

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-224829

(P2014-224829A)

(43) 公開日 平成26年12月4日(2014.12.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569	H
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	N
	GO 1 N 33/53	D

審査請求 有 請求項の数 10 O L 外国語出願 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2014-162124 (P2014-162124)	(71) 出願人	508029653
(22) 出願日	平成26年8月8日 (2014.8.8)		アンステイテュ・パストゥール
(62) 分割の表示	特願2012-556527 (P2012-556527) の分割		フランス・F-75724・パリ・セデック クス・15・リュ・デュ・ドクトゥール・ ルー・25-28
原出願日	平成23年3月10日 (2011.3.10)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	10290124.6		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成22年3月10日 (2010.3.10)	(74) 代理人	100064908
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 志賀 正武
		(74) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経学的障害の予後判定のためのHMGB1および抗HMGB1抗体

(57) 【要約】

【課題】神経学的障害の予後判定のためのHMGB1および抗HMGB1抗体を提供する。

【解決手段】本発明は、患者から得た試料、特に、血清試料または脳脊髄液試料に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するためのin vitro方法、および神経学的障害の予後判定および/または診断における、この方法の使用に関する。これらの方法は、特に、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染していることが分かっている対象のHIV感染をモニタリングするため、および後天性免疫不全症候群(AIDS)の進行の状況またはAIDSへの進行の状況、特に、AIDSに関連する神経学的障害の進行の状況またはAIDSに関連する神経学的障害への進行の状況の予後判定および/または診断に適用することができる。最後に、本発明は、患者、特にHIVに感染した患者の免疫不全または免疫活性化のレベルを決定するための方法に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象から得た脳脊髄液試料に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するためのin vitro方法であって、

a)前記脳脊髄液試料を、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および

b)HMGB1に特異的な抗体を定量するステップを含む方法。

## 【請求項2】

HIVに感染していることが分かっている対象の状態をモニタリングするためのin vitro方法であって、

a)脳脊髄液試料、血清試料または血清の試料と脳脊髄液の試料の両方に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を、前記対象から得た前記試料をネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させることによって定量するステップ;および

b)前記対象から得た、同じ前記試料中のケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1を定量するステップを含む方法。

## 【請求項3】

前記定量されたHMGB1、ならびに前記定量されたIP-10および/または前記定量されたMCP-1が、HIVに感染していない対象から得た試料から、または同じ対象から違う時間に、もしくは複数の違う時間に得た試料から定量されたHMGB1、ならびに定量されたIP-10および/または定量されたMCP-1の量とそれぞれ比較される、請求項2に記載のin vitro方法。

## 【請求項4】

HIVに感染していることが分かっている患者の免疫不全を評価するためのin vitro方法であって、

a)前記患者から得た脳脊髄液試料または血清試料または血清の試料と脳脊髄液の試料の両方を、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および

b)前記脳脊髄液試料、前記血清試料または前記血清の試料と脳脊髄液の試料の両方に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体が多いほど、免疫不全が高度である、方法。

## 【請求項5】

HIVに感染していることが分かっている患者における免疫活性化のレベルを決定するためのin vitro方法であって、

a)前記患者から得た脳脊髄液試料または血清試料または血清の試料と脳脊髄液の試料の両方を、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および

b)前記脳脊髄液試料、前記血清試料または前記血清の試料と脳脊髄液の試料の両方に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体が多いほど、免疫活性化の持続性が高い、方法。

## 【請求項6】

試料をネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させる前に、試料中に見いだされる免疫複合体を解離させるために、酸処理によって試料を処理するステップを含む方法であって、前記方法において、定量された高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体がHMGB1に特異的な総抗体である、請求項1から5のいずれか一項に記載のin vitro方法。

## 【請求項7】

前記酸処理を、1.5Mのグリシンを低pHで用いて実行する、請求項6に記載のin vitro方法。

## 【請求項8】

定量された高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体が、前記抗体の循環画分(循環抗体)またはそれらの免疫複合体形成画分である、請求項1から5のいずれか一項に記載のi

10

20

30

40

50

n vitro方法。

【請求項 9】

HMGB1タンパク質誘導体が、組換えHMGB1、HMGB1の免疫学的反応性部分、配列が種々の起源のHMGB1タンパク質に共通であるHMGB1の免疫学的反応性部分ならびにヒトおよびマウスHMGB1に共通の配列に対応するHMGB1由来の組換えBOXBからなる群において選択される、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記HIVがHIV-1またはHIV-2である、請求項2から5のいずれか一項に記載のin vitro方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本出願は、生体試料、特に血清および脳脊髄液(CSF)におけるタンパク質HMGB1またはHMGB1に特異的な抗体を定量すること、およびそれらのそれぞれの、神経学的障害、特にHIV感染に関連する神経学的障害の進行の状況、または神経学的障害、特にHIV感染に関連する神経学的障害への進行の状況の予後判定方法との相関、および診断方法との相関に関する。本発明は、タンパク質HMGB1またはHMGB1に特異的な抗体の、HIV感染をモニタリングすることとの相関またはウイルス量ならびにAIDSの進行の状況の予後判定方法との相関にも関する。

【背景技術】

20

【0002】

感染後間もなく、HIV-1は脳に浸透することができ、最終的に、中枢神経系(CNS)におけるHIV-1関連合併症に至る。HIV関連認知症(HAD)は、臨床的に、発作、昏睡、および発病の6ヶ月以内の死亡をもたらす運動機能障害および行動機能障害を特徴とする。HADの病理相関であるHIV-脳炎は、広範なアストログリオシス、酸化ストレス、サイトカイン/ケモカイン調節不全、および神経変性を特徴とする(Gonzalez-ScaranoおよびMartin-Garcia、Nat Rev Immunol 2005、5:69~81頁)。ニューロンは、HIV-1に感染しないので、現在の考えは、これらの細胞は、活性化されたグリア細胞によって放出される炎症性ケモカインによって間接的に損傷を受けるというものである。IP-10(CXCL10)は、星状膠細胞において上方制御される神経毒性ケモカインであり、レトロウイルスの感染を増強し、ニューロン損傷を媒介することが示唆されている。HIV感染症において、CSF中のIP-10の上昇が報告され、そのレベルは、CSF中のHIVウイルス量と相関した(Cinque Pら J Neuroimmunol 2005、168:154頁)。CSF中のマクロファージ走化性タンパク質(macrophage chemoattractant protein)1(MCP-1またはCCL2)のレベルと、進行性HIV感染症を伴うHAARTを経験したコホートにおけるHADの発症との間の関連性の可能性も報告された(Sevigny JJ, Albert SM, McDermott MP;ら Neurology. 2004;63:2084頁)。別の試験により、血漿MCP-1レベルとHIV関連認知症との関連性が報告された(Sevignyら Arch. Neurol. 2007、64:97頁)。

30

【0003】

高移動度群ボックス1(high mobility group box1)(HMGB1)タンパク質は、活性化されたマクロファージ、単球、樹状細胞またはNK細胞などの他の細胞から活発に分泌されると、強力な炎症促進サイトカインとして作用する非ヒストン染色体タンパク質である。HMGB1は、炎症細胞を誘引する炎症のトリガーとして機能し、また、幹細胞を動員し、それらの増殖を促進する組織修復のトリガーとして機能する。さらに、HMGB1は樹状細胞(DC)を活性化し、それらの機能的成熟、およびそれらのリンパ節ケモカインに対する反応を促進する。活性化された白血球は、微小環境においてHMGB1を活発に分泌する。したがって、HMGB1は、自己分泌型/傍分泌型で作用し、修復および防御のプログラムを長期間持続させる(BianchiおよびManfredi、2007; LotzeおよびTracey、2005)。

40

【0004】

最近の研究において、HMGB1は、HIVに感染したDCにおけるHIV複製を誘発し、したがって、DCにおけるウイルスリザーバーを構成する一因となっていることが示された(Saidi H

50

、Melki M-T, Gougeon M-L, PLoS One 2008)。DCが、粘膜感染の最初の数時間におけるHIVの第1の標的であり、次にそれが二次リンパ器官に移動し、そこでHIVをT細胞に伝達することを考えると、これらの発見は、HMGB1が、ウイルス複製およびウイルスリザーバーの補充の誘発における *in vivo*での関与に関する問題を喚起する。HMGB1は、HIVに感染したDCと活性化されたNK細胞との間のクロストークの間に産生され、HIVに感染したDCのNKによる死滅に対する抵抗性ももたらす。DCの生存は、感染したDCにおいて、HMGB1によって誘導されるプロセスである、c-IAP2およびc-FLIPの2種のアポトーシス阻害物質の上方制御と関連した(Melki M-Tら PLoS Pathogens 2010、6(4)e1000862)。グリチルリジンまたは遮断抗体などの特異的な阻害剤によってHMGB1活性を遮断することにより、感染したDCにおけるHIV複製が抑止され(Saidi H, Melki M-T, Gougeon M-L, PLoS One 2008)、感染したDCの、NKによる死滅に対する感受性が回復する(Melki M-Tら PLoS Pathogens 2010、6(4)e1000862)。HIVがどのようにDCを、ウイルス伝播を促進し、また、長期間のリザーバーの生存能力を維持するように強制するかに新しい洞察をもたらすこれらの発見は、特許出願PCT/EP2009/06828の目的となっている。

10

#### 【 0 0 0 5 】

これらの発見は、HMGB1が、ウイルス複製およびウイルスリザーバーの補充の誘発における *in vivo*での関与に関する問題も喚起する。これに関する問題に取り組むために、HIV感染患者由来の血清中のHMGB1濃度を数量化して(ELISA、Shino test、IBL)、循環HMGB1の、血漿HIVウイルス量および疾患の進展に対する *in vivo*における寄与を評価した。さらに、SLE(狼瘡)などの自己免疫疾患においてHMGB1に特異的な自己抗体を見いだすことができることを考慮して(Hayashiら、2009)、特異的なELISAアッセイを開発して、HIV感染患者由来の血清中のHMGB1に特異的な抗HMGB1抗体が、HIV疾患において検出されるかどうかを調査した。

20

#### 【 0 0 0 6 】

患者の血清中のHMGB1と抗HMGB1抗体の両方の測定値が、特許出願PCT/EP2009/06828において報告された。以下の結論が引き出された：

- (i) 慢性HIV感染は、HMGB1の産生を誘発し、感染した患者由来の血清において検出されるHMGB1のレベルが上昇し、それが今度は、中和性抗体の産生を誘導する；
- (ii) HMGB1と抗HMGB1抗体(Ab)との間に逆相関が検出され、これはHMGB1が抗体に結合すると、それは、もはや血清試料において検出されないことを示している；
- (iii) 血清中の抗HMGB1抗体が多いほど(初期に産生されるHMGB1が多いほどという意味)、CD4 T細胞が少なく、これは、血清中抗HMGB1抗体のレベルの上昇が疾患の進展に関連することを示唆している；および
- (iv) 強力な抗レトロウイルス療法(HAART)により、HMGB1と抗HMGB1抗体の両方の血清レベルが低下し、それらが基線レベル未満に正常化し得る。

30

#### 【 0 0 0 7 】

特許出願PCT/EP2009/06828は、血清中の抗HMGB1抗体が多いほど、血清中のウイルス量が少ないという仮説も立てている。しかし、この仮説は、実施された実験の徹底的な分析および患者のより大きなコホートにおいて確認されていない。実際に、特許PCT/EP2009/06828に開示されている抗HMGB1抗体と血清中のウイルス量との間に確立された相関は、無処置の患者と処置された患者(ウイルス量に対する効果を有する処置)の両方を包含する患者のコホートから得られた結果の不適切な統計分析から導かれたことがさらに示されている。

40

#### 【 先行技術文献 】

#### 【 特許文献 】

#### 【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 PCT/EP2009/06828

#### 【 非特許文献 】

#### 【 0 0 0 9 】

【 非特許文献 1 】 Gonzalez-ScaranoおよびMartin-Garcia、Nat Rev Immunol 2005、5:69

50

~ 81頁

【非特許文献 2】Cinque Pら J Neuroimmunol 2005、168:154頁

【非特許文献 3】Sevigny JJ、Albert SM、McDermott MP;ら Neurology. 2004;63:2084  
頁

【非特許文献 4】Sevignyら Arch. Neurol. 2007、64:97頁

【非特許文献 5】Saidi H、Melki M-T、Gougeon M-L、PLoS One 2008

【非特許文献 6】Melki M-Tら PLoS Pathogens 2010、6(4)e1000862

【非特許文献 7】Lotze、ら、Nature Reviews、Immunology 5:351頁(2005)

【非特許文献 8】Antinoriら Neurology. 2007年10月30日;69(18):1789 ~ 99頁

【非特許文献 9】Launayら Vaccine 2009、27:1184 ~ 1191頁

10

【非特許文献 10】Giorgi JVら、Shorter survival in advanced HIV-1infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. J Infect Dis 1999年

【非特許文献 11】Liu Zら Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the MACS Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1997;16:83 ~ 92頁

【非特許文献 12】Paola Cinqueaら Cerebrospinal fluid interferon- $\gamma$ -inducible protein 10(IP-10, CXCL10)in HIV-1infection. J Neuroimmunology 2005年

20

【非特許文献 13】Ratai EMら PLoS One.2010年5月7日;5(5):e10523;Yiannoutsos CTら Neuroimage.2008年3月1日;40(1):248 ~ 55頁

【非特許文献 14】Paul RHら J Neuropsychiatry Clin Neurosci.2007年夏;19(3):283 ~ 92頁

【非特許文献 15】Greco JBら Magn Reson Med.2004年6月;51(6):1108 ~ 14頁

【非特許文献 16】Meyerhoff DJら AJNR Am J Neuroradiol. 1996年5月;17(5):973 ~ 8頁

【非特許文献 17】Scarpini Eら J Neurological Sciences 195:41頁、2002

【非特許文献 18】Dhillonら Roles of MCP-1in development of HIV-dementia. Front Biosci. 2008、13:3913 ~ 3918頁

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、HIV感染をモニタリングするための、およびある場合にはウイルス量をモニタリングするための、HMGB1および抗HMGB1抗体の定量に基づく方法に関する問題ならびに AIDSおよびAIDSまたはHIV感染に関連する神経学的障害の発生の予後判定方法およびHIV感染患者の診断方法における、HMGB1、抗HMGB1抗体、およびケモカインの関連の可能性に関する問題に取り組む。

【課題を解決するための手段】

【0011】

40

より一般的には、本発明は、神経学的障害の進行の状況または神経学的障害への進行の状況のいずれかを、HMGB1、抗HMGB1抗体、および場合によってケモカインの定量に基づいて予後判定する方法、および診断方法にも関する。最後に、本発明は、HMGB1が関与する(例えば、健康な患者または健康な集団におけるHMGB1レベルよりもHMGB1レベルが高い)ことが示されている疾患または障害の進行の状況を、抗HMGB1抗体、および場合によってケモカインの定量に基づいてin vitroで予後判定する方法にも関する。

【0012】

HMGB1は、核内に現れる周知のタンパク質であり、サイトカインであることも公知である。HMGB1の物理特性および機能特性は、Lotzeら、Nature Reviews、Immunology 5:351頁(2005)に開示されており、参照により組み込まれる。

50

## 【 0 0 1 3 】

HMGB1に結合する抗体は公知であり、当技術分野で周知の方法によって作製することができる。市販の抗HMGB1抗体の例は、ヒトHMGB1の残基150～C末端に由来するKLHとコンジュゲートした合成ペプチドを対象とする、ヒトHMGB1(Abeam ref. 18256)に対するウサギ一次ポリクローナル抗体である。これらの方法としては、HMGB1に対するポリクローナル抗体、およびHMGB1に対する、またはHMGB1の特定の断片に対するモノクローナル抗体を作製する方法が挙げられる。治療への適用において使用される抗体は、遮断特性を有し、例えば、特に感染した樹状細胞におけるHMGB1に誘導されるHIV複製に干渉する。これらの抗体は、好ましくは、それらが投与され、認識される対象と同じ種に由来する、または、それらが投与される種と同じ種のHMGB1へ誘導される。これらの抗体は、IgAアイソタイプ、IgGアイソタイプまたはIgMアイソタイプなどの異なるアイソタイプを有し得る。Fab、Fab<sub>2</sub>、および単鎖抗体またはそれらの断片を含めた、HMGB1に結合する抗体断片も使用することができる。

