

(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2016-504572

(P2016-504572A)

(43) 公表日 平成28年2月12日 (2016. 2. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	J
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	K
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 9 7
GO 1 N 15/14 (2006.01)	GO 1 N 15/14	C

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2015-543451 (P2015-543451)	(71) 出願人	513064405
(86) (22) 出願日	平成25年11月25日 (2013. 11. 25)		ロフィアス バイオサイエンス ゲゼ
(85) 翻訳文提出日	平成27年5月19日 (2015. 5. 19)		ルシャフト ミット ベシュレンクテル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/074603		ハフツング
(87) 国際公開番号	W02014/080009		ドイツ連邦共和国 9 3 0 5 3 レーゲン
(87) 国際公開日	平成26年5月30日 (2014. 5. 30)		スブルク ヨゼフ・エンゲルト・シュトラ
(31) 優先権主張番号	61/729, 473		ーセ 1 3 ビオパルク ドリット
(32) 優先日	平成24年11月23日 (2012. 11. 23)	(74) 代理人	100092093
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 辻居 幸一
(31) 優先権主張番号	12194069.6	(74) 代理人	100082005
(32) 優先日	平成24年11月23日 (2012. 11. 23)		弁理士 熊倉 禎男
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CMV感染の存在を認識する方法

(57) 【要約】

患者におけるCMV感染の存在を認識する方法であって、
 -患者から得られる全血試料におけるCD28neg/CD27neg
 CD4 T細胞のレベルを測定すること； -CMVに感染して
 いない対照群のレベルとCD28neg/CD27neg CD4 T細胞の
 レベルを比較すること； および-患者におけるCD28neg/C
 D27neg CD4 T細胞のレベルが対照群のCD28neg/CD27neg
 CD4 T細胞のレベルよりも著しく高い場合にCMV感染の
 存在を特徴づけることによる前記方法。

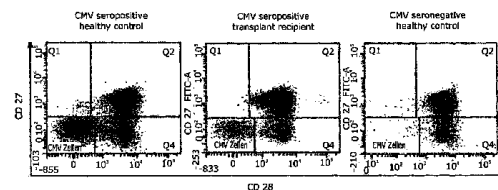


Fig.1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者におけるCMV感染の存在を認識する方法であって、
-患者から得られる全血試料におけるCD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルを測定すること；
-CMVに感染していない対照群のレベルとCD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルを比較すること；および
-患者におけるCD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルが対照群のCD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルよりも著しく高い場合にCMV感染の存在を特徴づけること
による前記方法。

10

【請求項 2】

CD28neg/CD27neg CD4 T細胞のPD-1発現を測定し、この発現が経時的に増加するかどうかをウイルス血症の指標とする、非活動性CMV感染と活動性CMV感染とを区別するための、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

免疫不全患者、移植レシピエントまたは新生児においてCMV感染によって引き起こされる合併症のリスク評価のための、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

抗ウイルス薬でのCMVの治療の進行をモニターするための、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

CD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルがフローサイトメトリーによって測定される、請求項 1 ~ 4 の少なくとも 1 つに記載の方法。

20

【請求項 6】

CD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルが、それぞれ別々に標識したCD4、CD27、CD28、およびPD-1に対する抗体を用いる複数色分析によって測定される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

CD28、CDs27、CD4およびPD-1に対する抗体と混合し、次いで周囲温度でインキュベートし、溶解液を添加し、次いでインキュベートし、細胞を分離し、フローサイトメトリーを行うことによって血液試料が処理される、請求項 1 ~ 6 の少なくとも 1 つに記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、CMV感染の存在を認識する方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

サイトメガロウイルス(CMV)は、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)またはヒトヘルペスウイルス5型(HHV5)とも呼ばれ、多くの感染症を引き起こす。詳しくは、http://en.wikipedia.org/wiki/Human_cytomegalovirusを参照されたい。

