

(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2019-535011

(P2019-535011A)

(43) 公表日 令和1年12月5日(2019.12.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A Y	4 B O 6 5
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 H	4 C O 8 4
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 C O 8 5
CO 7 K 16/28 (2006.01)	CO 7 K 16/28	4 H O 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-517293 (P2019-517293)
 (86) (22) 出願日 平成29年9月30日 (2017. 9. 30)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月29日 (2019. 5. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2017/056054
 (87) 国際公開番号 WO2018/060978
 (87) 国際公開日 平成30年4月5日 (2018. 4. 5)
 (31) 優先権主張番号 16/59440
 (32) 優先日 平成28年9月30日 (2016. 9. 30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 17/52126
 (32) 優先日 平成29年3月15日 (2017. 3. 15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 フランス (FR)

(71) 出願人 511119776
 セントレ ナショナル デ ラ レセルシ
 ュ シャンティフィク
 フランス国 F-75794 パリ セデ
 ックス 16 ルー ミシェル アンジュ
 3
 (71) 出願人 515011944
 ユニヴェルシテ・ドゥ・モンペリエ
 フランス・F-34090・モンペリエ・
 リュ・オーギュスト・ブルソネ・163
 (74) 代理人 100091982
 弁理士 永井 浩之
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞マーカー

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物免疫不全ウイルスの細胞内リザーバの検出のための、分化マーカー C D 3 2 の使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物免疫不全ウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバの検出のための方法であって、前記方法が、インビトロまたはエクスピボで、前記哺乳動物免疫不全ウイルスに感染し、および特に前記哺乳動物免疫不全ウイルスに対する特定の抗レトロウイルス療法で治療した哺乳動物の細胞を、表面上にCD32分化マーカーを発現するリンパ球細胞の検出を可能にする薬剤と接触させるステップを含む、方法。

【請求項 2】

表面上に分化マーカーCD32を発現するリンパ球細胞の検出を可能にする前記薬剤が、抗CD32抗体である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記哺乳動物免疫不全ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、またはネコ免疫不全ウイルス(FIV)である、請求項1または請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

表面上に前記分化マーカーCD32を発現する前記リンパ球細胞が、TC4リンパ球細胞、特に静止状態のTC4細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

表面上にCD32分化マーカーを発現するリンパ球細胞であって、前記細胞が、その核デオキシリボ核酸中に、少なくとも1つの哺乳動物免疫不全ウイルスのゲノムを含み、前記少なくとも1つの哺乳動物免疫不全ウイルスのゲノムが、遺伝子組み換えされていて、天然に存在せず、特に前記少なくとも1つの遺伝子組み換えされた哺乳動物免疫不全ウイルスのゲノムが蛍光マーカータンパク質の発現を可能にする、リンパ球細胞。

20

【請求項 6】

哺乳動物免疫不全ウイルスの細胞内リザーバを検出するためのキットであって、前記細胞の表面上のCD32分化マーカーを検出する少なくとも1種の薬剤と、前記細胞のゲノム中の前記哺乳動物免疫不全ウイルスのDNAの存在を判定することを可能にする少なくとも1つの組成物とを含む、キット。

【請求項 7】

前記細胞のゲノム中の前記哺乳動物免疫不全ウイルスのDNAの存在を判定することを可能にする前記組成物が、特にポリメラーゼ連鎖反応の実行のための、前記ウイルスのゲノムの配列の特定のオリゴヌクレオチドを含む、請求項6に記載のキット。

30

【請求項 8】

哺乳動物免疫不全に対する抗ウイルス療法剤を使用した治療の中止に続く哺乳動物免疫不全の再発に関するインビトロでの予後を診断するための方法であって、前記方法が、CD32マーカーを表面上に発現し、かつ前記哺乳動物免疫不全の原因であるウイルスのDNAをゲノム中に有するリンパ球細胞を定量化するステップを含む、方法。

【請求項 9】

哺乳動物免疫不全に対する抗ウイルス療法剤を使用した治療の中止に続く哺乳動物免疫不全の完全寛解に関する診断をインビトロで行うための方法であって、前記方法が、哺乳動物免疫不全ウイルスのDNAをゲノム中に有し、かつ表面上に少なくともCD32マーカーを発現するリンパ球細胞の不在を検出するステップを含む、方法。

40

【請求項 10】

哺乳動物免疫不全ウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバの検出のための方法であって、前記方法が、インビトロまたはエクスピボで、前記哺乳動物免疫不全ウイルスに感染し、ならびに特に前記哺乳動物免疫不全ウイルスに対する特定の抗レトロウイルス療法および/または前記細胞内リザーバを根絶することを目的とした療法で治療した哺乳動物の細胞を、表面上にCD32分化マーカーを発現するリンパ球細胞の検出を可能にする薬剤と接触させるステップを含む、方法。

【請求項 11】

50

哺乳動物免疫不全ウイルスに感染した哺乳動物細胞の細胞内リザーバの根絶を目的とした治療の有効性の評価のための方法であって、前記方法が、インビトロまたはエクスピボで、表面上にCD32分化マーカーを発現するリンパ球細胞の存在、量、または不在の検出を可能にする薬剤を使用して、前記細胞内リザーバを検出するステップを含む、方法。

【請求項12】

検出された細胞内リザーバの存在、不在、または量に従い、前記感染した哺乳動物を分類するステップを更に含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

CD32マーカーの少なくとも1つのエピトープ、およびリンパ球細胞、特に前記リンパ球細胞、特にTリンパ球細胞に特徴的な少なくとも1つのマーカーの両方を認識する、多重特異性抗体。

10

【請求項14】

前記抗体が、CD32抗原およびCD3抗原を特異的に認識する二重特異性抗体である、請求項13に記載の多重特異性抗体。

【請求項15】

前記抗体が、モノクローナル抗体、特にヒトまたはヒト化抗体である、請求項13または14に記載の抗体。

【請求項16】

哺乳動物免疫不全ウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバを根絶することにおける使用のための、CD32マーカーを発現するリンパ球細胞を認識する少なくとも1種の薬剤を含む組成物。

20

【請求項17】

前記薬剤が、CD32マーカーを認識する少なくとも1つの抗体、特にCD32マーカーの単一特異性抗体、またはCD32マーカーおよびリンパ球細胞、特にTリンパ球細胞に特徴的な少なくとも1つのマーカーの少なくとも1つのエピトープを認識する多重特異性抗体である、請求項16に記載の使用のための組成物。

【請求項18】

- 請求項13～15のいずれか一項に記載の抗体と、
- 抗レトロウイルス剤の組み合わせと、
- 潜在的に、請求項16または17に記載の組成物と、を含む組成物。

30

【請求項19】

レンチウイルスによる感染症、特にHIV、SIV、またはFIVに関連した感染症の治療における使用のための、レンチウイルスのリンパ球細胞内リザーバ上に発現されたCD32マーカーを特異的に認識する抗体。

【請求項20】

前記抗体が、潜在的に細胞毒性剤に結合された、抗CD32抗体、または少なくとも二重特異性であり、CD32マーカーおよび少なくとも1つの他の特異的マーカーに加えて、リンパ球細胞、特にCD3マーカーを認識する抗体である、上に定義される使用のための抗体。

【請求項21】

レンチウイルスによる感染症、特にHIV、SIV、またはFIVに関連した感染症の治療における使用のための、請求項18に記載の組成物。

40

【請求項22】

前記特異的抗体と抗レトロウイルス剤の組み合わせとが、同時に、別々に、または経時的に互い違いになるように使用される、請求項21に記載の使用のための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞マーカー、およびウイルスリザーバを形成する感染細胞、特にレトロウイルスに感染した細胞を特定することの一部としてのその使用に関する。

50

【0002】

抗レトロウイルス治療は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に感染した患者の予後を著しく改善し、特にウイルスを増殖させる能力を改変する。

【0003】

これらの治療は、それらが停止され得るように十分に有効でないが、それらはウイルスの細胞内リザーバ (cellular reservoirs) を排除せず、中断された治療が、事実上全身的に血中のウイルス再出現をもたらすため、感染が持続していることを証明する。

【0004】

したがって、これらの潜伏性ウイルスリザーバの持続は、HIV感染を治癒するという概念に対する主要な障害であり、臨床および科学的分野における主要な問題となっている。

10

【0005】

最近の研究は、一旦患者が感染すると、静止状態 (quiescent) のTCD4リンパ球が、長年の治療にわたって持続可能である主要なウイルスリザーバを構成することを示した [Chun et al., 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94, 13193 - 13197; Finzi et al., 1997 Science 278, 1295 - 1300; Chomont et al., 2009 Nat Med 15, 893 - 900.]。

【0006】

しかしながら、HIV細胞内リザーバを非感染細胞と区別するのを可能にするマーカーは、これまで同定されていない。

20

【0007】

これらのウイルスリザーバを同定するのを可能にするマーカーの不在下で、それらがホストするウイルスを「パージする ("purging") 」ことによってその持続性を標的とすることを目的とする異なる戦略が試験されてきたが、これらの戦略は、研究室で観察されたその有効性が患者において再生されるのを可能にしなかった。これらの戦略が試験されたインビトロ条件は、「患者の状況」からかけ離れすぎている可能性がある。

【0008】

加えて、ウイルス感染を完全に根絶するために、これらの細胞を同定する必要がある。

30

【0009】

本発明は、先行技術におけるこれらの短所を克服する方法を提案する。

【0010】

本発明の目的のうちの1つは、細胞内リザーバを同定するのを可能にする新たなマーカーの使用を提案することである。

【0011】

本発明の別の目的は、ウイルスの細胞内リザーバを同定し、根絶するための方法を提供することである。

【0012】

本発明は、少なくとも1つのレンチウイルス、特にレンチウイルスの細胞内リザーバの検出のための、リンパ系細胞、および潜在的に骨髄系細胞の表面上に発現された細胞マーカーの使用に関し、当該細胞内リザーバは、当該レンチウイルスに感染した細胞であり、当該レンチウイルスに対する特定の治療剤に不応答性である。本発明は、少なくとも1つのレンチウイルス、特にレンチウイルスの細胞内リザーバの検出のための、リンパ系細胞、および潜在的に骨髄系細胞の表面上に発現された細胞マーカーの使用に更に関し、当該細胞内リザーバは、当該レンチウイルスに感染した細胞であり、当該レンチウイルスに対する特定の治療剤に不応答性である。

40

【0013】

本発明は、細胞マーカー、特に表面抗原分類 (CD) のある特定のマーカーが、特異的に発現されるか、またはレンチウイルスによる非感染細胞中の当該マーカーの発現レベル

50

に対して、少なくとも1つのレンチウイルスの細胞内リザーバによって、ある特定のレベルで発現されるという、発明者らによって行われた驚くべき観察に基づいている。

【0014】

下記の実施例に記載されるアプローチを使用して、発明者らは、ある特定の特異的CDマーカーが、レンチウイルス細胞内リザーバを検出するために特に興味深いことを示した。

【0015】

本発明において、細胞内リザーバは、複製可能なウイルス形態が蓄積し、活発に複製しているウイルス形態よりも遅い置換動態で持続する細胞を意味することが理解される。

【0016】

特に興味深いマーカーは、以下のとおりである。CD123マーカー（遺伝子番号3563）、CD87マーカー（遺伝子番号5329）、CD89マーカー（遺伝子番号2204）、CD172aマーカー（遺伝子番号140885）、CD112マーカー（遺伝子番号5819）、CD213a1マーカー（遺伝子番号3597）、CD120bマーカー（遺伝子番号7133）、CD121aマーカー（遺伝子番号3554）、CD54マーカー（遺伝子番号3383）、CD11cマーカー（遺伝子番号3687）、FPR1マーカー（遺伝子番号2358）、およびCD32マーカー（CD32a遺伝子番号2212、CD32b遺伝子番号2213）。

【0017】

CD123マーカーまたは抗原はまた、ヒトインターロイキン-3受容体のサブユニットとして知られている。それは、I型膜貫通糖タンパク質およびサイトカイン受容体のスーパーファミリーのメンバーである。CD123は、インターロイキン-3受容体を形成するために、CD131抗原（インターロイキン-3受容体のサブユニット）を有するヘテロ二量体を形成する。受容体内で、それはサイトカインへの特異性を付与するCD123抗原である。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号27の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号1の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号14の配列によって表される核酸分子（cDNA）によってコードされる。

【0018】

CD87マーカーまたは抗原はまた、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体またはuPARとしても知られている。CD87は、血管新生内皮の移行に關与する主要な参与因子である。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号28の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号2の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号15の配列によって表される核酸分子（cDNA）によってコードされる。

【0019】

CD89マーカーは、クラスA免疫グロブリン（IgA）の定常Fc領域の受容体である。膜貫通糖タンパク質受容体は、骨髓系統細胞、例えば好中球細胞、単球、マクロファージ、および好酸球の表面上で発現され、その中で病原体への免疫応答の媒介に参与する。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号29の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号3の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号16の配列によって表される核酸分子（cDNA）によってコードされる。

【0020】

CD172aまたはSIRP抗原（シグナル調節タンパク質抗原）は、骨髓系細胞、幹細胞、およびニューロンによって優先的に発現される膜糖タンパク質である。この抗原は、細胞の食作用を調節する目的で、CD47抗原と相互作用する阻害剤受容体として作用する。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号30の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号4の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号17の配列によって表される核酸分子（cDN

