

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4264256号
(P4264256)

(45) 発行日 平成21年5月13日(2009.5.13)

(24) 登録日 平成21年2月20日(2009.2.20)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 33/15 (2006.01) GO 1 N 33/15 Z
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 10 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2002-536538 (P2002-536538)	(73) 特許権者	502377213
(86) (22) 出願日	平成13年10月22日 (2001.10.22)		ビルコ・ビーブイビーエイ
(65) 公表番号	特表2004-511800 (P2004-511800A)		ベルギー・ビー-2800メシユレン・ジ
(43) 公表日	平成16年4月15日 (2004.4.15)		エネラールドウイツテラールエル11ビー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/012337		4
(87) 国際公開番号	W02002/033402	(74) 代理人	110000741
(87) 国際公開日	平成14年4月25日 (2002.4.25)		特許業務法人小田島特許事務所
審査請求日	平成16年6月30日 (2004.6.30)	(72) 発明者	ヘルトグス, クルト
(31) 優先権主張番号	60/241, 836		ベルギー・ビー-2018アントワーペン
(32) 優先日	平成12年10月20日 (2000.10.20)		・キンテンマテイスレイ11/42
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ラーダー, ブレンダン
前置審査			イギリス・ケンブリッジシヤー シービー
			3 7エイチキュー・ケンブリッジ・チャ
			ーチレーン・モノナ6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療に対する耐性を予測するための生物学的カット-オフ値の確立

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つのH I V治療に対するH I V感染の耐性を予測するための方法に従って決定された少なくとも1つのH I V治療のためのカット-オフ倍数耐性値を決定することを含んでなる、少なくとも1つのH I V治療に対する患者の耐性を決定する方法であって

a) 該少なくとも1つのH I V治療に関する患者サンプルの感度を決定し、ここで患者サンプルの感度が少なくとも1つの遺伝子型アッセイまたは表現型アッセイを行うことにより決定され;

b) 該少なくとも1つのH I V治療に関する参照サンプルの感度を決定し、ここで参照サンプルの感度が少なくとも1つの遺伝子型アッセイまたは表現型アッセイを行うことにより決定され;

c) b) で得た感度に対する a) で得た感度の比率から、患者の倍数耐性を決定し;

d) 患者の倍数耐性がカット-オフ倍数耐性値より高いかどうかを決定することにより、少なくとも1つのH I V治療に対する疾患耐性を予測し、

e) ここでカット-オフ耐性値は、ある患者群について定められた、少なくとも1つのH I V治療に関する患者の倍数耐性値の平均および分布の標準偏差から決定され、

f) それによって少なくとも1つのH I V治療に対する患者の耐性を決定する、ことを含んで成る上記方法。

【請求項2】

10

20

上記の患者サンプルが処置を受けていない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

カット - オフ倍数耐性値が、患者の倍数耐性値の平均に患者の倍数耐性値の分布の標準偏差の 2 倍を加えて定められる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

表現型アッセイが、ブランク減少アッセイ、末梢血単核細胞p24成長阻害アッセイ、組換えウイルスアッセイ、グリーン蛍光タンパク質マーカーアッセイおよび細胞培養アッセイの少なくとも 1 つを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

治療が抗ウイルス療法である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 6】

治療がプロテアーゼインヒビター療法を含んで成る、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

治療が逆転写酵素インヒビター療法を含んで成る、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

逆転写酵素インヒビター療法が、非-ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター療法である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

治療が AZT、ddI、ddC、d4T、アバカビル、ネビラピン、デラビルジン、エファビレンツ、インジナビル、リトナビル、ネルフィナビル、サキナビル、アンブレナビル、ロピナビ

20

【請求項 10】

治療がエンペロープインヒビター、融合およびインテグラーゼインヒビター処置の少なくとも 1 つを含んで成る、請求項 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、治療に対する疾患の耐性を予測する精度を改善するための方法および系に関する。より詳細には、本発明は表現型または遺伝子型の耐性試験に関する生物学的カット - オフ値を確立するために役立つ利用可能な治療について、個体間の治療耐性における自然な表現型の変動性を確立する方法を提供する。本発明は、疾患の表現型または遺伝子型を決定するために使用する試験またはアッセイと提携して使用することができる。例えば本発明は、種々の抗ウイルス剤に対するウイルス単離物の耐性を決定する試験に応用することができる。また本発明は特定の治療または治療の組み合わせに対する疾患の臨床的応答を予測する精度を改善するための方法および系に関する。