【0003】

このウイルスは、ヒトの感染個体の細胞内に終世存続する。この疾患が終了した後であっても、そのヒトの終生、このウイルスが体液を介して無症状で断続的に排出される場合がある。HCMVの初感染では、多くの場合重篤な症状がほとんど見られないため、その感染個体は、その個体が感染していることを自覚さえしない。このウイルスは、まれに、長期の発熱および頸部アデノパシーを含む単核球症様症候群に関連する場合がある。さらに、免疫適格個体において、まれに関節痛および関節炎、大腸炎、肺炎、肝炎または心筋炎に付随して初感染が生じる場合がある。健常集団の60%までが、リンパ組織に終世存続するHCMVを有している。

40

【0004】

対照的に、周産期および免疫不全個体においてはCMV感染は顕著である。これらの個体

50

には、臓器移植患者、幹細胞移植患者、細胞増殖抑制剤で治療した患者または、エイズを患っておりCD4+レベルが低い個体が含まれる。長期の免疫抑制によってウイルス複製が制御されず重篤な疾患が生じる恐れのある、臓器移植または幹細胞移植後の免疫不全患者においては、CMV関連疾患症状ははるかに一般的である。このリスクは、免疫抑制剤のレベルに加えて、主としてドナーおよびレシピエントのCMV感染状態によって決定される。CMV関連合併症のリスクは、陰性移植片のCMV陰性レシピエントにおいて最も低い。レシピエントがCMV陽性である場合、このリスクは中程度に高いが、CMV陰性患者がCMV陽性ドナーから移植片を受容する場合にこのリスクは最も高い。これらの環境下では、CMV感染は、ほとんどの器官において、核または細胞質における巨細胞を示すリンパ球または形質細胞の間質性感染をもたらす。しばしば肺炎、網膜炎、大腸炎および肝炎が生じる。細菌によるさらなる重感染が引き起こされる場合があり、これは致死性の合併症をもたらす恐れがある。

10

患者の臨床症状を呈するCMV疾患と、診断検査（CMV-PCRまたはpp65抗原による血液中のCMVの検出）後にのみ認識することができるCMV感染とは区別される。残念ながら、これらの診断テストは最適ではない。例えばCMV-PCRは25%の偽陽性結果を示す。

【0005】

Sesterらは、Transplantation 2001 (Sester M, Sester U, Gartner B, Heine G, Girndt M, et al. (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. Transplantation 71: 1287-1294)およびAJT 2005 (Sester U, Gartner BC, Wilkens H, Schwaab B, Wossner R, et al. (2005) Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. Am J Transplant 5: 1483-1489.)において、改善された検出法に関して報告している。しかしながら、この方法は、それが長時間行われ（結果が得られるまで約8時間）、さらに、T細胞は機能的に無傷でなければならず、そのため例えば試料を永続して約4（2～6）に冷却して分析する骨の折れる処置と試料採取後24時間以内に測定を行うことを必要とするため好ましくない。

20

【0006】

Jesser et al. 2006 (Jesser RD, Li S, Weinberg A (2006) Regulatory T cells generated during cytomegalovirus in vitro stimulation of mononuclear cells from HIV-infected individuals on HAART correlate with decreased lymphocyte proliferation. Virology 352: 408-417.)およびTovar-Salazar et al 2010 (Tovar-Salazar A, Patterson-Bartlett J, Jesser R, Weinberg A (2010) Regulatory function of cytomegalovirus-specific CD4+CD27-CD28- T cells. Virology 398: 158-167)は、CMV特異的T細胞(CD27neg CD28neg CD4 T細胞と定義される)の頻度が、PBMCのin vitro CMV特異的増殖と相互関連し(Jesser 2006)、これらが多量のPD1を発現すること(Tovar-Salazar et al 2010)を示した。

30

【発明の概要】

【0007】

本発明の目的の1つは、先行技術の欠点を避ける方法を提供することである。

40

本目的は、患者におけるCMV感染の存在を認識する方法であって、

-患者から得られる全血試料におけるCD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルを測定すること；

-CMVに感染していない対照群のレベルとCD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルを比較すること；および

-患者におけるCD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルが対照群のCD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルよりも著しく高い場合にCMV感染が存在すると同定すること