10

20

30

40

50

A)によってコードされる。

【0021】

CD112抗原は、ネクチン-2としても知られる膜糖タンパク質である。それはまた、ポリオまたはヘルペスウイルスの侵入におけるその関与に起因して、PVR2(ポリオウイルス受容体関連2)またはHVEB(ヘルペスウイルス侵入媒介物質B)としても知られている。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号31の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号5の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号18の配列によって表される核酸分子(cDNA)によってコードされる。

【0022】

CD213a1抗原はまた、インターロイキン-13受容体の-1鎖(IL13RA1)であるとして知られている。受容体のこのサブユニットは、JAK/STAT経路を介してシグナル伝達に参与する。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号32の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号6の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号19の配列によって表される核酸分子(cDNA)によってコードされる。

【0023】

CD120抗原は、腫瘍壊死因子受容体2(TNFR2)に対応する。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号33の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号7の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号20の配列によって表される核酸分子(cDNA)によってコードされる。

【0024】

CD121a抗原は、インターロイキン1受容体1型(IL1R1)に対応し、IL1に関わる免疫および炎症応答に参与する。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号34の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号8の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号21の配列によって表される核酸分子(cDNA)によってコードされる。

【0025】

CD54抗原はまた、細胞間接着分子1(ICAM-1)としても知られている。ICAM-1は、内皮細胞およびインテグリンと相互作用する免疫系細胞中で発現される細胞表面糖タンパク質である。ICAM-1はまた、標的細胞に侵入するためにライノウイルスによって使用される。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号35の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号9の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号22の配列によって表される核酸分子(cDNA)によってコードされる。

【0026】

CD11c抗原は、樹状細胞中で高度に発現されるが、単球、マクロファージ、好中球、およびいくつかのリンパ球B細胞によっても発現される、I型膜貫通タンパク質である。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号36の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号10の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号23の配列によって表される核酸分子(cDNA)によってコードされる。

【0027】

FPR1抗原はまた、N-ホルミルペプチド受容体2としても知られている。これは、好中球の化学誘引物質であり、後にその活性化を誘導する、N-ホルミル-メチオニルペプチドに対して低い親和性を有する受容体である。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号37の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号11の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体が配列番号24の配列によって表される核酸分子(cDNA)によってコードされる。

【0028】

10

20

30

40

50

CD32抗原は、リンパ球B細胞の大半によって発現される免疫グロブリンG膜受容体である。CD32は、過剰産生中の免疫グロブリンの産生の調節に關与する。ヒトにおいて、例えば、この抗原は、配列番号38または配列番号39の配列に含まれる遺伝子によってコードされる。抗原は、特に、配列番号12(CD32a)または配列番号13(CD32b)の配列によって表されるアミノ酸の配列によって形成され、それ自体がそれぞれ、配列番号25または配列番号26の配列によって表される核酸分子(cDNA)によってコードされる。

【0029】

本発明において、CD(表面抗原分類)分子が言及されるとき、これらの分子は、交換可能に「マーカー」、「抗原」、または「分子」と称される。

10

【0030】

加えて、本発明はまた、有利に、以下の抗原、CD123マーカー、CD87マーカー、CD89マーカー、CD172aマーカー、CD112マーカー、CD213a1マーカー、CD120bマーカー、CD121aマーカー、CD54マーカー、CD11cマーカー、FPR1マーカー、およびCD32aマーカーもしくはCD32bマーカー、または両方のうちの少なくとも1つ、あるいはレンチウイルスの細胞内リザーバであって、上に定義されるとおりである細胞内リザーバの検出のための当該上述のマーカーを検出するための手段の使用に關する。

【0031】

本発明において、研究される細胞内リザーバに感染するレンチウイルスは、有利に、哺乳動物免疫不全、とりわけ類人猿、とりわけヒト科動物、特にヒト、およびネコ科動物、とりわけネコに關与するレンチウイルスである(すなわち、それぞれHIV1および2ウイルス、SIV、ならびにFIV)。

20

【0032】

加えて、本発明はまた有利に、哺乳動物免疫不全ウイルス、特にレンチウイルスの細胞内リザーバであって、当該哺乳動物免疫不全ウイルスに感染し、哺乳動物免疫不全抗ウイルス療法剤に不応答性の細胞である細胞内リザーバの検出のための、以下の抗原、CD32マーカー、特にCD32aもしくはCD32b、または両方、CD87マーカー、CD89マーカー、CD172aマーカー、CD112マーカー、CD213a1マーカー、CD120bマーカー、CD121aマーカー、CD54マーカー、CD11cマーカー、FPR1マーカー、およびCD123マーカーから選択される少なくとも1つの抗原の使用に關する。

30

【0033】

本発明において、上述のマーカーのうちの1つ、または上述のマーカーの組み合わせを使用することが可能である。

【0034】

上述の選別のために、CD32マーカーを単独で、または上述のマーカーのうちの少なくとも1つと組み合わせて使用することが特に有利である。

【0035】

加えて、本発明はまた有利に、哺乳動物免疫不全ウイルス、特にレンチウイルスの細胞内リザーバであって、当該哺乳動物免疫不全ウイルスに感染し、不応答性の細胞である、細胞内リザーバの検出のための、少なくともCD32分化マーカーの使用、特に単一CD32マーカーの使用に關し、当該細胞は、治療法、特にヒトにおける3剤併用療法または多剤併用療法を停止した後のウイルスリバウンドに關与する。

40

【0036】

本発明において(上記および下記)、CD32についての言及は、CD32aマーカーもしくはCD32bマーカー、またはCD32aおよびCD32bの2つのマーカーに關する。

【0037】

有利な実施形態において、本発明は、上述の使用に關し、上記CD32マーカーが、配

50

列番号 12 または 13 の配列のタンパク質からなる。

【0038】

下記の実施例に示すように、発明者らは、特に哺乳動物免疫不全に關与するレンチウイルスに關連した細胞である、細胞内リザーバの表面上で特異的に発現されるものとして、CD89 マーカーを同定した。

【0039】

本発明において、「治療剤に不応答性」とは、特に免疫不全ウイルスに感染した細胞について、薬物治療の効果に対する著しい応答がないことを意味することが理解される。治療剤への不応答性は、ウイルス潜伏性または治療剤へのアクセス不能に起因する、応答の完全な不在を特徴とし得、これは1つ以上の薬物の効果が、いかなる治療剤（薬学的に許容されるビヒクル、賦形剤、水、またはプラセボでさえ）も含有しない組成物の効果と本質的に同じであることを意味する。不応答性はまた、いかなる治療剤も含有しない組成物で得られるものと著しく異ならない応答を特徴とし得る。

10

【0040】

本発明の細胞内リザーバは、ウイルスを根絶するために使用される現在の治療法では、これらの細胞が殺滅されないか、破壊されないか、またはアポトーシスもしくは壊死プロセスに誘導されないため、あるいは免疫系によって非自己の一部として認識されるため、抗ウイルス治療剤に対して不応答性であると呼ばれる。HIV（HIV1 もしくは HIV2）、SIV、または FIV などの免疫不全ウイルスの特定の場合において、細胞内リザーバは、現在使用されている抗レトロウイルス剤（侵入阻害剤、逆転写酵素阻害剤、抗プロテアーゼ、修飾ヌクレオチド等）によって排除されない。

20

【0041】

加えて、本発明は更に、少なくとも1つの哺乳動物免疫不全ウイルス、特にレンチウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバの検出のための方法に關し、当該方法は、特にインビトロまたはエクスピボで、当該哺乳動物免疫不全ウイルスに感染した、特に当該哺乳動物免疫不全ウイルスに対する特定の抗レトロウイルス療法で治療された哺乳動物の細胞を、以下の抗原、CD123 マーカー、CD87 マーカー、CD89 マーカー、CD172a マーカー、CD112 マーカー、CD213a1 マーカー、CD120b マーカー、CD121a マーカー、CD54 マーカー、CD11c マーカー、FPR1 マーカー、および CD32 マーカーのうち少なくとも1つを表面上に発現するリンパ球細胞の検出を可能にする薬剤と接触させるステップを含む。

30

【0042】

本発明において、「少なくとも1つのウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバ」は、当該少なくとも1つのウイルスに感染した細胞下位集団を意味し、当該集団は、感染した細胞の集団の一部であることが理解される。これらの細胞内リザーバは、上に定義されるとおりである。「少なくとも1つのウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバ」はまた、少なくとも1つのウイルスの細胞内リザーバを意味する。

【0043】

上述の方法は、（ヒトまたは動物）対象のリンパ球細胞を、上述のマーカーのうち少なくとも1つを発現する細胞を特異的に明示可能な薬剤（an agent capable of specifically evidencing cell）と接触させるレンチウイルス細胞内リザーバを検出することを提案する。これを行うために、当業者に周知である、フローサイトメトリーなどのリンパ球細胞を単離するための従来の免疫学的方法を使用することができる。

40

【0044】

上記マーカーを検出するのを可能にする薬剤は、有利に、1つ以上の抗体である。この抗体またはこれらの抗体は、複数のマーカーを同時に検出することが目的である場合、または同じマーカーの複数の抗体が使用される場合、抗体とそれらの標的との間の免疫複合体を検出するのを可能にする薬剤のうち1つに結合され得る。例えば、抗体は、発光もしくは蛍光分子、またはその産物が分析者の目に見える反応を触媒する酵素に結合され得る。免疫複合体を検出するためのこれらの技法は、先行技術において非常に広く知られ

50

ている。

【0045】

有利に、本発明は、少なくとも1つの免疫不全ウイルス、特に哺乳動物ウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバの検出のための方法であって、当該方法は、特にインビトロまたはエクスピボで、当該哺乳動物免疫不全ウイルスに感染し、当該哺乳動物免疫不全ウイルスに対する特定の抗レトロウイルス療法で治療した哺乳動物の細胞を、表面上に少なくともCD32分化マーカーを発現するリンパ球細胞の検出を可能にする薬剤と接触させるステップを含む。

【0046】

有利な実施形態において、本発明は、上述の方法に関し、上記CD32マーカーが、配列番号12または13の配列のタンパク質からなる。

10

【0047】

有利に、本発明は、上に定義される方法に関し、表面上に分化マーカーCD32を発現するリンパ球または骨髄系細胞を検出するのを可能にする上記薬剤が、抗CD32抗体である。

【0048】

有利な実施形態において、本発明は、上に定義される方法に関し、上記哺乳動物免疫不全ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、特にHIV1もしくはHIV2ウイルス、サル免疫不全ウイルス(SIV)、またはネコ免疫不全ウイルス(FIV)である。

【0049】

有利な実施形態において、本発明は、上に定義される方法に関し、表面上に分化マーカーCD32を発現するリンパ球細胞が、TC4リンパ球細胞、特に静止状態のTC4細胞である。静止状態のリンパ球は、それらが分割せず、長い寿命(数週間~数年)、低い転写速度、およびそれらに固有の代謝活性を有することを特徴とする。

20

【0050】

本発明は、その表面上の以下のマーカー、CD123マーカー、CD87マーカー、CD89マーカー、CD172aマーカー、CD112マーカー、CD213a1マーカー、CD120bマーカー、CD121aマーカー、CD54マーカー、FPR1マーカー、CD11cマーカー、およびCD32マーカーのうち少なくとも1つを発現するリンパ球細胞に更に関し、当該細胞は、その核デオキシリボ核酸中に、少なくとも1つの哺乳動物免疫不全ウイルスのゲノムを含み、当該少なくとも1つの哺乳動物免疫不全ウイルスのゲノムは、遺伝子組み換えされていて、自然界に天然に存在しない。

30

【0051】

細胞は新しく、天然の状態が存在しない。これらの細胞は、修飾レンチウイルスがゲノムに挿入された細胞である。これらの細胞は、ヒト、サル、またはネコ細胞である。これらの細胞はまた、単離される。

【0052】

有利に、本発明は、表面上に少なくともCD32分化マーカーを発現するリンパ球細胞に更に関し、当該細胞は、その核デオキシリボ核酸中に、少なくとも1つの哺乳動物免疫不全ウイルスのゲノムを含み、当該少なくとも1つの哺乳動物免疫不全ウイルスのゲノムは、遺伝子組み換えされていて、ヒト介入なしに哺乳動物において天然の状態が存在しない。

40

【0053】

有利な実施形態において、本発明は、上述の細胞に関し、上記CD32マーカーが、配列番号12または13の配列のタンパク質からなる。

【0054】

有利に、本発明は、上述の細胞に関し、上記少なくとも1つの遺伝子組み換えされた哺乳動物免疫不全ウイルスのゲノムが、蛍光マーカータンパク質を発現するのを可能にする。

【0055】

50

特に、上述の細胞は、それらが、それらの表面上にCD32抗原を発現し、免疫不全に
関与するレンチウイルスをそれらのゲノムに統合したリンパ球細胞内リザーバであること
を特徴とし、レンチウイルスは、ウイルスの生活環に関与する遺伝子とは別に、GFPま
たはその誘導体などの、マーカータンパク質をコードする1つ以上の遺伝子が挿入される
ように遺伝子組み換えされている。