30

【0002】

本明細書で使用する用語「疾患」は、病原体の感染または悪性細胞の複製から生物に病理的状态を引き起こす病原体または悪性細胞を称する。本明細書で使用する用語「病原体」は、限定するわけではないが細菌、ヒト免疫不全症ウイルス (HIV)、C 型肝炎 (HCV) または B 型肝炎 (HBV) のようなウイルス、プリオン、藻類、菌類および原生生物を含む。

40

本明細書で使用する用語「悪性細胞」は、限定するわけではないが悪性の特徴を持つ細胞、増殖形質転換細胞、接触阻止の点の越えて成長し続ける細胞、同じ型の正常な細胞に比べて異常に高い頻度で分割する細胞、または退形成、侵襲および転移を表す細胞を含む。

本明細書で使用する治療とは、任意の動物、植物、鉱物、医薬物質、放射の状態、または病原体もしくは悪性細胞を処置するために使用する遺伝子治療を称する。用語「有効成分」とは、化学品、薬剤、それらの化合物、ペプチド、タンパク質、抗体、アプタマー、DNA (アンチ-センスDNAを含む)、RNA、リボザイムおよび医薬的に許容される組成物を含むと理解される。「患者サンプル」とは、血液、血清、血漿のような個体から得た任意のサンプルと定義する。このサンプル中、病原体または該病原体に由来するタンパク質もしくは核酸を使用することができる。「参照サンプル」とは、例えば HIV LAI 111B 株のような

50

標準的な研究用の参照病原体と定める。治療に対する「感受性 (susceptibility)」または「感度 (sensitivity)」とは、治療により影響を受ける疾患、悪性細胞および/または病原体の能力を称する。「耐性」とは、疾患、悪性細胞および/または病原体が治療により影響を受けない程度を称する。治療に対する疾患の感度、感受性または耐性は、 IC_{50} 値の平均により表すことができる。 IC_{50} 値は治療が存在しない病原体の成長に比べて、所定の治療が病原体に成長に抑制をもたらす濃度である。治療に対する疾患の耐性は、表現型または遺伝子型の改変により生じ得る。遺伝子型の改変には突然変異、単一ヌクレオチド多形、マイクロサテライト変異、メチル化のような翻訳後修飾を含む。表現型の変異は遺伝子型の変異により、または翻訳後修飾により影響を受け得る。

【0003】

治療に対する疾患の耐性の決定する技術は、ますます重要になって来ている。ウイルス耐性の発生と臨床的進行との間の関係を示唆する最初の報告が出てから、治療に対する病原体または悪性細胞の耐性を決定する技術が、治療計画の臨床的研究に包含されることが多くなった。引用により本明細書に編入するBrendan Larder et al., HIV耐性および治療との関係 (HIV Resistance and Implications for Therapy) (1998)。例えばウイルスでの感染のように、p53突然変異が特異的な抗ガン剤療法、放射線処置または遺伝子治療に対する腫瘍の反応も予測し得ることを示す報告もある。胸部ガンの場合、初期の研究でシスプラチンおよびタモキシフェン(商標)がp53突然変異を有する腫瘍を持つ患者に、より効果的であることが示された。すなわち耐性監視の目的は、医師が個々の患者に最も最適な治療の組み合わせを処方できるようにするために必要な情報の提供することである。