による前記方法によって達成される。

【0008】

本発明の方法は、顕著な量のCD28neg/CD27neg/CD4 T細胞がCMVに特異的であるという

50

驚くべき発見に基づく。従って、CD28neg/CD27neg/CD4 T細胞は、Sesterらによって記載されたアッセイにおける代替物として用いることができる。

本発明の方法は、非活動性CMV感染と活動性CMV感染とを区別するために用いることができる。移植の場合、CD28neg/CD27neg CD4 T細胞のPD-1またはLA-4発現を測定し、この発現が経時的に増加するかどうかをウイルス血症の指標とすることによって活動性(一次)CMV感染を検出することができる。驚くべきことに、CD28neg/CD27neg CD4 T細胞において、PD-1発現を測定するだけで、この発現が経時的に増加するかどうかウイルス血症の指標となる場合、CTLA-4発現を測定しなくてもCMVの再活性化を同定することができる。

本発明の方法は、移植レシピエントにおけるCMV感染によって引き起こされる合併症のリスク評価に用いることができる。

【0009】

他の実施形態において、本発明の方法は、抗ウイルス薬でのCMVの治療の進行をモニターするために用いることができる。

本発明によれば、CD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルは、特にフローサイトメトリーによって測定される。

本発明のさらなる実施形態において、CD28neg/CD27neg CD4 T細胞のレベルは、それぞれ別々に標識したCD4、CD27、CD28およびPD-1に対する抗体を用いる4色分析によって測定される。

本発明のさらに他の実施形態において、CD28、CDs27、CD4およびPD-1に対する抗体と混合し、次いで周囲温度でインキュベートし、溶解液を添加し、次いでインキュベートし、細胞を分離し、フローサイトメトリーを行うことによって血液試料が処理される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】CD28neg/CD27neg/CD4 T細胞のCMV血清反応陽性集団を示す図である。

【図2】CD28neg/CD27neg/CD4 T細胞の百分率 0.44によって、CMV血清反応陽性とCMV血清陰性とが区別されることを示す図である。

【図3】CD28-CD27CD4 T細胞上のPD-1が一次CMV感染および再活性化の両方においてアップレギュレートされることを示す図である。

【図4】CD28-CD27CD4 T細胞上のCTLA-4が、一次CMV感染においてはアップレギュレートされるが、再活性化においてはアップレギュレートされないことを示す図である。

【図5】移植後のCD28-CD27-CD4 T細胞上のPD1 MFIの縦断的解析を示す図である。

【図6】CD28-CD27-CD4 T細胞上のPD1 MFIの、ウイルス血症に関連した縦断的解析を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の方法は、全血から出発するアッセイ、すなわち、血清反応陽性患者と血清反応陰性患者を区別するためのカットオフ値の決定(例えば、感度88,89%および特異度100%のCD28neg CD27neg CD4 T細胞 0,61%または感度=93.33%および特異度=97.06%のCD28neg CD27neg CD4 T細胞 0.44%(図1および2))を提供する。対照は、例えばROC分析によって示される。45例のCMV血清反応陽性健常対照および34例のCMV血清反応陰性健常対照を用いた例を図2に示す。本例において、CMV血清反応陽性の正確な指標として、CD28-/CD27-CD4 T細胞の百分率 0.44%が同定された(感度=93.33%、特異度=97.06%)。特異度100%、感度88,89%では、カットオフ値はCD28neg CD27neg CD4 T細胞 0,61%である。

ウイルス血症は、PD-1発現の増加によって予測することができる(図3)。これによって、活動性CMV感染の初期症状が最初に出現する前に医師が抗ウイルス治療を具体的に開始することを可能にする。CD27neg CD4 T細胞のPD-1発現は、移植手術前の平均値(MFI:527)からウイルス血症発現直前のより高い値(MFI:722)へと増加するか、またはその値(MFI:722)からウイルス血症におけるさらに高い値(MFI:803)へと増加する。

【0012】

図4は、CD28neg CD27neg CD4 T細胞において、CTLA-4をモニターすることによって得

10

20

30

40

50

られた結果を示す。本例においては、CD28neg CD27neg CD4⁺ T細胞におけるCTLA-4は一次CMV感染においてアップレギュレートされるが、再活性化においてはアップレギュレートされない。

