

(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2014-507661
(P2014-507661A)

(43) 公表日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(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 H	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
C O 7 K 14/16 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-554964 (P2013-554964)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月21日 (2012. 2. 21)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年10月18日 (2013. 10. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/050787
 (87) 国際公開番号 WO2012/114272
 (87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012. 8. 30)
 (31) 優先権主張番号 11305187.4
 (32) 優先日 平成23年2月22日 (2011. 2. 22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 513212420
 インナヴィルヴァクス
 I N N A V I R V A X
 フランス国、エフ-91058 エヴリー、リュ・ピエール・フォンテーヌ 4、ジェノポール・アントルプリーズ、キャンピュ 1
 (71) 出願人 591100596
 アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル
 フランス国、エフ-75013 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 101
 (74) 代理人 110001508
 特許業務法人 津国

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV 疾病の進行の予後診断法

(57) 【要約】

a) HIV-1 ウイルスに感染した患者から収集された試料中の配列番号 2 の 3 S ペプチドに対して指向される抗体レベルを測定する工程、b) 工程 a) で測定した抗 3 S 抗体レベルを、HIV-1 感染の進行を示す抗 3 S 抗体レベルの基準値と比較する工程を含む、前記患者における in vitro における HIV-1 感染の進行の予後診断法。

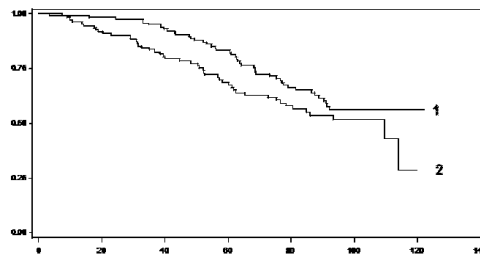


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H I V - 1 ウイルスに感染した患者における *in vitro*における H I V - 1 疾病の進行の予後診断法であって、

a) 前記患者から収集した試料中の配列番号 2 の 3 S ペプチドに対して指向される抗体のレベルを測定する工程、

b) 工程 a) で測定した抗 3 S 抗体のレベルを、H I V - 1 疾病の進行を示す抗 3 S 抗体レベルの基準値と比較する工程

を含む、前記方法。

【請求項 2】

工程 a) は、配列番号 2 のペプチドに対して指向される抗体の免疫検出によって行なわれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

工程 a) は、固相支持体上に固定された配列番号 2 のペプチドを含むポリペプチドを使用して E L I S A アッセイによって行なわれる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

以下の工程：

1) 前記患者から収集した前記試料中の H I V - 1 ウイルス負荷を測定する工程、および

2) 工程 1) で測定したウイルス負荷値を、H I V - 1 疾病の進行を示す基準値と比較する工程

を含むとしてさらに定義される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

工程 a) が、H I V - 1 感染患者から収集した試料中の少なくとも 1 つの他の H I V - 1 疾病予後診断マーカーを測定することをさらに含み、そして

工程 b) が、工程 a) で測定した各 H I V - 1 疾病予後診断マーカーについて、得られたマーカー値を、前記予後診断マーカーについての基準値と比較することを含む、請求項 1 記載の *in vitro*における H I V - 1 疾病の進行の予後診断法。

【請求項 6】

前記の 1 つ以上の他の H I V - 1 疾病予後診断マーカーが、(i) H I V ウイルス負荷、(i i) C D 4 T 細胞の絶対数、(i i i) C D 4 T 細胞の比率、および (i v) C D 4 + / C D 8 + T リンパ球の比からなる群より選択される、請求項 5 記載の *in vitro*における方法。

【請求項 7】

工程 a) が、

- 上のマーカー (i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i) および (i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i) および (i i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i) および (i i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i)、(i i) および (i i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル

、

- 上のマーカー (i)、(i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i)、(i i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベ

ル、

10

20

30

40

50

- 上のマーカー (i)、(i i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、および

- 上のマーカー (i)、(i i)、(i i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル

からなる群より選択された H I V - 1 疾病予後診断マーカーの組合せの測定を含む、請求項 6 記載の *in vitro* における方法。

【請求項 8】

a) 必要とする H I V - 1 感染患者に、1 つ以上の抗レトロウイルス剤を含む薬学的組成物を投与することによって治療処置を行なう工程、および

b) 前記患者から収集した試料に対して、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の *in vitro* における H I V - 1 疾病の進行の予後診断法を実施する工程、および 10

c) 必要であれば、工程 a) で実施された治療処置を適切に適合させる工程を含む、治療処置の効力をモニタリングするための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、H I V 疾病の予後診断の分野に関する。

【0002】

H I V ウイルスによるヒトの感染は、一般的に、血漿試料中の抗 H I V 抗体の免疫検出によって診断される。今日、数多くの H I V E L I S A 検査キットが市販されている。一般的に、公知の H I V E L I S A 検査キットは、H I V 抗原の混合物で予めコーティングされたポリスチレン製マイクロウェルのストリップを使用し、前記 H I V 抗原は、組換え H I V - 1 g p 4 1、g p 1 2 0 および H I V - 2 g p 3 6 糖タンパク質などの、*E. coli* で発現される組換え H I V 抗原からなり得る。 20

【0003】

一旦、H I V ウイルスによる個体の感染が診断されたら、いつ抗レトロウイルス製剤による処置 (A R T) を開始するかを決定する目的を含めて、H I V 疾病の進行の経過観察が行なわれる。これは、前記患者に対する H I V 病期分類法を実施することを必要とする。

【0004】

H I V 疾病病期分類システムおよび分類システムは、臨床医および患者に、臨床管理のための必要な情報を提供する重要なツールである。2 つの主要な分類システム、すなわち、それぞれ (i) システム世界保健機関 (W H O) 臨床病期分類システムおよび疾病分類システム、並びに (i i) 米国疾病管理予防センター (C D C) 分類が現在使用されている。 30

【0005】

H I V / A I D S の W H O 臨床病期分類システムおよび疾病分類システムは、主に、臨床事象の発生の決定に基づき、臨床検査結果は必ずしも必要とされない。W H O 臨床病期分類システムは、資料の限られた国で広く使用されており、そして施設において第一レベルおよび紹介レベルの両方において実用的および有用であることが証明された。 40

【0006】

C D C 病期分類システムは、C D 4 + T リンパ球細胞 (C D 4) 数によって、および特定の H I V 関連容態の存在によって、H I V 疾病の重度を評価する。C D C 病期分類システムによると、A I D S の定義は、2 0 0 個の細胞 / μ l 未満の C D 4 数、または 1 4 % 未満の C D 4 比率 (全てのリンパ球に対して) を有する全ての H I V 感染個体、並びに特定の H I V 関連容態および症状を有するものを含む。従って、C D C システムによると、C D 4 数は、H I V の段階および予後を評価するための、並びに A I D S への進行および日和見的な病気のリスクをモニタリングするための標準的な臨床検査からなる。C D 4 細胞数はまた、医師が症状のある患者における鑑別診断を行ない、そして抗レトロウイルス処置 (A R T) の開始に関する決定を下し、そして日和見感染のための予防を開始するこ 50

とを手引きする。

【0007】

非処置のHIV感染では、HIV複製は、通常、1日に数十億個の新たなHIVコピーを産生する。血漿中HIV RNA（ウイルス負荷）検査は、血漿中のHIVウイルス負荷（burden）を定量する。ウイルス負荷のモニタリングを行なえる地域では、ウイルス負荷は、ARTを受けている患者における処置応答をモニタリングし、そしてCD4細胞数と共に、HIV進行を評価するために使用される標準的なツールである（特に、Mellors et al., 1996, Science, Vol. 272(5265) : 1167-170参照）。

【0008】

AIDSは、世界中で3000万人を超える人々が罹患している大流行の疾病であり、毎年200万人を超える人々が新たに感染している。現在までに、AIDSは依然として致命的な疾病であり、これにより2009年には200万人を超える人々が死亡した。

10

【0009】

複数の明確に異なる治療処置を利用できる必要性または既存のARTを絶え間なく改良する必要性の他に、医師に、特にARTを開始する適切な時期を決定させ、そしてケースバイケースで疾病進行プロファイルに対して処置を正しく適応させることを手助けすることを目的とした的確なまたは補完するツールを提供するために、複数の病期分類法または予後診断法が絶えず必要とされている。