【0056】

本発明はまた有利に、哺乳動物免疫不全ウイルスの細胞内リザーバを検出するためのキ
ットまたはパックに関し、少なくとも1つの検出剤を含むか、または細胞の表面上の、以
下のマーカー、CD123マーカー、CD87マーカー、CD89マーカー、CD172
aマーカー、CD112マーカー、CD213a1マーカー、CD120bマーカー、C
D121aマーカー、CD54マーカー、CD11cマーカー、FPR1マーカー、およ
びCD32マーカーのうちの少なくとも1つ、ならびに当該細胞のゲノム中の当該哺乳
動物免疫不全ウイルスのDNAの存在を判定するのを可能にする少なくとも1つの組成物
の検出を可能にする。

10

【0057】

したがって、上述の検出キットは、上述のマーカーのうちの少なくとも1つの膜発現を
検出するための手段、および免疫不全に関与するレンチウイルスのDNA細胞のゲノムへ
の挿入を検出するための手段を含む。マーカーを検出するための手段は、上述されるもの
、特に当該マーカーの特異的抗体である。

20

【0058】

有利に、本発明はまた、哺乳動物免疫不全ウイルスの細胞内リザーバを検出するための
キットまたはパックに関し、細胞の表面上のCD89分化マーカーを検出する少なくとも
1種の薬剤と、当該細胞のゲノム中の当該哺乳動物免疫不全ウイルスのDNAの存在を判
定するのを可能にする少なくとも1つの組成物と、を含む。

【0059】

有利な実施形態において、本発明は、上述のキットに関し、上記CD32マーカーが、
配列番号12または13の配列のタンパク質からなる。

【0060】

有利に、本発明は、上に定義されるキットに関し、上記細胞のゲノム中の上記哺乳動物
免疫不全ウイルスのDNAの存在を判定するのを可能にする上記組成物が、特にポリメ
ラーゼ連鎖反応またはPCRの実行のために、当該ウイルスのゲノムの配列の特定のオリ
ゴヌクレオチドを含む。

30

【0061】

HIV、SIV、およびFIVウイルスの発見以降に構築された知識に照らして、当業
者は、当該ウイルスの存在が細胞のゲノム中で同定されるのを可能にするオリゴヌクレ
オチドを同定することが可能である。PCR反応が実行されるのを可能にするオリゴヌ
クレオチド対の使用は、特に有利であるが、当業者は、所望される場合、サザンプロ
ットなどの他の分子生物学技法を利用する。

【0062】

別の態様では、本発明は、哺乳動物免疫不全に関与する抗ウイルス療法剤での治療の中
止に続く哺乳動物免疫不全の再発に関して、特にインビトロで予後を診断するための方法
に関し、当該方法は、表面上の以下の抗原、CD123マーカー、CD87マーカー、C
D89マーカー、CD172aマーカー、CD112マーカー、CD213a1マーカー
、CD120bマーカー、CD121aマーカー、CD54マーカー、CD11cマ
ーカー、FPR1マーカー、およびCD32マーカーのうちの少なくとも1つを発現し、当
該哺乳動物免疫不全に関与するウイルスのDNAをゲノム中に有するリンパ球細胞を定
量化するステップを含む。

40

【0063】

本発明の予後診断方法 (prognosis method) は、レンチウイルス細胞内リザーバの検出
または検出の不在に基づいている。

50

【 0 0 6 4 】

H I V に対する抗ウイルス治療の中止に続いて、ウイルスは再興し、病理（免疫不全）が再出現する。患者が抗ウイルス治療および細胞内リザーバを根絶することを目的とする治療の両方により治療された場合、抗ウイルス治療の中止に続いて、ウイルスの再活性化に起因する、患者における疾患再興の可能性を決定する必要がある。加えて、本発明の状況において、細胞内リザーバを検出するための記載された手段を使用して、上述の治療（抗ウイルス治療および抗細胞内リザーバ治療）に続いて残留細胞内リザーバの量を測定することが可能である。患者が非常に低い量の細胞内リザーバを有するか、またはそれらかもはや細胞内リザーバを有していない場合、予後はこの症例において非常に好ましく、疾患が短期間で再興する可能性は低い。対照的に、多くの細胞内リザーバが依然として存在する場合、診断は好ましくなく、患者の再発は急速である。

10

【 0 0 6 5 】

有利に、本発明はまた、哺乳動物免疫不全に關与する抗ウイルス療法剤による治療の中止に続く哺乳動物免疫不全の再発に關する、特にインビトロでの予後を診断するための方法であって、当該方法が、少なくとも C D 8 9 マーカーを表面上に発現し、当該哺乳動物免疫不全に關与するウイルスの D N A をゲノム中に有するリンパ球細胞を定量化するステップを含む。

【 0 0 6 6 】

有利な実施形態において、本発明は、上述の方法に關し、上記 C D 3 2 マーカーが、配列番号 1 2 または 1 3 の配列のタンパク質からなる。

20

【 0 0 6 7 】

加えて、本発明は、哺乳動物免疫不全に關与する抗ウイルス療法剤での治療の中止に続く哺乳動物免疫不全の完全寛解に關して、特にインビトロで診断を行うための方法に關し、当該方法は、表面上の以下のマーカー、C D 1 2 3 マーカー、C D 8 7 マーカー、C D 8 9 マーカー、C D 1 7 2 a マーカー、C D 1 1 2 マーカー、C D 2 1 3 a 1 マーカー、C D 1 2 0 b マーカー、C D 1 2 1 a マーカー、C D 5 4 マーカー、C D 1 1 c マーカー、F P R L 1 マーカー、および C D 3 2 マーカーのうちの少なくとも 1 つを発現し、哺乳動物免疫不全ウイルスの D N A をゲノム中に有するリンパ球細胞の不在を検出するステップを含む。

【 0 0 6 8 】

この診断方法において、患者がもはや体内にいかなる H I V 細胞内リザーバも有しない場合、ウイルス感染の、したがって關連した免疫不全の完全寛解の診断を提供することが可能である。細胞内リザーバの不在の検出は、当然のことながら、本発明による検出手段によって実行される。

30

【 0 0 6 9 】

有利に、本発明はまた、哺乳動物免疫不全に關与する抗ウイルス療法剤による治療の中止に続く哺乳動物免疫不全の完全寛解に關する診断を、特にインビトロで行うための方法に關し、当該方法は、哺乳動物免疫不全ウイルスの D N A をゲノム中に有し、表面上に少なくとも C D 3 2 マーカーを発現するリンパ球細胞の不在を検出するステップを含む。

【 0 0 7 0 】

有利な実施形態において、本発明は、上述の方法に關し、上記 C D 3 2 マーカーが、配列番号 1 2 または 1 3 の配列のタンパク質からなる。

40

【 0 0 7 1 】

本発明はまた、哺乳動物免疫不全ウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバの検出のための方法に關し、当該方法は、インビトロまたはエクスピボで、当該哺乳動物免疫不全ウイルスに感染し、ならびに、特に当該哺乳動物免疫不全ウイルスに対する特定の抗レトロウイルス療法および / または当該細胞内リザーバを根絶することを目的とした療法で治療した哺乳動物の細胞を、表面上に上述の分化マーカー、特に C D 3 2 マーカーを発現するリンパ球細胞の検出を可能にする薬剤と接触させるステップを含む。

【 0 0 7 2 】

50

本発明はまた、上記哺乳動物免疫不全ウイルスに感染した哺乳動物細胞の細胞内リザーバの根絶を目的とした治療の有効性の評価のための方法に関し、当該方法が、インビトロまたはエクスピボで、表面上にCD32分化マーカーを発現するリンパ球細胞の存在、量、または不在の検出を可能にする薬剤を使用して、当該細胞内リザーバを検出するステップを含む。

【0073】

有利に、本発明は、上述の方法に関し、検出された細胞内リザーバの存在、不在、または量に従い、上記感染した哺乳動物を分類するステップを更に含む。

【0074】

この方法において、細胞内リザーバは、それらを破壊することを目的とする治療に続いて捜される。細胞内リザーバが、依然としてそれらを根絶することを目的とする上記治療前の数と実質的に同一の数で存在する場合、したがって治療は機能しなかった。しかしながら、細胞内リザーバの数が著しく減少した場合、特に細胞内リザーバを同定することもはや可能でなくなった場合、治療は機能した。

10

【0075】

加えて、本発明は、本発明において同定されるレンチウイルスのリンパ球細胞内リザーバ、特にHIV1、HIV2、SIV、およびFIVウイルスなどの哺乳動物免疫不全に關与するウイルスの細胞内リザーバを特異的に標的とする治療剤に関する。

【0076】

有利に、治療剤は、抗体または本発明において同定される細胞内リザーバを認識することが可能な化学剤である。

20

【0077】

上述の治療剤は、より有利に、以下のマーカーのうちの1つ、CD123マーカー、CD87マーカー、CD89マーカー、CD172aマーカー、CD112マーカー、CD213a1マーカー、CD120bマーカー、CD121aマーカー、CD54マーカー、CD11cマーカー、FPR1マーカー、CD32マーカー、およびCD3抗原（Tリンパ球の特異的T細胞受容体もしくはTCRに関連したタンパク質）、またはT細胞の1つ以上の他の特異的マーカーの両方を認識することが可能な二官能性抗体である。

【0078】

本発明は、有利に、CD89マーカーの少なくとも1つのエピトープおよびリンパ球細胞、特にリンパ球細胞、特にTリンパ球細胞に特徴的な少なくとも1つのマーカーの両方を認識する多重特異性抗体に関する。

30

【0079】

より有利に、本発明は、上述の多重特異性抗体に関し、当該抗体は、CD32抗原およびCD3抗原を特異的に認識する二重特異性抗体である。

【0080】

有利に、本発明の状況において、上述の抗体は、モノクローナル抗体、特にヒトもしくはヒト化抗体、サルもしくはサル化抗体、またはネコもしくはネコ化抗体である。

【0081】

本発明において、多重特異性抗体は、その第1のCDRによって第1の抗原を認識し、その第2のCDRによって第2の抗原を認識することが可能な抗体を意味することが理解される。

40

【0082】

有利に、上に定義される抗体は、CD32抗原およびCD3抗原を認識する二官能性または二重特異性抗体である。

【0083】

本発明において、二官能性または二重特異性抗体は、特定のエピトープを認識する超可変領域、および第1のものとは異なる第2のエピトープを認識する第2の超可変領域を有する組み換え抗体を意味することが理解される。したがって、二官能性または二重特異性抗体は、2つの異なるタンパク質を同時に認識することができる。これらの抗体はまた、

50

二重特異性 s c F v、二重特異性 b i - s c F v、二重特異性ミニボディ、または二重特異性ダイアボディなどのそれらの断片の形態であってもよい。

【 0 0 8 4 】

これらの二重特異性抗体またはそれらの断片は、有利に、ヒト療法における使用のためにヒト化されている。先行技術において周知のヒト化は、抗体の全体構造を、一般にマウスのモノクローナル抗体に由来する関心対象の超可変領域がグラフトされる、ヒト配列分子と置き換えることを必要とする。

【 0 0 8 5 】

加えて、本発明は、有利に、以下のマーカー、C D 1 2 3 マーカー、C D 8 7 マーカー、C D 8 9 マーカー、C D 1 7 2 a マーカー、C D 1 1 2 マーカー、C D 2 1 3 a 1 マーカー、C D 1 2 0 b マーカー、C D 1 2 1 a マーカー、C D 5 4 マーカー、C D 1 1 c マーカー、F P R L 1 マーカー、C D 3 2 マーカー、および C D 3 マーカーのうちの1つの両方を同時に認識することができる、モノクローナル抗体、特にヒト化抗体、またはその上述の断片のうちの1つに関する。

10

【 0 0 8 6 】

本発明において、使用される抗体は、毒素（例えば、リシンもしくはメイトインシン D M 1 誘導体）などの活性剤、放射性アイソトープ（例えば、イットリウム - 9 0 もしくは ^{90}Y （ マイナス放射の純粋な放射体 ）、およびヨード - 1 3 1 または ^{131}I （ マイナスおよび 放射体 ））、生物学的薬剤、薬物、あるいは酵素に結合され得る。したがって、治療効果は、主に結合された薬剤に基づき、抗体は、標的に対して薬剤を誘導する

20

【 0 0 8 7 】

本発明はまた、レンチウイルスによる感染症、特に H I V または S I V に関連した感染症の治療における使用のための、以下のマーカー、C D 1 2 3 マーカー、C D 8 7 マーカー、C D 8 9 マーカー、C D 1 7 2 a マーカー、C D 1 1 2 マーカー、C D 2 1 3 a 1 マーカー、C D 1 2 0 b マーカー、C D 1 2 1 a マーカー、C D 5 4 マーカー、C D 1 1 c マーカー、F P R L 1 マーカー、および C D 3 2 マーカーのうちの1つ、ならびに特異的 T - 細胞マーカー、特に C D 3 マーカーの両方に対する二重特異性抗体に関する。

【 0 0 8 8 】

より有利に、本発明は、レンチウイルスによる感染症、特に H I V、S I V、または F I V に関連した感染症の治療における使用のための、C D 3 2 および C D 3 の両方に対する二重特異性抗体に関する。