図5の左部分のグラフは感染の経過を示す。図3の右部分是非ウイルス血症患者のグラフを示す。非ウイルス血症患者よりも急な左のグラフの傾きから、CMVによって引き起こされる感染が開始されたため治療を開始しなければならないことを医師は理解する。傾きが横ばい状態になる場合、医師はその治療が有効であることを知る。

【0013】

本発明の方法は以下の利点を提供する：

- ・本方法はCMV関連細胞性免疫の刺激非依存的同定を可能にする；
- ・本方法は従来の試験の持続期間約8時間よりも迅速（＜1.5時間）である；
- ・本方法はより簡単である（簡単な表面染色、わずか100 μ lの血液を必要とするのみ、インキュベーション時間なし）；
- ・より優れたロジスティックス、表面染色は、刺激依存的アッセイと比較してより長期間の試料の保存を可能にする。

10

【0014】

本発明の方法は、以下のプロトコルによってさらに説明される。

全血100 μ lにCD27、CD28、CD4およびPD1(CTLA-4)に対する抗体を滴定量に加え、混合し、室温、暗所で20分間インキュベートした。続いて、赤血球を溶解し、これをリン酸緩衝化生理食塩水、5%濾過ウシ胎児血清、0.5%ウシ血清アルブミンおよび0.07%アジ化ナトリウムからなるFACS緩衝液で洗浄し、その後細胞上での抗原の発現を解析した。

20

【図2】

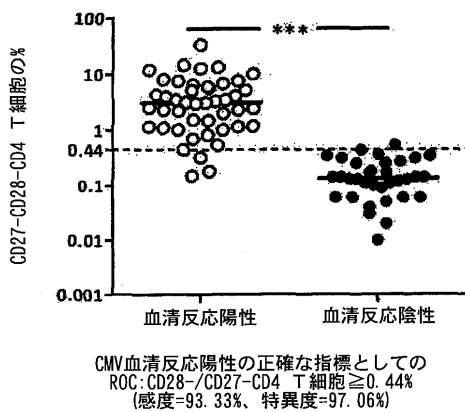
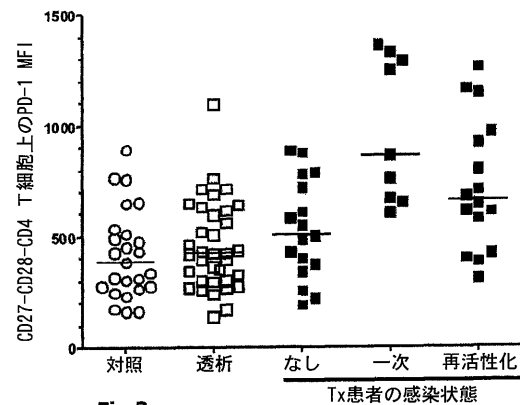