【0004】

より多くの治療的な選択が可能になれば、表現型の治療耐性試験は病原体の感染またはガンの管理および処置に、ならびに個別化された処置計画の開発に重要な役割を果たすと期待される [例えば、Haulbrich et al., JAIDS, 2001, 26S1, S51-S59を参照にされたい]。さらに薬剤耐性疾患の数も増える。表現型の方法は、病原体または悪性細胞が研究室で種々の治療 (1つまたは複数) の存在下で成長する能力を測定する。これは通常、 IC_{50} または IC_{90} 値の倍数-変化 (fold-change) (IC_{50} または IC_{90} 値は、それぞれ群の50%または90%が悪性細胞の複製を阻害される治療濃度である) として表す。高度に耐性な悪性細胞は、例えば IC_{50} において50または100倍の上昇を示す。幾つかの突然変異では IC_{50} がわずか2~3倍に上昇するだけである。遺伝子型の型別とは異なり、表現型による型別は治療 (1つまたは複数) の存在下で、悪性細胞群の挙動に基づき、既知のまたは未知のすべての突然変異の効果および相互作用を反映する感受性の直接的尺度である。一方、カット-オフ値は所定の治療に対する病原体の過敏性を示すために使用することができる。HIV突然変異の組み合わせが所定の治療に対する病原体の過敏性を導くことが証明された。

【0005】

表現型による型別は耐性試験の「ゴールドスタンダード (gold standard)」と考えられるが、その用途は例えば病原体または悪性細胞が耐性と考えられる IC_{50} における「カット-オフ」値の倍数の上昇に依存する。本明細書で使用する用語「カット-オフ値」は、病原体または悪性細胞が特定の治療に関して感受性が低下したと分類されるよりも上の感受性における変化を称する。本明細書で使用する「治療耐性」は、病原体または悪性細胞に対する治療の耐性、感度、感受性または効果の能力を意味する。最近、現在使用されているカット-オフ値の関連性に関する議論があった。例えば現在使用されているウイルス学のカット-オフ値は、試験する各治療に関して通常、同じ値であり、そして臨床的基準によって決定されるのではなく、例えば1つの野生型 (wt) 標準ウイルスの反復的試験で見られるアッセイの変動性により決定される。幾つかのウイルス学的カット-オフ値は、既知の応答データとは明らかに一致しない。例えば非ヌクレオチド逆転写酵素インヒビター (NNRTI) に対する低レベルの耐性の表示は、これまでに処置されなかった個体で治療に対して鈍い応答を導かない (Harrigan et al., Bachelor et al., 第4回 HIV薬剤耐性および処置法に関する国際ワークショップ (4th International Workshop on HIV Drug Resistance and Treatment Strategies)、シトゲス、スペイン、要約(2000))。主にアッセイの再

10

20

30

40

50

現性に基づくカット - オフ値を有する他のアッセイは各治療について同じであるか、または治療が臨床的な現場で病原体または悪性細胞に対して効くのかどうかには関係なく、したがってやや任意である。

本発明の要約および詳細な説明

「カット - オフ」値のこれらの問題の解決には、利用可能な治療に関して未処置個体間の治療耐性における自然な表現型の変動性を確立するための新しい方法が関与し、表現型の耐性試験について生物学的に関連するカット - オフ値を作成するために役立つ。得られた新規に定めたカット - オフ値（本明細書では生物学的カット - オフ値と呼ぶ）は、群中の自然な変動のより正確な反映であり、そしてウイルス学的なカット - オフ値よりも臨床的応答のよりよい予測を示すことができる。

10

【0006】

本発明の1つの態様では、生物学的カット - オフ値は、研究用の野生型標準病原体または悪性細胞参照サンプルに対する患者サンプルの感度における倍数変化（本明細書では「倍数耐性 (fold resistance)」とも呼ぶ）の平均および標準偏差 (SD) 値から決定し、これは生のデータが標準化された後に、各治療に対して患者サンプルが感受性において固有に異なる変動の程度を表すことを示すために算出される（例えば形質転換した対数）。平均および標準偏差は当業者に既知の任意の方法により算出することができる。

【0007】

1つの態様では、本発明は少なくとも1つの治療に対する疾患の耐性を予想する方法に関し、この方法は：

20

- a) 該少なくとも1つの治療に関する患者サンプルの感度を決定し；
 - b) 該少なくとも1つの治療に関する参照サンプルの感度を決定し；
 - c) b) で得た感度に対して a) で得た感度の比率から、患者の倍数耐性を決定し；
 - d) 患者の倍数耐性がカット - オフ倍数耐性値より高いかどうかを決定することにより、少なくとも1つの治療に対する疾患耐性を予測し、
- ここでカット - オフ耐性値は、ある患者群について定められた、少なくとも1つの治療に関する患者の倍数耐性値の平均および分布の標準偏差から決定する、ことを含んで成る。