30

【 0 0 8 9 】

本発明は、哺乳動物免疫不全ウイルスに感染した細胞の細胞内リザーバを根絶することにおける使用のための、C D 3 2 マーカーを発現するリンパ球細胞を認識する少なくとも1種の薬剤を含む、組成物に関する (The invention further relates to a composition comprising at least one agent that recognizes the lymphocyte cells expressing the CD32 marker, for its use in eradicating cellular reservoirs of cells infected by a mammalian immunodeficiency virus)。

【 0 0 9 0 】

有利に、本発明は、上述の組成物に関し、上記薬剤は、その上述の使用のための、C D 3 2 マーカーを認識する少なくとも1つの抗体、特に C D 3 2 マーカーの単一特異性抗体、または C D 3 2 マーカーおよびリンパ球細胞、特に T リンパ球細胞に特徴的な少なくとも1つのマーカーの少なくとも1つのエピトープを認識する多重特異性抗体 (a multi-specific antibody that recognizes at least one epitope of the CD32 marker and at least one marker characteristic of the lymphocyte cells, in particular the T lymphocyte cells) である。

40

【 0 0 9 1 】

上に示すように、毒性剤に結合された抗体は、細胞内リザーバを根絶するために有利であり得る。

50

【0092】

本発明はまた、

- 上に定義される二重特異性抗体と、
- レンチウイルスによる感染症、特にH I VまたはS I Vに関連した感染症の治療における使用のための、抗レトロウイルス剤の組み合わせ、との両方、
- およびもしかすると (potentially)、細胞内リザーバを根絶する組成物を含む、組成物に関する。

【0093】

有利に、本発明は、その上述の使用のための組成物に関し、特異的抗体および抗レトロウイルス剤が、同時に、別々に、または経時的に互い違いになるように使用される。

10

【0094】

レンチウイルス、特に哺乳動物免疫不全を引き起こすレンチウイルスによる感染症を治療するための方法もまた記載され、有効用量の上述の組成物を、感染した哺乳動物、特にH I Vに感染したヒトに投与することを含む。

【0095】

本発明はまた、レンチウイルスによる感染症、特にH I V、S I V、またはF I Vに関連した感染症の治療における使用のための、レンチウイルスのリンパ球細胞内リザーバ上に発現されたC D 3 2 マーカーを特異的に認識する抗体に関する。

【0096】

有利に、上述の抗体は、潜在的に細胞毒性剤に結合された (potentially coupled to a cytotoxic agent) 抗C D 3 2 抗体、または少なくとも二重特異性であり、C D 3 2 マーカーおよび少なくとも1つの他の特異的マーカーに加えて、リンパ球細胞、特にC D 3 マーカーを認識する抗体 (an antibody that is at least bispecific and recognizes lymphocyte cells, in particular the CD3 marker, in addition to the CD32 marker and at least one other specific marker) である。

20

【0097】

本発明はまた、レンチウイルスによる感染症、特にH I V、S I V、またはF I Vに関連した感染症の治療における使用のための、上述の組成物に関する。

【0098】

有利に、本発明は、その上述の使用のための組成物に関し、特異的抗体および抗レトロウイルス剤が、同時に、別々に、または経時的に互い違いになるように使用される。

30

【0099】

本発明は、以下に記載される実験データおよびこれを例証する図面に照らしてより良く理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】潜伏的に感染したT C D 4 リンパ球を得るために、発明者らによって使用された実験的アプローチを示す。A . : 健康な個体 (H I Vに感染していない) からの末梢血単核細胞 (P B M C) を、t 0 で採取する。いかなる更なる治療もせずに、それらは対照細胞4 (感染していない、N I) を構成する。P B M Cの残りを、タンパク質V p x (V L P - V p x、B .) で治療する。後に治療されない細胞は、V p x 治療した非感染細胞の第2の対照3を構成する。最後に、残りの細胞を、H I Vウイルスに感染させ、G F P (C .) の構成的発現を可能にする。故に、H I Vに曝露された細胞分画は、2つのカテゴリーに分割される。G F P (2 .) を発現しない曝露された非感染細胞および感染し、G F P (1 .) を発現するウイルスに曝露された細胞。異なる細胞を、それらのR N Aの抽出、当該抽出されたR N Aのシーケンシング、生物情報学的分析、およびフローサイトメトリーによる候補の検証のための調製において、フローサイトメーターによってソートする。

40

【図2】ユークリッド距離にわたって実行され、細胞1 . ~ 3 . の各サブアセンブリと非感染細胞 (4 .) との間で正規化対数変換遺伝子発現カウントを使用して計算される、階

50

層クラスタリングを示すカラーチャートである（本明細書では黒色および白色）。このチャートは、異なる4ドナーに由来するP B M Cについての結果を示す。1 - : 個体2に由来する細胞1 .、2 - : 個体4に由来する細胞1 .、3 - : 個体1に由来する細胞1 .、4 - : 個体3に由来する細胞1 .、5 - : 個体4に由来する細胞4 .、6 - : 個体1に由来する細胞3 .、7 - : 個体1に由来する細胞2 .、8 - : 個体1に由来する細胞4 .、9 - : 個体2に由来する細胞3 .、10 - : 個体2に由来する細胞2 .、11 - : 個体3に由来する細胞4 .、12 - : 個体4に由来する細胞3 .、13 - : 個体4に由来する細胞2 .、14 - : 個体2に由来する細胞4 .、15 - : 個体3に由来する細胞3 .、16 - : 個体3に由来する細胞2 .、17 - : 個体3に由来する細胞2 .、18 - : 個体3に由来する細胞3 .、19 - : 個体2に由来する細胞4 .、20 - : 個体4に由来する細胞2 .、21 - : 個体4に由来する細胞3 .、22 - : 個体3に由来する細胞4 .、23 - : 個体2に由来する細胞2 .、24 - : 個体2に由来する細胞3 .、25 - : 個体1に由来する細胞4 .、26 - : 個体1に由来する細胞2 .、27 - : 個体1に由来する細胞3 .、28 - : 個体4に由来する細胞4 .、29 - : 個体3に由来する細胞1 .、30 - : 個体1に由来する細胞1 .、31 - : 個体4に由来する細胞1 .、および32 - : 個体2に由来する細胞1 .。

10

【図3】健康な4ドナーからのサブグループ1 .（黒色の点）、2 .（濃灰色の点）、3 .（薄灰色の点）、および4 .（白色の点）についての正規化対数変換遺伝子発現の主成分分析を示すグラフである。このグラフは、2つの第1の主成分についての点を示す。x軸は、PC2 : 17%の分散を示し、y軸は、PC1 : 58%の分散を示す。

20

【図4】感染T C D 4細胞（1 .）と曝露された非感染T C D 4細胞（2 .）との間の、有意性（偽発見率（F D R））および遺伝子発現改変を示すボルケーノプロットを示す。黒色の点は、細胞2 .と比較して、分画1 .におけるそれらの有意な過剰発現に起因して選別された遺伝子を示す（F D R < 10⁻⁸）。x軸は、発現改変の底を2とする対数を示し、y軸は、F D Rの底を10とする対数を示す。

【図5】4群間、特に2 .対1 .の示差的に発現された253遺伝子を示すベン図を示す。（F D R < 10⁻⁸）。濃灰色の交差部は、後の分析のために選別された遺伝子を示す。A : 4 .対3 .、B : 4 .対1 .、C : 2 .対1 .、およびD : 4 .対2 .。

【図6】T C D 4細胞1 .および2 .において評価されたマーカー（111潜在的候補における遺伝子1~22）の各々について、発現増加サイトメトリー（x軸）の結果を示す棒グラフを示す。マーカーは、以下のとおりである。9 : a q p 9、15 : m u c 1 1、3 : c a 1 2、14 : v n n 3、11 : e a a t 1、10 : c 2 2 o r f 4 2、13 : g p r 9 1、17 : C D 6 6 d、12 : s t e p 1 b、2 : g j b 2、1 : c o l e c 1 2、19 : C D 8 0、16 : n i a c r 1、8 : C D 3 5 4、20 : C D 1 1 6、21 : s c a r f 1、22 : l l r k 2、4 : C D 3 0 0 c、5 : c l e c 4 d、18 : t l r 2、7 : C D 3 2、および6 : f p r 1 1。

30

【図7】細胞1における最も信頼できる候補の発現を強調するために、各マーカーを発現する全T C D 4細胞2 .のパーセンテージを示す棒グラフを示す。マーカーは、以下のとおりである。9 : a q p 9、15 : m u c 1 1、3 : c a 1 2、14 : v n n 3、11 : e a a t 1、10 : c 2 2 o r f 4 2、13 : g p r 9 1、17 : C D 6 6 d、12 : s t e p 1 b、2 : g j b 2、1 : c o l e c 1 2、19 : C D 8 0、16 : n i a c r 1、8 : C D 3 5 4、20 : C D 1 1 6、21 : s c a r f 1、22 : l l r k 2、4 : C D 3 0 0 c、5 : c l e c 4 d、18 : t l r 2、7 : C D 3 2、および6 : f p r 1 1。

40

【図8】#7マーカー（C D 3 2）および#6マーカー（f p r 1 1）を発現する全T C D 4細胞1 .のパーセンテージを示す棒グラフを示す。

【図9 A - 9 B】発明者らによって開発されたウイルス潜伏モデルにおける#7マーカー（C D 3 2）の発現プロファイルを示す。図9 Aは、図1に示されるように生成された、潜在的に感染したT C D 4細胞についてのサイトメトリーの結果を示す。#7マーカー（C D 3 2）の発現は、感染T C D 4細胞（1 .、B .）および静止状態の非感染T C

50

D4細胞2.(A.)(n=3)の表面上でフローサイトメトリーによって評価した。GFP+/マーカー#7+(CD32+)パーセンテージを各パネルに示す。x軸は、GFPの蛍光強度を示し、y軸は、CD32マーカーの蛍光強度を示す。図9Bは、細胞2.(GFPneg、A.)と4.(GFPpos、B.)との間の、#7+(CD32+)マーカーを発現する細胞のパーセンテージを示す棒グラフを示す。

【図10A-10B】感染TCD4細胞(n=3)中のGFPの発現の強度と相関させた、#7(CD32)マーカーの蛍光強度を示す。図10Aは、以下3つの細胞下位群について、CD32マーカーの蛍光強度の関数として、細胞数の表現を示す。A.:GFPを発現しない細胞、B.:GFPを弱く発現する細胞、およびC.:GFPを強く発現する細胞。図10Bは、図10Aに記載される3つのカテゴリーA.、B.、およびC.について、TCD4細胞中のCD32マーカーのパーセンテージのグラフを示す。

【図11A-11B】非刺激TCD4細胞(11A)またはTCR経路によって刺激されたTCD4細胞(n=2)(11B)の集団の表面上の#7(CD32)マーカーの発現を示す棒グラフを示す。黒色の棒は、陽性GFP細胞のパーセンテージを示し、灰色の棒は、陰性GFP細胞のパーセンテージを示す。

【図12】偽型ウイルス粒子VSV-Gの使用が、TCD8細胞(n=2)などの細胞上の#7(CD32)マーカーの発現の誘導を証明するのを可能にすることを示す棒グラフを示す。平均およびIQRは、必要に応じて、細胞2.(GFPneg)と4.(GFP+)との間の増加とともに、各棒グラフ上に提示される。

【図13A-13B】感染していないか、またはVLP-Vpxのみで治療された細胞と比較して、静止状態の感染TCD4細胞(GFP+)の表面上の#7(CD32)マーカーの誘導に関するサイトメトリー分析を示す。健康なドナー(n=3)からのPBMCを、SIVmac239ウイルス(13A)およびHIV-2(13B)に感染させた。FACS分析の結果は、非感染集団(GFP-、A.)および感染集団(GFP+、B.)における#7(CD32)マーカーを発現する細胞の%で表される。棒グラフは、SIVmac239およびHIV-2を使用して実行された実験の平均および標準偏差を示す。

【図14A-14B】健康なドナー(A)と比較して、HIV-1に感染し、ウイルス抑制された(B)患者のTCD4細胞の表面上の#7(CD32)マーカーの発現のエクスピボレベルの比較を示す棒グラフを示す。図14Aは、TCD4細胞の総数におけるCD32+細胞のパーセンテージを示す。図14Bは、未成熟DR+TCD4細胞の総数におけるCD32+細胞のパーセンテージを示す。

【図15A-15C】第1の患者におけるCD32マーカーの発現の結果を示す。図15Aは、アイソタイプによって、非ウイルス血症患者(n=2)におけるTCD4リンパ球(CD3+/CD4+選別)上の#7(CD32)マーカーの発現の異なるエクスピボレベルを示すフローサイトメトリーの結果を示す。x軸は、CD3の蛍光のレベルを示し、y軸は、CD32の蛍光のレベルを示す。図15Bは、抗CD32抗体によって、非ウイルス血症患者(n=2)におけるTCD4リンパ球(CD3+/CD4+選別)上の#7(CD32)マーカーの発現の異なるエクスピボレベルを示すフローサイトメトリーの結果を示す。A:CD32を強く発現する細胞、B:CD32を弱く発現する細胞、およびC:CD32を発現しない細胞。x軸は、CD3マーカーの蛍光強度を示し、y軸は、CD32マーカーの蛍光強度を示す。図15Cは、以下の細胞上でqPCRによって定量化(-グロビン遺伝子で標準化)された細胞別の全HIV-1DNAのコピー数を示す棒グラフを示す。A:CD4+細胞、B:CD4+CD32-細胞、C:CD4+CD32(強く発現された)。