【0010】

発明の要約

20

本発明は、HIV-1ウイルスに感染した患者におけるin vitroにおけるHIV-1疾病の進行の予後診断法に関し、前記方法は、

a) 前記患者から収集した試料中の3Sペプチドに対して指向される抗体のレベルを測定する工程、

b) 工程a)で測定した抗体のレベルを、HIV-1疾病の進行を示す基準値と比較する工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、200個の細胞/ μ lを上回るCD4数を有し、そして予め決定された基準値（ここでは、予め決定された基準値すなわち「カットオフ」値は50である）より上（上の曲線、1番）または下（下の曲線、2番）のそれぞれ抗3S抗体レベルを有するHIV-1感染患者の120カ月の期間におよぶ生存時間を示した Kaplan-Meier 曲線を示した図である。横座標：月数で表現した、HIV-1感染日後の期間。縦座標：生存分布（100% = 1単位）。

30

【図2】図2は、200個の細胞/ mm^3 を上回るCD4数を有し、そして予め決定された基準値（ここでは、予め決定された基準値すなわち「カットオフ」値は50である）より上（上の曲線、1番）または下（下の曲線、2番）のそれぞれ抗3S抗体レベルを有するHIV-1感染患者の36カ月の期間におよぶ生存時間を示した Kaplan-Meier 曲線を示した図である。横座標：月数で表現した、HIV-1感染日後の期間。縦座標：生存分布（100% = 1単位）。

40

【図3】図3は、200個の細胞/ mm^3 を上回るCD4数を有し、そして予め決定された基準値（ここでは、ウイルス負荷基準値すなわち「カットオフ」値は4 logである）より下（上の曲線、1番）または上（下の曲線、2番）のそれぞれウイルス負荷レベルを有するHIV-1感染患者の36カ月の期間におよぶ生存期間を示した Kaplan-Meier 曲線を示した図である。横座標：月数で表現した、HIV-1感染日後の期間。縦座標：生存分布（100% = 1単位）。

【図4】図4は、200個の細胞/ mm^3 を上回るCD4数を有し、そして(i) 予め決定された基準値を上回る抗3S抗体 (> 50) および予め決定された基準値よりも低いまたは等しいウイルス負荷 (4 log) (曲線番号1)、(ii) 予め決定された基準値

50

を上回る抗 3 S 抗体 (> 50) および予め決定された基準値を上回るウイルス負荷 ($> 4 \log$) (曲線番号 2)、(i i i) 予め決定された基準値よりも低いまたは等しい抗 3 S 抗体 (≤ 50) および予め決定された基準値よりも低いまたは等しいウイルス負荷 ($\leq 4 \log$) (曲線番号 3)、および (i v) 予め決定された基準値よりも低いまたは等しい抗 3 S 抗体 (≤ 50) および予め決定された基準値を上回るウイルス負荷 ($> 4 \log$) (曲線番号 4) のそれぞれの 4 つのクラスに分類された、患者の 36 ヶ月間の期間におよぶ生存時間を示した Kaplan-Meier 曲線の図を示す。横座標：月数で表現した、HIV-1 感染日後の期間。縦座標：生存している人々の比 ($100\% = 1$ 単位)。

【図 5】図 5 は、 200 個の細胞/mm³ を上回る CD4 数を有し、そして (i) 予め決定された基準値を上回る抗 3 S 抗体 (> 50) および予め決定された基準値よりも低いまたは等しいウイルス負荷 ($\leq 4 \log$) (曲線番号 1)、(i i) 予め決定された基準値を上回る抗 3 S 抗体 (> 50) および予め決定された基準値を上回るウイルス負荷 ($> 4 \log$) (曲線番号 2)、(i i i) 予め決定された基準値よりも低いまたは等しい抗 3 S 抗体 (≤ 50) および予め決定された基準値よりも低いまたは等しいウイルス負荷 ($\leq 4 \log$) (曲線番号 3)、および (i v) 予め決定された基準値よりも低いまたは等しい抗 3 S 抗体 (≤ 50) および予め決定された基準値を上回るウイルス負荷 ($> 4 \log$) (曲線番号 4) のそれぞれの 4 つのクラスに分類された、患者の 120 ヶ月間の期間におよぶ生存時間を示した Kaplan-Meier 曲線の図を示す。横座標：月数で表現した、HIV-1 感染日後の期間。縦座標：生存している人々の比 ($100\% = 1$ 単位)。

【図 6】図 6 は、 200 個の細胞/mm³ を上回る CD4 数を有し、そして (i) 予め決定された基準値を上回る抗 3 S 抗体 (> 50) および予め決定された基準値よりも低いまたは等しいウイルス負荷 ($\leq 4 \log$) (曲線番号 1)、(i i) 予め決定された基準値を上回る抗 3 S 抗体 (> 50) および予め決定された基準値を上回るウイルス負荷 ($> 4 \log$) (曲線番号 2)、(i i i) 予め決定された基準値よりも低いまたは等しい抗 3 S 抗体 (≤ 50) および予め決定された値よりも低いまたは等しいウイルス負荷 ($\leq 4 \log$) (曲線番号 3)、および (i v) 予め決定された基準値よりも低いまたは等しい抗 3 S 抗体 (≤ 50) および予め決定された値を上回るウイルス負荷 ($> 4 \log$) (曲線番号 4) のそれぞれの 4 つのクラスに分類された、AIDS を有さない患者の 120 カ月の期間におよぶ生存時間を示した Kaplan-Meier 曲線の図を示す。横座標：月数で表現した、HIV-1 感染日後の期間。縦座標：生存している人々の比 ($100\% = 1$ 単位)。

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、HIV-1 感染患者における HIV-1 疾病の進行状態を示す新規で独立したマーカーを提供する。本発明は、前記の新規で独立したマーカーを使用して、HIV-1 疾病の進行の予後を決定するための新規な方法を提供する。

【0013】

本発明によると、検査した HIV-1 感染個体からの試料において決定された、特定の HIV-1 由来ペプチド(「3S-ペプチド」)に対して指向される抗体のレベルは、前記個体の HIV-1 疾病の進行の状態を示すことが判明した。

【0014】

HIV-1 ウイルスの gp41 糖タンパク質に由来するペプチドからなる前記 3S ペプチドはそれ自体公知である。3S ペプチドは、当技術分野において、CD4⁺T 細胞において NKp44 タンパク質の膜発現を誘導することが示されている。CD4⁺T 細胞の表面における NKp44 発現は、HIV-1 感染の最中の活性化 NK 細胞による CD4⁺T 細胞の溶解において重要な役割を果たし、そして結果として、3S-ペプチドに対して指向される特異的抗体は、疾病の経過に影響を及ぼし得ると考えられた (Vieillard et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 102 : 10981-10986 参照)。

【0015】

また、当技術分野において、抗 3S 抗体は、ALT と命名された非常に特殊な患者コホ

10

20

30

40

50

ートに属する幾人かのH I V - 1感染患者において検出され、前記コホートは、専ら、無症候性の長期生存という稀な表現型を有するH I V - 1感染患者を含む(Vieillard et al., 2006, AIDS, Vol. 20(14) : 1795-1804参照)。Vieillard et al.(2006)は、前記のA L T患者コホートにおいて、(i) C D 4 + T細胞数の減少と、(i i) 抗3 S抗体レベルの減少との間の相関の存在を示した。Vieillard et al. (2006)はまた、抗3 S抗体の存在が、これらの高度に特異的なH I V感染個体において、高レベルのC D 4 + T細胞と相関していたことを示した。

【 0 0 1 6 】

Vieillard et al.(2006)は、抗3 S抗体の存在が、N K p 4 4 Lの発現およびN K溶解に対するC D 4の感受性を抑制することで疾病の経過に影響を及ぼし得ると結論付けた。また、Vieillard et al.(2006)は、血清中の抗3 S抗体の存在がC D 4細胞数を制御するのに役に立つと述べた。これらの著者らは、C D 4 T細胞全個体群の枯渇が、抗3 S抗体の消失と密接に関連することを観察した。これらの著者らはまた、抗3 S抗体の産生が、おそらく、C D 4 T細胞の進行性の枯渇を減速させることに寄与し得ることを付け加えた。

10

【 0 0 1 7 】

今回、本発明により、抗3 S抗体のレベルは、H I V - 1感染患者におけるH I V - 1疾病の進行状態の信頼性あるマーカーを構成することが判明した。

【 0 0 1 8 】

驚くべきことに、本発明者らは、抗3 S抗体のレベルは、H I V - 1疾病進行の信頼性のある指標であることを示した。

20

【 0 0 1 9 】

さらに、本明細書において、抗3 S抗体レベルは、マーカーが単独で使用された場合にさえ、H I V - 1疾病の進行を示すマーカーを構成することが示された。

【 0 0 2 0 】

またさらに、本明細書において、抗3 S抗体レベルは、C D 4数予後診断マーカーおよびウイルス負荷予後診断マーカーを含む他の慣用的に使用されるH I V - 1予後診断マーカーとは独立した、H I V - 1疾病進行マーカーを構成することが示された。