10

## 【 0 0 1 4 】

本発明は、対象から得た脳脊髄液試料に含有される抗体、特にHMGB1に特異的な総抗体を定量するためのin vitro方法であって、(a)定量される抗体が総抗体である場合、試料中に見いだされるHMGB1を含む免疫複合体を解離させるために、酸処理によって、好ましくは、1.5Mのグリシンを低pHで用いて脳脊髄液試料を処理するステップ;(b)いずれの場合でも、前記場合によって処理した生体試料を、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および(c)抗体、特にHMGB1に特異的な総抗体を定量するステップを含む方法に関する。

20

## 【 0 0 1 5 】

「脳脊髄液」または「CSF」という表現は、脳の周りおよび内側のくも膜下腔および脳室系を占める体液を指す。CSFは、くも膜と軟膜との間の空間を占める。CSFは、脳内の脳室、槽、および溝の全て、ならびに脊髄の中心管の内容物を構成する。CSFは、通常、腰椎穿刺によって得られる。

## 【 0 0 1 6 】

好ましい実施形態では、酸処理は、脳脊髄液試料を、低pH、好ましくは、pH1からpH3の間を有し、脳脊髄液試料において、HMGB1タンパク質を、それが免疫学的に結合した抗体から、この抗体の結合能を変化させることなく分離するために選択された酸性解離溶液と接触させることからなる。特定の実施形態では、酸性解離溶液は、低pH、好ましくは、pH1からpH3の間(例えば1.85)のグリシン(例えば1.5M)である。次いで、中和緩衝液(トリス、例えば、1.5Mのトリス、pH9など)を用いて酸処理を停止する。別の好ましい実施形態では、前のものと組み合わせて、または組み合わせずに、温度20 から37 の間、好ましくは、25 で、酸性解離溶液と一緒にインキュベートし、かつ/または水中で中和ステップを行う。

30

## 【 0 0 1 7 】

本出願では、「定量すること」という用語は、「数量化すること」という用語、およびHMGB1タンパク質または特異的な抗体についての任意の適切な情報価値のある決定を包含する。

40

## 【 0 0 1 8 】

「循環」とは、試料、特に血清またはCSFにおいて見いだされる残留抗体、すなわち、複合体を形成していない(タンパク質HMGBと)形態で見いだされる抗体を意味する。「循環」という用語は、処理せずに定量された残留HMGB1タンパク質にも適用される。

## 【 0 0 1 9 】

「総」とは、循環抗体および免疫複合体を形成した抗体の合計または全部合わせた量を意味する。

## 【 0 0 2 0 】

本出願に開示されており、CSFにおいて実行される方法は全て、類似性によって、すなわち、他の生体試料、特に血清、血液、血漿、唾液または組織に対して同様に行うことが

50

できる。

【0021】

特定の実施形態では、本発明は、HIVに感染した対象から得た血清試料または脳脊髄液試料のいずれかである体液試料または両方の試料に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体、特にHMGB1に特異的な総抗体を定量することによってHIV感染をモニタリングするためのin vitro方法であって、

a)前記体液試料を、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および

b)HMGB1に特異的な抗体を定量するステップを含み、検出された抗HMGB1抗体の数量が感染の予後と関連し、特に、前記相関が前記対象におけるウイルス量と無関係である、方法にも関する。

10

【0022】

脳脊髄液試料中のHMGB1に特異的な総抗体を調製するための本明細書に開示されている処理ステップは、血清試料からそのような抗体を得るために同様に適用される。

【0023】

本発明の方法は、HIV、特にHIV-1またはHIV-2に感染した対象の状態をモニタリングするために適している。特定の実施形態では、レトロウイルス療法を受けている、かつ/または非ウイルス血症の患者である(すなわち、血液1ml当たり40コピーのHIV RNA)、HIVに感染した患者において本発明の方法を実行する。レトロウイルス療法を受けているHIVに感染した患者は、一般には、ウイルス量の抑制、CD4数および最下点のCD4数によって測定される中程度の免疫不全、および活性化マーカーであるCD38およびHLA-DRを発現しているCD8<sup>+</sup>T細胞によって測定される中程度の免疫活性化を示す。例えば、図14に記載の「全患者」群の臨床的パラメータを示すHIV感染患者、より具体的には、1ml当たり1.6log<sub>10</sub>コピーのHIV RNAの平均ウイルス量を示し(すなわち、非ウイルス血症の患者)、かつ/または1mm<sup>3</sup>当たり300から800の間のCD4<sup>+</sup>T細胞を示すHIV感染患者は、一般にはレトロウイルス療法(HAART)を受けているHIV感染患者である。

20

【0024】

対象の「状態」とは、HIVに感染した後の対象の臨床状態(status)、またはこの対象の、AIDSに進行する、またはHIV関連神経学的障害に進行する危険性を指す。

【0025】

本発明は、HIVに感染していることが分かっている対象においてHIV感染をモニタリングするためのin vitro方法であって、この対象から得た脳脊髄液試料に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するステップを含み、定量の標的とされる抗体が、HMGB1に特異的な総抗体またはそれらの循環画分(循環抗体)またはそれらの免疫複合体形成画分のいずれかである方法にも関する。

30

【0026】

本明細書に開示されている、免疫不全を評価するため、または免疫活性化のレベルを決定するためにHIV感染をモニタリングするための方法、ならびに予後判定方法および/または診断方法は、前記方法がウイルス量の決定と並行して実施される場合を含め、HMGB1に特異的な循環抗体(残留抗体)の定量、またはHMGB1に特異的な総抗体の定量、またはHMGB1/特異的な抗体の免疫複合体の画分の定量に基づいてよい。

40

【0027】

免疫不全を評価するための方法または免疫活性化のレベルを決定するための方法ならびに本明細書に開示されている予後判定方法および/または診断方法は、CSF試料および/または血清試料などの試料中のHMGB1に特異的な抗体の定量に基づく。これらの方法のいくつか、例えば診断方法などについて、診断結果に到達するために追加的なステップが適切または必要であり得る。

【0028】

HMGB1に特異的な抗体を定量するためのin vitro方法、HIV感染をモニタリングするためのin vitro方法、免疫不全を評価するための方法または免疫活性化のレベルを決定するた

50

めの方法ならびに本明細書に開示されている予後判定方法および/または診断方法の特定の実施形態では、定量された患者のHMGB1に特異的な抗体を、健康な集団(例えば、HIVに感染していない)、観察される神経学的障害を伴わない対象の集団(病気または病気でない)(例えば、HANDを伴わないHIV感染患者の集団)、またはこの疾患の進行の特定の病期に分類される疾患の患者の集団(例えば、HIV感染患者の病期第1期～病期第4期)から決定されたHMGB1に特異的な抗体の量と比較することができる。定量された患者のHMGB1に特異的な抗体は、同じ患者において、違う時間に、または複数の違う時間に決定されたHMGB1に特異的な抗体の量と比較することもできる;この後者の場合、得られた定量値の比を算出することができる、HMGB1に特異的な抗体の量の進展を決定することができる。同じ比較ステップを、ケモカイン、例えばIP-10および/またはMCP-1などの定量にも適用することができる。

10

**【0029】**

特定の実施形態では、これらの方法は全て、循環している、いわゆる残留している特異的な抗体の定量または特異的な総抗体の量のいずれかに基づく(包含する)。

**【0030】**

HMGB1に特異的な総抗体の定量が好ましい場合がある。

**【0031】**

定量が、HMGB1に特異的な総抗体に基づく場合、本発明の方法は、HMGB1に特異的な抗体と形成された免疫複合体(immunological complex)を解離させるために適したステップも含み、例えば、本発明の方法は、上に開示されている酸性処理、具体的には、実施例に開示されている酸性処理に基づく定量方法を使用する、またはそれを含む。定量がHMGB1に特異的な循環抗体に基づく場合、前記解離ステップは必要ない。

20

**【0032】**

特定の実施形態では、前記HMGB1に特異的な抗体の定量は、脳脊髄液試料(対象から得た)を、高移動度群ボックスI(HMGB1)タンパク質またはその誘導体と接触させることにより行う。脳脊髄液試料と前記タンパク質を接触させること、ならびに形成された複合体の定量はin vitroで行う。

**【0033】**

特定の実施形態では、前記HMGB1に特異的な抗体の定量は、血清試料(対象から得た)を、高移動度群ボックスI(HMGB1)タンパク質またはその誘導体と接触させることにより行う。血清試料と前記タンパク質を接触させること、ならびに形成された複合体の定量はin vitroで行う。

30

**【0034】**

本発明の、HIV感染をモニタリングするために設計した方法、特に、免疫不全を評価するため、および免疫活性化のレベルを決定するためにウイルス量を決定することを伴う場合、ならびに予後判定方法および/または診断方法では、全長のHMGB1タンパク質の配列(哺乳動物起源、好ましくは、ヒト起源、例えば、受託番号NP\_002119の下で定義済みのものなど)、または、HMGB1に特異的な抗体に結合し、かつ/または抗HGB1抗体を定量することができる限りは、HMGB1に由来する任意のペプチド(10～30個のアミノ酸残基)またはポリペプチド(30～215個のアミノ酸残基、好ましくは、30～50残基、または30～100残基、または30～150残基)(HMGB1タンパク質誘導体)を使用することが可能であることが理解される。そのような誘導体は、組換えHMGB1(例えば、HMG biotech HM-115として商業化されたタンパク質)、HMGB1の免疫学的反応性部分、配列が種々の起源のHMGB1タンパク質に共通であるHMGB1の免疫学的反応性部分からなる群において選択される。そのような例は、ヒトおよびマウスHMGB1に共通の配列に対応する、HMGB1由来の組換えBOXB(HMGbiotech HM-051)である。

40

**【0035】**

「HIV感染患者」または「HIVに感染していることが分かっている対象」とは、HIVウイルスについて陽性かつ正確に診断された対象または患者、および関連する検査の後にHIV感染が確認された対象または患者を意味する。HIV感染患者は、ウイルス量、CD4 T細胞の

50

数またはAIDSの臨床的な症状などのいくつかのパラメータに従って分類することができる。

【0036】

神経学的障害に罹患している患者において、特定の分類は、以下の通り、臨床医によって決定されるこれらのHIV感染に関連する神経学的障害に基づく；

-病期第1期、NP(神経心理学的な)検査正常；

-病期第2期、1つの認知力テストにおいて平均を下回る少なくとも2SD(標準偏差)または同じ領域について審査する2つ以上の検査において平均を下回る少なくとも1SD。これらの結果によりND(神経心理学的欠損)の状態が定義される；

-病期第3期、ANI(無症候性の認知神経科学的機能障害)についての判断基準を有する患者を含む；および

-病期第4期、MCD(軽微な認知神経科学的障害)を有する患者を含む。

【0037】

この分類は、Antinoriらによって提唱された分類(Neurology. 2007年10月30日;69(18):1789~99頁)と以下の通り関連づけることができる：HAND(HIV関連神経学的障害)を伴わない患者は病期第1期および病期第2期を含み、一方、HANDを伴う患者は、病期第3期および病期第4期を含む。

【0038】

上に開示されている通り、血清試料中のHMGB1または抗HMGB1抗体の検出または定量を実施することによってHIV感染を検出またはモニタリングすることは、周知の技法によってウイルス量を決定することにより実現することができる。

【0039】

本発明の特定の実施形態では、前記ウイルス量を決定することは、本発明の方法それ自体を、特に、診断された患者がHIV感染症に対する治療を受けていない場合に実施することによって実現することができる。

【0040】

したがって、本発明は、特定の実施形態において、HIVに感染していることが分かっている対象のHIVウイルス量をモニタリングするための方法であって、試料中、特に、血清中または脳脊髄液試料中のHMGB1に特異的な総抗体を定量する方法を実行するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体が多いほど、ウイルス量が多い、方法にも関する。ウイルス量(VL)をモニタリングするためのこの手法は、ウイルス量をモニタリングする時に、HIVに感染していることが分かっており、この感染に対する治療を受けていない患者において、またはVLが制御されていない患者において適切であるだろう。

【0041】

「ウイルス量」とは、HIV RNA(ウイルス粒子に由来し、血漿中に存在する)またはHIV DNA(細胞ゲノム内に組み込まれ、細胞内に存在する)のいずれかを意味する。特定の実施形態では、HMGB1に特異的な抗体の定量に基づく本発明の方法は、HIV RNAウイルス量をモニタリングするために適している。

【0042】

「HIV感染をモニタリングすること」とは、HIV感染を時間内に経過観察することを意味する。HIV感染は、種々のパラメータ、例えば、ウイルス量の測定値、CD4 T細胞数、および/または疾患の進展に関連する臨床パラメータなどによって評価することができる。HIV感染の進行、すなわち、測定されたパラメータの、以前のアッセイと比較した減少、増加または安定により、患者の看護の仕方が決定される。HIV感染の進行は、HIV複製および/またはHIVゲノムの、標的細胞のゲノムへの組み込みを反映する。

【0043】

本発明は、HIVに感染した患者の後天性免疫不全症候群(AIDS)の進行の状況またはAIDSへの進行の状況、またはHIV感染に関連する神経学的障害への進行の状況のいずれかを *in vitro* で予後判定する方法であって、HIV感染後、好ましくは、一次感染もしくは急性感染の間に、または慢性感染の間に患者から得た試料、特に、血清または脳脊髄液試料におけ

10

20

30

40

50

る、上に開示されているHIV感染を定量する方法またはモニタリングするための方法を実行するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体のレベルが高いほど、AIDSまたはAIDSが進行した状況を発症する危険性が高く、特に、HIV感染に関連する神経学的障害を発症する危険性が高い、方法も対象とする。

【0044】

本発明は、神経学的障害の進行の状況または神経学的障害への進行の状況を *in vitro* で予後判定する方法であって、

a) 前記患者から得た脳脊髄液試料または血清試料または血清の試料と脳脊髄液の試料の両方を、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ; および

b) 前記脳脊髄液試料、前記血清試料または前記血清の試料と脳脊髄液の試料の両方に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するステップ

を含み、HMGB1に特異的な抗体のレベルが高いほど、神経学的障害を発症する危険性または進行期の神経学的障害を発症する危険性が高い、方法も対象とする。

【0045】

特定の実施形態では、前記神経学的障害が、感染(病原体、細菌またはウイルスによる)に起因する、またはそれに起因すると考えられる場合、試料は、一次感染もしくは急性感染の間に、または慢性感染の間に得る。

【0046】

「予後判定」という用語は、患者から得た試料に対してHMGB1に特異的な抗体の定量を行った時に、患者に対する、神経学的障害を発症する危険性または神経学的障害に進行する危険性、またはHIV感染患者において、AIDSを発症する危険性またはAIDSに進行する危険性を評価する可能性を指す。

【0047】

本発明は、(1)患者において、神経学的障害が存在すること、またはHIV感染患者において、AIDSに関連する神経学的障害が存在することを、従来の臨床的な基準によって評価すること; および(2)免疫学的パラメータを決定すること、具体的には、HMGB1に対する特異的な抗体を定量すること(および場合によってケモカイン、例えば、IP-10および/またはMCP-1などを定量すること)によって、場合によって体積変化および/または代謝変化を決定することと組み合わせ、これらの神経学的障害の発生を確認することまたは相互に関連づけることを組み合わせる診断方法にも関する。特異的なHMGB1抗体の定量は、予後判定方法について本出願に記載されている通り行う。したがって、HMGB1に特異的な抗体のレベルは、従来の臨床的な基準の知見と相互に関連づけて、臨床的診断を確認することができる。「診断的」および「診断」という用語は、患者について、この患者から得た試料に対してHMGB1に特異的な抗体の定量を行った時に、神経学的障害が存在すること、または存在しないこと、またはHIV感染患者において、AIDSに関連する神経学的障害が存在すること、または存在しないことを、従来の臨床的な基準と免疫学的パラメータの両方に依拠することによって決定する可能性を指す。診断方法の過程においてHMGB1に特異的な抗体を定量することは、従来の臨床的な基準では、神経学的障害の発生を確実に結論づけることができない患者において特に適している。例えば、病期第2期(神経心理学的欠損)に分類されたHIV感染患者において、HMGB1に特異的な抗体の定量は、従来の臨床的な基準を用いて得られた神経学的障害の診断を確認するため、無効にするため、または認定するための効率的な相補的な指標であってよい。

【0048】

特定の実施形態では、本 *in vitro* 予後判定方法および/または診断方法は、HMGB1が関与することが示されており、病理学的な危険性または状態を伴う疾患または障害に一般的に適用可能である。