【図16】全TCD4細胞(A)の集団、TCD4CD32-(B)集団、およびTCD4CD32+(C)集団中の、非ウイルス血症の7患者においてqPCRによって定量化された細胞別のHIV-1DNAのコピー数を示す棒グラフである。TCD4+CD32-分画とCD32+分画との間のウィルコクソン検定は、CD32+分画中のHIV-1DNAの有意な富化を示す(p=0.0156)。

10

20

30

40

50

【図17】HIVウイルスの再活性化後の4患者(27、439、566、および771)に由来するTC₄ CD₃⁺細胞の集団の100万当たりの感染単位の対数を示す棒グラフである。

【図18】異なる別々の患者から得た3つの試料からの全TC₄細胞(黒色の点)またはCD₃細胞中で枯渇したTC₄(灰色の点)の集団からの経時的な(数日で発現された、x軸)ウイルス再活性化を示す3つの曲線を示す。y軸は、p₂₄の量をpg・mL⁻¹で示す。

【図19A-19C】CD₃およびCD₈表面マーカーのアイソタイプ対照(陰性対照)を示すフローサイトメトリー結果を示す。図19Aは、患者からの、CD₃およびCD₄マーカーで検出された細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。CD₄+CD₃+集団は、窓によってマークされる(集団の40.5%)。図19Bは、図19Aの窓からの細胞、ならびにCD₃および対照アイソタイプマーカーを使用して検出されたCD₃マーカーのアイソタイプ対照マーカーに関するフローサイトメトリーの結果を示す。CD₃およびアイソタイプでマークされた細胞は、CD₃抗原に対するそれらの陽性または陰性について検出される。図19Cは、図19Bにおける下窓からの細胞(CD₃⁻)に関するフローサイトメトリーの結果を示す。CD₃およびアイソタイプでマークされた細胞は、CD₈抗原に対するそれらの陽性または陰性について検出される。

【図19D-19F】CD₃およびCD₈表面マーカーを示すフローサイトメトリーの結果を示す。図19Dは、患者からの、CD₃およびCD₄マーカーで検出された細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。CD₄+CD₃+集団は、窓によってマークされる(集団の43.8%)。図19Eは、図19Aの窓からの、CD₃およびCD₃マーカーを使用して検出される細胞に関するフローサイトメトリーの結果を示す。CD₃⁺細胞(上窓)およびCD₃⁻細胞(下窓、88.8%)が示される。

図19Fは、図19Bにおける下窓からの細胞(CD₃⁻)に関するフローサイトメトリーの結果を示す。CD₃およびCD₈でマークされた細胞は、CD₈抗原に対するそれらの陽性または陰性について検出される。窓は、CD₈⁺CD₃⁻細胞(0.074%)を示す。

【図20】別々の4患者から得たTC₄細胞の全集団(A)、TC₄+CD₃⁻CD₈⁻細胞の下位集団(B)、およびTC₄+CD₃⁻CD₈⁺細胞の下位集団(C)からの1細胞当たりのHIV DNAコピー数を示すグラフである。これらの分画の各々に存在するウイルス性DNAを、qPCR DNA HIV-1によって定量化した。試験した患者において、CD₈マーカーは、実際に、感染細胞のリザーバを同定する(TC₄+CD₃^a-CD₈⁺細胞当たり0.1HIV-1 DNAコピーの近似中央値)。

【図21】HIV再活性化に供されたGFP+患者の細胞中のCD₃に関して、マーカーA、B、C、D、E(CD₈)、F、G、H、およびIの比を示す棒グラフである。ウイルスの再活性化は、RNAseqによって測定される。

【図22】HIV再活性化に供されたGFP+患者の細胞中のCD₃⁻細胞中のマーカーA、B、C、D、E(CD₈)の比を示す棒グラフである。これらのマーカーは、CD₃と相互に排他的である。

【図23】CD₃およびCD₈抗体で(右下の画像)またはアイソタイプで(左側の画像)マークされた患者(患者812)から得たTC₄細胞、ならびに単一マークされた(CD₃またはCD₈)細胞および二重マークされた(CD₃およびCD₈)細胞の検出に関するフローサイトメトリーの結果を示す。2つの集団は排他的であり、二重マーキングは検出されなかったことが指摘される。

【実施例】

【0101】

実施例1-細胞内リザーバの特異的マーカーの同定

本発明によって取り組まれる問題は、インビトロモデルおよび有効な抗ウイルス(抗レ

10

20

30

40

50

トロウイルス)治療中のHIV-1に感染した患者の一次細胞のエキスピボ表現型調査によって、感染した細胞の特異的マーカーを同定し、検証することである。感染した細胞の表面上の、特にCD32マーカーの特異的発現のインビトロおよびエキスピボを用いて、HIV-1に感染した患者におけるウイルスリザーバを標的とし、排除すること、したがって感染した患者においてウイルスを決定的に根絶するのを可能にする有効な治療法を提案することができる。

【0102】

材料および方法：

1. ウイルス産生およびVLP

Vpxおよびウイルス粒子を含有するVLPは、293T細胞中のDNAのリン酸カルシウム形質移入についての標準プロトコルに従って産生した。VLP-Vpxは、8μgのpSIV3+プラスミドおよび2μgのpMD2-G VSV-Gプラスミドを同時形質移入することによって産生した。形質移入後16時間で培養培地を置き換えた後、48時間後にVLPを抽出し、それらを遠心分離し、それらを0.45mmフィルター上で濾過し、それらを超遠心分離によって100倍遠心分離した。HIV-1-CMV-eGFPウイルス粒子は、5μgのpHRETプラスミド、5μgのpSPAX2パッケージングプラスミド、および2μgのpMD2-Gプラスミドを同時形質移入することによって産生した。濃縮後、p24力価ウイルスストックを、ELISAによって測定し、感染力価(MOI)を、293T細胞上の力価によって測定した。

10

【0103】

2. インビトロでの静止状態の感染したTCD4+リンパ球の感染および「ソーティング」

健康なドナーからの末梢血単核細胞を、密度勾配(Ficoll)によって単離し、24ウェルプレート上でVLP-Vpxの存在下、最終300μLの完全培地(RPMI 10%SVF)中 2×10^6 細胞/ウェルの濃度で12時間培養した。次いで、HIV-1-CMV-eGFP(10倍のMOIに相当する1μg p24)を添加することによって、細胞を感染させた。対照として、VLP-Vpx、HIV-1-CMV-eGFPの存在下で排他的に細胞を培養するか、または未治療のままにした。感染の3日後に、静止状態の感染した(XH+)TCD4+細胞(CD69-HLA-DR-)、HIV-1-CMV-eGFP(XH-)で排他的に治療された静止状態のTCD4+細胞、および対照(XまたはNT)を、ソーターによって単離した。ソートした細胞を、β-メルカプトエタノールを添加したRA1中に再懸濁し、全RNA抽出前に-80℃で貯蔵した。

20

30

【0104】

3. 全RNAシーケンシングおよび生物情報学的分析

XH+、XH-、X、およびNT分画に由来する全RNAを、GE Healthcare Illustra RNAミニキットを使用して抽出した。RNAの品質を、Agilentからの2100 Bioanalyzer上で、およびRNA Nanochipによって分析した。次いで、Illuminaライブラリーを確立した。シーケンシング前に、試料を多重化した。異なる分画について、正規化対数変換遺伝子発現カウントの主成分分析を実行した。

40

【0105】

4. HIV-1患者からの末梢血単核細胞の単離

有効に治療されたHIV-1患者からの末梢血単核細胞(ウイルス負荷<20コピーのRNA HIV-1/mL血液)を、密度勾配(Ficoll)によって単離した。

【0106】

5. TCD4+リンパ球の下位集団のフローサイトメトリーおよび「ソーティング」

健康なドナーおよびHIV-1患者からの末梢血のインビトロ感染に由来する細胞を、抗CD3、抗CD4、抗CD32、抗HLA-DR、および抗CD69抗体を使用してマークし、FACSによって分析した。HIV-1患者からの新鮮な細胞を、抗CD3、抗CD4、抗CD32、および抗HLA-DR抗体を使用してマークし、CD32マーカー

50

の発現の関数としてSH800 (Sony) を使用してソートするために、IgG2 アイソタイプ対照をマークした (全TC D 4 +、TC D 4 + CD 3 2 -、TC D 4 + CD 3 2 低、TC D 4 + CD 3 2 +)。各下位集団について、ソートした細胞の一部を、全H I V - 1 DNAの定量化のために乾燥ペレット中 - 80 で保持し、第2の部分、誘導性およびウイルス増幅試験のために培養した。

【0107】

6. 全H I V - 1 DNAの定量化

H I V - 1患者の血液から単離した異なる分画のDNAを、Q I A a m p DNAマイクロキット (Q i a g e n) を使用して精製した。DNA濃度を、 β -グロビンqPCRによって決定した。1細胞当たりの全H I V - 1 DNAのコピー数を、超高感度qPCR (B i c e n t r i c) によって決定した。

10

【0108】

具体的な説明

マーカー候補を同定するために、発明者らは、健康なドナーに由来する静止状態のTC D 4リンパ球が初めて感染するのを可能にするインビトロモデルを開発した。実際に、これらの細胞は、先行する活性化シグナル (TCRまたはPHA/I L 2による活性化) なしに、H I V - 1による感染に対して許容状態ではない。これらの細胞中の制限に關与するS A M H D 1タンパク質を同定する発明者らは、V p xタンパク質 (S I V m a c 2 5 1ウイルスによりコードされる) を含有するV L Pによる治療の開発を可能にし、制限を取り除くことを可能にし、活性化シグナルを必要とすることなく、感染の配向を可能にした。健康なドナーからのP B M Cが、V L P - V p xで治療され、次いでH I V - 1 - C M V - G F Pに感染したこのモデル (図1) を使用して、メッセンジャーRNA上でRNA - s e q実験を実行するために、感染細胞 (G F P +) の全RNAを抽出した。V L P - V p xで治療されたが、感染しなかったP B M C、ならびに非感染細胞は、対照として使用した。統計的および生物情報学的分析は、静止状態のTC D 4リンパ球の転写プログラムに対するH I V - 1感染の影響を決定するのを可能にした。

20

【0109】

実際に、主成分分析 (PCA) (図2) および階層的クラスタリングHC (図3) を、RNA - s e q結果に基づいて実行した。4ドナーに対して実行された2つの分析PCAおよびHCは、V L P - V p xで治療し、感染した細胞 (V L P - V p x G F P +) が、対照細胞 (V L P - V p x G F P -、V L P - V p xのみ、および非感染) の別個のクラスタを形成したことを証明した。これらの結果は、異なるドナーからのV L P - V p x G F P +細胞が、それらを他の集団と区別するサインを共有することを示す。したがって、感染中に、H I V - 1は、静止状態のTC D 4リンパ球の遺伝子発現を調整し、それらを非感染細胞と区別する表現型プロファイルに翻訳することができた。

30

【0110】

したがって、発明者らは、示差的に発現した遺伝子 (DE遺伝子) および特に潜伏性感染中の上方調節された遺伝子に興味を持った (図4および5)。したがって、表面タンパク質に対応する22マーカー候補は、インビトロでの検証のために選別された。健康なドナーからのP B M C上でインビトロモデルを使用することによって、22マーカーの発現を、静止状態の感染TC D 4リンパ球上でF A C S分析 (図6) により試験した。結果を、G F P +感染細胞および非感染細胞 (G F P -) 上のマーカー (# 1 ~ # 22) の発現率で提示する。この分析は、対照細胞と比較して、感染細胞上のCD 3 2マーカー (マーカー # 7) の特異的発現を明らかにした (図7および8)。したがって、マーカー候補の同定は、CD 3 2マーカーに焦点を当てた。

40

【0111】

図21は、他の9マーカーもまた、感染し、ウイルス性再発しやすい患者のTC D 4細胞の表面上で発現されることを示す。

【0112】

新たなドナーに対する分析を継続することにより、G F P高集団におけるこのマーカー

50

の発現レベルの富化を伴い潜在的に、感染細胞中のCD32マーカーの特異的発現の誘導を確認することが可能になった(図9Aおよび9B、ならびに10Aおよび10B)。発明者らはまた、CD32マーカーの誘導が、静止状態の集団に限定されることを示した。実際に、TCR経路により刺激された細胞(抗CD3/抗CD28)は、CD32マーカーを発現しない(図11Aおよび11B)。VSVウイルスのエンベロープを介した偽型ウイルスの使用は、CD8などの他の感染集団上のこのマーカーの誘導を実証するのを可能にした(図12)。加えて、HIV-2およびSIVレンチウイルスが、HIV-1と同じ方法でCD32の発現を誘導するかどうかを決定した。図13Aおよび13Bは、SIVおよびHIV-2が、Vpxの存在下で静止状態の感染TC4細胞の表面上にCD32の発現を誘導可能であることを示す。

10

【0113】

CD32マーカーをインビトロで検証した後に、発明者らは、エクスピボでその関連を確立しようとした。したがって、TC4細胞リンパ球上のこのマーカーの発現レベルの表現型FACS分析を、健康なドナーと比較して、感染し、抗ウイルスで有効に治療した患者のPBMC上で実行した。患者におけるCD32の著しく高い発現を証明することができた(図14Aおよび14B)。