【 0 0 2 1 】

本明細書において、本発明による結果は、一般的なH I V - 1感染患者のコホート、すなわちH I V - 1血清陽性個体のコホートから得られ、Vieillard et al.(2006)によって研究されたA L Tコホートのような無症候性の長期生存という稀な表現型を有する患者コホートからは得られていないことが明記されている。

30

【 0 0 2 2 】

当然のこととして、無症候性の長期生存個体におけるH I V感染の進行機序は、一般的なH I V感染被験者の個体群で見られ得るものとは異なる。これは再度、本明細書において開示された本発明の所見によって完全に説明される。

【 0 0 2 3 】

本発明によると、一般的なH I V - 1感染患者の個体群においては、A L T患者コホートから得られたVieillard et al.の所見とは対照的に、(i) 抗3 S抗体レベルと(i i) C D 4 + T細胞レベルとの間に相関はないことが判明した。本発明の所見はここでも、当業者が、一般的なH I V感染被験者の個体群におけるH I V感染の進行を解明するために、無症候性の長期生存H I V感染個体から得られたデータの利点を活用することを期待できないことを示す。

40

【 0 0 2 4 】

さらに、上で示したように、当技術分野において、特殊なA L T患者コホートにおいては、抗3 S抗体のレベルは、C D 4 T細胞数と強く相関すると考えられた。Vieillard et al.(2006)の以前の結果は、抗3 S抗体レベルとC D 4細胞数との間に見られた強い相関のために、(i) H I V - 1疾病予後診断マーカー、すなわちC D 4細胞数と(i i) H I V - 1感染患者の生物学的パラメーター、すなわち抗3 S抗体レベルとの間に強い依

50

存性が見られたことを当業者にせいぜい教義しただけであったことが思い出される。当業者はVieillard et al.(2006)の結果を考慮すると仮説的に認めたとしても、CD4細胞数および抗3S抗体レベルによって予想通りにもたらされるであろう以前に開示された情報の重複は、当業者に、抗3S抗体レベルが、HIV-1疾病進行の予後診断マーカーを構成し得るという可能性を探索することをやめさせるだろう。

【0025】

特定の局面において、本発明は、HIV-1疾病進行の重度の予後診断法を提供し、前記方法は、特に、AIDSの経過をモニタリングするために、並びに抗レトロウイルス処置の治療効力をモニタリングするために使用され得る。

【0026】

本発明は、HIV-1ウイルスに感染した患者におけるin vitroにおけるHIV-1疾病の進行の予後診断法に関し、これは

a) 前記患者から収集した試料中の配列番号2の3Sペプチドに対して指向される抗体のレベルを測定する工程、

b) 工程a)で測定した抗3S抗体のレベルを、HIV-1疾病の進行を示す抗3S抗体レベルの基準値と比較する工程を含む。

【0027】

本明細書の実施例に示されているように、一般的なHIV-1感染個体の個体群において、抗3S抗体の存在ではなく抗3S抗体のレベルと、HIV-1疾病の進行の予後との間に相関が認められた。

【0028】

本明細書で意味するような「HIV-1疾病」は、ウイルス感染事象の時から始まって、個体の死亡日までに(個体の死亡が、ウイルス感染事象の直接的な結果または間接的な結果であるかに関わらず)、HIV-1ウイルスに感染した個体の受ける全ての生理学的容態を基本的に包含する。HIV-1ウイルスによる個体の感染は、免疫系の効力の減少を進行的に引き起こし、そしてHIV-1感染個体を日和見感染および腫瘍にかかりやすくする、慢性的な疾病状態を引き起こすことが思い出される。従って、HIV-1疾病は、一次感染(または急性感染)の時期、血清転換の時期、無症候性段階の時期、HIV-1症候性疾病の初期および中期の段階、並びにHIV-1疾病の後期の段階(AIDSとも呼ばれる)を包含する。

【0029】

本発明によると、配列番号2のペプチドに対して指向される抗3S抗体は、ペプチド配列NH₂-SWSNKS-COOH(配列番号1)を含むアミノ酸配列を有する基準ポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含する。これらの抗体はまとめて本明細書において「抗3S抗体」と呼ばれる。それはまた、配列番号2の配列に密接に関連したアミノ酸配列を有するペプチドに結合する抗体にも対応し得る。配列番号2に密接に関連した配列を有するペプチドは、配列番号3および配列番号4からなる群より選択されたアミノ酸配列を含むペプチド(これは16アミノ酸残基長を有するペプチドを含む)、並びに配列番号3および配列番号4からなる群より選択されたアミノ酸配列を含むペプチド(例えば、これは(i)配列番号2のペプチドの変異体(11位のアミノ酸残基セリンが、トレオニン残基によって置換されている)および(ii)配列番号2のペプチドの変異体(10位のアミノ酸残基リジンが、アルギニン残基によって置換されている)を含む)を包含する。

【0030】

本明細書において意図したように、3S-ペプチドに対して指向される抗体は、配列番号2のペプチドに結合する抗体を包含する。

【0031】

本発明によると、抗3S抗体は、好ましくは、3Sペプチドに結合するポリクローナル抗体からなり、そしてこれはHIV感染個体から収集された試料中に含まれる。

【0032】

10

20

30

40

50

好ましくは、3S-ペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列からなるペプチドからなる。

【0033】

本明細書において意図するHIV疾病診断予後マーカーの「レベル」は、試料中、例えばHIV感染患者から収集した試料中の前記予後診断マーカーの定量値からなる。いくつかの態様において、前記の定量値は、実際に測定された絶対値からなるのではなく、むしろ、使用したアッセイフォーマットで起こるシグナル・ノイズ比を考慮し、そして/またはアッセイごとのHIV疾病マーカーレベルの測定の再現性を高めるために使用された校正基準値を考慮して得られた最終値からなる。いくつかの態様において、HIV疾病予後診断マーカーの「レベル」は、任意単位として表現される。なぜなら、重要なのは同じ種類 10の任意単位を(i)アッセイごとに、または(ii)HIV感染患者ごとに、または(iii)同じ患者の明確に異なる時点で実施されたアッセイごとに、または(iv)患者の試料中で測定されたHIV予後診断マーカーレベルと、予め決定された基準値(これは本明細書においては「カットオフ」値とも呼ばれ得る)とを比較することであるからである。

【0034】

実際に、試料中の抗3S抗体レベルを表現するためにどのような種類の数値的単位を使用したとしても、測定された数値は、検査した試料中に含まれる抗3S抗体の量、または最も好ましくは前記試料中の抗3S抗体の濃度を反映する。

【0035】

また実例として、HIVウイルス負荷予後診断マーカーは、検査した患者の試料中に含まれるHIVゲノムのコピー数、または代替的には検査した患者の試料中のHIVゲノムコピーの濃度を反映する数値的単位で表現され得る。

【0036】

同様に、他のHIV予後診断マーカーも数値的単位で表現され得、これはそれぞれ(i)検査した試料中のCD4 T細胞の数または代替的にはその濃度、および(ii)検査した試料中に存在する全リンパ球細胞の中のCD4 T細胞の比率を反映する。

【0037】

本明細書で意図したように、患者から収集した試料は、抗体を含むと予想されるあらゆる体液、並びに主に血液および血液由来物質を包含する。本発明によると、患者から収集された試料は、全血試料、血清試料および血漿試料を包含する。

【0038】

本明細書の実施例において示したように、本発明のin vitroにおける方法は、HIV感染患者における免疫抑制状態の早期発生または遅延発生の可能性を決定することを可能とする。結果として、本発明のin vitroにおけるHIV疾病の進行の予後診断法は、HIV感染患者の臨床パラメーターを追跡するための時間間隔の期間を決定する目的で、そしてその後、抗レトロウイルス治療処置を開始する好機を決定するために実施され得る。

【0039】

また、本明細書の実施例において示されているように、本発明のin vitroにおける方法は、ウイルス感染に因り免疫抑制状態をすでに受けているHIV感染患者におけるHIV 40疾病の進行の予後を決定することを可能とする。別の言葉で言えば、本発明のin vitroにおける方法は、(i)HIV疾病の症候性段階に早期に入る可能性が高いHIV感染免疫抑制患者と、(ii)HIV疾病の症候性段階に早期に入る可能性が低いHIV感染免疫抑制患者とを識別することを可能とする。

【0040】

また、本明細書の実施例は、本発明のin vitroにおけるHIV疾病の進行の予後診断法が、(i)長期生存の可能性が高いHIV感染患者と、(ii)長期生存の可能性が低いHIV感染患者とを識別することを可能とすることを示す。