【0049】

したがって、本発明の方法は、

(1) それらの原因が何であれ、神経学的障害が存在する疾患または障害において実行する

10

20

30

40

50

ことができる。このカテゴリーとしては、これらに限定されないが、感染が原因の疾患または障害、例えば、細菌感染症、病原体感染症、ウイルス感染症またはプリオンによる感染症が挙げられる。神経学的障害を伴う感染性障害の特定の例は、HIV感染である。このカテゴリーとしては、これらに限定されないが、原因が感染ではない、(例えば、原因が外傷性である)または原因が不明の疾患または障害、例えば、急性ニューロン損傷、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、ハンチントン病、虚血後脳損傷、パーキンソン病、末梢神経系および/または脊髄に影響を及ぼす任意の障害、例えば、脊髄損傷など、筋萎縮性側索硬化症、ならびに脱髄性疾患、例えば、多発性硬化症(MS)なども挙げられる。

#### 【0050】

「神経学的障害」とは、例えば、認知症候群(ADC)、脳障害、中枢神経系リンパ腫、クリプトコックス髄膜炎、サイトメガロウイルス(CMV)脳炎、帯状疱疹ウイルスによって引き起こされる脳炎および脊髄炎、ニューロパチー(末梢性ニューロパチーおよび遠位感覚多発性ニューロパチー(distal sensory polyneuropathy))、神経梅毒、進行性多巣性白質脳症(PML)、トキソプラズマ脳炎または脳トキソプラズマ症および空胞性脊髄症を意味する。

10

#### 【0051】

本発明の方法は、(2)HMGB1タンパク質が関与することが示されており、感染(細菌、病原体またはウイルス)が原因である、または自己免疫が原因である、神経学的障害を伴わない疾患または障害において実行することができる。この第2のカテゴリーの疾患の例は、これらに限定されないが、1型糖尿病、全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ、HSV-2感染症、慢性B型肝炎、レジオネラ感染症、敗血症または喘息を包含する。

20

#### 【0052】

より詳細には、本発明は、HIVに感染した患者の、後天性免疫不全症候群(AIDS)に関連する神経学的障害の進行の状況またはHIV感染またはAIDSに関連する神経学的障害への進行の状況のいずれかを *in vitro* で予後判定する方法であって、感染後に、好ましくは、一次感染もしくは急性感染の間に、または慢性感染の間に前記患者から得た試料、特に、血清または脳脊髄液試料における、上に開示されているHIV感染を定量する方法またはモニタリングするための方法を実行するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体のレベルが高いほど、AIDSに関連する神経学的障害を発症する危険性または進行したAIDSに関連する神経学的障害またはAIDSの進行期の神経学的障害を発症する危険性が高い、方法を対象とする。

30

#### 【0053】

「AIDSの進行またはAIDSへの進行の状況」という表現は、AIDSの進行またはAIDSへの進行において遭遇する種々の病期を指し、具体的には、世界保健機構(World Health Organisation)によって作成され更新されるHIV感染および疾患についてのWHO疾患病期分類システム(WHO Disease Staging System)を指し、それが以下に要約されている。I期:HIV疾患は無症候性であり、AIDSとしてカテゴリー化されない;II期は、軽微な皮膚粘膜の症状発現および上気道感染症の再発を含む;III期は、1ヶ月を超える原因不明の慢性の下痢、重篤な細菌感染症および肺結核を含む;IV期は、脳のトキソプラズマ症、食道、気管、気管支または肺のカンジダ症およびカポジ肉腫を含む。

40

#### 【0054】

「神経学的障害への進行の状況」という表現は、HIV感染患者に適用される場合、上記の神経学的障害の病期(1~4)分類を指す。あるいは、Antinoriらによって提唱された分類およびHAND(HIV関連神経学的障害)がない患者およびHAND患者を指すことも考えることができる。

#### 【0055】

「後天性免疫不全症候群に関連する神経学的障害」または「AIDSに関連する神経学的障害」または「HIV感染に関連する神経学的障害」という表現は、HIVウイルスによって、ある特定の癌および/または日和見感染症によって直接引き起こされる神経系の神経学的障害、ならびにウイルスによって影響を受けるが、直接それによって引き起こされることは

50

分かっていない原因不明の障害を包含する。これらのAIDSに関連する神経学的障害のいくつかは、上で定義された疾患の進行の状況の特性であり得る。AIDSに関連する神経学的障害の例は、AIDS認知症候群(ADC)またはHIV関連脳障害、中枢神経系リンパ腫、クリプトコックス髄膜炎、サイトメガロウイルス(CMV)脳炎、帯状疱疹ウイルスによって引き起こされる脳炎および脊髄炎、ニューロパチー(末梢性ニューロパチーおよび遠位感覚多発性ニューロパチー(distal sensory polyneuropathy))、神経梅毒、進行性多巣性白質脳症(PML)、トキソプラズマ脳炎または脳トキソプラズマ症および空胞性脊髄症である。AIDSの病期にない、ウイルス量(VL)が制御されている一部の患者、例として、強力な抗レトロウイルス療法(HAART)を受けている患者は、神経学的障害を発症する可能性がある。これらの神経学的障害に関する臨床的な分類は、上に開示されている。

10

**【0056】**

本発明の好ましい実施形態では、HIV感染もしくは後天性免疫不全症候群(AIDS)に関連する神経学的障害の進行の状況またはHIV感染もしくはAIDSに関連する神経学的障害への進行の状況のいずれかをin vitroで予後判定する方法を、AIDSの病期にない、ウイルス量(VL)が制御されている患者、例として、強力な抗レトロウイルス療法(HAART)を受けている患者由来の生体試料に対して実施する。

**【0057】**

本発明は、患者、特に、HIVに感染していることが分かっている対象の免疫不全(immune deficiency)(または免疫不全(immunodeficiency))を評価するためのin vitro方法であって、前記対象から得た試料、特に、血清または脳脊髄液試料において、上に開示されているHIV感染を定量する方法またはモニタリングするための方法を実行するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体が多いほど、免疫不全が高度である、方法にも関する。HIV感染患者に関して、感染後に観察される免疫不全は、特異的な抗HMGB1抗体のレベルと負に相関することが本発明において示されているCD4 T細胞が減少した結果である。

20

**【0058】**

患者、特に、HIVに感染していることが分かっている対象における、特に持続性の炎症性の状況を引き出す免疫活性化、特に持続性の免疫活性化または体の一部の区画における持続性の免疫活性化のレベルを決定するためのin vitro方法であって、前記対象から得た試料、特に、血清または脳脊髄液試料において、上に開示されている定量方法を実行するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体が多いほど、免疫活性化の持続性が高い、方法も本発明の一部である。持続性の(または慢性の)免疫活性化は、CD8T細胞における、活性化マーカー、特に、CD38マーカーおよび/またはHLA-DRマーカーの高発現と関連する。したがって、本発明は、特異的なHMGB1抗体が高レベルであることと、CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>T細胞とCD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>T細胞の両方が高レベルであることが相関することの証拠を提示した。

30

**【0059】**

免疫活性化とは、具体的には、HIV感染の急性期の患者において観察される免疫活性化、または慢性HIV感染の患者、特に、前記患者が抗レトロウイルス治療(ART)を受けていない、またはHIV感染に関連する神経学的障害が存在する場合に観察される免疫活性化を指す。

**【0060】**

免疫不全を評価するため、または免疫活性化のレベルを決定するためのin vitroの予後判定方法および/または診断方法の中で、定量方法は、例えば、

40

a)前記患者から得た脳脊髄液試料または血清試料または血清の試料と脳脊髄液の試料の両方を、好ましくは一次感染もしくは急性感染の間に、または慢性感染の間に、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および

b)前記脳脊髄液試料、前記血清試料または前記血清の試料と脳脊髄液の試料の両方に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するステップを含む方法である。

**【0061】**

抗HMGB1抗体の定量に基づく、in vitroで予後判定する方法、免疫不全を評価するため

50

の方法または免疫活性化のレベルを決定するための方法の特定の実施形態では、抗HMGB1抗体レベルが、健康な集団またはHANDを伴わないHIV感染患者の集団における抗HMGB1抗体レベルのレベルと比較して20%超上昇することは、持続性の免疫活性化、進行期の神経学的障害を発症する危険性がより高いこと、および/または免疫不全がより高度であることと相関する。

#### 【0062】

本発明の方法は、ステップa)の前に、特異的な総抗HMGB1抗体を定量するために、HMGB1に特異的な抗体と形成した免疫複合体を解離させるために適したステップも含んでよい。例えば、この追加的なステップは、実施例に開示されているものなどの酸性処理を含む。特定の実施形態では、この酸処理は、試料(脳脊髄液、血清またはその両方)を、HMGB1タンパク質が、それが免疫学的に結合した抗体から、試料中のこの抗体の結合能を変化させることなく分離するように選択した、低pH、好ましくは、pH1からpH3の間である酸性解離溶液と接触させることを含む。特定の実施形態では、酸性解離溶液は、低pH、好ましくは、pH1からpH3の間(例えば、1.85)のグリシン(例えば、1.5M)である。次いで、中和緩衝液(トリス、例えば、1.5Mのトリス、pH9など)を用いて酸処理を停止する。酸性処理により生体試料(CSF、血清)が希釈される。別の好ましい実施形態では、前のものと組み合わせ、または組み合わせずに、温度20 から37 の間、好ましくは、25 で酸性解離溶液と一緒にインキュベートし、かつ/または水中で中和ステップを行う。

10

#### 【0063】

特定の実施形態では、前記HMGB1に特異的な抗体の定量を、in vitroにおいて、試料を、高移動度群ボックスI(HMGB1)タンパク質またはその誘導体と接触させることによって行う。したがって、前記定量は、全長のHMGB1タンパク質の配列(哺乳動物起源、好ましくは、ヒト起源、例えば、受託番号NP\_002119の下で定義済みのものなど)、または、HMGB1に特異的な抗体に結合し、かつ/または抗HGB1抗体を定量することができる限りは、HMGB1に由来する任意のペプチド(10~30個のアミノ酸残基)またはポリペプチド(30~215個のアミノ酸残基、好ましくは、30~50残基、または30~100残基、または30~150残基)(HMGB1タンパク質誘導体)を使用して行う。そのような誘導体は、組換えHMGB1(例えば、HMG biotech HM-115として商業化されたタンパク質)、HMGB1の免疫学的反応性部分、配列が種々の起源のHMGB1タンパク質に共通であるHMGB1の免疫学的反応性部分からなる群において選択する。そのような例は、ヒトおよびマウスHMGB1に共通の配列に対応する、HMGB1由来の組換えBOXB(HMGbiotech HM-051)である。

20

30

#### 【0064】

本出願に開示されているin vitroにおける方法のそれぞれ、または全ては、場合によっては、試料(例えば、血清または脳脊髄液試料など)中に見いだされる他の分子、特に、ケモカインを定量するステップをさらに含む。それぞれ独立に、アッセイすること、および定量することができるケモカインの例は、ケモカインIP-10およびケモカインMCP-1である。ヒトケモカインIP-10(10kDaのインターフェロンガンマに誘導されたタンパク質)は、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド10またはCXCL10とも称され、NCBI受託番号NP\_001556の下で参照される);ヒトケモカインMCP-1(単球走化性タンパク質1)は、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド2(CCL2)とも称され、NCBI受託番号NP\_002973の下で参照される)。

40

#### 【0065】

分子、特に、ケモカイン、例えば、ケモカインIP-10およびケモカインMCP-1などに適用する場合、「定量すること(quantitating)」または「定量(quantitation)」という用語は、「数量化すること」という用語、およびケモカインIP-10およびケモカインMCP-1のレベルの任意の適切な情報価値のある決定を包含する。

#### 【0066】

特に、本発明は、HIVに感染していることが分かっている対象の状況をモニタリングするためのin vitro方法であって、本明細書に開示されている定量方法(HMGB1に特異的な抗体の定量)、および前記対象から得た試料、特に、血清中または脳脊髄液試料中のケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1を定量するためのステップを実行することを含

50

む方法に関する。

【0067】

別の実施形態では、本発明は、神経学的障害の進行の状況または神経学的障害への進行の状況のいずれかについて *in vitro* で予後判定する方法または診断方法であって、患者から得た試料、特に、血清または脳脊髄液試料またはその両方において、本明細書に開示されている定量方法、およびケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1を定量するためのステップを実行することを含み、HMGB1に特異的な抗体のレベルが高いほど、ケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1が多いほど、神経学的障害を発症する危険性、または進行期の神経学的障害を発症する危険性が高い、方法も対象とする。

【0068】

さらに、本発明は、HIVに感染した患者の、一般に後天性免疫不全症候群(AIDS)もしくはHIV感染に関連する神経学的障害の進行の状況または一般にAIDSもしくはHIV感染に関連する神経学的障害への進行の状況を、*in vitro* で予後判定する方法であって、感染後に患者から得た試料、特に、血清または脳脊髄液試料において、本明細書に開示されている定量方法(HMGB1に特異的な抗体の定量)およびケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1を定量するためのステップを実行することを含み、HMGB1に特異的な抗体のレベルが高いほど、ケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1が多いほど、一般にAIDSもしくはHIV感染に関連する神経学的障害を発症する危険性、または一般にAIDSもしくはHIV感染に関連する進行期の神経学的障害を発症する危険性が高い、方法も対象とする。

【0069】

本明細書に記載の全ての予後判定方法について、ケモカインを定量するステップは、特にHMGB1に特異的な抗体を定量するステップと同時に実施する。

【0070】

本発明は、HIVに感染した個体の脳脊髄液試料において、および血清試料においてHMGB1に特異的な抗体を定量するステップ(例えば、上記の通り)であって、どちらの定量も同じ個体において、かつ同時に取得した試料に対して行うステップと、場合によって、同じ個体において同時に取得した脳脊髄液試料と血清試料の両方においてケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1を定量するステップを含む方法にも関する。

【0071】

2つの異なる試料においてHMGB1に特異的な抗体を並行して定量することに基づくこの方法は、以下の適用において使用することができる：

- HIVに感染していることが分かっている対象におけるヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染をモニタリングするための *in vitro* 方法；
- HIVに感染した患者の後天性免疫不全症候群(AIDS)の進行の状況またはAIDSへの進行の状況を、好ましくは、一次感染もしくは急性感染の間に、または慢性感染の間に *in vitro* で予後判定する方法；
- 患者の神経学的障害の進行の状況または神経学的障害への進行の状況のいずれかを *in vitro* で予後判定する方法；
- HIVに感染した患者の、後天性免疫不全症候群(AIDS)もしくはHIV感染に関連する神経学的障害の進行の状況またはAIDSもしくはHIV感染に関連する神経学的障害への進行の状況のいずれかを、一次感染もしくは急性感染の間に、または慢性感染の間に *in vitro* で予後判定する方法；および
- 他の手段を伴う場合、患者の神経学的障害の進行の状況または神経学的障害への進行の状況のいずれか、特に、HIVに感染した患者におけるAIDSもしくはHIV感染に関連する神経学的障害の進行の状況またはAIDSもしくはHIV感染に関連する神経学的障害への進行の状況のいずれかを診断するための方法。

【0072】

「同時に」とは、試料を、決定された患者から、前記HIV感染患者の臨床的な症状、特に、神経学的障害、例えば、AIDSもしくはHIVに関連する神経学的障害など、AIDSの病期および/または血清もしくはCSFのウイルス量が同様である(統計学的に有意でない)または

10

20

30

40

50

同一である期間内に得たことを意味する。具体的には、この期間は、6ヶ月、3ヶ月、1ヶ月または2週間を超えない(それ未満である)。

【0073】

上に開示されている、脳脊髄液試料および血清試料における、*in vitro*で予後判定する方法および/または診断方法、免疫不全を評価するための*in vitro*方法、患者の状態の*in vitro*モニタリング、免疫活性化のレベルを決定するための*in vitro*方法、およびHMGB1に特異的な抗体を定量する方法のそれぞれおよび全てと並行して、HIVウイルス量を、従来の方法を使用して(例えば、PCRによって)決定する。「並行して」という表現は、同じ患者から同時に得た試料において方法を行うことを意味する。

【0074】

興味深いことに、患者の血清中のウイルス量および/またはCSF中のウイルス量は検出不可可能な場合があり、これは血液および/またはCNSにおいてHIVウイルスの複製が存在しないことを示すが、大量のHMGB1に特異的な抗体が、おそらく多量のケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1と一緒に定量されることにより、他の区画または器官、例えば、肝臓、脳または腸などにおいてHIVウイルスが複製されていることが示される。これは、公知の標準物質に従ってHIVウイルス量が低い、または検出不可能である治療されたHIV感染患者は、神経学的障害を示しているが、AIDSには進行しないことを説明している可能性がある。この知見により、血清中のウイルス量を決定することと並行して、HIVウイルスが種々の器官および区画に感染し、維持されるという事実を考慮に入れるために、他のアッセイ、例えば、HMGB1に特異的な抗体の定量などを実行してよいことが正当化される。