【0114】

最後に、発明者らは、2人のウイルス抑制された患者においてCD32マーカーを示差的に発現するTC4リンパ球の異なる下位群(全TC4、TC4 CD32⁻、TC4 CD32^低、およびTC4 CD32⁺)におけるHIV-1 DNAによる富化のレベルを調査した。これらの異なる集団をソートした後に(図15A~15C)、ゲノムDNAを抽出し、全HIV-1 DNAを、異なる分画中でqPCRにより定量化した。2人の患者について得られた結果は、このマーカーを発現しないTC4と比較して、CD32マーカーを発現するTC4分画中のHIV-1 DNAの強力な富化を示す(図16)。

20

【0115】

故にこのインビトロおよびエクスピボ結果の組は、HIV-1に感染した細胞の特異的マーカーとしてCD32を検証するのを可能にした。CD32の同定は、HIV-1に感染した細胞を直接標的とすることを目的とする新たな戦略を確立するのを可能にし、ウイルスリザーバがパージされるのを可能にし、AIDSの治癒を可能にする。

30

【0116】

実施例2

HIV-1患者の血液から単離された細胞下位集団を、IL2(50IU/mL)の存在下、PHAまたは抗CD3、抗CD28、および抗CD2ビーズ(Miltenyi)などの賦活剤の不在下または存在下で培養した。TC4⁺およびTC4⁺ CD32⁻分画を、24ウェルプレート上で1mLの完全培地当たり10⁶細胞の濃度で培養し、p24 ELISA試験のために、上清を2日毎に回収した。

【0117】

以下の表および図17に結果を記載する。

【表1】

40

患者	CD4細胞100万個当たりの感染 単位(IUPM) (95% IC)	CD4 CD32 a+細胞のIUPM (95% IC)
27	2.2 (0.51~9.44)	4977 (533~46,400)
489	5.5 (1.33~23.01)	16,422 (1841~146,000)
566	2.2 (0.51~9.44)	2326 (249~21,700)
771	2.2 (0.51~9.44)	2158 (231~20,100)

50

【0118】

この第1の実験は、CD32 + 分画を含有する全TC4 + リンパ球からの新たなウイルス粒子の産生が、TC4 + CD32 + 細胞の場合よりも低いことを証明しようとし、これはウイルスリザーバが、CD32 a + 細胞であることを示す。得られた結果は、全TC4 + リンパ球に対して、TC4 + CD32 a + 細胞中のIUPM数の3000倍の富化を示す。

【0119】

第2の実験では、3患者の血液から単離されたTC4 + リンパ球を、ウイルス産生対照としてインビトロでポリクロー的に活性化した(抗CD3 / 抗CD28 + IL2)。同時に同じ患者について、CD32 a マーカーを発現する細胞中で枯渇したTC4 + リンパ球もまた、単離され、次いで同じ条件下インビトロで活性化した。

10

【0120】

TC4 + CD32 低およびCD32 + 分画を、丸底96ウェルプレート上で培養した後、SIMOAによるウイルス増幅試験、超高感度p24 ELISAアッセイのために、培養物上清を3日毎に除去して、2000 MT4C5細胞に添加する。この第2の実験は、TC4 + CD32 + およびTC4 + CD32 低の活性化によって産生が誘導されたウイルスが、共培養において産生性感染を確立可能であることを実証することを目的とする。

【0121】

この実験は、CD32 + 細胞中で枯渇したTC4 + 細胞とは逆に、CD32 + 分画を含有する全TC4 + リンパ球からの新たなウイルス粒子の産生を誘導することが可能であることを証明しようとした。

20

【0122】

結果を図18に記載する。

【0123】

全TC4 + 細胞(黒色の点)とTC4 + CD32 a - 細胞(灰色の点)との間のウイルス複製動態の比較の結果は、TC4 + CD32 a + の枯渇が、ウイルス複製の大幅な遅延につながることである。これらの結果は、TC4 + CD32 a + 細胞が、感染し、ウイルス複製可能な細胞の全リザーバに著しく寄与することを確認する。

【0124】

実施例3

この実施例では、発明者らは、患者に由来し、CD32中で枯渇したTC4細胞の集団がどのように、活性化後にHIVウイルスを常に再活性化し得るかを理解しようとした。

30

【0125】

他の上記マーカーを試験し、CD32を発現するもの以外のリザーバを特定した。

【0126】

特に、発明者らは、TC4 CD89 + 細胞が、ウイルスリザーバを形成したことを特定した。実施例1と同じプロトコルを使用した。

【0127】

4患者において、特異的抗体によるマーキングは、TC4 + リンパ球の表面上のCD89の発現を証明するのを可能にした。これらの細胞の表面上のCD89マーカーの発現が、その感染につながったことを実証するために、全TC4 + リンパ球のみならず、TC4 + CD32 a - CD89 - 細胞およびTC4 + CD32 a - CD89 + 細胞もまた、上記のように(代表的な患者に対する開窓戦略)これらの同じ患者から単離した。結果を図19A ~ 19Fに記載する。

40

【0128】

実施例1と同じプロトコルに従い、これらの分画の各々に存在するウイルスDNAを、qPCR DNA HIV-1によって定量化した(図20)。試験した患者において、CD89マーカーは、実際に、感染細胞のリザーバを同定する(TC4 + CD32 a

50

- C D 8 9 + 細胞当たり 0 . 1 H I V - 1 D N A コピーの近似中央値)。

【 0 1 2 9 】

実施例 4

研究を継続するために、発明者らは、異なるマーカー候補が、ウイルスリザーバであるとして同定された細胞中で同時発現したかどうかを最後に試験した。

【 0 1 3 0 】

図 2 2 は、T C D 4 細胞 (C D 3 2 を発現しない) の表面上に C D 8 9 マーカーが発現される、6 つのマーカーを示し、これらのマーカーは、H I V に感染した細胞の 1 7 ~ 3 0 % を表し、したがって当該 H I V を再活性化する可能性が高い。

【 0 1 3 1 】

C D 8 9 マーカーが、C D 3 2 について同定されたもの以外のリザーバを形成するかどうかを特定するために、発明者らは、患者からの細胞集団上の C D 3 2 および C D 8 9 の共発現を試験した。

【 0 1 3 2 】

結果を図 2 3 に記載する。

【 0 1 3 3 】

これらの結果は、2 つのマーカー、C D 3 2 および C D 8 9 が互いに排他的であり、各々が別々のリザーバを同定することを示す。

【 0 1 3 4 】

実施例 5

C D 3 2 に対して配向される本発明の抗体は、当業者に既知の様々な技法、特に下記のものによって産生され得る。

【 0 1 3 5 】

B A L B / c マウスは、総ヒト C D 3 2 タンパク質で、またはヒト免疫グロブリンの F c ドメインに融合された細胞外断片で免疫付与される。マウスに、皮下投与によって、1 0 μ g のタンパク質または断片を、0 日目、1 4 日目、および 2 8 日目に、フロイント完全アジュバント (第 1 の注入)、または不完全アジュバント (第 2 および第 3 の注入) の存在下で注入する。マウスの脾細胞を、上記プロトコル (S a l h i e t a l . B i o c h e m . J . 2 0 0 4) に従い、マウス骨髄腫細胞 (P X 6 3 . A g 8 . 6 5 3 ; A T C C、R o c k v i l l e , M D) に融合させる。ハイブリドーマの選別を可能にする H A T 培地中の培養プレート上で (1 ウェル当たり 10^5 細胞)、細胞を培養する。1 2 日後に、上清を回収し、C D 3 2 へのそれらの結合について、E L I S A によって試験する。したがって、細胞を限界希釈によってサブクロニングステップに供し、次いで陽性クローンを、単離するために限界希釈によって第 2 のサブクロニングサイクルに供し、E L I S A に従い、精製されたクローンは、最高の親和性を有する。次いで、これらのクローンを更に大きな規模で培養して、抗体をインビトロで産生する。次いで、タンパク質 G 親和性クロマトグラフィーカラム中で上清を精製する。

【 0 1 3 6 】

W O 2 0 0 7 / 0 7 4 4 9 6 に記載されるように改変ベクターを使用するファージディスプレイ、またはファージディスプレイ選別に続くバイオパニング選別 (K r e b b e r e t a l , (1 9 9 7)、W O 2 0 0 6 / 1 1 7 6 9 9) の技法はまた、C D 3 2 に対して配向された高親和性抗体を得るための別の代替例である。

【 0 1 3 7 】

次いで、選別されたハイブリドーマのシーケンシングまたは選別されたファージ既に知られている得られたシーケンシングは、可変領域、またはより具体的にはプラスミド中のエピトープへの特異的結合に關与する C D R のクローン化を可能にし、形質移入後、C H O 細胞などの細胞を産生する際に、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体の産生および入手を可能にする。

【 0 1 3 8 】

抗 C D 3 抗体は、同じステップを実行することによって得られる。次いで、単一特異性

10

20

30

40

50

抗CD32または二重特異性抗CD32/CD3ヒト化またはヒト抗体の作成は、以前に得られた配列を使用することを必要とする（対応する抗原（それぞれCD32およびCD3）またはバクテリオファージに対して最良親和性を有するハイブリドーマ）。抗体がハイブリドーマに由来する場合、CDRは、抗原を認識するために重要なアミノ酸、およびCDRの良好な折り畳みを可能にする構造アミノ酸を最適化するように、突然変異誘発によって改変される。ヒト化のステップは、マウスハイブリドーマに由来する配列を、ヒト抗体配列のデータベース、Kabatデータベースと比較することを必要とする。次いで、それらのマウス性質に起因して潜在的に免疫原性であるアミノ酸が改変される。ヒト化後に、抗体がハイブリドーマによって得られた場合、または配列から開始して、ファージディスプレイ技法の場合に得られた場合、2つの抗原（CD32およびCD3）に対して配向されたヒト化/ヒト重（VH）および軽（VL）可変領域についてコードする配列を、真核発現ベクターへの融合によってクローン化して、CHO細胞中の産生を可能にする。