【0041】

前記方法の工程a)において、抗3S抗体のレベルは、当業者には周知の任意の抗体検 50

出法によって測定され得る。従って、抗 3 S 抗体のレベルは、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、イムノアフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降法などを含むがそれらに限定されない、任意の種類イムノアッセイによって測定され得る。

【 0 0 4 2 】

特定の態様において、抗 3 S 抗体のレベルは、E L I S A 法を包含するイムノソルベントアッセイによって測定される。

【 0 0 4 3 】

工程 a) において、抗 3 S 抗体のレベルは、(i) 抗体検出法においてベイトとして使用される 3 S ペプチドと (i i) 検査した患者の試料中に存在する抗 3 S 抗体との間に形成される複合体によって直接的にまたは間接的に生成される実際のシグナルを指す数値として表現される。

10

【 0 0 4 4 】

抗体検出法、例えば E L I S A のようなイムノアッセイを実施する場合には慣用的であるように、シグナルレベル (すなわち抗 3 S 抗体レベル) は、任意単位 (A U) として表現される。任意単位は、一般的に、バックグラウンドノイズシグナルを差し引いた後に決定され、後者は、抗 3 S 抗体が除外されていることが知られる患者の試料 (例えば血清試料または血漿試料) と同じ種類の試料から測定される。一般的に、任意単位は、一連の校正標準物質 (例えば、一連の試料、各試料は既知量の抗 3 S 抗体を含む) を使用して、抗体検出法を校正した後に決定される。

【 0 0 4 5 】

20

本発明の *in vitro* における H I V 疾病予後診断法の工程 b) において、工程 a) で測定される抗 3 S 抗体のレベルの定量値を、H I V 疾病の予後を示す予め決定された基準値と比較する。前記の予め決定された基準値は、「H I V 疾病予後を示す」。なぜなら、それは、(i) 前記の基準値を上回る工程 a) で測定された値に対する H I V 疾病進行の「良好な」予後と、(i i) 前記の基準値を下回る工程 a) で測定された値に対する H I V 疾病進行の「悪い」予後との識別を可能とするからである。

【 0 0 4 6 】

本明細書の実施例において開示されているように、生存時間を含む種々の関連した臨床パラメーターについて追跡された大きな H I V 感染個体コホートから収集された試料において得られた抗 3 S 抗体レベル値からの Kaplan-Meier 曲線を実施することによって、本発明者らは、(i) 遅延した自発的な H I V 疾病進行および長い生存時間を含む好ましい転帰を有する患者と、(i i) 遅延していない自発的な H I V 疾病進行および短い生存時間を含む不良な転帰を有する患者とを識別することを可能とする抗 3 S 抗体レベル値を決定した。

30

【 0 0 4 7 】

実例として、本明細書の実施例において開示された E L I S A 検査フォーマットを使用した場合、予め決定された基準値 (これはまた「カットオフ」値とも呼ばれ得る) は 5 0 である。従って、実施例において開示された E L I S A 検査フォーマットを使用して、5 0 未満の抗 3 S 抗体レベル値が、本発明による *in vitro* における方法の工程 a) で測定された H I V 感染患者から収集された試料は、好ましくない転帰を有する患者として分類される。逆に、5 0 を超える抗 3 S 抗体レベル値が本発明による *in vitro* における方法の工程 a) で測定された H I V 感染患者から収集された試料は、好ましい転帰を有する患者として分類される。

40

【 0 0 4 8 】

本発明の *in vitro* における H I V 疾病予後診断法を実施するために、前記方法の工程 b) で比較のために使用される基準値 (これはまた「カットオフ」値とも呼ばれ得る) は、以下に記載のように決定され得る。

【 0 0 4 9 】

抗 3 S 抗体予後診断マーカーの基準 (「カットオフ」) 値は、
a) H I V 感染患者からの試料の収集物を準備する工程 ;

50

b) 工程 a) で準備された各患者の試料のために、対応する HIV 感染患者についての実際の臨床転帰に関する情報を準備する工程；

c) 抗 3 S 抗体レベルについての一連の任意の定量値を準備する工程；

d) 工程 a) で準備された収集物に含まれる各患者の試料中の抗 3 S 抗体のレベルを定量する工程；

e) 工程 b) で準備された 1 つの特定の任意定量値に対して前記の患者の試料をそれぞれ以下の 2 つの群に分類する工程；

(i) 前記の一連の定量値に含まれる前記の任意の定量値よりも低い抗 3 S 抗体レベルについての定量値を示す患者の試料を含む第 1 群；

(i i) 前記の一連の定量値に含まれる前記の任意の定量値よりも高い抗 3 S 抗体レベルについての定量値を示す患者の試料を含む第 2 群；

これにより、前記の特定の定量値に対して 2 つの群の患者の試料が得られ、各群の患者の試料は別々に列挙される；

f) 工程 d) で得られた前記の生物学的マーカーについての定量値と、(i i) 工程 e) で定義された第 1 群および第 2 群に含まれる血清 / 血漿試料が得られた患者の実際の臨床転帰との間の統計学的有意性を計算する工程；

g) 工程 e) から f) まで種々の任意値を検査する工程、

h) 得られた任意の定量値 (最も高い統計学的有意性 (最も有意) が工程 g) で観察された) からなるとして前記の基準値 (「カットオフ」値) を設定する工程を含む方法を実施することによって予め決定され得る。

【 0 0 5 0 】

上において開示されているように、前記の方法は、悪い転帰予後と良好な転帰予後とを識別することを可能とする「カットオフ」値の設定を可能とする。

【 0 0 5 1 】

本明細書において意図されているように、そして本明細書の実施例において示されているように、(i) 悪い転帰予後は、500 個の細胞 / mm³ を下回る CD 4 T 細胞数を有する患者 (200 個の細胞 / mm³ を下回る CD 4 T 細胞数を有する患者を含む) について、AIDS の臨床症状の発症が、HIV による感染時から 6 ~ 7 2 カ月後の期間内に起こる高い確率、並びに、短い生存期間を包含し、一方、(i i) 良好な転帰予後は、500 個の細胞 / mm³ を下回る CD 4 T 細胞数を有する患者 (200 個の細胞 / mm³ を下回る CD 4 T 細胞数を有する患者を含む) についての、AIDS の臨床症状の発症が、HIV による感染時から 6 ~ 7 2 カ月後の期間内に起こる低い確率、並びに、長い生存期間を包含する。

【 0 0 5 2 】

上のカットオフ値を決定するための方法の工程 b) の特定の好ましい態様において、HIV 感染患者の実際の臨床転帰に関する前記情報は、(i) AIDS を有さない生存期間 (AFS) および (i i) 500 個の CD 4 細胞 / mm³ を下回るまたは 200 個の CD 4 細胞 / mm³ を下回る CD 4 T 細胞数を有する患者の生存時間 (TCDB) からなる群より選択される。

【 0 0 5 3 】

本明細書の実施例において示されているように、予後診断マーカーとして抗 3 S 抗体のレベルを使用した場合に、HIV 疾病予後診断の正確度は、前記の予後診断マーカーを、それ自体公知である 1 つ以上の HIV 予後診断マーカー、例えば HIV ウイルス負荷と組み合わせることによってさらに改善され得る。

【 0 0 5 4 】

実施例において示されているように、抗 3 S 抗体レベルの HIV 疾病予後診断正確度は、他の公知の HIV 予後診断マーカーの 1 つ、すなわちウイルス負荷の予後診断正確度よりも有意に高い。しかしながら、実施例はまた、本発明の *in vitro* における HIV 疾病予後診断法の予後診断正確度は、(i) ウイルス負荷マーカーと (i i) 抗 3 S 抗体マーカーのレベルとを組み合わせることによって改善され得ることを示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

従って、本発明の *in vitro* における HIV 疾病予後診断法のいくつかの態様において、前記方法はさらに、

- 1) 前記患者から収集した前記試料中の HIV ウイルス負荷を測定する工程、および
 - 2) 工程 1) で測定したウイルス負荷値を、HIV 疾病の進行を示す基準値と比較する工程
- を含む。

【 0 0 5 6 】

上の方法の態様において、ウイルス負荷は、当業者には周知の慣用的な技術のいずれか 1 つを通して測定され得る。実例として、ウイルス負荷は、Jennings et al. (2005, J Clin Microbiol, Vol. 43(12) : 4950-4956) によって開示された方法を使用することによって測定され得る。実際に、ウイルス負荷定量のための基準値は、抗 3 S 抗体のレベルの予め決定された基準値 (または「カットオフ」値) を計算するために本明細書において記載されたものと同じ方法を使用することによって決定され得る。