【0075】

*in vitro*の予後判定方法および/または診断方法は、神経学的障害の進行の状況または神経学的障害への進行の状況、特に、AIDSもしくはHIV感染に関連する神経学的障害を確認または検証するために設計された相補的なアッセイをさらに含んでよい。これらのアッセイは、

(a)前記患者の基底核の体積変化を、好ましくは核磁気共鳴画像法(Magnetic Resonance Imaging)測定によって同定するステップ;および/または

(b)前記患者の基底核の代謝変化を、好ましくは血清コリン/N-アセチルアスパラギン酸比(Cho/NAA)を算出することによって同定するステップを含む。

【0076】

本明細書に記載の方法は全て*in vitro*で実行する。

【0077】

本発明は、患者、特に、HIV感染患者の神経学的障害の進行の状況または神経学的障害への進行の状況を*in vitro*で予後判定するためのキット、マーカーまたは手段を製造するための、上で定義されているネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体の使用にも関し、前記予後判定および診断は、

a)前記患者から得た脳脊髄液試料または血清試料または血清の試料と脳脊髄液の試料の両方を、好ましくは一次感染もしくは急性感染の間に、または慢性感染の間に、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および

b)前記脳脊髄液試料、前記血清試料または前記血清の試料と脳脊髄液の試料の両方に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するステップを含み;

HMGB1に特異的な抗体のレベルが高いほど、神経学的障害を発症する危険性、または進行期の神経学的障害を発症する危険性が高く、特に、HIV感染に関連する神経学的障害を発症する危険性、またはHIV感染に関連する進行期の神経学的障害を発症する危険性が高い、方法によって得られる。

【0078】

本発明は、患者、特に、HIVに感染していることが分かっている対象の免疫不全を評価するためのキット、マーカーまたは手段を製造するための、上で定義されているネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体の使用にも関し、前記評価は、

a)前記対象から得た脳脊髄液試料または血清試料または血清の試料と脳脊髄液の試料の両方を、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および

b)前記脳脊髄液試料、前記血清試料または前記血清の試料と脳脊髄液の試料の両方に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体が多いほど、免疫不全が高度である、方法によって得られる。

【0079】

本発明は、患者、特に、HIVに感染していることが分かっている対象において免疫活性化のレベルを決定するためのキット、マーカーまたは手段を製造するための、上で定義されているネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体の使用にも関し、前記決定は、

a)前記対象から得た脳脊髄液試料または血清試料または血清の試料と脳脊髄液の試料の両方を、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体と接触させるステップ;および

b)前記脳脊髄液試料、前記血清試料または前記血清の試料と脳脊髄液の試料の両方に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)に特異的な抗体を定量するステップを含み、HMGB1に特異的な抗体が多いほど、免疫活性化の持続性が高い、方法によって得られる。

【0080】

本発明は、患者、特に、HIVに感染していることが分かっている対象における本発明の診断方法のためのキット、マーカーまたは手段を製造するための、上で定義されているネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体の使用にも関する。

【0081】

上記のキット、マーカーまたは手段の製造は、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体に加えて、HMGB1/抗HMGB1抗体の免疫複合体を解離させるために適した酸性解離溶液の使用および/またはケモカイン、例えば、IP-10および/またはMCP-1などを定量するための手段の使用も含んでよい。特定の実施形態では、上記のキット、マーカーまたは手段の製造は、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体、およびHMGB1/抗HMGB1抗体の免疫複合体を解離させるために適した酸性解離溶液の使用も含む。別の実施形態では、上記のキット、マーカーまたは手段の製造は、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体、およびケモカインIP-10を定量するための手段の使用も含む。

【0082】

HMGB1に特異的な抗体を定量することを含む、上に開示されているin vitroにおける方法はいずれも、ELISA、または他の免疫学的検出方法を、固体支持体上にコーティングした高移動度群ボックスI(HMGB1)タンパク質またはその誘導体を使用して、および場合によって、HMGB1に特異的な抗体を検出することができる二次抗体を使用して実行することによって行うことができる。

【0083】

ケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1の定量が関与する場合、ELISAまたは当技術分野で公知の任意の他の方法を使用することができる。

【0084】

出願人は、脳脊髄液試料においてタンパク質HMGB1自体をアッセイすることができることの証拠を提示した。

【0085】

したがって、本発明のさらに別の態様は、HIVに感染した対象由来の脳脊髄液試料におけるHMGB1の濃度の上昇を検出することに関する。脳脊髄液試料におけるウイルス量とHMGB1濃度との間の正の相関も、HIV感染をモニタリングするために用いることができる。HMGB1濃度は、ELISA試験などの周知の診断検査を用いて定量することができる。組換えhHMGB1、抗hHMGB1モノクローナル抗体およびウサギ抗hHMGB1血清が市販されており、そのような診断検査において使用することができる。

【0086】

本発明は、HIVに感染した対象におけるHIV感染をモニタリングするためのin vitro方法であって、前記対象から得た脳脊髄液試料に含有される高移動度群ボックスI(HMGB1)タンパク質を、特に、HIVに感染した前記対象由来の生体試料を、高移動度群ボックスI(HMGB1

10

20

30

40

50

)と免疫学的に結合する抗体と接触させることによって定量するステップを含み、定量の標的とされるHMGB1タンパク質が、総HMGB1タンパク質またはその循環画分(残留している循環HMGB1)またはその免疫複合体形成画分のいずれかである、方法にも関する。

【0087】

本発明は、HIVに感染していることが分かっている対象のHIVウイルス量をモニタリングするためのin vitro方法であって、前記対象から得た脳脊髄液試料におけるHMGB1タンパク質の定量を実行するステップを含み、HMGB1タンパク質が多いほど、ウイルス量が多い、方法にも関する。「ウイルス量」とは、HIV RNA(ウイルス粒子に由来し、血漿中に存在する)またはHIV DNA(細胞ゲノム内に組み込まれ、細胞内に存在する)のいずれかを意味する。特定の実施形態では、HMGB1を定量することに基づく本発明の方法は、HIV RNAウイルス量をモニタリングするために適している。

10

【0088】

HIV感染またはウイルス量をモニタリングするための方法は、循環(残留)HMGB1を定量することに基づいて、総HMGB1を定量することに基づいて、またはHMGB1/特異的な抗体の免疫複合体の画分を定量することに基づいて実行することができる。

【0089】

特定の実施形態では、これらの方法は、循環HMGB1を定量すること、または総HMGB1を定量することのいずれかに基づく。定量が、総HMGB1に基づく場合、本発明の方法は、HMGB1に特異的な抗体と形成した免疫複合体を解離させるために適したステップも含み、例えば、本発明の方法は、脳脊髄液試料を酸性処理することを用いる、またはそれを含む。

20

【0090】

適切な酸性処理は、脳脊髄液試料を、HMGB1タンパク質を特異的な抗体から、HMGB1タンパク質およびその特異的な抗体による認識力を変化させることなく分離するように選択した、低pH、好ましくは、pH1からpH3の間である酸性解離溶液と接触させることを含む。特定の実施形態では、酸性解離溶液は、低pH、好ましくは、pH1からpH3の間(例えば、1.85)のグリシン(例えば、1.5M)である。次いで、中和緩衝液(例えば、1.5Mのトリス、pH9などのトリス)を用いて酸処理を停止する。別の好ましい実施形態では、前のものと組み合わせ、または組み合わせずに、温度20 から37 の間、好ましくは、25 で酸性解離溶液と一緒にインキュベートし、かつ/または水中で中和ステップを行う。

【0091】

HMGB1タンパク質の定量を、HIVに感染していない対象から得た脳脊髄液試料由来のHMGB1の量と、または同じ対象から違う時間に得た脳脊髄液試料由来のHMGB1の量と比較することができる。

30

【0092】

本発明は、同じ適用のために、HIVに感染した個体の脳脊髄液試料において、および血清試料においてHMGB1を定量するステップ(例えば、上記の通り)であって、どちらの定量も、同じ個体において同時に行うステップ、および場合によって、同じ個体において同時に、脳脊髄液試料および血清試料の両方においてケモカインIP-10および/またはケモカインMCP-1を定量するステップを含む方法にも関する。

【0093】

本発明の別の態様は、以下の適用:HIVに感染した対象のヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染をモニタリングすること、HIV感染に対する治療を受けていないHIVに感染した対象のHIVウイルス量をモニタリングすること、HIVに感染した患者の、後天性免疫不全症候群(AIDS)の進行の状況またはAIDSへの進行の状況のいずれかの予後判定を行うこと、患者の神経学的障害の進行の状況、特に、後天性免疫不全症候群(AIDS)もしくはHIV感染に関連する神経学的障害、または患者の神経学的障害への進行の状況、特に、HIVに感染した患者のAIDSもしくはHIV感染に関連する神経学的障害いずれかの予後判定を行うこと、患者、特に、HIVに感染した対象の免疫不全を評価すること、患者、特に、HIVに感染した対象の免疫活性化、特に持続性の免疫活性化のレベルを決定すること、HIVに感染した対象の状態(state)をモニタリングすることの1つを実行するために使用することができ、また、本発明

40

50

の診断方法において使用することができるキットに関する。

【0094】

このキットは、上で定義されているネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体、および場合によって、上で定義済されているような患者から取得した場合に生体試料中に見いだされるHMGB1/抗HMGB1抗体の免疫複合体を解離させるために適した酸性解離溶液、および場合によって、ケモカインIP-10を定量するための手段および/またはケモカインMCP-1を定量するための手段を含む。場合によって、このキットは、例えば、上で定義されている中和緩衝液および/またはHMGB1/特異的な抗体の複合体に結合し、かつ/またはその形成を明らかにする二次抗体も含有してよい。場合によって、このキットは、使用説明書(小冊子)も含有してよい。特定の実施形態では、キットは、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体、およびHMGB1/抗HMGB1抗体の免疫複合体を解離させるために適した酸性解離溶液を含む。別の実施形態では、キットは、ネイティブなHMGB1タンパク質またはその誘導体、およびケモカインIP-10を定量するための手段を含む。

10

【0095】

キットは、任意の生体試料、特に、HIV感染患者の脳脊髄液試料またはHIV感染患者の血清試料から、または並行して定量することが必要な場合は、前記HIV感染患者の脳脊髄液試料と血清試料の両方から抗HMGB1抗体を定量するために実行される。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】図1Aは、HIV-1感染患者由来のCSFにおけるHMGB1および抗HMGB1抗体の検出を示すグラフである。左側のパネル:健康なドナー(HD)10人および神経学的障害を伴うHIV-1感染患者23人由来のCSF中のHMGB1濃度をElisa(Shinotest、IBL)によって定量した。箱ひげ図は、2つの群におけるCSF中のHMGB1濃度の平均±SDを示す(検出限界0.25ng/ml)[HDにおいて0.5ng/ml(範囲0.25~1.47)対患者において1.67ng/ml(範囲0.25~15.9)]。右側のパネル:HIV感染患者を、神経学的障害の重症度に応じて病期第2期から病期第4期までに層別化し、CSFは病期第3期の患者および病期第4期の患者についてのみ得た。病期第3期の患者由来のCSFにおいて検出されたHMGB1の濃度はHDに対して増加したが、この値は変動したので、両群のHDと患者との間の差異は統計的に有意ではなかった。図1Bは、HIV-1感染患者由来のCSFにおけるHMGB1および抗HMGB1抗体の検出を示すグラフである。左側のパネル:健康なドナー(HD)10人および神経学的障害を伴うHIV-1感染患者23人由来のCSFにおける抗HMGB1Ab濃度をElisaによって数量化した。箱ひげ図は、CSF中の抗HMGB1濃度の平均±SDを示す(箱に平均値および範囲値が示されている)。有意差のp値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。右側のパネル:病期第3期の患者(n=12)および病期第4期の患者(n=11)のCSFを、抗HMGB1Abについて試験し、HD(n=10)と比較した。箱ひげ図は、抗HMGB1濃度の平均±SDを示す。有意差のp値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。

20

30

【図2】図2Aは、CSFにおけるHMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルに対するウイルス量の影響を示すグラフである。患者を、CSF中のウイルス量(VL)に応じて2群に層別化した:検出不可能(すなわち、<40コピー/ml)および陽性(VL>40コピー/ml)。箱のそれぞれに平均値が示されている。HMGB1濃度および抗HMGB1濃度をこれらの2群間で比較した。p値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。図2Bは、CSFにおけるHMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルに対するウイルス量の影響を示すグラフである。HMGB1または抗HMGB1抗体のいずれかのCSF中濃度とCSF中のLog VLとの間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。図2Cは、CSFにおけるHMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルに対するウイルス量の影響を示すグラフである。血漿中のVLとCSF中のHMGB1濃度(左側のパネル)またはCSF中のVL(右側のパネル)との間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

40

【図3】図3Aは、CSFにおける抗HMGB1抗体レベルと疾患の進展との相関を示すグラフである。末梢のCD4 T細胞数は、疾患の進展の相関現象である。患者を、それらの血中CD4 T細胞数に応じて3群に層別化し、HMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルを3群間で比較した。

50

p値(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)が報告されている。図3Bは、CSFにおける抗HMGB1抗体レベルと疾患の進展との相関を示すグラフである。HMGB1または抗HMGB1AbのいずれかのCSF中濃度とCD4 T細胞の数との間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図4A】図4Aは、CSFにおけるHMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルと免疫活性化との相関を示すグラフである。CSF中のVL、T CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>およびT CD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>の百分率を、それらのCD4 T細胞数に応じて層別化した患者3群の中で比較した。p値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。

【図4B】図4Bは、CSFにおけるHMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルと免疫活性化との相関を示すグラフである。CSF中のVLまたは血清中のVLとCD8<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>T細胞またはCD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>T細胞の百分率との間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図4C】図4Cは、CSFにおけるHMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルと免疫活性化との相関を示すグラフである。上のパネル:CSF 抗HMGB1抗体とCD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>T細胞またはCD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>T細胞の百分率との間のスピアマン相関である。下のパネル:CSF中のHMGB1とCD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>T細胞の百分率との間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図5】図5は、病期第3期の患者および病期第4期の患者のCSFにおける24種のサイトカインおよびケモカインの数量化を示すグラフである。HD、病期第3期の患者および病期第4期の患者由来のCSFにおいて、24種のサイトカインおよびケモカインのパネルをMAP技術(Luminex)によって数量化した。箱ひげ図は、ケモカインのパネルの平均±SDを示す。IP-10およびMCP-1のみが有意なレベルで検出された。患者とHDとの間で統計比較するためのp値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。

【図6A】図6Aは、CSF中のIP-10レベルおよびMCP-1レベルとCSF中のウイルス量および疾患の進展との相関を示すグラフである。CSF中のIP-10とCSF中のVL、T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>の百分率およびCD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>の百分率との間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図6B】図6Bは、CSF中のIP-10レベルおよびMCP-1レベルとCSF中のウイルス量および疾患の進展との相関を示すグラフである。CSF中のMCP-1と血中のCD4 T細胞の数、CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>T細胞の百分率(B)およびCSF中のIL-10(C)との間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図6C】図6Cは、CSF中のIP-10レベルおよびMCP-1レベルとCSF中のウイルス量および疾患の進展との相関を示すグラフである。CSF中のMCP-1と血中のCD4 T細胞の数、CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>T細胞の百分率(B)およびCSF中のIL-10(C)との間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図7A】図7Aは、病期第3期の患者および病期第4期の患者におけるCSF中のIP-10およびMCP-1と抗HMGB1抗体との相関を示すグラフである。病期第3期の患者または病期第4期の患者およびHDにおける比較的なIP-10濃度(上のパネル)およびMCP1濃度(下のパネル)である。図の下部に平均値が示されている。患者とHDとの間で統計比較するためのp値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。