【0008】

本発明に従い、倍数耐性の分布を確立するために有用な患者群は10~50人の患者である。好ましくは50~500人の患者群を使用して倍数耐性の分布を決定することができる。より好ましくは少なくとも500人の患者群を使用して倍数耐性の分布を決定することができる。分布は正規分布（ガウス分布）であることができ、または非正規分布であることができる。非正規分布は正規分布を得るために変換してもよい。

30

【0009】

幾つかの態様では、患者サンプルは処置を受けていない。処置を受けていないサンプルは野生型を予測する、またはその既知の配列に基づき当業者により野生型と分類される遺伝子材料のような病原材料を含んでもよい。

【0010】

幾つかの態様では、生のデータを標準化した後、各治療について少なくとも感度において約平均の倍数増加 + 2 × SD 値を、感受性（正常範囲内）と耐性（正常範囲より上）との間のカット - オフ値として使用する。すなわち幾つかの態様では、ガウス分布で95%の信頼上限に等しい2 × SD 値をカット - オフ倍数耐性値として使用することができる。（図1を参照されたい）。後者の場合、倍数耐性における97.5%の増加は、この95%の信頼上限間隔の下になるだろう。別の態様では、97.5%の信頼上限のようなより高い信頼限界をカット - オフ値として使用してもよい。

40

【0011】

本発明の幾つかの態様では、この方法は疾患に利用できる幾つか、またはすべての治療に関する倍数耐性を決定するために使用することができる。

【0012】

50

本発明は、上記定義で提供される任意の疾患および治療に使用することができる。例えば少なくとも部分的には病原体感染または悪性細胞の複製により引き起こされる病理的状態に対する1以上の治療に対して耐性を予測するために使用することができる。

【0013】

治療監視の本質は、治療がまだ効果的であるかどうかを決定することである。この決定は患者が持つ標的での薬剤効果を参照標的と比べることによる。この比較は参照に対する患者標的での効果の比率を提供する。これはしばしば耐性における倍数の増加として表され、ここで耐性は IC_{50} 値により表すことができる。 IC_{50} は、薬剤がインヒビターが無い標的の活性に比べて半分まで標的の活性を下げる濃度であり得る。化合物または薬剤がまだ効果的かどうかの決定はカット - オフにあり、すなわち IC_{50} 値において定めた増加である。このカット - オフはしばしばアッセイの変動性に基づく。これはアッセイの分析的性能に大いに依存するカット - オフを提供する。この取り組みは薬剤応答性における変動に基づき群を考察しないという限界に問題がある。さらにそのような取り組みは異なる治療計画に対する異なる応答性については説明しない。

10

【0014】

現行の取り組みは耐性感度における変動性に基づいて群を説明しないので、我々は IC_{50} において倍数変化の生物学的分布を提供するために、未処置患者の混合群における IC_{50} の平均倍数変化を決定した。混合群は例えば単一の性別、年齢、人種、性行為に限定しない。第2に本発明の方法は、異なる薬剤に対する群の異なる応答性を説明する。したがって、この取り組みにより決定される薬剤に特異的なカット - オフ値は、感受性の患者に関する耐性を予測するより信頼性のあるパラメーターとなる。さらなる取り組みでは、カット - オフにおける平均の倍数増加に基づく群が、野生型配列を持つ患者で決定された。このさらなる改善は、評価した群における有力な処置耐性個体により、耐性の倍数増加における潜在的偏りを説明する。予期せず両方の取り組み、すなわち処置を受けていない患者の表現型の型別および処置を受けてはいるが野生型の病原体も有する群中の仮定の表現型の型別からの結果は、評価した各HIV薬剤に関する耐性に同様の平均倍数変化を生じた。

20

【0015】

治療(1つまたは複数)の存在下で、病原体または悪性細胞が成長する能力における変化を測定することができる任意の方法を本発明で使用することができる。そのような表現型の型別法には、当業者に既知のすべての方法を含む。既知の遺伝子型の型別も本発明に使用することができる。