10

【 0 0 5 7 】

当業者によって容易に理解され得るように、ウイルス負荷マーカーの予め決定された基準値 (または「カットオフ」値) は、使用されるウイルス負荷アッセイフォーマットに依存して変化し得る。

【 0 0 5 8 】

実例として、ウイルス負荷マーカーの $4 \log$ の予め決定された基準値 (「カットオフ」値) は、本発明の *in vitro* における HIV 疾病予後診断法を実施するために実施例において使用されている。

20

【 0 0 5 9 】

任意の特定の理論によって固めたくはないが、本発明者らは、本発明の *in vitro* における HIV 疾病予後診断法は、抗 3 S 抗体予後診断マーカーと、1 つ以上の他の HIV 疾病予後診断マーカーとを組み合わせることによって実施され得ると考える。前記の 1 つ以上の HIV 疾病予後診断マーカーは、(i) HIV ウイルス負荷、(i i) CD 4 T 細胞の絶対数および (i i i) CD 4 + T リンパ球の比率からなる群より選択され得る。

【 0 0 6 0 】

これらの態様によると、*in vitro* における HIV 疾病の進行の予後診断法は、

- a) HIV 感染患者から収集した試料中の抗 3 S 抗体のレベルおよび少なくとも 1 つの他の HIV 疾病予後診断マーカーを測定する工程、および
 - b) 工程 a) で測定した各 HIV 疾病予後診断マーカーについて、得られたマーカー値を、前記予後診断マーカーの基準値と比較する工程
- を含み得る。

30

【 0 0 6 1 】

好ましい態様において、前記の 1 つ以上の他の HIV 疾病予後診断マーカーは、(i) HIV ウイルス負荷、(i i) CD 4 T 細胞の絶対数、(i i i) CD 4 T 細胞の比率および (i v) CD 4 + / CD 8 + T リンパ球の比率からなる群より選択される。これらは、HIV 疾病予後診断マーカーの以下の組合せ：

40

- 上のマーカー (i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i) および (i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i) および (i i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i) および (i i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、

50

- 上のマーカー (i)、(i i) および (i i i) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル
- 上のマーカー (i)、(i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i i)、(i i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、
- 上のマーカー (i)、(i i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベル、および
- 上のマーカー (i)、(i i)、(i i i) および (i v) と組み合わせた抗 3 S 抗体レベルを含む。

10

【 0 0 6 2 】

工程 a) で測定した各マーカー値が、それぞれの基準値より上または下であるかどうか (工程 b) で比較する) に依存して、H I V 疾病の進行の「良好な」予後または H I V 疾病の進行の「悪い」予後が決定される。実際に、(i) 予め決定された値を上回る抗 3 S 抗体値は「良好な」予後として分類され、一方 (i i) 予め決定された基準値を上回るウイルス負荷値は「悪い」予後パラメーターとして分類される。

【 0 0 6 3 】

実際に、工程 b) の結果は、(i) 検査した少なくとも 1 つの H I V 予後診断マーカーについて、工程 a) で測定したマーカー値が、前記マーカーについて「悪い」予後として分類される (すなわち、マーカーは「低い」と印され得る) 状況、および (i i) 検査した少なくとも 1 つの他の H I V 予後診断マーカーについて、工程 a) で測定したマーカー値が、前記マーカーについて「良好な」予後として分類される (すなわちマーカーは「高い」と印され得る) 状況を包含する。これらの状況において、H I V 疾病の進行についての予後は、「高い」マーカーおよび「低い」マーカーの数および場合によりそれぞれの統計学的重みを考慮に入れることによって決定される。いくつかの態様において、検査された各マーカーの測定値は、前記の測定されたマーカー値に対して、H I V 疾病の進行の予後における統計学的有意性のその重みを実体化する数的因子を作用させることによって平衡化される。

20

【 0 0 6 4 】

抗 3 S 抗体予後診断マーカーを 1 つ以上の他の H I V 疾病予後診断マーカーと組み合わせる本発明の H I V 疾病の進行の予後診断法の態様において、工程 b) は、検査した各 H I V 予後診断マーカーについて工程 a) で測定した値を数学的に積分し、そして各々の対応する基準値と比較することによって行なわれ、よって得られた複合 H I V 疾病予後診断マーカーの単一の予測値 (例えば「悪い」予後または「良好な」予後) が生成される。2 つ以上のマーカーの組合せを統合した複合マーカーの生成は、当業者には周知である。

30

【 0 0 6 5 】

実例として、H I V 疾病進行についての複合予後診断マーカーは、そこに含まれる各々の個々の予後診断マーカーの線形的な組合せから生じ得、ロジスティック回帰分析を使用して、複合予後診断マーカー内の各々の個々の予後診断マーカーのそれぞれの重みを推定し得る。あるいは、適切な数学的モデルを使用して、使用したマーカー組合せの予後値を

40

【 0 0 6 6 】

本発明はさらに、疾病進行の正確な予後指標を提供することによって、H I V 感染のための治療処置の効力をモニタリングするための方法を提供する。このようなモニタリング法は、(i) 可能な治療薬を同定するために、および (i i) これらの薬物を用いた療法を受けている患者をモニタリングするための両方のために非常に重要である。

【 0 0 6 7 】

特に、本発明は、治療処置の効力をモニタリングするための方法を扱い、これは
a) 必要とする H I V 感染患者に、1 つ以上の抗レトロウイルス剤を含む薬学的組成物を投与することによって治療処置を実施する工程、および

50

b) 前記患者から収集した試料に対して本明細書に記載された *in vitro* における HIV 疾病の進行の予後診断法を実施する工程、および

c) 必要であれば、工程 a) で実施された治療処置を適切に適応させる工程を含む。

【0068】

いくつかの態様において、工程 a) で実施される治療処置は、「良好な」予後、例えば、AIDS 段階への進入を伴わない長い生存時間の高い可能性が決定されれば継続される。

【0069】

いくつかの態様において、治療処置は、「悪い」予後、例えば AIDS 段階への進入を伴わない長い生存時間の低い可能性が決定されれば、適応させる（例えば、より高い用量で投与されるか、または1つ以上の活性成分をより効率的なものと置き換える）。

【0070】

特定の局面において、本発明は、有効量の抗ウイルス剤（または抗ウイルス剤の組合せ）を HIV 感染個体に投与し、そして治療転帰をモニタリングすることを考える。

【0071】

本明細書において以前にすでに明記したように、*in vitro* における HIV 疾病の進行の予後診断法は、好ましくは、公知の免疫検出法によって実施される。本明細書の実施例は、非常に慣用的な免疫検出法である酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）によって、本発明の *in vitro* における HIV 予後診断法を実施する態様を説明する。他の免疫検出法と同様に、ELISA は、非競合的イムノアッセイとしてまたは競合的イムノアッセイとしてのいずれかで実施され得る。

【0072】

非競合的 ELISA では、標識されていない抗原（例えば 3S ペプチド）を、マイクロタイタープレートまたはバイオチップの表面などの固相支持体または反応容器に結合させる。

【0073】

その後、生物学的試料（例えば HIV 感染患者から収集された試料）を、反応容器に結合した抗原と合わせ、そして生物学的試料中に存在する抗体（例えば、HIV 感染患者から収集された試料中に存在する抗 3S 抗体）を、固相支持体上に固定された抗原と結合させ、これにより免疫複合体を形成させる。

【0074】

免疫複合体が形成された後、過剰な生物学的試料を除去し、そして容器を洗浄して、非特異的に結合した抗体を除去する。その後、免疫複合体を、適切な酵素標識抗免疫グロブリン（これは「二次抗体」とも呼ばれ得る）と反応させる。二次抗体は、免疫複合体中の抗体（例えば抗 3S 抗体）と反応するが、反応容器に結合した他の抗原とは反応しない。ヒト抗体との結合に特異的な二次抗体は当技術分野において周知であり、そしてこれは Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) などから市販されている。

【0075】

2 回目の洗浄工程後、酵素基質を加える。二次抗体に連結した酵素は、基質を検出可能な産物へと変換する反応を触媒する。過剰な抗原が存在する場合、産物の量は、患者の試料中に存在する抗体（「一次抗体」とも呼ばれる）の量と正比例する。

【0076】

いくつかの態様において、産物は蛍光または発光であり、これは、当技術分野において周知の技術および装置を使用して測定することができる。いくつかの態様において、酵素反応により、酵素基質の発色性産物への変換がなされ、これは分光光度的に測定され得る。

