2012-04-26 US 13/457049 2012-04-26 US 61/480616 2011-04-29 US		
其他公开文献	JP2014519018A5 JP6077524B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

艰难梭状芽孢杆菌疾病包括一系列临床特征，从温和的~自限性的腹泻到威胁生命的假膜性结肠炎和巨核细胞增生。根据疾病的严重程度对艰难梭菌病例进行不同的治疗。轻中度病例可用甲硝唑治疗，中度至重度易燃病例常用万古霉素或非达霉素治疗。艰难梭菌病的存在是由艰难梭菌病引起的。使用包括艰难梭菌抗原（GDH），毒素A和B以及粪便乳铁蛋白的生物标志物组检测。在疑似艰难梭菌病的患者中，当检测到GDH时，表明存在艰难梭菌，然后表明产生毒素的艰难梭菌，并且毒素A和/或B中检测到支持艰难梭菌相关性疾病，粪便乳铁蛋白浓度的诊断通过指示被测量肠道炎症的量，以确定疾病的严重程度。

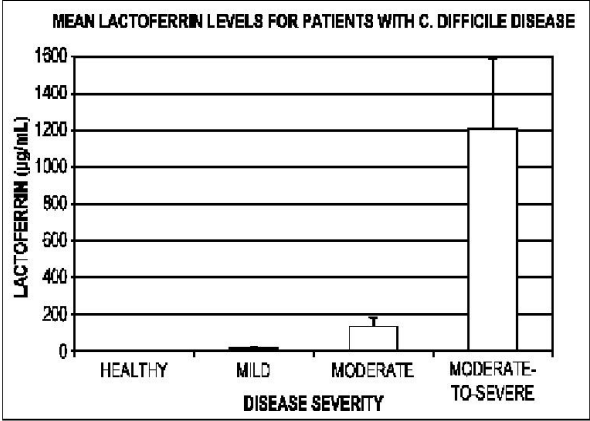


FIG. 1B