【図7B】図7Bは、病期第3期の患者および病期第4期の患者におけるCSF中のIP-10およびMCP-1と抗HMGB1抗体との相関を示すグラフである。CSF中の抗HMGB1抗体とCSF中のIP-10またはCSF中MCP1との間のスピアマン相関が示されている。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図8A】図8Aは、病期第2期における血清中抗HMGB1抗体レベルと血漿中のVLとの相関を示すグラフである。病期第1期(n=33、神経学的障害なし)、病期第2期(n=41、穏やかな神経学的障害)、病期第3期(n=17)および病期第4期(n=13)のHIVに感染した患者における比較的な血清中HMGB1濃度(左側のパネル)および抗HMGB1抗体濃度(右側のパネル)である。患者群間で統計比較するためのp値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。

10

20

30

40

50

【図8B】図8Bは、病期第2期における血清中抗HMGB1抗体レベルと血漿中のVLとの相関を示すグラフである。患者を、CSF中のVLに応じて2群に層別化した：検出不可能(すなわち、 $<40\text{cp/ml}$ 、 $n=55$ )および陽性( $\text{VL}<40\text{cp/ml}$ 、 $n=28$ )。抗HMGB1AbおよびCD4 T細胞の数をこれらの2群間で比較し、 $p$ 値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。

【図8C】図8Cは、病期第2期における血清中抗HMGB1抗体レベルと血漿中のVLとの相関を示すグラフである。患者を、VLに応じて、 $x$ 軸に示されている通り層別化した。抗HMGB1抗体濃度およびHMGB1濃度(左上および下のパネル)を、各群について比較した。 $p$ 値が報告されている(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。右上のパネルは、患者105人に対する抗HMGB1抗体と血清中のVLとの間のスピアマン相関を示す。相関係数( $r$ )および $p$ 値が報告されている。

10

【図9】図9Aは、血清中抗HMGB1抗体レベルとIP-10との相関を示すグラフである。患者106人の血清に対する抗HMGB1抗体レベルとIP-10(左側のパネル)またはHMGB1(右側のパネル)との間のスピアマン相関である。相関係数( $r$ )および $p$ 値が報告されている。図9Bは、血清中抗HMGB1抗体レベルとIP-10との相関を示すグラフである。それぞれ患者105人および86人の血清に対する、IP-10とCD4 T細胞の数(左側のパネル)またはT CD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>の百分率(右側のパネル)との間のスピアマン相関である。相関係数( $r$ )および $p$ 値が報告されている。

【図10A】図10Aは、HAARTを用いたVLの抑制は、CSF中の抗HMGB1、HMGB1、IP-10、MCP-1および免疫活性化の低下と関連することを示すグラフである。患者を、HAARTを受けたか、または抗レトロウイルス療法を受けていないかの事実に応じて層別化した。ウイルス量(VL)、HMGB1、抗HMGB1抗体(Ab)の平均レベルを2群間で比較した(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。 $p$ 値が報告されている。

20

【図10B】図10Bは、HAARTを用いたVLの抑制は、CSF中の抗HMGB1、HMGB1、IP-10、MCP-1および免疫活性化の低下と関連することを示すグラフである。患者を、HAARTを受けたか、または抗レトロウイルス療法を受けていないかの事実に応じて層別化した。CD8+CD38+細胞およびCD8+HLA-DR+細胞の百分率を2群間で比較した(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。 $p$ 値が報告されている。

【図10C】図10Cは、HAARTを用いたVLの抑制は、CSF中の抗HMGB1、HMGB1、IP-10、MCP-1および免疫活性化の低下と関連することを示すグラフである。患者を、HAARTを受けたか、または抗レトロウイルス療法を受けていないかの事実に応じて層別化した。IP-10のレベルおよびMCP1のレベルを2群間で比較した(ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。 $p$ 値が報告されている。

30

【図11】図11は、ウイルス量が抑制されている患者由来のCSFにおけるHMGB1、抗HMGB1、IP-10およびMCP1の持続性を示すグラフである。VLが $40\text{cp/ml}$ 未満の患者66人および健康なドナー(HD)10人において、CSF中のHMGB1レベル、抗HMGB1レベル、IP-10レベルおよびMCP1レベルを比較した。中央値(25%~75%パーセンタイル)が示されている。ノンパラメトリックなマンホイットニー検定を用いて統計比較を行った。 $p$ 値が報告されている。

【図12A】図12Aは、VLが抑制されている患者において、神経学的障害が血清中抗HMGB1 Abのレベルの上昇に関連することを示すグラフである。抗HMGB1抗体(Ab)のレベルおよびHMGB1のレベルを、異なる神経性の病期間で比較した。全員が $40\text{cp/ml}$ 未満のVLを示していた。平均値が示されており、ノンパラメトリックなマンホイットニー検定を用いて統計比較を行った。 $p$ 値が報告されている。

40

【図12B】図12Bは、VLが抑制されている患者において、神経学的障害が血清中抗HMGB1 Abのレベルの上昇に関連することを示すグラフである。抗HMGB1抗体(Ab)のレベルおよびHMGB1のレベルを、病期第2期、第3期および第4期の患者( $n=45$ )と病期第1期の患者( $n=21$ )との間で比較した。全員が $40\text{cp/ml}$ 未満のVLを示していた。平均値が示されており、ノンパラメトリックなマンホイットニー検定を用いて統計比較を行った。 $p$ 値が報告されている。

【図12C】図12Cは、VLが抑制されている患者において、神経学的障害が血清中抗HMGB1

50

Abのレベルの上昇に関連することを示すグラフである。示されているパラメータについて、Bと同じ比較(病期第1期対病期第2期、第3期および第4期の患者)を行った。これらのパラメータのいずれについても統計学的差異は見いだされなかった。

【図13A】図13Aは、病期第2期、第3期および第4期の患者における抗HMGB1、MCP1、IP-10および免疫活性化とウイルス量の抑制との間の相関を示す図である。病期第2期、第3期および第4期であり、VLが40cp/ml未満であるHIV+患者45人の血清における、示されているパラメータ間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図13B】図13Bは、病期第2期、第3期および第4期の患者における抗HMGB1、MCP1、IP-10および免疫活性化とウイルス量の抑制との間の相関を示す図である。病期第2期、第3期および第4期であり、VLが40cp/ml未満であるHIV+患者45人の血清における、示されている

10

パラメータ間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図13C】図13Cは、病期第2期、第3期および第4期の患者における抗HMGB1、MCP1、IP-10および免疫活性化とウイルス量の抑制との間の相関を示す図である。病期第2期、第3期および第4期であり、VLが40cp/ml未満であるHIV+患者45人の血清における、示されているパラメータ間のスピアマン相関である。相関係数(r)およびp値が報告されている。

【図14】図14は、試験に含めた患者の臨床的パラメータおよび免疫学的パラメータを示す表である。HIVに感染した対象を、18歳を超える対象の中で、CD4細胞数およびウイルス量にかかわらず無作為に選択した。排除の判断基準は、以前のHANDの診断、能動的な日和見性の感染症、神経学的障害の任意の病歴であった。HANDは、本文に記載の通り定義した。HMGB1、抗HMGB1、IP10およびMCP1は本出願に記載の通り数量化した。P値は、マンホイットニー検定を用いて決定した。P<0.05を有意とみなした。

20

【図15】図15は、HANDがある患者およびHANDがない患者が、匹敵する臨床的パラメータおよびウイルス学的パラメータを示したことを示すグラフである。各患者について、示されたマーカー(含めた際のCD4数、最下点のCD4、血漿中のHIV-RNA、HIV-DNA、活性化マーカー)を記録または数量化した。これらのマーカーを、HANDを伴う患者およびHANDを伴わない患者において比較した。いずれのマーカーについても有意差は検出されなかった(マンホイットニー検定)。

【図16】図16は、ウイルス血症であるまたは非ウイルス血症である、HANDがある患者およびHANDがない患者においてHMGB1レベルと抗HMGB1レベルが有意に異なることを示すグラフである。患者全員について、HMGB1および抗HMGB1の血清レベルを本出願に記載の方法に従って数量化した。それらのレベルを、それらのウイルス量に関係なく、または、ウイルス血症の患者または非ウイルス血症の患者のみを考慮に入れて、HANDがある患者とHANDがない患者との間で比較した。統計分析はマンホイットニー検定を用いて実施した。P<0.05を有意とみなした。

30

【図17】図17は、IP-10の血清レベルが、免疫活性化、MCP1、抗HMGB1および最下点のCD4と相関したことを示すグラフである。血清IP10レベルと、示されている免疫パラメータとの間の相関が示されている。スピアマン相関検定を使用した。P<0.05を有意とみなした。

【図18】図18は、MCP-1の血清レベルが、免疫活性化、IP-10、HMGB1および最下点のCD4と相関したことを示すグラフである。血清MCP1レベルと、示されている免疫パラメータとの間の相関が示されている。スピアマン相関検定を使用した。P<0.05を有意とみなした。

40

【図19】図19Aは、HANDを伴う患者における基底核の体積変化および代謝変化との相関を示すグラフである。基底核(BG)の体積変化およびCho/NAA比を本明細書に記載の通りMRIによって測定した。HANDを伴う患者はより大きな被殻を有した(ヤコビアン値が1未満)。

図19Bは、HANDを伴う患者における基底核の体積変化および代謝変化との相関を示すグラフである。基底核(BG)の体積変化およびCho/NAA比を本明細書に記載の通りMRIによって測定した。HANDを伴う患者は、BGのMRI分光分析においてより高いCho/NAA比を有した。図19Cは、HANDを伴う患者における基底核の体積変化および代謝変化との相関を示すグラフである。基底核(BG)の体積変化およびCho/NAA比を本明細書に記載の通りMRIによって測定した。被殻の体積がより大きいことは、Cho/NAA値がより高いことと相関した(p=0.02)。

50

【図20】図20は、神経性の機能障害(Cho/NAA比)が抗HMGB1AbレベルおよびIP10レベルと相関することを示すグラフである。免疫活性化(CD8+CD38+HLA-DR+T細胞の百分率)の増加、ならびに抗HMGB1AbのレベルおよびIP10のレベルの上昇は、Cho/NAA値の増加と相関する。統計分析はマンホイットニー検定を用いて実施した。P<0.05を有意とみなした。

【発明を実施するための形態】

【0097】

実施例

I. 試料(血清および/またはヒト脳脊髄液)中のHMGB1タンパク質および抗HMGB1抗体の検出

HIV感染患者由来の試料中のHMGB1タンパク質(すなわち、残留している循環HMGB1タンパク質)の濃度を、ELISAキットShino Test (IBL)に従って定量した。

【0098】

さらに、HMGB1に特異的な総抗HMGB1抗体を検出するための特異的なElisaアッセイを開発した。以下の試薬を使用した:

- ヒトHMGB1の残基150~C末端に由来するKLHとコンジュゲートした合成ペプチドを対象とする、ヒトHMGB1に対するウサギ一次ポリクローナル抗体(Adcam ab18256)。

- E.Coliにおいて、ヒトおよびマウスにおいて完全に同一である哺乳動物の配列をコードする発現プラスミドから作製したHMGB1(HMGBiotech HM-051)由来の組換えBOXB。

- 対照ウサギ血清(Sigma ;Ref:R9133)

- アルカリホスファターゼ(PAL)とコンジュゲートした抗ウサギIgGまたはIgM、基質のp-ニトロフェニルリン酸錠(pNPP)

- 校正物質: 血清由来のヒトIgG(Sigma;ref 12511)および血清由来のヒトIgM(Sigma;ref 18260)

- ヤギにおいて作製した抗ヒトIgG(Fc特異的)-アルカリホスファターゼ抗体(Sigma;Ref A9544)、ヤギにおいて作製した抗ヒトIgM( $\mu$ 鎖特異的)-アルカリホスファターゼ抗体(Sigma ;ref A3437)

【0099】

HMGB1に特異的な総抗HMGB1抗体を定量するためのElisaアッセイを以下の通り行った:

96ウェルプレートのコーティングを、DPBS中0.5  $\mu$ g/mlのBOXBを用いて4  $^{\circ}$ Cで一晩実施した。同時に、校正物質のコーティングを、対応するアイソタイプのDPBS中段階希釈を用いて実施した(ヒト試料を用いて行うELISAアッセイのみ)。プレートを、マイクロプレートウォッシャー(Antis ;Oasys)を使用して、DPBS/0.05%(v/v)Tween(登録商標)20を用いて4回洗浄した。ELISAアッセイの各ステップの後に同様の洗浄を実施した。結合していない部位を、PBS/2%(w/v)BSAを用いて4  $^{\circ}$ Cで2時間ブロックした。DPBS/0.05%(v/v)Tween(登録商標)/1%(W/V)BSA中に希釈した試料の一定分量100  $\mu$ lをコーティングしたウェルおよびコーティングしていないウェルに加え、37  $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。試験している全ての試料を、水浴中25  $^{\circ}$ Cで30分、1.5Mのグリシン(v/v、pH1.85)で処理し、さらに氷上で保ち、1.5Mのトリス、v/v、pH9.0で希釈した。次いで、試料を直ちに希釈し(1/10~1/1000まで)、コーティングしたプレート上に分配した。アルカリホスファターゼとコンジュゲートした抗ウサギIgG抗体(比率1/10000)、またはヤギ抗ヒトIgG(比率1/2000)、またはDPBS/0.05%(v/v)Tween(登録商標)/1%(W/V)BSA中に希釈した、アルカリホスファターゼとコンジュゲートしたIgM抗体(比率1/2000)を、37  $^{\circ}$ Cで1時間にわたって加えた。37  $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした後に、100  $\mu$ lのpNPP基質を用いて抗原特異的な抗体の検出を実施し、100  $\mu$ lのNaOH 3Mを加えることによって反応を停止させた。BOXBに特異的な抗体の濃度を、標準の免疫グロブリン溶液の吸光度から得た検量線に従って、Ascentソフトウェア、ThermoElectrocorpによって、Elisaに特異的なShigella LPS(Launayら Vaccine 2009, 27:1184~1191頁)において本発明者らが以前報告した通り、算出した。データは、検出された抗体のng/mlで表されている。

【0100】

II. HIV感染患者由来のCSFにおけるHMGB1および特異的な抗HMGB1抗体、ならびにケモカ

インのサインの分析。

HIV感染患者

HMGB1、および抗HMGB1抗体に関してCSF中の含有量について分析する患者群は、AIDS関連神経学的障害に応じて分類された(上で説明した通り)慢性HIV感染患者105人のコホートの一部である。群1は、神経学的障害を伴わないHIV-1感染患者を含み、一方、群2、3および4は、認知神経科学的障害が増加している患者を含む。

【0101】

IIa. HMGB1および特異的な抗HMGB1抗体とウイルス量、疾患の進展およびケモカインサインの相関

HIVに感染した(HIV<sup>+</sup>)患者由来のCSF試料におけるHMGB1および抗HMGB1Abのレベルの、健康なドナーと比較した上昇

10

HMGB1を検出するためのShinotest ELISA(IBL)アッセイ(検出限界0.25ng/ml)および抗HMGB1抗体を検出するための本発明者らの自家製のELISAアッセイ(検出限界90ng/ml)を使用し、HIV感染患者(P)由来のCSFにおいて、健康なドナー(HD)と比較してHMGB1のレベルの上昇(図1A)および抗HMGB1抗体のレベルの上昇(図1B)の両方が見いだされた。患者のCSFにおけるHMGB1のレベルの上昇は、HDと統計学的に異ならなかった(図1A)が、抗HMGB1抗体のレベルは、HDと比較して有意に増加した(図1B)。それらの神経性の病期に応じて患者を層別化したことにより、病期第3期の患者および病期第4期の患者について、CSFにおいてHMGB1および抗HMGB1抗体の両方のレベルの上昇が観察されたことが示された。抗HMGB1抗体レベルのみがHDのレベルと統計学的に異なった(図1)。

20

【0102】

CSF試料由来のHMGB1および抗HMGB1抗体はウイルス量と相関する

HIV-1は、おそらく、CSFにおけるHMGB1および抗HMGB1抗体の産生を刺激する。これは、両方の分子のレベルが、ウイルス量(VL)が制御されていない患者において、VLが検出不可能な患者(<40cp/ml CSF)と比較して高いことによって示唆される(図2A)。さらに、HMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルは、CSF中のHIV-1VLと正に相関することが見いだされた(図2B)。推論として(CSF中のVLが血漿中のVLと強力に相関したことを考えると、図2C)、CSF中のHMGB1レベルは血漿中のVLと正に相関した(図2C)。