【0077】

二次抗体に連結させることのできる典型的な酵素としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、アルカリ

10

20

30

40

50

ホスファターゼ、 - ガラクトシダーゼおよびウレアーゼが挙げられる。

【0078】

E L I S A を実施するために適切な固相支持体としては、有機および無機ポリマー、例えばデキストラン、天然または改質セルロース (modified celluloses)、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリアクリルアミドなどが挙げられる。

【0079】

3 S ペプチドを使用した抗 3 S 抗体の免疫検出によって、本発明に記載の in vitro における H I V 疾病の進行の予後診断を実施するために、前記 3 S ペプチドは、(i) 化学合成によって、または (i i) 前記 3 S ペプチドをコードする発現カセット (最終的に組換えベクター、すなわち組換えプラスミドに挿入される) で形質転換された例えば E. coli 細胞における組換え発現によって得られる。

10

【0080】

本発明はさらに、以後の実施例によって (いずれにしてもこれに制限されることはない) 説明される。

【0081】

実施例

実施例 1 : H I V 疾病の進行の予後診断マーカーとしての抗 3 S 抗体のレベルの同定

A . 材料および方法

A . 1 . 患者

1988年に開始された A N R S S E R O C O / H E M O C O コホートには、21の病院および個人開業医のネットワークから問い合わせられた H I V 感染成人が登録された。研究は倫理委員会によって承認され、そして全ての被験者は、書面によるインフォームドコンセントを提出した。患者は参加時に臨床検査を受け、そしてその後、その臨床状態に応じて3または6カ月毎に診察を受ける。全ての A I D S 指標疾患がカルテで確認され、そして担当医師によって見直される。経過観察できなかった患者の臨床状態は、国立 A I D S 登録一覧表 (national AIDS register) を用いて照合確認することによって評価される。登録時および6カ月毎の受診時に収集された血清は - 180 で保存される。

20

【0082】

本研究において適格な患者は、既知の血清転換日を有し、感染から24カ月後以内および1996年より前にコホートに含められ、そして登録時から利用可能な凍結保存された血清試料を有していた。H I V 血清転換は、H I V 抗体検査陰性から陽性までの24ヶ月未満の間隔、または不完全なウェスタンブロット、その後の完全なウェスタンブロットによって記述された。感染日は、不完全なウェスタンブロット日 - 1カ月、または初回症候性感染日 - 15日間、または2つの検査の間の midpoint として定義された (Hubert 2000)。入手可能な凍結血清を有する244人の血清転換者がこの分析に含められた。経過観察は、c A R T の広範な使用の時代の前の1996年に検閲された。感染年の中央値は1989年であり、そして感染以後の経過観察時間の中央値は6.5年間であった。

30

【0083】

A . 2 . 研究プロトコール

本発明者らは、感染から24カ月後以内の S E R O C O コホートにおける1996年以前に登録された244人の H I V - 1 の非処置の血清転換者を検討した (登録年の中央値は1989年)。経過観察は1996年に検閲し、経過観察の中央値は6.5年間であった。初期抗 3 S 抗体レベルは、登録時に凍結血清から測定した。疾病進行のリスクに対する抗 3 S 抗体の役割を推定するために、感染から $200 / \text{mm}^3$ を下回る C D 4 (91 事象) および臨床的 A I D S (83 事象) までの時間を、50単位 / mL を超える抗体を有する患者を、より低いまたは検出不可能なレベルを有する患者と比較して、 Kaplan-Meier 曲線を通して推定した。粗および調整 R R を、C o x 回帰モデルを通して推定した。

40

【0084】

A . 3 . 抗 3 S 抗体レベルの測定

E L I S A アッセイを、平底96ウェルマイクロプレート上 (Maxisorp, Nunc) で実施

50

した。

【0085】

プレートを、PBS中2mg/mlの3Sペプチドを用いて4℃で一晩17時間かけてコーティングした。プレートを2回PBS/0.1%Tweenで洗浄し、そしてその後、PBS/3%脱脂乳中で37℃で2時間かけて遮断した。

【0086】

検査した血清/血漿を熱で失活させ(56℃、45分間)、そしてその後、種々の濃度(1/20、1/200および1/2000)で3連、37℃で1時間30分かけて加えた。血清をアッセイバッファー(PBS、3%脱脂乳、0.1%Tween-20)中で希釈した。

【0087】

PBS/0.1%Tween中で2回洗浄した後、1/2000に希釈したビオチン-SP-コンジュゲートウサギ抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch)を加え、そして37℃で1時間かけてインキュベーションした。ビオチンコンジュゲート抗体をアッセイバッファー(PBS、3%脱脂乳、0.1%Tween-20)中で希釈した。

【0088】

洗浄後、ビオチンを、1/5000に希釈したExtraAvidinペルオキシダーゼコンジュゲート(Sigma)を使用して37℃で1時間かけて捕捉した。ExtraAvidinをアッセイバッファー(PBS、3%脱脂乳、0.1%Tween-20)中で希釈した。最後の洗浄後、基質溶液を用いて発色させ、そして450nmにおける吸光度(OD)を測定した。

【0089】

プレートを、2回PBS/0.1%Tween中で、そしてその後2回PBS中で洗浄し、そしてTMB(Sigma)の存在下、室温で暗闇下で30分間かけて色を顕現させた。

【0090】

化学反応を4N H₂SO₄を用いて停止し、そして450nmで分析した(Microplate reader, Molecular Devices)。

【0091】

陰性対照は、アッセイバッファーで1/20に希釈した10人の非感染ドナーからのヒトAB血清(SAB)および血漿を使用した。

【0092】

抗3S抗体の定量は、15C8f2と命名された、精製マウス抗3Sモノクローナル抗体の希釈液を含む、校正標準物質を使用した。標準曲線は、このモノクローナル抗体の連続2倍希釈液に相当し、数値は0から200ng/mlの間であった。モノクローナル抗体はアッセイバッファーで希釈される。

【0093】

検査した試料のODは、標準曲線の線形部分内に報告され、同じシグナルを与える15C8F2モノクローナル抗体の対応する濃度が得られる。

【0094】

任意単位で表現される抗3S抗体の数値は、検査した試料の希釈係数および容量を考慮することによって決定される。検出限界は、陰性対照について得られた数値によって設定され、そして10の任意単位の数値に固定される。

【0095】

A.4. 他の方法

CD4リンパ球数は、受診の度にフローサイトメトリーによって決定される。全てのHIV-1RNAレベルは保存された血清から遡及的に決定された。

【0096】

3つの参加している大学研究室が逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応を使用した(AmpliCor HIV-1モニターアッセイ, Roche Molecular Systems, Neuilly-sur-Seine, 定量閾値400コピー/mL)。初期の抗3S抗体レベルを、登録時に凍結血清から測定した(推定感染日からの時間の中央値: 9か月間)。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 7 】

A . 5 統計学的分析

ピアソンカイ二乗検定またはフィッシャー直接検定を使用して、質的変数を比較し：ノンパラメトリックなクラスカル・ウォリス検定を連続変数のために使用した。

【 0 0 9 8 】

H I V 疾病進行のリスクの予後診断マーカーとしての抗 3 S 抗体レベルの適格性についてアッセイするために、感染から 2 0 0 / mm³ を下回る C D 4 (9 1 事象) までのおよび臨床的 A I D S (8 3 事象) までの時間を、カプランマイヤー曲線を通して推定した。5 0 単位 / mL を超える抗体を有する患者における無事象生存曲線を、ログランク検定を使用してより低いまたは検出不可能なレベルを有するものと比較した。粗および調整された相対リスク (R R) を、C o x モデルを使用することによって推定した。

10

【 0 0 9 9 】

B . 結果

血清転換者の 7 2 % が、血清転換に近い検出可能な抗 3 S 抗体を有し (推定感染日からの時間の中央値 : 9 か月) 、 5 3 % が 5 0 単位を超えていた。登録時の抗 3 S 抗体レベルは、H I V - R N A レベルと逆相関したが、以下の表 1 に示されているように、C D 4 数とは全く関連が認められなかった。従って、結果は、抗 3 S 抗体レベルおよび C D 4 T 細胞数は、独立したマーカーからなることを示す。

【 0 1 0 0 】

【 表 1 】

20

表 1

抗 3S レベル	< 10	11-50	51-85	86-120	121-180	>180	P
	N=69	N=45	N=48	N=39	N=32	N=11	
CD4 含有量*	530	534	563	520	609	610	0.61

* 中央値

【 0 1 0 1 】

2 0 0 / mm³ を下回る C D 4 への進行は、5 0 を超える抗 3 S 抗体を有する患者において有意に遅延したが、効果は一過性であった (抗 3 S 抗体と時間との間の相互作用項 : p = 0 . 0 0 3) 。これらの結果を図 1 および 2 に示す。