【0139】

本発明は、本明細書に記載される実施形態に限定されず、他の実施形態が当業者に明らかとなるであろう。

【図1】

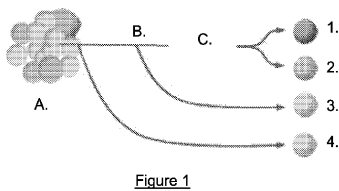


Figure 1

【図3】

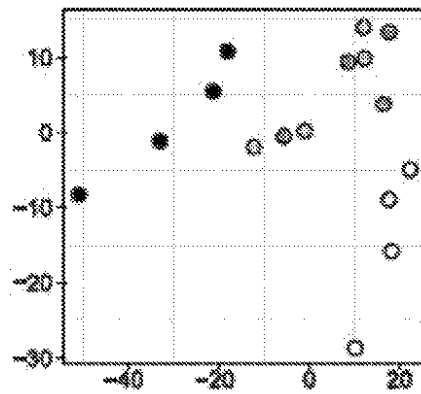


Figure 3

【図2】

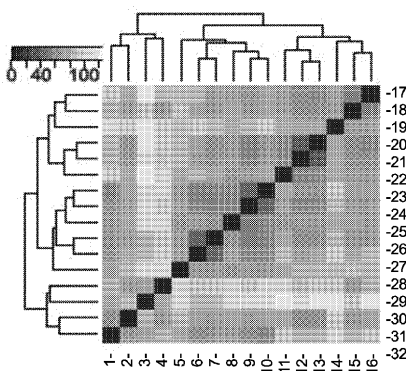


Figure 2

【 図 4 】

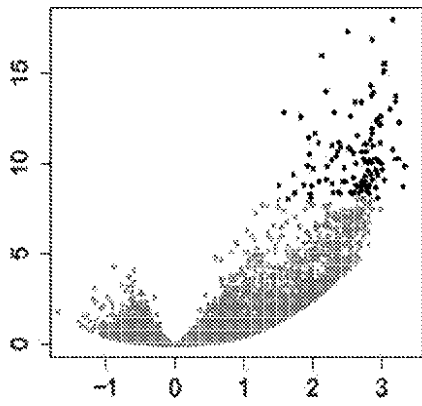


Figure 4

【 図 5 】

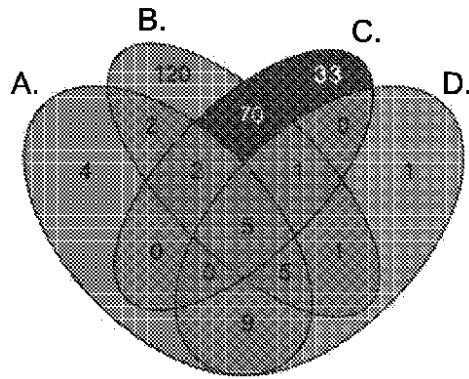


Figure 5

【 図 6 】

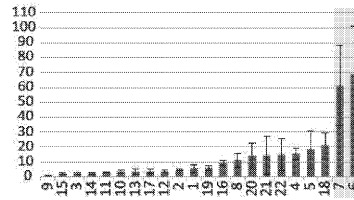


Figure 6

【 図 7 】

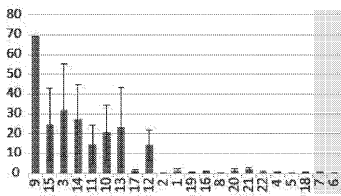


Figure 7

【 図 9 A 】

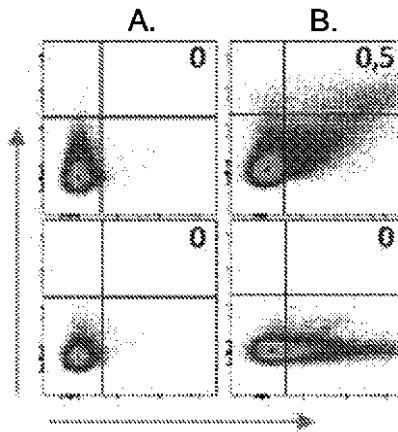


Figure 9A

【 図 8 】

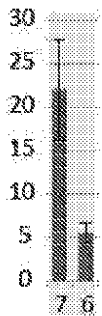


Figure 8

【 図 9 B 】

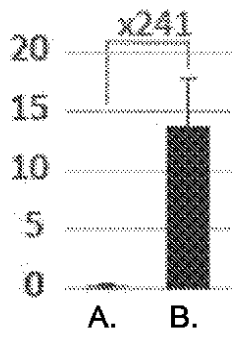


Figure 9B

【 図 1 0 A 】

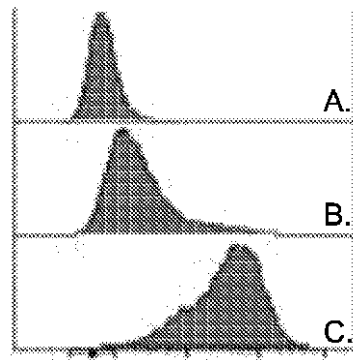


Figure 10A

【 図 1 0 B 】

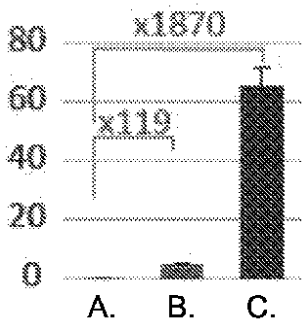


Figure 10B

【 図 1 1 A 】

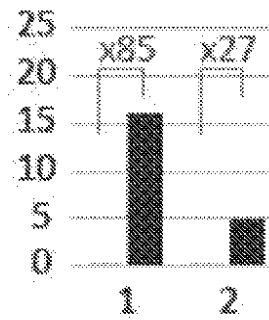


Figure 11A

【 図 1 1 B 】

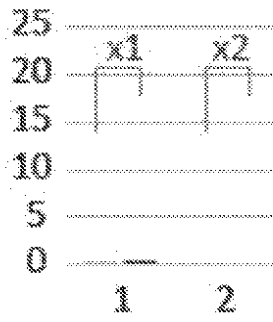


Figure 11B

【 図 1 2 】

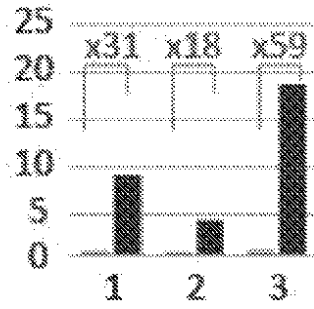


Figure 12

【 図 1 3 A 】

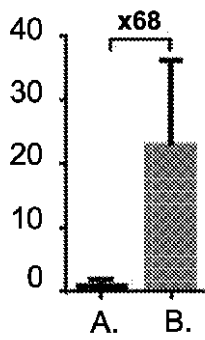


Figure 13A

【 図 1 3 B 】

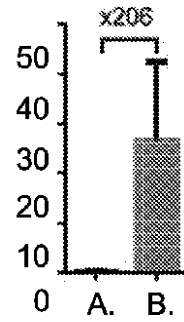
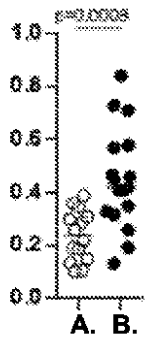


Figure 13B

【 図 1 4 A 】



Figures 14A

【 図 1 4 B 】

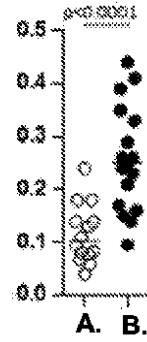


Figure 14B

【 図 1 5 A 】

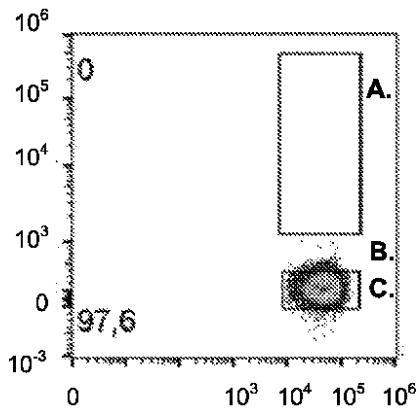


Figure 15A

【 図 1 5 B 】

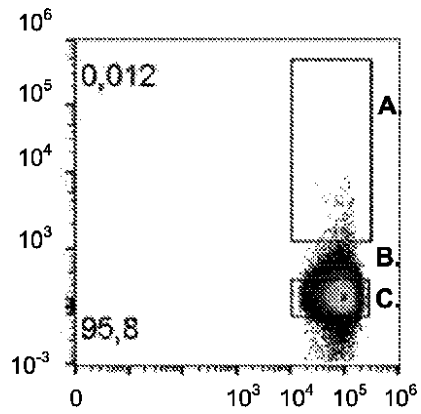


Figure 15B

【 図 15 C 】

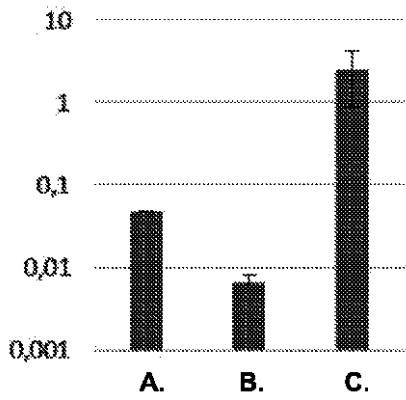


Figure 15C

【 図 16 】

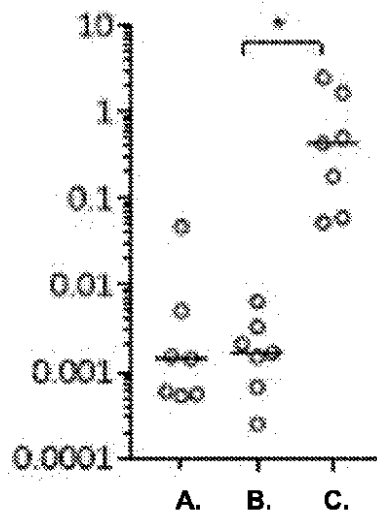


Figure 16

【 図 17 】

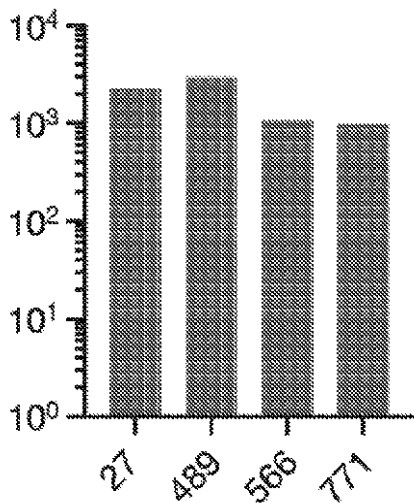
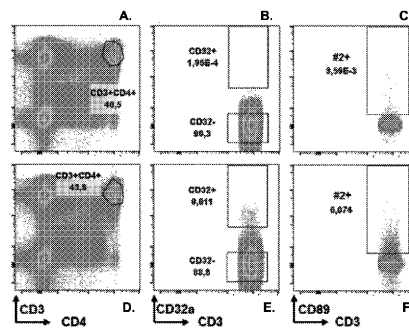


Figure 17

【 図 19 】



Figures 19

【 図 18 】

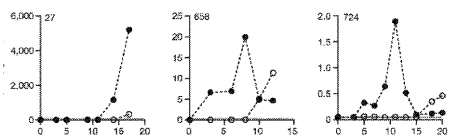


Figure 18

【 図 2 0 】

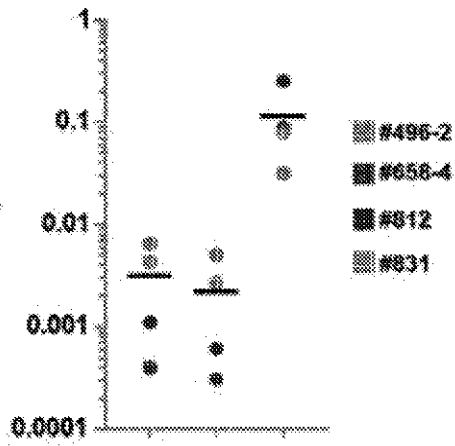


Figure 20

【 図 2 1 】

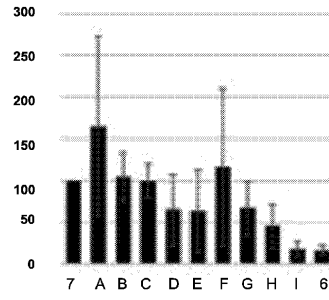


Figure 21

【 図 2 2 】

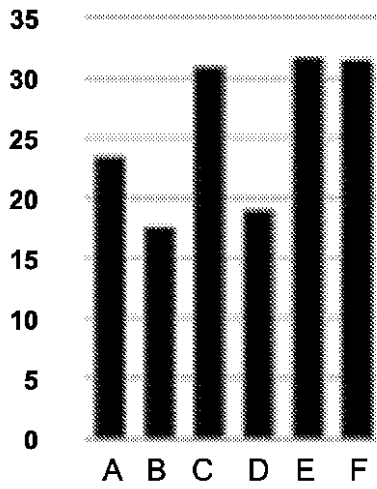


Figure 22

【 図 2 3 】

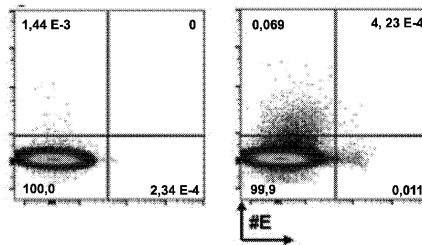


Figure 23

【配列表】

2019535011000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2017/056054

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/569 C07K16/46 C12N5/0781 C12N5/0783 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 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, COMPENDEX, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PETITJEAN ET AL: "Isolation and characterization of HIV-1-infected resting CD4<+> T lymphocytes in breast milk", JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 1, 17 April 2007 (2007-04-17), pages 1-8, XP022032673, ISSN: 1386-6532, DOI: 10.1016/J.JCV.2007.02.004 the whole document abstract page 2, section 2.3 Isolation of resting CD4+ T cells from BMC samples page 2, section 2.4 Isolation of resting CD4+ T cells from blood samples pages 3-5, section 2.6 Resting CD4+ T cell polyclonal activation, culture conditions and HIV-1-Ag-ELISpot assay ----- -/--	1-4, 6-12,16, 17,19,20
<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 : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 February 2018		13/03/2018
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
		Gall-Truchot, A

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2017/056054

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 2016/102829 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 30 June 2016 (2016-06-30)</p> <p>the whole document abstract page 8, line 35 - page 9, line 21 claim 10</p> <p>-----</p>	1-4, 6-12,16, 17,19,20
A	<p>GREGORY M. LAIRD ET AL: "Rapid Quantification of the Latent Reservoir for HIV-1 Using a Viral Outgrowth Assay", PLOS PATHOGENS, vol. 9, no. 5, 30 May 2013 (2013-05-30), page e1003398, XP055204081, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003398</p> <p>the whole document abstract page 2, right-hand column, paragraph 1; figure 1</p> <p>-----</p>	1-4, 6-12,16, 17,19,20
X	<p>WO 2015/021089 A1 (MACROGENICS INC [US]) 12 February 2015 (2015-02-12)</p> <p>the whole document</p>	13,15
Y	<p>abstract claim 1</p> <p>-----</p>	14
Y	<p>WO 2015/149077 A1 (XENCOR INC [US]) 1 October 2015 (2015-10-01)</p> <p>the whole document abstract paragraph [0328] - paragraph [0330] paragraph [0340] - paragraph [0341] paragraph [0357] - paragraph [0358] figure 11 claim 1 paragraph [0323] - paragraph [0327]</p> <p>-----</p>	14
Y	<p>WO 2016/110576 A1 (GENMAB AS [DK]) 14 July 2016 (2016-07-14)</p> <p>the whole document abstract claim 1</p> <p>-----</p>	14
T	<p>BENJAMIN DESCOURS ET AL: "CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses", NATURE, vol. 543, no. 7646, 15 March 2017 (2017-03-15), pages 564-567, XP055374988, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature21710</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2017/056054

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-4, 6-17, 19, 20
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2017/056054

This International Searching Authority found multiple inventions or groups of inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-4, 6-12, 16, 17, 19, 20