Fig.2

【図3】



【図 4】

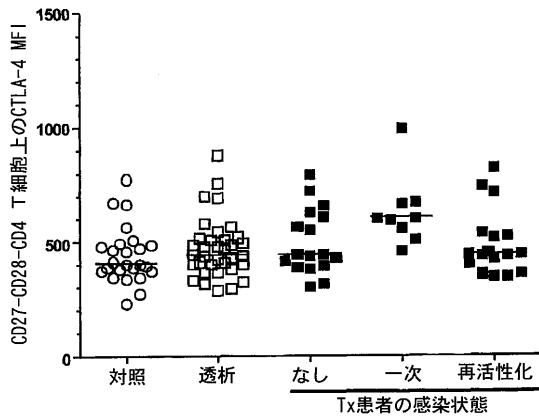


Fig.4

【図 6】

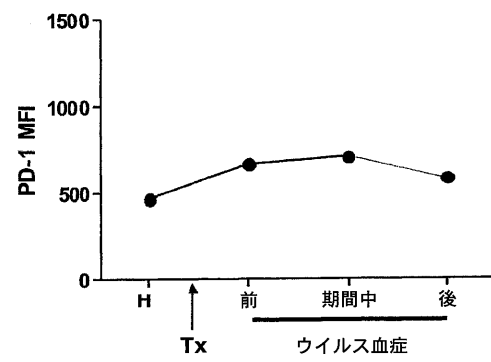


Fig.6

【図 5】

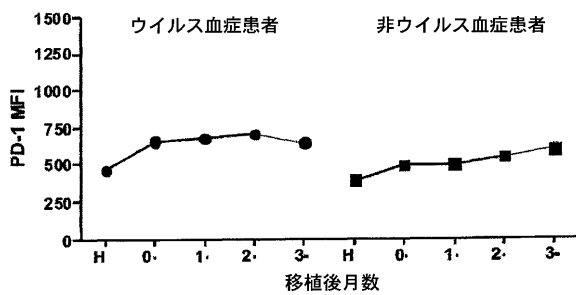


Fig.5

【 図 1 】

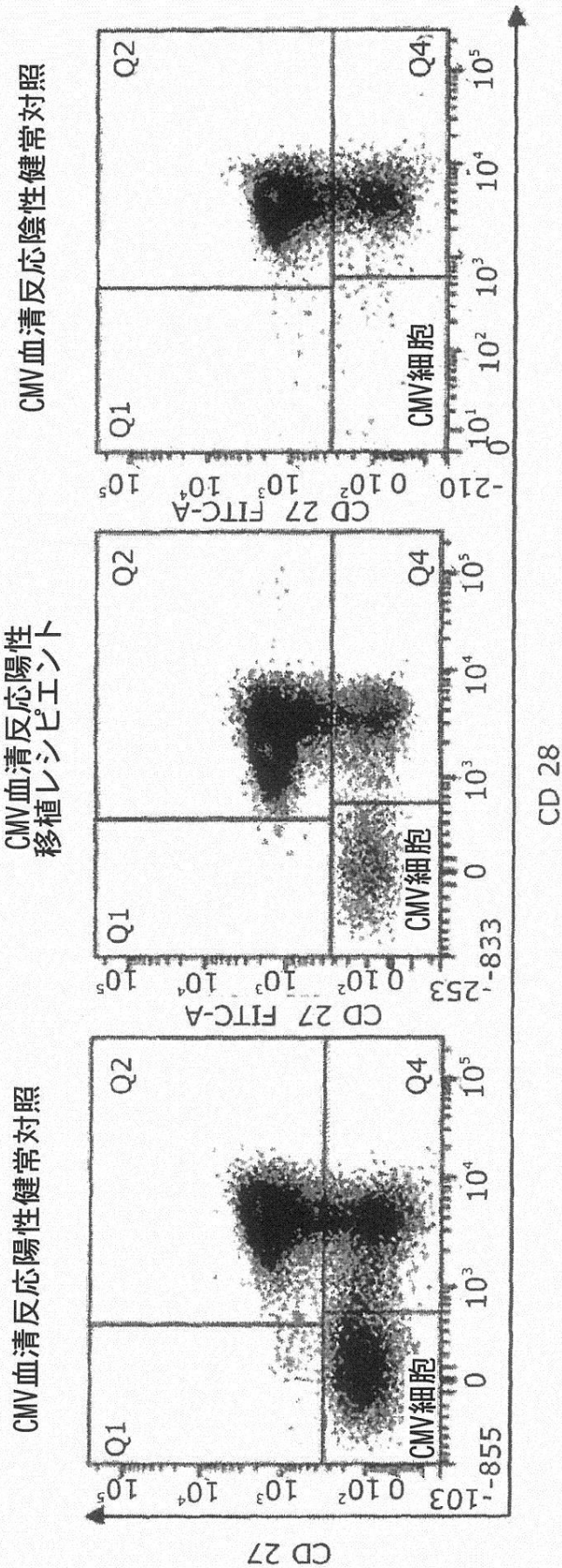


Fig.1

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/074603

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/569
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOVAR-SALAZAR A; PATTER- SON-BARTLETT J; JESSER R; WEINBERG A: "Regulatory function of cytomegalovirus-specific CD4+CD27-CD28- T cells", VIROLOGY, vol. 398, 2010, pages 158-167, XP002694596, cited in the application abstract; figure 1 page 162, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* 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