【0103】

CSF中の抗HMGB1レベルは疾患の進展と相関する

30

HIV感染の特徴は、血液中のCD4 T細胞が次第に消失することであり、および末梢のCD4 T細胞の数は、HIV疾患の進行のマーカーである。図3A(右側のパネル)は、CSF中の抗HMGB1抗体のレベルはCD4 T細胞の数が減少すると上昇し、CD4 T細胞の数が少ない(<300)患者において、CD4 T細胞の数が多(>600)患者よりも有意に高いことを示している。さらに、CSF中の抗HMGB1抗体のレベルは、抗HMGB1抗体がCD4 T細胞の数と負に相関する(図3B、右側のパネル)ので、疾患の進展の相関現象であると考えられる。CSF中のHMGB1レベルに関しては、それらはCD4 T細胞の数によって変動しない(図3A、3B、左側のパネル)。HMGB1を数量化するために使用するアッセイ(Shinotest、IBL)では、残留している遊離のHMGB1(すなわち、抗体と複合体を形成していないHMGB1)のみが検出されるが、本発明者らの研究室において開発された、抗HMGB1抗体を数量化するためのアッセイでは、HMGB1と複合体を形成する抗体を含めた総抗体が検出されることには注目すべきである。したがって、抗HMGB1抗体のレベル(HMGB1よりも1000倍多い)は、残留HMGB1よりも正確な疾患の進展の測定値を表す。

40

【0104】

CSF中のHMGB1レベルおよび抗HMGB1抗体レベルは、持続性の免疫活性化と関連する

いくつもの試験により、慢性HIV感染症により、疾患の進行の強力なマーカーである免疫活性化の状況が誘導されることが実証された(Giorgi JVら Shorter survival in advanced HIV-1infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. J Infect Dis 1999年)。免疫活性化は、血液中のCD8 T細胞、特に、その組み合わせがAIDSへの進行の危険性

50

と関連するCD38およびHLA-DRにおける活性化マーカーの発現によって分析することができる(Liu Zら Elevated CD38 antigen expression on CD8<sup>+</sup> T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the MACS Study than CD4<sup>+</sup> cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;16:83~92頁)。図4Aは、CD8+CD38<sup>+</sup>T細胞の百分率が、CD4 T細胞の数が少ない患者(CD4 <300/μL)において、CD4 T細胞の数が多き患者(>600/μL)と比較して有意に上昇することを示し、また、T細胞の活性化の状況(すなわち、CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T細胞の百分率)はCSF中のウイルス量と血漿ウイルス量の両方と正に相関する(図4B)。その意味で、HMGB1および抗HMGB1抗体の発現は、T細胞の活性化の状況と正に相関することには注目すべきである(図4C)。

10

## 【0105】

したがって、神経学的障害を伴う患者のCSFにおいてHMGB1および抗HMGB1が検出されることは、HIVによって刺激される持続性の免疫活性化の結果である。

## 【0106】

CSF試料におけるHMGB1および抗HMGB1抗体のレベルの上昇は、炎症性ケモカインIP-10およびMCP-1のレベルの上昇と関連する。

HD由来のCSFおよび病期第3期または病期第4期の神経学的障害を伴うHIV<sup>+</sup>患者由来のCSFを、24種のサイトカイン/ケモカインを同時検出するためにMAP(MultiAnalyte Profiling)技術を用いて試験した。図5は、HD由来のCSFおよびHIV<sup>+</sup>患者由来のCSFにおけるケモカインプロファイルの比較を示している。HD由来のCSFでは、2種のケモカイン、IP-10およびMCP-1が検出されたことによってサイトカイン/ケモカインサインが特徴付けられた。HIV<sup>+</sup>患者由来のCSFにおいても、これらの2種のケモカインが検出されたが、レベルがより高かった。患者のCSFにおけるIP-10の濃度の上昇は、CSF中のVLと相関し(以前の報告と一致した(Paola Cinqueaら Cerebrospinal fluid interferon- $\gamma$ -inducible protein 10(IP-10, CXCL10) in HIV-1 infection. *J Neuroimmunology* 2005年)、また、CD8 T細胞の活性化の状況と相関した(図6A)。同様に、MCP-1の濃度の上昇は、T細胞の活性化の状況と相関し、MCP-1レベルは、CSF中のMCP1濃度とCD4 T細胞数との間の逆相関によって示されている通り、疾患の進展の相関現象であると思われる(図6B)。図6Cは、IP-10およびMCP-1のレベルが、患者のCSFにおいて正に相関することを示している。

20

30

## 【0107】

神経学的障害を伴う患者由来のCSFにおいて検出された介在物質の本質を特徴付けるために、IP-10レベルおよびMCP-1レベルを、HDと病期第3期の患者および病期第4期の患者との間で比較した。図7Aは、病期第3期にはIP-10およびMCP-1の両方の有意な増加が伴うことを示している。興味深いことに、CSF中のIP-10濃度およびMCP-1濃度は、抗HMGB1抗体のレベルと正に関連した(図7B)。

## 【0108】

11b. 神経学的障害を伴うHIV<sup>+</sup>患者由来の血清中のHMGB1、抗HMGB1抗体およびケモカインのサイン

血清中の抗HMGB1抗体レベルは、病期第2期から上昇し、HIVウイルス量によって刺激される

40

図8Aは、病期第2期から、患者において血清中抗HMGB1抗体レベルの有意な上昇が示されたが、一方HMGB1レベルはあまり識別できなかったことを示している。異なる群間でVLに有意差はなかった(示されていない)。血清中のウイルス量に基づいて患者を層別化(検出不可能<40cp/ml対陽性>40cp/ml)したことにより、ウイルス量が検出可能な患者において抗HMGB1抗体が有意に増加したことが明らかになった(図8B)。予測通り、検出可能なVLは、CD4 T細胞の数の減少と関連した(図8B)。血清中のVLをより微細に層別化することにより、抗HMGB1抗体が1000cp/mlより高いVLから有意に上昇し、また、HMGB1AbレベルがVLと正に相関したことが示された(図8C)。CSFにおいて観察された通り、HMGB1レベルはあまり識別できなかった。

50

## 【 0 1 0 9 】

血清中抗HMGB1Abレベルは、IP-10濃度と相関する

患者のCSFにおいて観察された通り、抗HMGB1抗体とIP-10レベルとの間に正の相関が見いだされた(図9A)。IP-10は、CD4の喪失に伴って増加し、T細胞における活性化マーカーの発現によって評価された通り、その産生は免疫系の持続性の活性化と関連したので、疾患の進展の相関現象であることが見いだされた(図9B)。興味深いことに、HMGB1および抗HMGB1抗体のレベルは、逆相関し(図9A)、これは、抗HMGB1抗体の産生がHMGB1の産生によって刺激されること、および抗HMGB1抗体が中和活性を有することを示している。

## 【 0 1 1 0 】

11c. ウイルス量が抑制されている患者における神経学的障害は、CSFおよび血清における抗HMGB1およびケモカインIP-10およびケモカインMCP-1の持続性に関連する

HAARTを用いたウイルス量(VL)の抑制には、CSF中の抗HMGB1、HMGB1、IP-10、MCP-1および免疫活性化の低下が伴う。

好結果の抗レトロウイルス療法は、神経学的障害を伴う患者の大部分においてCSF中のウイルス量の抑制を伴う(図10A)。同時に、CSF中のHMGB1のレベル、抗HMGB1のレベル(図10A)、IP-10のレベルおよびMCP1のレベル(図10C)が低下し、同様にCD8 T細胞におけるCD38およびHLA-DRの発現も低下する(図10B)。

## 【 0 1 1 1 】

ウイルス量が抑制されている患者由来のCSFにおけるHMGB1、抗HMGB1、IP-10およびMCP1の、健康なドナーと比較した持続性。

VLが40cp/ml未満であるHIV+患者由来のCSFにおけるサイトカイン/ケモカインレベルと、健康なドナー由来のCSFにおけるサイトカイン/ケモカインレベルを比較することにより、HMGB1、抗HMGB1、IP-10およびMCP-1の持続性が明らかになった(図11)。したがって、これらのデータは、VLが抑制されているにもかかわらず持続する神経学的障害は、CSFにおける抗HMGB1、IP-10およびMCP1分子のレベルの上昇を伴うことを示している。

## 【 0 1 1 2 】

血清中抗HMGB1Abにより、ウイルス複製が抑制されているにもかかわらず、病期第2期～第4期の患者が病期第1期の患者と区別される。

抗HMGB1Abは、病期第2期～第4期のHIV+患者において、病期第1期のHIV+患者(神経性のトラブルがない)と比較してさらに有意に増加することが見いだされたが、これらの患者は全員、検出不可能なレベルのVL(<40cp/ml)を示した(図12A)。図12Bおよび12Cは、HMGB1、IP-10またはMCP-1レベルも、nCD4 T細胞、nCD8 T細胞、最下点のCD4、活性化されたCD4 T細胞およびCD8 T細胞の百分率も、病期第2期、第3期および第4期の患者と病期第1期の患者とで異なることが見いだされたことを示している。したがって、抗HMGB1レベルは、病期第2期、第3期および第4期の患者を病期第1期の患者と区別する唯一の因子を示す。

## 【 0 1 1 3 】

病期第2期、第3期および第4期の患者における抗HMGB1、MCP1、IP-10および免疫活性化とウイルス量の抑制との間の相関

ウイルス量が制御されているにもかかわらず抗HMGB1レベルが持続する理由を理解するために、臨床的な進展に関連する種々のパラメータ間のスピアマン相関を分析した。図13Aは、抗HMGB1レベルが、CD4 T細胞およびCD8 T細胞におけるHLA-DRおよびCD38の発現によって測定された(図13B)、それら自体が免疫活性化の状況に関連するIP-10レベルおよびMCP-1レベルと正に相関することを示している。コホート全体においてすでに観察された通り(上記)、免疫活性化の状況は、CD4 T細胞の数によって測定される疾患の進展の相関現象である(図13C)。全体的に、これらのデータは、持続性の免疫活性化が、ウイルス量が抑制されている病期第2期、第3期および第4期の患者において検出され、抗HMGB1Abの産生を刺激することを示している。患者のコホート全体(ウイルス量が変動する病期第1期～第4期)(図9A)およびウイルス量が抑制されている病期第2期、第3期および第4期の患者の両方において見いだされる血清中の抗HMGB1およびHMGB1の間の負の相関(図13A)により、抗

10

20

30

40

50

体の *in vivo* 中和活性が示されている。

【0114】

患者のコホートを特徴付ける免疫学的パラメータの試験を2つの目的で追求した:

- (1) 病期分類第3期および第4期のCSFにおいて報告された分子サインが、患者の血清においても見いだされるかどうか、およびHAND/HANDなし分類を伴うかどうかの両方を決定するために、分析をコホート全体(n=106の患者)の血清に拡張すること;および
- (2) 基底核の体積変化、およびCNSの変化に関連づけられる代謝変化を同定する磁気共鳴画像法(MRI)の測定値がこの分子サインと相関するかどうかを評価すること。

【0115】

III. 循環HMGB1タンパク質のレベルおよび総抗HMGB1抗体のレベルは、HAND患者とHANDなし患者を区別する唯一のパラメータである。

HANDを定義するために、Antinoriらによって提案された判断基準(Neurology, 2007年10月30日;69(18):1789~99頁)を使用した。上記の病期分類第1期~第4期との対応を以下と考える:HANDなし(病期第1期および2);HAND(病期第3期および第4期)。

【0116】

図14は、試験した患者のコホートを特徴付ける臨床的パラメータおよび免疫学的パラメータを示している。これらの患者の大多数(81%)は、強力な抗レトロウイルス療法を受け、67%においてウイルス量が抑制された。CD4数によって測定された免疫不全は中程度であり、最下点のCD4数(すなわち、感染の始めから到達した最低のCD4値)は低くなかった。AIDSの病期にある無処置の患者において、CD8<sup>+</sup>T細胞の60~100%が活性化マーカーであるCD38およびHLA-DRを同時発現することを考えると、免疫活性化の程度は中程度であった。

【0117】

これらの患者の3分の1は、HANDを有し(詳細な情報については以下を参照されたい)、HANDなし群と比較すると、ウイルス量、CD4数および最下点のCD4数、ウイルス血症の患者の割合および免疫活性化のレベルに関して差異は示されなかった。

【0118】

著しく、これらの2つの群間で、HMGB1および抗HMGB1抗体についてのみ有意差が検出された(それぞれ、 $p=0.006$ 、および $p=0.05$ 、ノンパラメトリックなマンホイットニー検定)。IP-10およびMCP-1の血清レベルは、HANDがある患者とHANDがない患者との間で識別することができなかった(図14)。HANDがある患者およびHANDがない患者における免疫学的パラメータおよびウイルス学的パラメータの類似性は、図15にヒストグラムとして示されている。

【0119】

上記の通り、HMGB1および抗HMGB1は、2つの患者群を識別するただ2つのパラメータであった(図16)。この識別は、非ウイルス血症の患者(VL<40コピー/ml)においても観察されたので、RNAウイルス量とは無関係であった。

【0120】

IP-10ケモカインおよびMCP1ケモカインのレベルは、HANDがある患者とHANDがない患者との間で統計的に異ならず(図14)、感染の間のそれらの産生は持続性の免疫活性化、抗HMGB1およびMCP-1のレベルならびに疾患の進展と正に相関することが見いだされ、これは、慢性炎症がケモカインの放出の要因となったことを示している(図17および18)。これらの発見により、HIV感染患者のCSFに関して以前報告された結論が確認される(例IIAおよび図5、6および7)。

【0121】

IV. HANDを伴うHIV感染患者の基底核の体積変化および代謝変化と相関する免疫学的サイン

各患者に、広範な認知領域を探索する神経学的検査を実施した。NP検査の結果に応じて、患者を、HANDを伴う群またはHANDを伴わない群の2群に分割した(上記、Antinoriらを参照されたい)。一部の患者に対してMRI分析を実施した。平均の3D画像を創出し、さらにデジタルの脳地図(Montreal Neurological Institute)と融合し、そこで左側と右側の基底

10

20

30

40

50

核(BG)を同定した。これにより、各画像について、ヤコビアン値によって測定される体積および拡張または縮小の量を算出することが可能になった。1未満の値は、鋳型に対して対象画像が拡張していることを示し、一方、1を超える値は体積の低下を示す。BGにおける代謝変化を算出した。コリン/N-アセチルアスパラギン酸(Cho/NAA)は神経細胞の炎症マーカーであり、これを文献において以前に記載されている通り決定した(Ratai EMら *PLoS One*.2010年5月7日;5(5):e10523;Yiannoutsos CTら *Neuroimage*.2008年3月1日;40(1):248~55頁 Paul RHら *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*.2007年夏;19(3):283~92頁 Greco JBら *Magn Reson Med*.2004年6月;51(6):1108~14頁 Meyerhoff DJら *AJNR Am J Neuroradiol*. 1996年5月;17(5):973~8頁)。認知障害のあるHIV感染患者のBGにおいて、Cho/NAA比は一般に増加する。

10

## 【0122】

図19Aは、HANDを伴う患者がより大きな被殻を有した(ヤコビアン値が1未満;p=0.008)ことを示している。HANDを伴う患者は、BGのMRI分光分析においてより高いCho/NAA比を有した(図19B)。図19Cに体積測定パラメータと代謝的なパラメータとの間の関係が示されている:被殻の体積がより大きいことは、0.575(p=0.02)を超えるCho/NAA値と相関した。

## 【0123】

神経学的パラメータと免疫学的パラメータとの間の可能性のある関係を調査するために、患者をCho/NAA比に応じて層別化し、免疫マーカーを比較した。図20は、免疫活性化(CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>T細胞の百分率)の上昇および高レベルの抗HMGB1およびIP10が、Cho/NAA値の上昇と相関することを示している。