30

【 0 1 0 2 】

図 1 および 2 の結果は、2 0 0 の C D 4 T 細胞 / mm³ を下回る C D 4 T 細胞数に向かう進行のリスクは、参加後最初の 1 2 0 カ月間 (図 1 ; P ログランク = 0 . 0 7 ; P ウィルコクソン = 0 . 0 2) または参加後最初の 3 6 ヶ月間 (図 2 ; P ログランク = 0 . 0 0 2 ; P ウィルコクソン = 0 . 0 2) を考慮に入れた場合、5 0 のカットオフ値を上回る抗 3 S 抗体レベルを有する患者においては遅延することを示す。図 1 および 2 の結果は、抗 3 S 抗体レベルが、H I V 疾病の進行についての、特に、2 0 0 / mm³ を上回る C D 4 T 細胞数を有する H I V 感染患者における生存の予後についての実際的な予後診断マーカーを構成することを示す。

40

【 0 1 0 3 】

感染後から最初の 3 年間の間に C D 4 < 2 0 0 / mm³ の相対リスク (R R) は 0 . 2 1 であった ([9 5 % C I : 0 . 0 7 ~ 0 . 6 2] 、 p = 0 . 0 0 5) 。

【 0 1 0 4 】

この生存利点は、基線ウイルス負荷および C D 4 、年齢および性別について調整した後も依然として観察された (調整 R R : 0 . 2 3 [0 . 0 7 ~ 0 . 7 3] 、 p = 0 . 0 1) 。類似の結果が、A I D S までの時間についても観察された。

【 0 1 0 5 】

カプランマイヤー曲線は、5 0 単位 / mL を上回る抗体および 4 l o g を上回るウイルス

50

負荷を有する患者における生存利点は、4 log を超えるウイルス負荷を有する他の患者と比較して、5 ~ 6 年後にはもはや持続しなかったことを示す。これらの結果を図 4 ~ 6 に示す。図 3 は、H I V ウイルス負荷マーカー単独の H I V 予後値を示す (p ログランク = 0 . 0 0 5 ; P ウィルコクソン = 0 . 0 0 6) 。両方のバイオマーカーが、異なる固有の予後値を有し、これらの各々は独立している。

【 0 1 0 6 】

図 3 は、登録後最初の 3 6 カ月間の H I V ウイルス負荷のレベルの分析を示し、ウイルス負荷値は、4 log のカットオフ値より上または下として分類される。

【 0 1 0 7 】

図 4 は、コンタミ後から 3 6 カ月間の (i) 抗 3 S 抗体レベル (5 0 のカットオフ値より上 (「 高い 」) または下 (「 低い 」)) および (i i) H I V ウイルス負荷のレベル (4 log のカットオフ値より上または下) の複合分析を示す。図 4 の結果は、H I V 疾病の進行のより正確な予後が、抗 3 S 抗体レベルマーカー (5 0 のカットオフ値を上回る抗 3 S 抗体レベルを有する H I V 感染患者) を H I V ウイルス負荷マーカー (4 log のカットオフ値を下回る H I V ウイルス負荷値) と組み合わせた場合に決定されることを示す (p ログランク = 0 . 0 0 1 ; P ウィルコクソン = 0 . 0 0 1) 。コンタミ後から 1 2 0 カ月間の同じ結果を図 5 に示す (p ログランク = 0 . 0 0 0 1 ; p ウィルコクソン = 0 . 0 0 0 1) 。

10

【 0 1 0 8 】

図 6 は、コンタミ後から 1 2 0 ヶ月間、(i) 抗 3 S 抗体レベルおよび (i i) H I V ウイルス負荷のレベルの複合測定を使用した場合の、A I D S に向けての進行のリスクの予後を示す。図 6 の結果は、H I V 疾病の進行の高度に正確な予後を示し、それぞれ P ログランク = 0 . 0 0 0 5 および P ウィルコクソン = 0 . 0 0 0 3 の非常に有意な値を有する。

20

【 0 1 0 9 】

被験者の部分集合は、その抗体を、登録から 2 4 ~ 3 6 カ月後に再度測定された。

【 0 1 1 0 】

一貫して高い抗体を有する被験者は依然として、5 0 を下回る抗 3 S 抗体レベルの減少を経験した被験者と比較して、無病生存利点を有していた。

【 0 1 1 1 】

最後に、以下の表 2 に、抗 3 S 抗体および H I V ウイルス負荷のレベルは、H I V 感染患者における H I V 疾病の進行についての 2 つの独立した予後診断マーカーを構成することが示される。

30

【 0 1 1 2 】

【 表 2 】

表 2

抗 3S 抗体	粗 RR (CI 95%)	p	調整 RR ** (CI 95%)	p
抗 3S Ab ≤50	1		1	
Anti-3S Ab >50	0.21 (0.07-0.62)	0.005	0.31 (0.10-0.98)	0.046

40

** 年齢, 性別, ウイルス負荷および HIV DNA に関して調整

【 0 1 1 3 】

表 2 の結果はまた、2 0 0 の C D 4 T 細胞 / mm ³ 未満の C D 4 T 細胞数に向けての、3 6 ヶ月間の期間におよぶ、進行のリスクは、年齢、性別、H I V R N A および D N A の調整後、5 0 のカットオフ値を上回る抗 3 S 抗体レベルを有する患者において遅延して

50

いることを示す。

【 0 1 1 4 】

これら全ての結果は、C D 4 レベル、ウイルス負荷および抗 3 S が、H I V 感染の予後の 3 つの独立したマーカーであることを示す。さらに、抗 3 S の閾値は、不良な予後患者と良好な予後患者との間のカットオフ値として決定された。