30

【0016】

例えば具体的説明の例として、本発明に使用するために適する細菌の表現型の型別法は、限定するわけではないが阻止性帯直径(例えば引用により本明細書に編入するGuoming et al., *Sex Transm. Dis.* 27(2):115-8(2000)を参照にされたい)、比色表示法(例えば引用により本明細書に編入するLozano-Chui et al., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 31(3):417-24(1998)を参照にされたい)、およびブイヨンマクロダイリューション(broth macrodilution)法(例えば引用により本明細書に編入するIwen et al., *J. Clin. Microbiol.* 34(7):1779-83(1996)を参照されたい)を含む。

【0017】

さらなる具体的説明例として、本発明での使用に適するウイルスの表現型の型別法には、限定するわけではないがプラーク減少アッセイ、PBMC p24成長阻害アッセイ(例えば両方とも引用により本明細書に編入するJapour et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1095-1101(1993); Kusumi et al., *J. Virol.* 66:875-885(1992))、組換えウイルスアッセイ(例えばすべて引用により本明細書に編入するKellam & Larder, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:23-30(1994); およびPauwels et al., HIV薬剤耐性および処置法に関する第2回国際ワークショップ(2nd International Workshop on HIV Drug Resistance and Treatment Strategies)、マジヨーレ湖、イタリア、要約(1998)); 抗-ウイルスインヒビターの感受性を評価するためのマーカーとしてのGFPの使用(Marschall et al., 医学及び分子ウイルス学研究所(Institute of Clin. and Mol. Virol.)、アーランガー-ニュルンベルグ大学、シ

40

50

ユロブガルテン、ドイツ) ; および細胞培養アッセイ (引用により本明細書に編入する Hayden et al., N.Eng.J.Med.321:1696-702(1989)) を含む。

【 0 0 1 8 】

さらなる具体的な例および具体的な説明として、本発明での使用に適する悪性細胞の表現型の型別法には、限定するわけではないがフローサイトメトリーアッセイ (例えば両方とも引用により本明細書に編入する Pallis et al., Br.J.Haematol.104(2):307-12(1999) ; Huet et al., Cytometry 34(6):248-56(1998))、蛍光顕微鏡 (例えば引用により本明細書に編入する Nelson et al., Cancer Chemother.Pharmacol.42(4):292-9(1998))、カルセイン蓄積法 (例えば引用により本明細書に編入する Homolya et al., Br.J.Cancer.73(7):849-55(1996)) およびATP発光アッセイ (例えば引用により本明細書に編入する Andreotti et al., Cancer Res.55(22):5276-82(1995)) を含む。

10

【 0 0 1 9 】

本発明は耐性を決定する任意の表現型または遺伝子型測定試験またはアッセイと共に使用することができるが、以下の記載は本発明の可能な応用をさらに記載するために計画する。

【 0 0 2 0 】

1つの態様では、生物学的カット - オフ値を直接的な表現型アッセイ、例えばAntivirogram(商標) (ヴィルコ(Virco)社 ; 引用により本明細書に編入する国際公開第97/27480号明細書、米国特許第6,221,578号明細書) と提携して使用することができる。このアッセイは管理された研究室の条件下で、現在利用可能な各抗-HIV療法に対して患者個体に由来するHIVの耐性レベルを測定する表現型の耐性アッセイである。ウイルスの耐性「挙動」は、未だに同定されていない遺伝子変化を含む多くの異なる突然変異およびそれらの間の相互作用の効果が合わさった結果であり得る。換言すると、これは耐性の直接的測定である。

20

【 0 0 2 1 】

この試験はすべての利用可能な薬剤に対するウイルス耐性の定量的尺度を提供する。これはIC₅₀により表される。次いでこれを完全に感受性の非 - 突然変異「野生型」ウイルスに関するIC₅₀と比較する。次いで採取したウイルスの各治療に対する耐性を、野生型と比べてIC₅₀における倍数の変化で表す。この報告により医師はもはや活性ではない治療 (1つまたは複数) を同定でき、そして個々の患者に関する薬剤の最適な組み合わせの選択に役立つ。