22 January 2014

Date of mailing of the international search report

30/01/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luis Alves, Dulce

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/074603

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DERHOVANESEAN EVELYNA ET AL: "Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans.", THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY DEC 2011, vol. 92, no. Pt 12, December 2011 (2011-12), pages 2746-2756, XP002694597, ISSN: 1465-2099 abstract -----	1,5-7
X	GALLEZ-HAWKINS G M ET AL: "Increased Programmed Death-1 Molecule Expression in Cytomegalovirus Disease and Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation", BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, KLUGE CARDEN JENNINGS PUBLISHING, CHARLOTTESVILLE, VA, US, vol. 15, no. 7, 1 July 2009 (2009-07-01), pages 872-880, XP026192850, ISSN: 1083-8791, DOI: 10.1016/J.BBMT.2009.03.022 [retrieved on 2009-06-16] page 877, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 abstract -----	1,2
X,P	J. DIRKS ET AL: "PD-1 Analysis on CD28 - CD27 - CD4 T Cells Allows Stimulation-Independent Assessment of CMV Viremic Episodes in Transplant Recipients", AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION, vol. 13, no. 12, 22 December 2013 (2013-12-22), pages 3132-3141, XP55097656, ISSN: 1600-6135, DOI: 10.1111/ajt.12480 the whole document -----	1-7

フロントページの続き

(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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 パールマン フェルディナント ヘルマン

ドイツ連邦共和国 3 0 1 7 5 ハノーファー フェルディナントシュトラッセ 7

(72)発明者 フリーザー ダニーロ

ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデルベルク ハントシュースハイマー ラントシュトラッセ
9 / 1

(72)発明者 ゼスター マルティナ

ドイツ連邦共和国 6 6 4 2 4 ホンブルク リンデンシュトラッセ 1 1

(72)発明者 ゼスター ウルバン

ドイツ連邦共和国 6 6 4 2 4 ホンブルク リンデンシュトラッセ 1 1

专利名称(译)	如何识别CMV感染的存在		
公开(公告)号	JP2016504572A	公开(公告)日	2016-02-12
申请号	JP2015543451	申请日	2013-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	洛菲厄斯生物科学有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Rofiasu生物科学GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	バールマンフェルディナントヘルマン フリーザーダニーロ ゼスターマルティナ ゼスターウルバン		
发明人	バールマン フェルディナント ヘルマン フリーザー ダニーロ ゼスター マルティナ ゼスター ウルバン		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 G01N15/14		
CPC分类号	G01N33/56994 G01N2333/045		
FI分类号	G01N33/569.J G01N33/53.K G01N33/543.597 G01N15/14.C		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	61/729473 2012-11-23 US 2012194069 2012-11-23 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译) 识别患者中是否存在CMV感染的方法-确定从患者获得的全血样品中CD28neg / CD27neg CD4 T细胞的水平；-未感染CMV和CD28neg的对照组的水平/ 通过比较CD27neg CD4 T细胞的水平；并通过表征患者中CD28neg / CD27neg CD4 T细胞的水平显著高于对照组中CD28neg / CD27neg CD4 T细胞的水平来描述CMV感染的存在 方法。	(21) 出願番号 特願2015-543451 (P2015-543451) (86) (22) 出願日 平成25年11月25日 (2013.11.25) (85) 翻訳文提出日 平成27年5月19日 (2015.5.19) (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/074603 (87) 国際公開番号 WO2014/080009 (87) 国際公開日 平成26年5月30日 (2014.5.30) (31) 優先権主張番号 61/729,473 (32) 優先日 平成24年11月23日 (2012.11.23) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 12194069.6 (32) 優先日 平成24年11月23日 (2012.11.23) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 513064405 ロフィアス バイオサイエンスーズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング ドイツ連邦共和国 93053 レーゲンスブルク ヨゼフ・エンゲルトーシュトラッセ 13 ビオバルク ドリット (74) 代理人 100082083 弁理士 辻居 幸一 (74) 代理人 100082005 弁理士 熊倉 禎男 (74) 代理人 100084663 弁理士 稲田 篤 (74) 代理人 100083300 弁理士 浅井 賢治
---	--	--

最終頁に続く