【 図 1 】

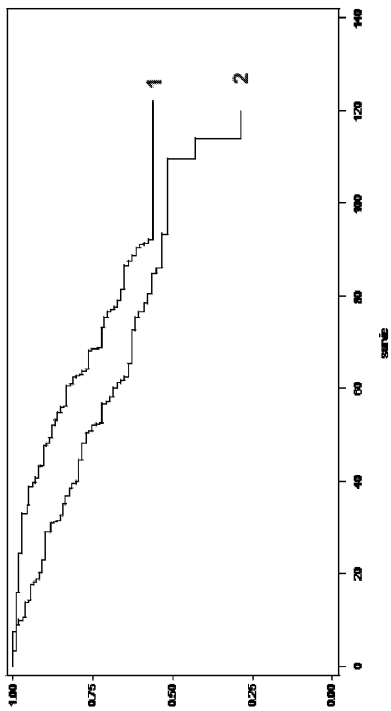


Figure 1

【 図 2 】

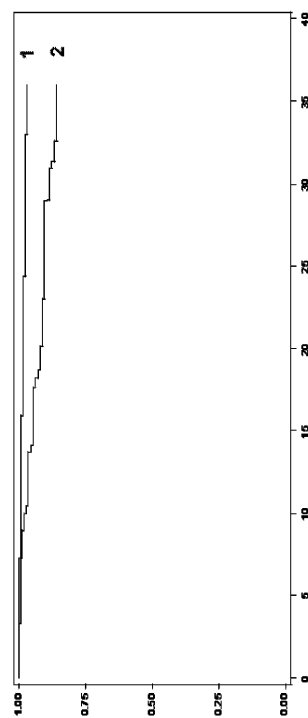


Figure 2

【 図 3 】

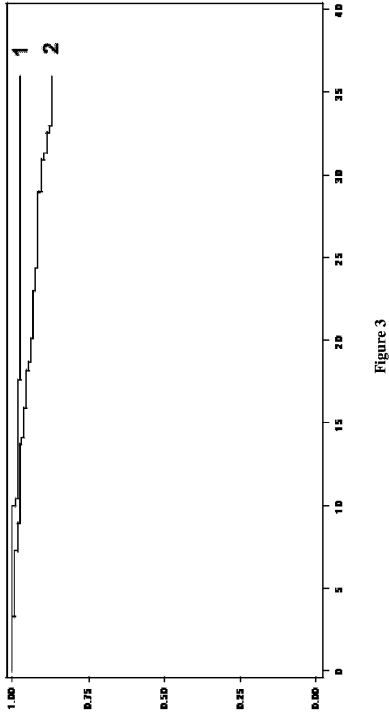


Figure 3

【 図 4 】

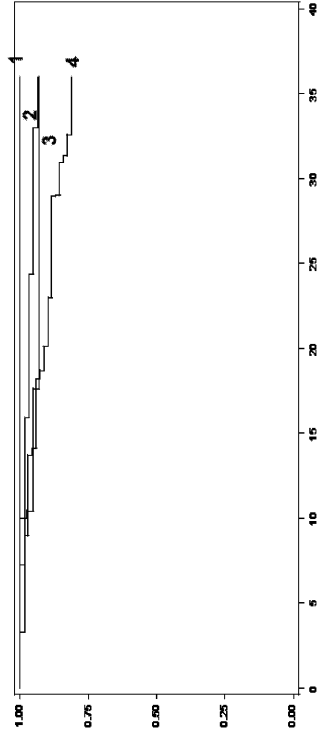


Figure 4

【 図 5 】

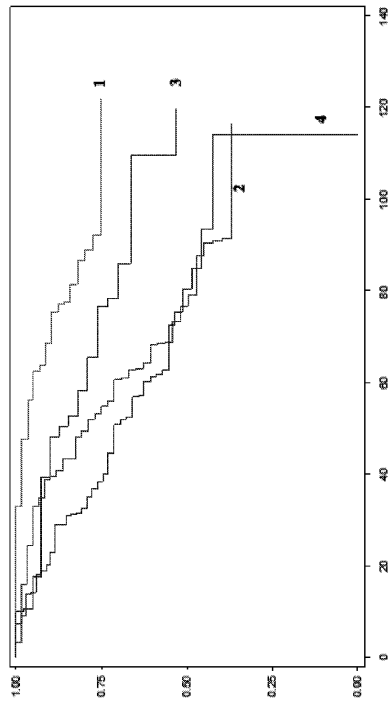


Figure 5

【 図 6 】

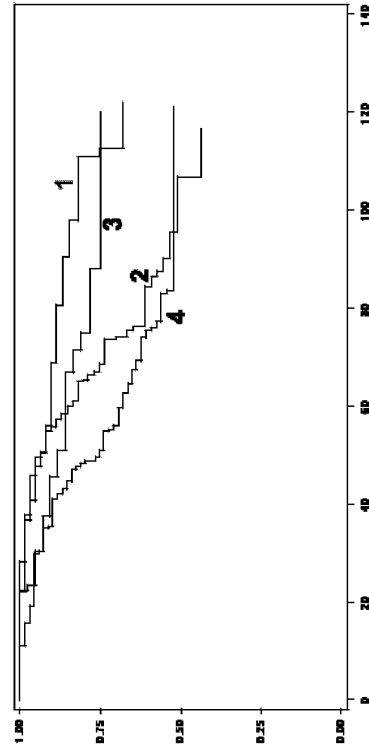


Figure 6

【配列表】

2014507661000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2012/050787

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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	NGO-GIANG-HUONG NICOLE ET AL: "HIV type 1-specific IgG2 antibodies: Markers of helper T cell type 1 response and prognostic marker of long-term nonprogression", AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol. 17, no. 15, 10 October 2001 (2001-10-10), pages 1435-1446, XP055004015, ISSN: 0889-2229 abstract; figure 3 ----- -/--	1-8		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.				
<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents :				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 </td> <td style="vertical-align: top;"> "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 </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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		Date of mailing of the international search report		
10 April 2012		16/04/2012		
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 Gundlach, Björn		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2012/050787

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	<p>anonymous: "DIAG3S : AN AIDS PROGNOSTIC TEST",</p> <p>2011, page 1, XP055001571, Retrieved from the Internet: URL:http://www.innavirvax.fr/RD-projects/menu-id-4.html [retrieved on 2011-06-28] abstract</p>	1-8
Y	<p>-----</p> <p>HUGUES FAUSTHER-BOVENDO ET AL: "HIV gp41 Engages gC1qR on CD4+ T Cells to Induce the Expression of an NK Ligand through the PIP3/H202 Pathway", PLOS PATHOGENS, vol. 6, no. 7, 1 July 2010 (2010-07-01), page E1000975, XP055001572, DOI: 10.1371/journal.ppat.1000975 abstract page 8, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1</p>	1-8
Y	<p>-----</p> <p>DEBRE PATRICE ET AL: "[Towards a vaccine for HIV infection: role of the gp41 envelope protein].", BULLETIN DE L'ACADÉMIE NATIONALE DE MÉDECINE JAN 2009 LNKD- PUBMED:19718985, vol. 193, no. 1, January 2009 (2009-01), pages 127-136 ; DIS, XP008139380, ISSN: 0001-4079 abstract page 132, paragraph 2 - page 133, paragraph 1</p>	1-8
Y	<p>-----</p> <p>VIEILLARD VINCENT ET AL: "Specific adaptive humoral response against a gp41 motif inhibits CD4 T-cell sensitivity to NK lysis during HIV-1 infection", AIDS, LONDON, GB, vol. 20, no. 14, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 1795-1804, XP008100308, ISSN: 0269-9370 cited in the application abstract page 1802, column 1, paragraph 2</p>	1-8
Y	<p>-----</p> <p>WO 2010/040853 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; DEBRE PATRICE [FR]; VIEILLARD VINCENT [F] 15 April 2010 (2010-04-15) sequence 4 page 1, line 12 - line 17</p> <p>-----</p>	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2012/050787

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010040853	A1	NONE	

フロントページの続き

(51) Int. Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K 14/16

(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, MD, RU, T J, 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, R O, 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, H U, 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

(74) 代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74) 代理人 100131808

弁理士 柳橋 泰雄

(74) 代理人 100119079

弁理士 伊藤 佐保子

(74) 代理人 100135873

弁理士 小澤 圭子

(74) 代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74) 代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74) 代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74) 代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74) 代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74) 代理人 100181102

弁理士 後藤 孝明

(72) 発明者 メイエ, ロランス

フランス国、エフ - 9 4 1 1 0 アルクイユ、リュ・ドゥ・スターリングラード 1 8

(72) 発明者 ヴィエイヤール, ヴァンサン

フランス国、エフ - 7 5 0 0 4 パリ、リュ・サン・ルイ・アン・リル 4 6

(72) 発明者 ドブレ, パトリス

フランス国、エフ - 7 5 0 0 6 パリ、リュ・ジャコブ 3

(72) 発明者 クルゼ, ジョエル

フランス国、エフ - 9 2 3 3 0 ソー、リュ・ミシェル・ヴォアザン 1 2

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QS39 QX02

4H045 AA11 AA30 BA10 BA14 BA17 CA05 EA50

专利名称(译)	HIV疾病进展的预后方法		
公开(公告)号	JP2014507661A	公开(公告)日	2014-03-27
申请号	JP2013554964	申请日	2012-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	内蒙古威乐科尔多瓦箱 INNAVIRVAX 法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	内蒙古威乐科尔多瓦箱 Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗		
[标]发明人	メイエロランス ヴィエイヤールヴァンサン ドブレパトリス クルゼジョエル		
发明人	メイエ,ロランス ヴィエイヤール,ヴァンサン ドブレ,パトリス クルゼ,ジョエル		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/04 C07K14/16		
CPC分类号	G01N33/56988 G01N33/569 C12Q1/703		
FI分类号	G01N33/569.H G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/543.545.A C12Q1/04.ZNA C07K14/16		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS39 4B063/QX02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA17 4H045/CA05 4H045/EA50		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 田中洋子 阿基奥·希巴达 后藤孝明		
优先权	2011305187 2011-02-22 EP		
其他公开文献	JP5952313B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

a) 测量从感染HIV-1病毒的患者收集的样品中针对SEQ ID NO : 2的3S肽的抗体水平, b) 比较步骤a) 中测定的抗-3S抗体水平一种预测所述患者体外HIV-1感染进展的方法, 包括与指示HIV-1感染进展的抗-3S抗体水平的参考值进行比较的步骤。

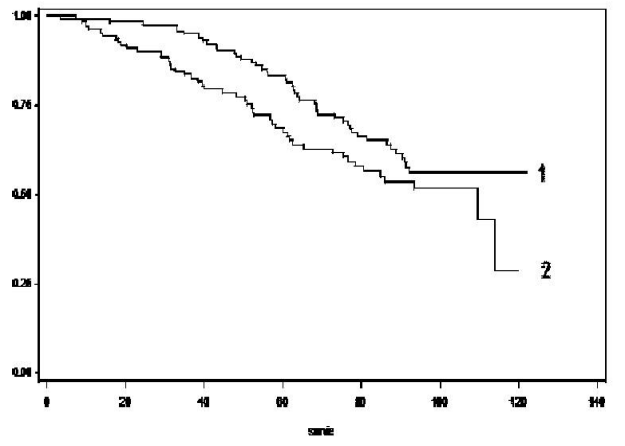


Figure 1