Methods and kits for the detection of cellular reservoirs infected with a mammalian immunodeficiency virus, based on detecting lymphocyte cells that express differentiation marker CD32 on the surface thereof, and uses of same

2. Claim: 5

Lymphocyte cells expressing differentiation marker CD32 on the surface thereof and comprising, in the nuclear deoxyribonucleic acid thereof, the genetically modified genome of a mammalian immunodeficiency virus

3. Claims: 13-15

Multi-specific antibodies that recognise both an epitope of marker CD32 and a characteristic marker of lymphocyte cells

4. Claims: 18, 21, 22

Composition comprising an antibody as defined in any of claims 13 to 15 and a combination of retroviral agents, and uses thereof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2017/056054

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016102829 A1	30-06-2016	EP 3237644 A1	01-11-2017
		FR 3030576 A1	24-06-2016
		US 2017350889 A1	07-12-2017
		WO 2016102829 A1	30-06-2016

WO 2015021089 A1	12-02-2015	AU 2014306105 A1	18-02-2016
		CA 2920021 A1	12-02-2015
		CN 105611943 A	25-05-2016
		DO P2016000044 A	15-04-2016
		EA 201690325 A1	30-09-2016
		EP 3030264 A1	15-06-2016
		GE P201706794 B	11-12-2017
		JP 2016527314 A	08-09-2016
		KR 20160042004 A	18-04-2016
		PE 05082016 A1	21-05-2016
		PH 12016500242 A1	16-05-2016
		SG 11201600855V A	30-03-2016
		TW 201536805 A	01-10-2015
		US 2016194396 A1	07-07-2016
WO 2015021089 A1	12-02-2015		

WO 2015149077 A1	01-10-2015	AU 2015237184 A1	20-10-2016
		CA 2943621 A1	01-10-2015
		CN 106471009 A	01-03-2017
		CR 20160506 A	10-03-2017
		EA 201691925 A1	30-06-2017
		EP 3122781 A1	01-02-2017
		JP 2017511130 A	20-04-2017
		KR 20160136422 A	29-11-2016
		PE 14312016 A1	22-01-2017
		PH 12016501908 A1	09-01-2017
		SG 11201607983Y A	28-10-2016
		US 2015307629 A1	29-10-2015
		WO 2015149077 A1	01-10-2015

WO 2016110576 A1	14-07-2016	AU 2016205967 A1	27-07-2017
		CA 2973159 A1	14-07-2016
		CN 107660214 A	02-02-2018
		EA 201791554 A1	29-12-2017
		EP 3242682 A1	15-11-2017
		KR 20170128222 A	22-11-2017
		SG 11201705496S A	30-08-2017
		US 2017355767 A1	14-12-2017
WO 2016110576 A1	14-07-2016		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2017/056054

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N33/569 C07K16/46 C12N5/0781 C12N5/0783 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N C07K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, COMPENDEX, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PETITJEAN ET AL: "Isolation and characterization of HIV-1-infected resting CD4<+> T lymphocytes in breast milk", JOURNAL OF CLINICAL VIROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 1, 17 avril 2007 (2007-04-17), pages 1-8, XP022032673, ISSN: 1386-6532, DOI: 10.1016/J.JCV.2007.02.004 le document en entier abrégé page 2, section 2.3 Isolation of resting CD4+ T cells from BMC samples page 2, section 2.4 Isolation of resting CD4+ T cells from blood samples pages 3-5, section 2.6 Resting CD4+ T cell polyclonal activation, culture conditions and HIV-1-Ag-ELISpot assay ----- -/--	1-4, 6-12,16, 17,19,20
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)		*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
26 février 2018	13/03/2018	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Gall-Truchot, A	

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/IB2017/056054

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 2016/102829 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 30 juin 2016 (2016-06-30)</p> <p>le document en entier abrégé page 8, ligne 35 - page 9, ligne 21 revendication 10</p> <p>-----</p>	1-4, 6-12,16, 17,19,20
A	<p>GREGORY M. LAIRD ET AL: "Rapid Quantification of the Latent Reservoir for HIV-1 Using a Viral Outgrowth Assay", PLOS PATHOGENS, vol. 9, no. 5, 30 mai 2013 (2013-05-30), page e1003398, XP055204081, DOI: 10.1371/journal.ppat.1003398</p> <p>le document en entier abrégé page 2, colonne de droite, alinéa 1; figure 1</p> <p>-----</p>	1-4, 6-12,16, 17,19,20
X	<p>WO 2015/021089 A1 (MACROGENICS INC [US]) 12 février 2015 (2015-02-12)</p> <p>le document en entier</p>	13,15
Y	<p>abrégé revendication 1</p> <p>-----</p>	14
Y	<p>WO 2015/149077 A1 (XENCOR INC [US]) 1 octobre 2015 (2015-10-01)</p> <p>le document en entier abrégé alinéa [0328] - alinéa [0330] alinéa [0340] - alinéa [0341] alinéa [0357] - alinéa [0358] figure 11 revendication 1 alinéa [0323] - alinéa [0327]</p> <p>-----</p>	14
Y	<p>WO 2016/110576 A1 (GENMAB AS [DK]) 14 juillet 2016 (2016-07-14)</p> <p>le document en entier abrégé revendication 1</p> <p>-----</p>	14
T	<p>BENJAMIN DESCOURS ET AL: "CD32a is a marker of a CD4 T-cell HIV reservoir harbouring replication-competent proviruses", NATURE, vol. 543, no. 7646, 15 mars 2017 (2017-03-15), pages 564-567, XP055374988, United Kingdom ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature21710</p> <p>le document en entier</p> <p>-----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/IB2017/056054

Cadre n° II Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Le rapport de recherche internationale n'a pas été établi en ce qui concerne certaines revendications conformément à l'article 17.2)a) pour les raisons suivantes :

1. Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration chargée de la recherche internationale n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir :

2. Les revendications n^{os} parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier :

3. Les revendications n^{os} parce qu'elles sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre n° III Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1. Comme toutes les taxes additionnelles exigées ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les revendications qui se prêtent à la recherche ont pu faire l'objet de cette recherche sans effort particulier justifiant des taxes additionnelles, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucunes taxes de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}:
1-4, 6-17, 19, 20

4. Aucune taxes additionnelles demandées n'ont été payées dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}.

- Remarque quant à la réserve**
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant et, le cas échéant, du paiement de la taxe de réserve.
- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant mais la taxe de réserve n'a pas été payée dans le délai prescrit dans l'invitation.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Demande internationale No. PCT/ IB2017/ 056054

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1-4, 6-12, 16, 17, 19, 20

méthodes et kits de détection de cellules réservoirs de cellules infectées par un virus de l'immunodéficience chez les mammifères, basés sur la détection des cellules lymphocytaires exprimant à leur surface le marqueur de différenciation CD32, et leurs usages

2. revendication: 5

cellules lymphocytaires exprimant à leur surface le marqueur de différenciation CD32 et comprenant dans leur acide désoxyribonucléique nucléaire le génome génétiquement modifié d'un virus de l'immunodéficience chez les mammifères

3. revendications: 13-15

anticorps multispécifiques reconnaissant d'une part un épitope du marqueur CD32 et d'autre part un marqueur caractéristique des cellules lymphocytaires

4. revendications: 18, 21, 22

composition comprenant un anticorps tel que défini dans l'une quelconque des revendications 13 à 15 et une combinaison d'agents anti-retroviraux, et ses usages

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/IB2017/056054

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication		
WO 2016102829 A1	30-06-2016	EP 3237644 A1	01-11-2017		
		FR 3030576 A1	24-06-2016		
		US 2017350889 A1	07-12-2017		
		WO 2016102829 A1	30-06-2016		

WO 2015021089 A1	12-02-2015	AU 2014306105 A1	18-02-2016		
		CA 2920021 A1	12-02-2015		
		CN 105611943 A	25-05-2016		
		DO P2016000044 A	15-04-2016		
		EA 201690325 A1	30-09-2016		
		EP 3030264 A1	15-06-2016		
		GE P201706794 B	11-12-2017		
		JP 2016527314 A	08-09-2016		
		KR 20160042004 A	18-04-2016		
		PE 05082016 A1	21-05-2016		
		PH 12016500242 A1	16-05-2016		
		SG 11201600855V A	30-03-2016		
		TW 201536805 A	01-10-2015		
		US 2016194396 A1	07-07-2016		
		WO 2015021089 A1	12-02-2015		

WO 2015149077 A1	01-10-2015	AU 2015237184 A1	20-10-2016		
		CA 2943621 A1	01-10-2015		
		CN 106471009 A	01-03-2017		
		CR 20160506 A	10-03-2017		
		EA 201691925 A1	30-06-2017		
		EP 3122781 A1	01-02-2017		
		JP 2017511130 A	20-04-2017		
		KR 20160136422 A	29-11-2016		
		PE 14312016 A1	22-01-2017		
		PH 12016501908 A1	09-01-2017		
		SG 11201607983Y A	28-10-2016		
		US 2015307629 A1	29-10-2015		
		WO 2015149077 A1	01-10-2015		

		WO 2016110576 A1	14-07-2016	AU 2016205967 A1	27-07-2017
CA 2973159 A1	14-07-2016				
CN 107660214 A	02-02-2018				
EA 201791554 A1	29-12-2017				
EP 3242682 A1	15-11-2017				
KR 20170128222 A	22-11-2017				
SG 11201705496S A	30-08-2017				
US 2017355767 A1	14-12-2017				
WO 2016110576 A1	14-07-2016				

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	

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

(74) 代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74) 代理人 100120617

弁理士 浅野 真理

(74) 代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74) 代理人 100188651

弁理士 遠藤 広介

(72) 発明者 モンセフ、ベンキラネ

フランス国サン、ジェリー、デュ、フェス、クロ、デュ、プティ、パリ、2

(72) 発明者 ガエル、プティジャン

フランス国モンペリエ、リュ、デュ、トリュエル、3 3

(72) 発明者 ベンジャマン、デクール

フランス国モンペリエ、レジダンス、ル、プラン、デ、4、セニウル、リュ、フランシス、ロペ、1 1 1

F ターム(参考) 4B065 AA90X AA94X AA97X AB01 AC20 CA25 CA46

4C084 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB09 ZB33 ZC55

4C085 AA14 EE03

4H045 AA11 AA30 BA70 CA40 DA76 DA86 EA50 FA74

专利名称(译)	细胞标记		
公开(公告)号	JP2019535011A	公开(公告)日	2019-12-05
申请号	JP2019517293	申请日	2017-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	中心国家德拉插座雅倩香提网络点击 海胆威赛引用和蒙彼利埃		
申请(专利权)人(译)	中心国家德拉Reserushu香提网络点击 Univerushite蒙彼利埃		
发明人	モンセフ、ベンキラネ ガエル、プティジャン ベンジャマン、デクール		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 C12N7/00 C07K16/28 A61K45/00 A61K39/395 A61P31/12 A61P31/18 A61P37/04		
CPC分类号	A61P31/12 A61P31/18 A61P37/04 A61P43/00 C12N5/0636 C12N2501/2302 C12N2501/515 C12N2501 /53 G01N33/56988 G01N2333/70535 A61K39/3955 A61K45/06 C07K16/2809 C07K16/283 C07K2317 /31 G01N2333/7051 G01N2800/26 G01N2800/54		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y G01N33/569.H C12N7/00 C07K16/28 A61K45/00 A61K39/395.N A61P31/12 A61P31/18 A61P37/04		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AA94X 4B065/AA97X 4B065/AB01 4B065/AC20 4B065/CA25 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C084/ZB33 4C084/ZC55 4C085 /AA14 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA70 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	永井裕之 中村KoTakashi 朝仓悟 浅野麻里 反町隆史博 Hirosuke远藤		
优先权	2016059440 2016-09-30 FR 2017052126 2017-03-15 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及分化标志物CD32在检测哺乳动物免疫缺陷病毒细胞内贮库中的用途。

(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2019-535011 (P2019-535011A)
	(43) 公表日	令和1年12月5日(2019.12.5)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	Z N A Y 4 B 0 6 5
G01N 33/569 (2006.01)	G01N 33/569	H 4 C 0 8 4
C12N 7/00 (2006.01)	C12N 7/00	4 C 0 8 5
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4 H 0 4 5
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2019-517293 (P2019-517293)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成29年9月30日(2017.9.30)	セントレ ナショナル デ ラ レセルシ ユ シャンティフィク
(23) 翻訳文提出日	令和1年5月29日(2019.5.29)	フランス国 F-75794 ハリ セデ ックス 16 ルー ミシエル アンジュ 3
(24) 国際出願番号	PCT/FR2017/050054	(71) 出願人
(25) 国際公開番号	WO2018/060978	ウニヴェルシテ・ドゥ・モンペリエ フランス・F-34090・モンペリエ・ リュ・オーギュスト・ブルズネ・163
(26) 国際公開日	平成30年4月5日(2018.4.5)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	16/59440	弁理士 永井 浩之
(32) 優先日	平成28年9月30日(2016.9.30)	弁理士 中村 行孝
(33) 優先権主張国・地域又は機関	フランス (FR)	
(31) 優先権主張番号	17/52126	
(32) 優先日	平成29年3月15日(2017.3.15)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関	フランス (FR)	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 細胞マーカー		