20

## 【0124】

## 結論

その一部がAIDS関連神経学的障害に罹患しているHIV感染患者由来の血清およびCSFにおいて検出された可溶性の介在物質のこの詳細な分析により、CSFにおいて、ケモカインIP-10の高発現に伴う重要なレベルの抗HMGB1抗体(放出されたHMGB1に対する反応)を特徴とする炎症プロファイルが示された。ケモカインは、多発性硬化症(MS)などの神経学的障害の免疫病原性に関係づけられており、特に、IP-10は、MS患者由来のCSFにおいて、炎症が顕著な場合に増加することが報告された(Scarpini Eら *J Neurological Sciences* 195:41頁 2002)。HIV感染患者において、試験により、一次HIV感染および無症候性HIV感染およびAIDS認知症候群を伴う対象において、IP-10レベルが上昇し、CSF中のウイルス量と正に相関したことが報告された(Paola Cinqueaら *Cerebrospinal fluid interferon- $\gamma$ -inducible protein 10(IP-10, CXCL10)in HIV-1 infection*. *J Neuroimmunology* 2005)。IP-10は、強力な化学誘引物質であり、レトロウイルスの感染を増強し、ニューロン損傷を媒介することが示唆されている。MCP1の炎症促進性およびそのHIV-1複製を上方制御する能力も、認知症の危険性が上昇する一因になることが示された。MCP-1により、感染した単球および/または活性化された単球が脳内に移動し、そこでHIV-1複製の宿主細胞になり、マクロファージ、小膠細胞および星状膠細胞によって活性化されることによっていくつもの強力な神経毒を放出することが容易になり得る(Dhillonら *Roles of MCP-1in development of HIV-dementia*. *Front Biosci*. 2008, 13:3913~3918頁)。本発明者らの知見により、病期第2期~第4期のHIV感染患者由来のCSFにおいて、アラミン(alarmin)HMGB1、および最も重要なことに、このアラミンに特異的な抗体が検出されること(IP-10およびMCP-1に加えて)、およびそれらがウイルス複製と疾患の進展の相関現象を示すことを実証する新しい発見がもたらされる。さらに、ウイルス複製が抑制されている患者における抗HMGB1抗体の持続性は、病期第2期~第4期の決定因子である。

30

40

## 【0125】

HANDなし/HANDコホートに対する結果により、HANDはMRIを用いて(より大きな被殻、Cho/NAAの上昇)および/または、末梢性のT細胞における活性化マーカー(CD38およびHLA-DRの発現)を含めた免疫マーカーおよび/または炎症性介在物質によって明らかにすることができる炎症性のパターンを伴うことが示されている。この試験は、総血清抗HMGB1抗体およびIP-10レベルが、HANDを伴う患者におけるBGの変化と相関することを初めて示し、HAND

50

を発症している患者の血液中のこれらの2つの分子を測定することの重要性が確認されている。重要なことに、これらの知見は、初めて、HANDに関連するMRIおよび分光法のパラメータ、例えば、より大きな被殻およびCho/NAAレベルの上昇などと、免疫学的パラメータ(抗HMGB1抗体およびIP10)および免疫活性化/炎症マーカーを関連づける。

【0126】

これらの結果は、HMGB1/抗HMGB1抗体、IP-10、MCP-1の組み合わせが、CNSにおける局所的な感染に対する反応および寄与する決定因子の両方であることを示唆している。本出願は、分子サインである抗HMGB1抗体およびIP-10および/またはMCP-1が、HMGB1が関与することが示されている、神経学的障害を伴う、または伴わない疾患、例えば、AIDSなどの診断および予後判定において有用であり得ることを示している。

10

【0127】

改変および他の実施形態

開示されている生成物、組成物および方法の種々の改変および変形ならびに本発明の概念は、本発明の範囲および主旨から逸脱することなく当業者に明らかになるであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関連して記載されているが、特許請求された本発明は、そのような特定の実施形態に限定されるものではないことが理解されるべきである。医学分野、免疫学分野、生物学分野、化学分野または薬理学分野、または関連分野の当業者にとって明白な本発明を実行するための記載の方式の種々の改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内にあるものとする。

【0128】

参照による組み込み

本開示において引用または参照された文書、特許、特許出願または特許公報のそれぞれは、特に、本文における参考文献の引用の周辺の特定の主題に関してその全体が参照によって組み込まれる。しかし、そのような参考文献が背景技術を構成することは容認されおらず、引用された文書の正確さおよび妥当性に異議を申し立てる権利が留保されている。

20

【 図 1 】

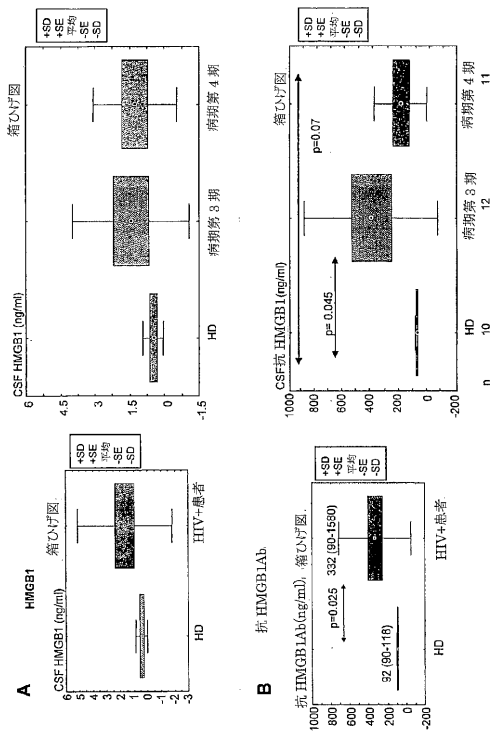


Fig. 1

【 図 2 】

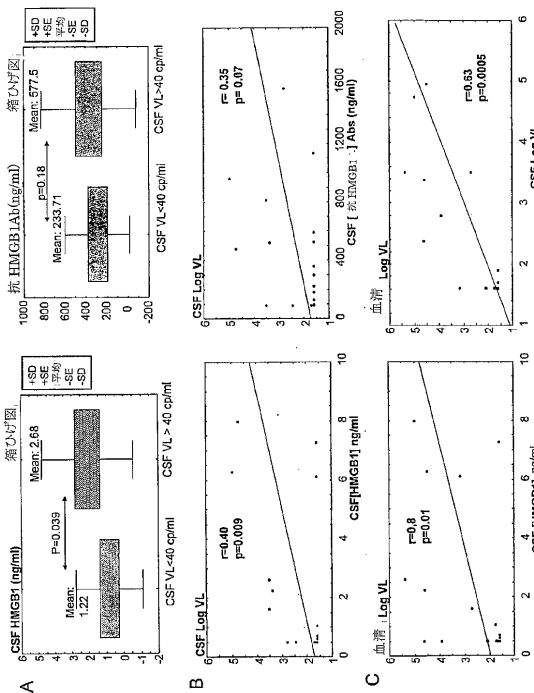


Fig. 2

【 図 3 】

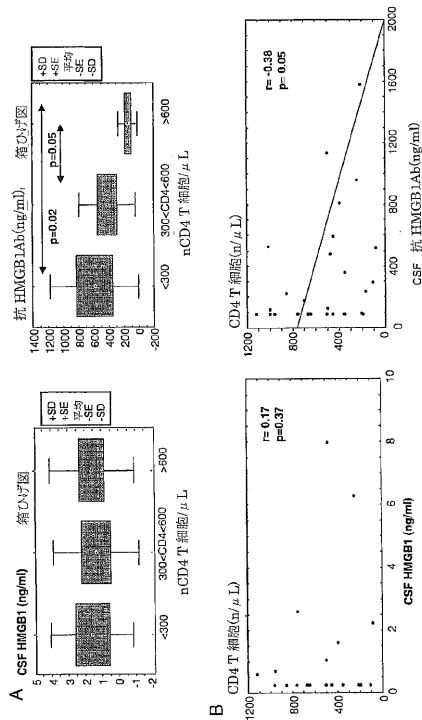
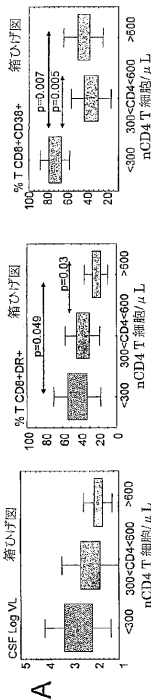
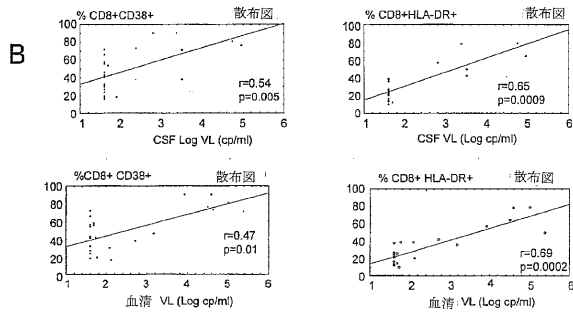


Fig. 3

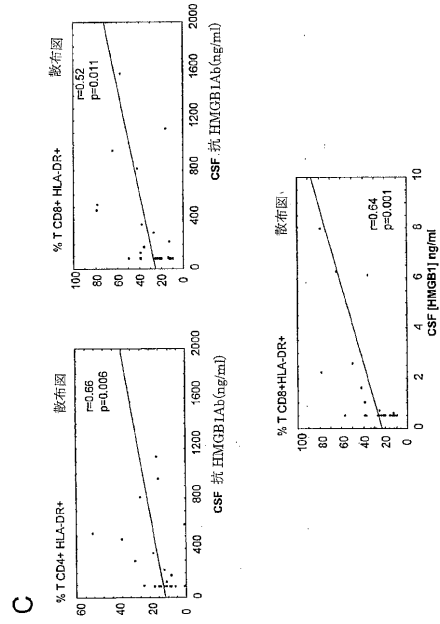
【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【 図 4 C 】



【 図 5 】

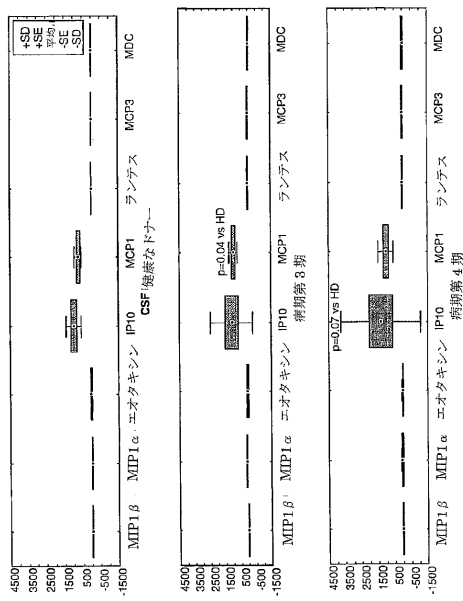


Fig. 5

【 図 6 A 】

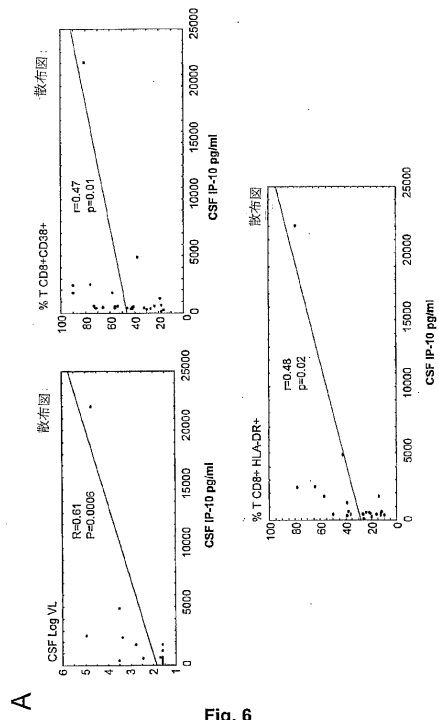
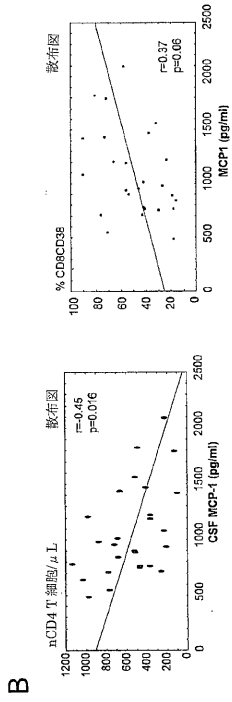
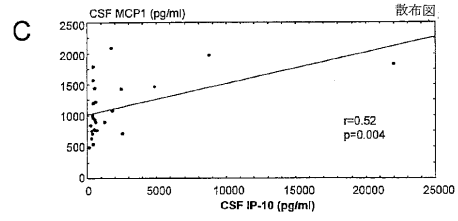


Fig. 6

【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 7 A 】

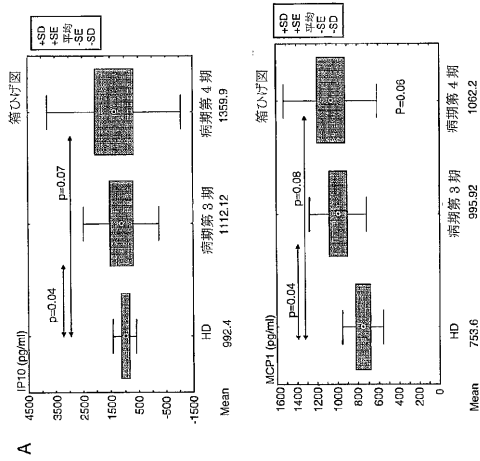


Fig. 7

【 図 7 B 】

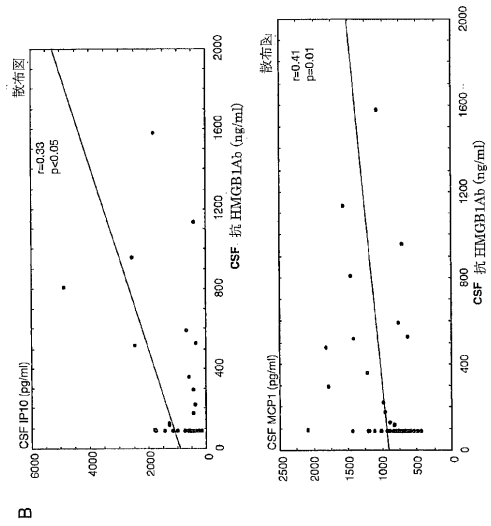
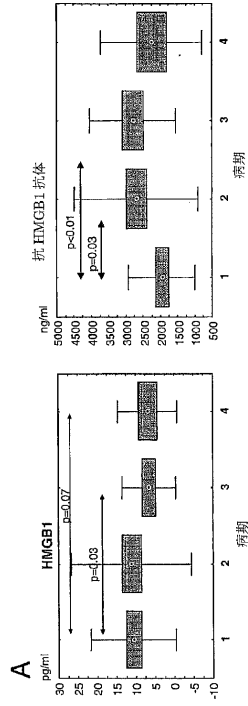
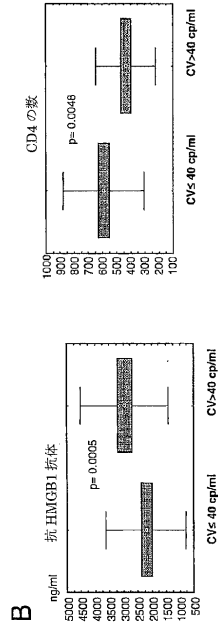


Fig. 7

【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



【 図 8 C 】

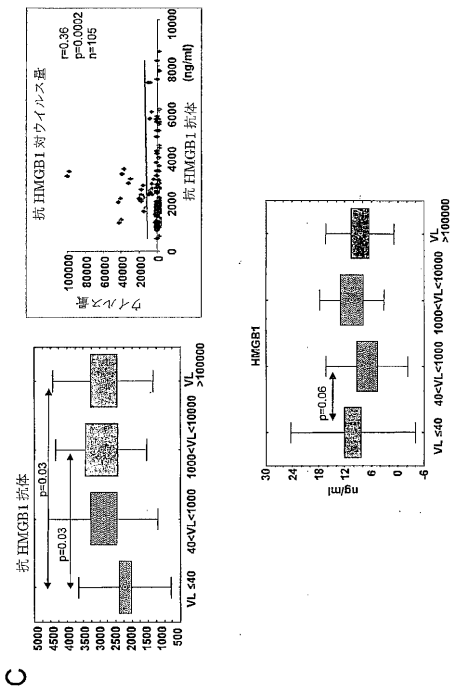


Fig. 8

【 図 9 】

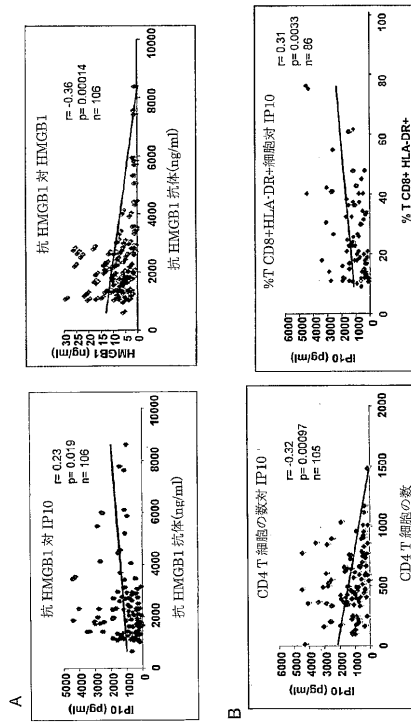
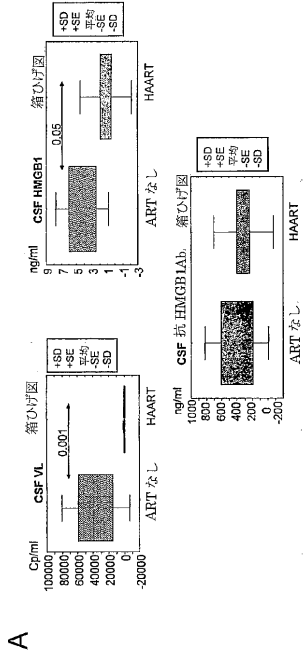
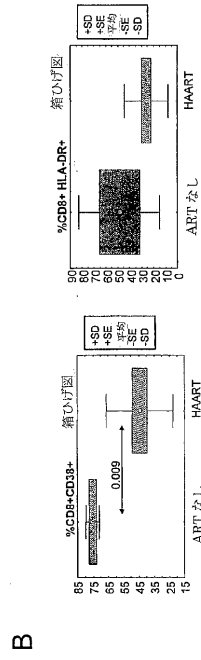