30

【 0 0 2 2 】

本発明の1つの態様では、未処置患者に由来する数千のサンプルならびに遺伝的に野生型ウイルス (いかなる耐性の突然変異ももたないウイルス) の耐性の程度を測定する。試験したウイルスの平均感受性は、薬剤毎に変動する。これらの生物学的データに基づき、各治療について独特なカット - オフ値を設定することができるので、カット - オフ値より高い結果は高い信頼度でウイルスが正常な感受性範囲よりも高いとすることができることを意味する。例えば1つの態様では、信頼のレベルは97.5%であり得る。

【 0 0 2 3 】

別の態様では本発明は、病原体または悪性細胞の治療耐性表現型を決定する規則に基づく、または他のより直接的ではない系と提携して使用することもできる。より直接的ではない系の例は、VirtualPhenotype(商標) (ヴィルコ社 ; 引用により本明細書に編入するPCT/E P01/04445) である。この系は遺伝子型の情報に基づきウイルス治療耐性を予測する。例えばウイルス例えばHIVの逆転写酵素またはプロテアーゼ遺伝子を配列決定し、そして野生型の配列と比較してこれらの遺伝子中の突然変異を同定する。

40

【 0 0 2 4 】

薬剤耐性に関する領域の遺伝子コードは、ソフトウェアシステムに供給される。このシステムは各薬剤に対する耐性に影響を及ぼすことができるすべての突然変異を同定する。これは次いで遺伝子型および表現型のデータベースに応答指令信号を送り、これらの突然変異が合った事前のサンプルから遺伝子型を見いだす。すべての対合が同定された時、ソウ

50

フウェアはこれらのサンプルに関する表現型を検索し、そして各薬剤に関する耐性の平均上昇を計算することによりVirtualPhenotype(商標)を作成する。VirtualPhenotype(商標)は典型的には、同じ突然変異パターンを持つ数百または数千の真の表現型からのデータに基づく。この例では、生物学的に関係するカット - オフ値を使用することにより、ウイルスの治療耐性を定める精度の上昇が新たなウイルス単離物についてその遺伝子型に基づき仮定の表現型を予測する精度の上昇に翻訳される。最後にこの間接的な系のカット - オフ値は、サンプルが生物学的に関係のあるカット - オフ値の上か下かを予測する間接的系の特異性および/または感度を改善するために選択することができる。

【 0 0 2 5 】

さらに別の態様では、本発明は病原体または悪性細胞の治療耐性表現型をその遺伝子型情報に基づき定めるニューラルネットワークのような、遺伝子情報から表現型を決定するための他の系と提携して使用してもよい。

10

【 0 0 2 6 】

例えばニューラルネットワークは、治療耐性試験について遺伝子型と表現型との間の関係のモデルを作るために使用することができる(引用により本明細書に編入する米国特許出願第09/589,167号明細書、PCT/EP01/06360)。ニューラルネットワークを使用して、治療に耐性を付与する突然変異(1つまたは複数)または突然変異パターンを同定することができ、そして遺伝子に基づく治療耐性を定める。例えば遺伝子型および表現型データの1組のデータが、遺伝子型 - 表現型データベースから集められる。各データ組の員は、治療耐性において表現型の変化に相関する遺伝子突然変異に対応する。

20

【 0 0 2 7 】

このデータの組を訓練(training)データ組および試験データ組に分ける。ニューラルネットワークを訓練した後、ニューラルネットワークの予測率または一致率を試験データ組から決定する。正しくない予測を与えるサンプルを試験データ組から取り出し、そして第2の訓練データ組に入れる。第2の訓練データ組は第1のデータ訓練組に試験データ組から正しくない予測を与えたサンプルを加えて含んで成る。次いで第2の訓練データ組を使用して、ニューラルネットワークを再訓練する。必要ならばこの処理を所望の性能レベルに達するまで繰り返す。この様式で神経網を再訓練することにより、ニューラルネットワークの性能の上げることが可能である。この応用の精度は、それが遺伝子型および表現型情報のデータベースによるので、本発明の生物学的カット - オフ値の使用を用いた表現型