Fig. 9

【 図 1 0 A 】



【 図 1 0 B 】



【 図 1 0 C 】

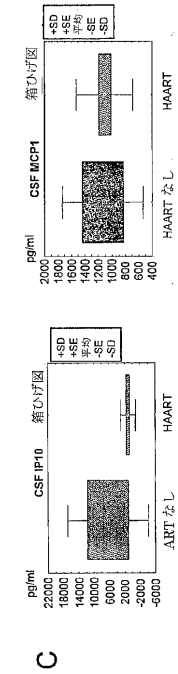


Fig. 10

【 図 1 1 】

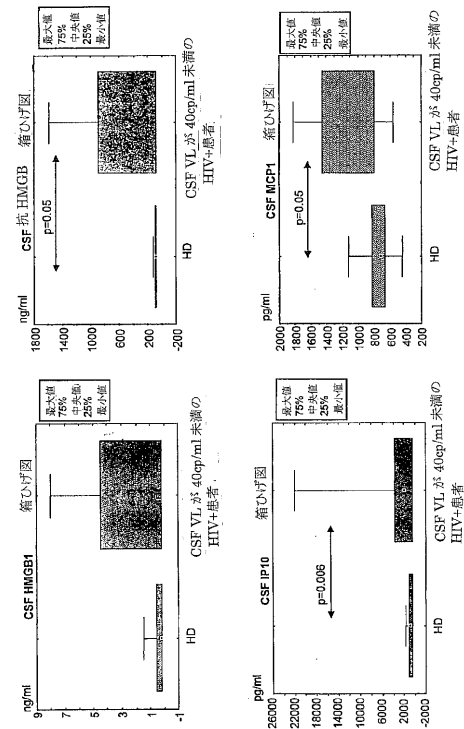
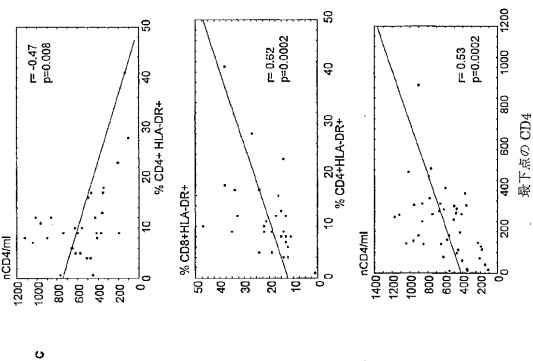


Fig. 11



【 図 1 3 C 】



【 図 1 4 】

	患者数	全患者 中央値(Q3)	HANDなし 中央値(Q3)	HANDあり 中央値(Q3)	1 例 HANDあり
含めた際の HIV RNA (log10コピー/ml)	103	1.6 (1.5-2.41)	1.6 (1.5-2.62)	1.6 (1.5-2.08)	NS
CD4 数(細胞数/mm <sup>3</sup> )		495 (557-741)	480 (372-729)	499 (351-754)	NS
最下点の CD4 数(細胞数/mm <sup>3</sup> )		216 (75-350)	216 (76-372)	207 (98-340)	NS
抗レトロウイルス薬法を受けている(%)		66 (61%)	59 (81%)	24 (80%)	NS
ウイルス血症(%)		34 (33%)	23 (31%)	11 (36%)	NS
% T CD8+HLA-DR*		13.4 (7.1-25.2)	13.6 (7-25.6)	13.4 (7.7-24.3)	NS
% T CD4+CD38+HLA-DR*		4.2 (2.8-8.4)	3.75 (2.7-8.4)	4.9 (3.2-7.7)	NS
総抗 HMGB1 (ng/ml)		6.29 (3.4-10.6)	7.4 (5.2-11.6)	3 (1.6-10)	0.006
総抗 MCP1 (pg/ml)		1186 (646-1855)	1166 (608-1696)	1285 (1047-2184)	0.05
IP10 (pg/ml)		953 (405-1533)	969 (375-1666)	832 (534-1359)	NS
MCP1 (pg/ml)		267 (195-400)	261 (198-374)	292 (179-462)	NS

Fig. 14

【 図 1 5 】

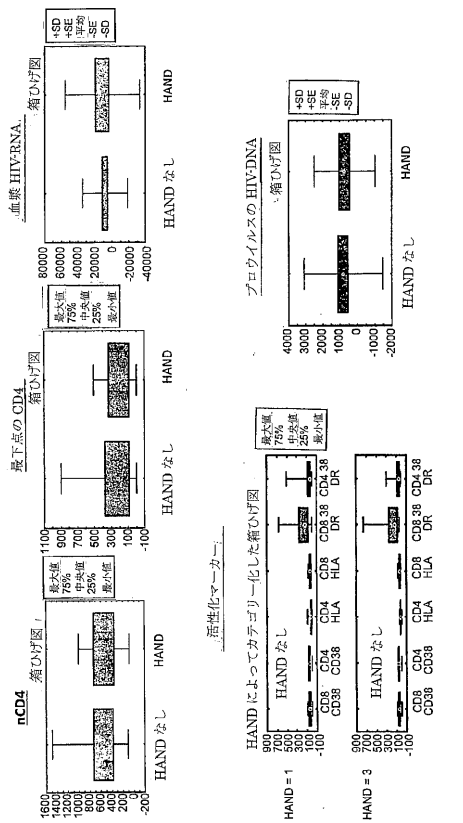


Fig. 15

【 図 1 6 】

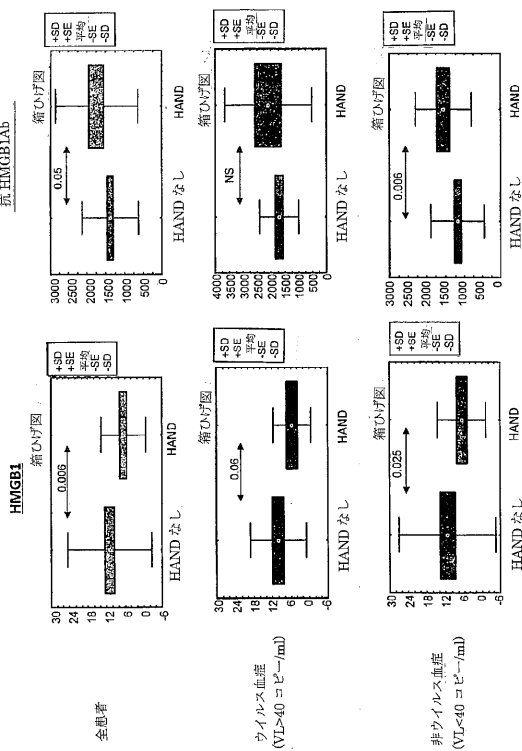


Fig. 16

【 図 17 】

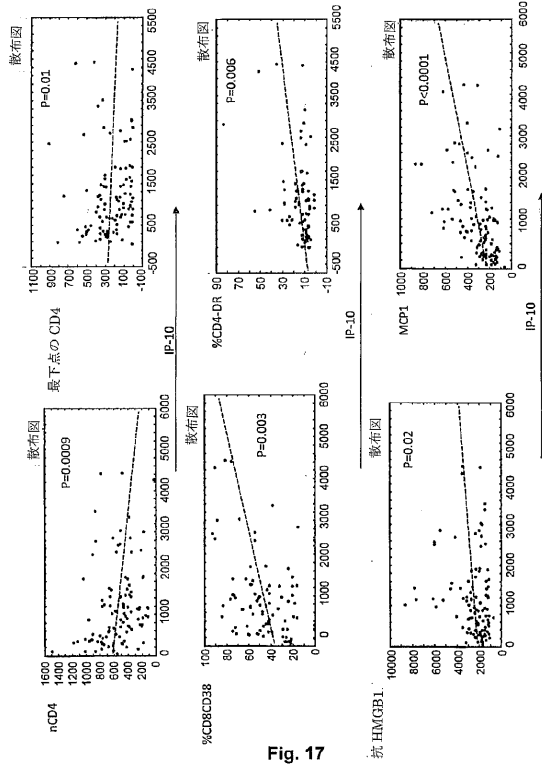


Fig. 17

【 図 18 】

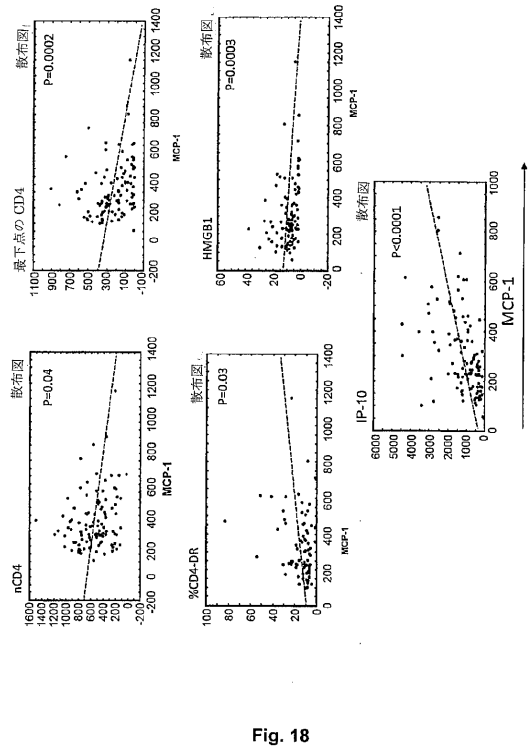


Fig. 18

【 図 19 】

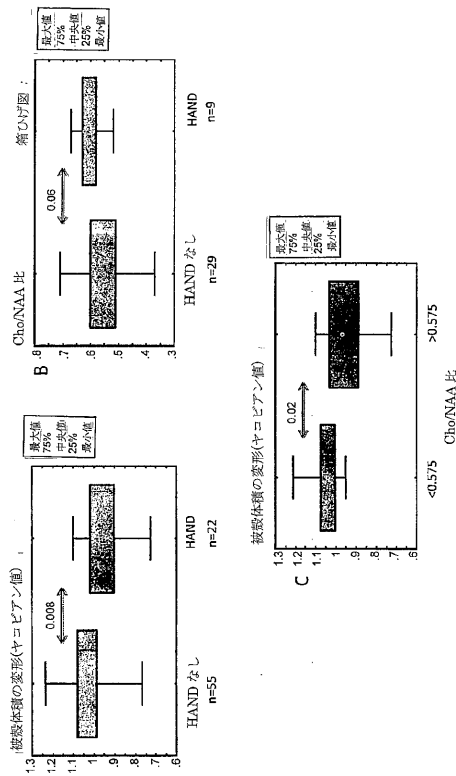


Fig. 19

【 図 20 】

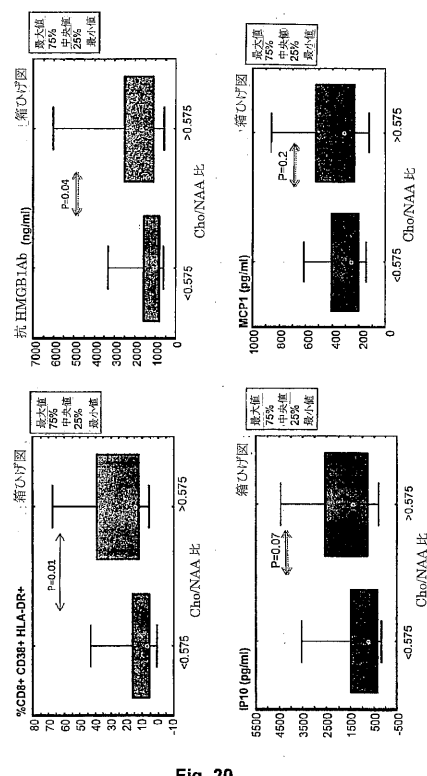


Fig. 20

---

フロントページの続き

- (72)発明者 マリー - リーズ・ゲージョン  
フランス・9 2 1 4 0・クラマル・リュ・ドゥ・フルーリー・4 7
- (72)発明者 ベアトリス・ポワリエ - ボードワン  
フランス・7 8 6 5 0・ベンヌ・プラス・ドゥ・レスタンダール・3
- (72)発明者 ヴァレリー・セファー  
フランス・9 1 8 0 0・ブリュノア・アヴニュ・ガリエニ・4・ビス
- (72)発明者 ヘラ・サイディ  
フランス・7 5 0 1 5・パリ・アヴニュ・デュ・メーヌ・1 4

【外国語明細書】

2014224829000001.pdf

专利名称(译)	hmgb1和抗hmgb1抗体可用于神经系统疾病的预后		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014224829A</a>	公开(公告)日	2014-12-04
申请号	JP2014162124	申请日	2014-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所		
申请(专利权)人(译)	法国巴斯德研究所		
[标]发明人	マリー・リーズ・グージョン ベアトリス・ポワリエ・ボードワン ヴァレリー・セファール ヘラサイディ		
发明人	マリー・リーズ・グージョン ベアトリス・ポワリエ・ボードワン ヴァレリー・セファール ヘラサイディ		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	A61B2010/0077 G01N33/56988 G01N33/6854 G01N2333/16 G01N2800/28 G01N2800/56 A61B5/0042 A61B5/055 A61B5/15 A61B5/4029 A61B5/4064 A61B5/407 A61B5/4082 A61B5/4088 G01N33/6896 G01N2333/52 G01N2333/522 G01N2333/523		
FI分类号	G01N33/569.H G01N33/53.N G01N33/53.D		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
优先权	2010290124 2010-03-10 EP		
其他公开文献	JP5851565B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于神经疾病预后的HMGB1和抗HMGB1抗体。本发明提供了一种体外方法，该方法用于定量从患者获得的样品，特别是血清样品或脑脊液样品中所含的高迁移率I型框I ( HMGB1 ) 特异的抗体，并要在神经系统疾病的预后和/或诊断中使用这种方法。这些方法尤其用于监视已知感染了人类免疫缺陷病毒 ( HIV ) 的受试者的HIV感染，以及获得性免疫缺陷综合症 ( AIDS ) 或AIDS的进展状况。它可以用于疾病进展状态的预后和/或诊断，特别是与艾滋病有关的神经系统疾病或与艾滋病有关的神经系统疾病。最后，本发明涉及一种用于确定患者特别是感染了HIV的患者中免疫缺陷或免疫激活水平的方法。[选择图]无

特開2014-22

(P2014-224

(43) 公開日 平成26年12月4日(2014.

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>G01N 33/569 (2006.01)</b>	G01N 33/569	H
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53	N
	G01N 33/53	D

審査請求 有 請求項の数 10 O L 外国語出願 (全 38

(2) 出願番号	特開2014-162124 (P2014-162124)	(7) 出願人	508029633
(2) 出願日	平成26年8月8日(2014.8.8)		アンスティテュ・バスターール
(6) 分割の表示	特開2012-556527 (P2012-556527) の分割		フランス・F-75724・パリ・セクス・15・リュ・デュ・ドクトゥール・25-28
原出願日	平成23年3月10日(2011.3.10)	(7) 代理人	100108433
(3) 優先権主張番号	10290124.G		弁理士 村山 清彦
(3) 優先日	平成22年3月10日(2010.3.10)	(7) 代理人	100064908
(3) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 志賀 正武
		(7) 代理人	100089037
			弁理士 渡邊 隆
		(7) 代理人	100110364
			弁理士 栗広 信哉