30

の治療耐性の決定に関する向上により強化される。

【 0 0 2 8 】

1つの態様では、本発明は本明細書に定める該少なくとも1つの治療に関するカット - オフ倍数耐性値を含んで成る、少なくとも1つのHIV治療に対する個体の耐性を決定するための診断用ツールに関する。この診断用ツールには、Antivirogram(商標)、VirtualPhenotyping(商標)、Phenosenceのような表現型の耐性試験を含む。

【 0 0 2 9 】

本発明はテノホビル、ロピナビルのようなHIV化合物、および国際公開第99/67417号明細書、欧州特許出願公開第945443号明細書および国際公開第00/27825号明細書に開示された化合物に対する耐性を決定するための方法に関する、特に、[3R-[3(1S*,2R*),3,6]]-[3-[[4-アミノフェニル]スルホニル](2-メチルプロピル)アミノ]-2-ヒドロキシ-1-(フェニルメチル)プロピル]カルバミン酸ヘキサヒドロフロ[2,3-b]フラン-3-イルエステルまたは4-[[6-アミノ-5-プロモ-2-[[4シアノフェニル)アミノ]-4-ピリミジニル]オキシ]-3,5-ジメチルベンゾニトリルまたは4-[[4-(2,4,6-トリメチルフェニル)アミノ]-2-2ピリミジニル]アミノベンゾニトリルまたはそれらの任意の医薬的に許容される塩または立体異性体。

40

【 0 0 3 0 】

1つの態様では、HBVに及ぼす薬剤の効果を、Isom et al.,(国際公開第99/37821号明細書、Delaney et al.,Antimicrob.Agents chemotherap.2001,45(6)1705-1713)により開示されたような技法を使用して監視することができる。

50

【0031】

1つの態様では、治療に対してHCVに及ぼす薬剤の効果はRice（国際公開第97/08310号、同第98/39031号明細書）およびBarthenschlager（欧州特許第1043399号明細書）により記載されているような技法を使用して決定することができる。

【0032】

以下の実施例は具体的説明として提供し、そして本発明を限定することを意図していない。

【0033】

【実施例】

実施例 1

異なる抗-HIV治療について生物学的に関連するカット - オフ値の決定

約1000の地理的に分布した未処置患者サンプルの薬剤感受性は、Antivirogram(商標)アッセイを使用して現在認められている抗レトロウイルス剤について決定した。研究用の野生型標準ウイルスに対する患者サンプルの感度(対数尺度)における倍数変化の平均および標準偏差(SD)値は、患者サンプルが各薬剤に対する感度において固有の異なる変動の程度を表したことを示した(プロテアーゼインヒビターでの(PI)の最小の変動およびNNRTIでの最大)。薬剤に対するサンプルの感度における倍数変化は、薬剤に対するサンプルの倍数耐性とも呼ぶ。各薬剤に関する $2 \times \text{SD}$ 値を、感受性(正常な感度の範囲内)と耐性(正常な感受性の範囲より高い)との間のカット - オフ値として使用した。このカット - オフ値を考慮すれば、サンプルの97.5%が正常な感受性の範囲であり、一方2.5%が正常範囲より高く、未処置個体は通常、感受性の範囲に入ることを示す。図1は単一の抗ウイルス剤に関するそのような分析の例を表す。これらはヌクレオシドに関して3~4.5倍の間で、NRTIについては6~10倍で、そしてPIについては2.5~4倍で変動する。

【0034】

交差確認(cross validation)のために、遺伝子型的に「野生型」のサンプルの大きな群に関しては平均倍数耐性値を算出した(薬剤あたり2100~7500の間)。これらの値は未処置患者のサンプルから得た平均値とほぼ完全に一致した。すなわち新たに定めた生物学的カット - オフ値は群中の自然な変動の正確な反映であり、そして既存のカット - オフ値よりも臨床的応答をより予測することが示された。図2は直接的な表現型の型別法(PT群)およびウイルスの表現型の型別法(vPT群)の両方を使用した幾つかのサンプルに関する平均倍数耐性値を含む。約1の倍数耐性は、野生型の研究室ウイルスとの差異が無いことを意味し、すなわちこの人は治療に感受性である。PT群は薬剤を受けていない患者を表し、そしてvPT群はすでに薬剤を摂取したが、遺伝子型の型別で有意な耐性を付与することが知られている突然変異を表さない個体を表す(例えば彼らは薬剤を受けていない患者に似ている)。

【0035】

図3は $2 \times \text{SD}$ 範囲(暗い灰色の背景)の底に示すサンプル数について、見いだされた平均倍数耐性(明るい灰色)を示す。幾つかの薬剤は感度について任意に選択した、このアッセイに以前に使用した表現型のカット - オフ値である4倍の上昇とは異なった。

【0036】

臨床的応答に対する新たなカット - オフ値の関係は未だ調査中であるが、NNRTIに対する耐性における軽度の上昇(約2.5~5倍)が処置の失敗を予測しなかったことは明らかであった。図4は旧および新カット - オフ値の比較を含む。デラビルジン(DLV)が4から10に上昇したことを示すが、この上昇が多くサンプルの決定に実際には影響を及ぼさなかったことは注目に値する。対照的に、d4Tはカット - オフ値に低下を示し、耐性サンプルの数を2倍にした(図5も参照にされたい)。図5はサンプルの耐性を考慮した決定に基づき、(図4に示す)カット - オフ値の変化の効果を示す。

【0037】

図6は既知の薬剤耐性突然変異が無い5000サンプルにおける表現型および仮想表現型の両試験による耐性を表す。図6と比較する時、図7は新規な生物学的カット - オフ値が仮想

10

20

30

40

50

の表現型の型別と直接的な表現型の型別との間によりよい合致を生じることを示す。

【 0 0 3 8 】

すべての特許、特許出願および参考文献は、引用により全部、本明細書に編入する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 所定の治療に関する多様な組の患者サンプルの薬剤感受性において、倍数変化の平均および2×標準偏差を示す例示曲線である。

【図2】 種々の利用可能な抗ウイルス剤に対する患者サンプルの平均倍数耐性(平均FR)を示す。データは薬剤を受けていない患者の直接的な表現型の型別(PT)および現在薬剤を摂取している野生型様のウイルスを有する患者の仮想の表現型の型別(vPT)の両方から算出する。Nは試験した患者サンプル数を示す。使用した抗-ウイルス剤は、AZT、ddI、ddC、d4T、アバカビル(ABC)、ネビラピン(NVP)、デラビルジン(DLV)、エファビレンツ(EFV)、インジナビル(IDV)、リトナビル(RTV)、ネルフィナビル(NFV)、サキナビル(SQV)およびアンブレナビル(APV)である。

10

【図3】 2×標準偏差(2SD)範囲と比べた、患者サンプルに関する平均倍数耐性(平均FR)。感度における4倍上昇の点線は、以前使用した表現型のカット-オフ値である。

【図4】 抗-ウイルス剤に関する旧および新表現型カット-オフ値の比較である。

【図5】 抗-ウイルス剤に対する耐性の予測に及ぼす新表現型カット-オフ値の効果である。

【図6】 旧カット-オフ値を使用して既知の薬剤耐性突然変異が無い5000サンプルを対象とした表現型(PT)および仮想表現型(vPT)から予測される、抗-ウイルス剤に対する予想耐性を示す。

20

【図7】 新カット-オフ値を使用して既知の薬剤耐性突然変異が無い5000サンプルを対象とした表現型(PT)および仮想表現型(vPT)から予測される、抗-ウイルス剤に対する予想耐性を示す。

【図1】

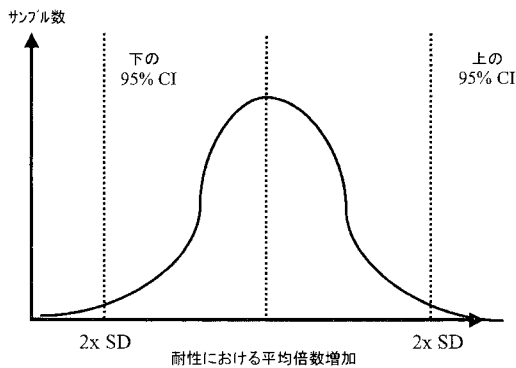


FIGURE 1

【図2】

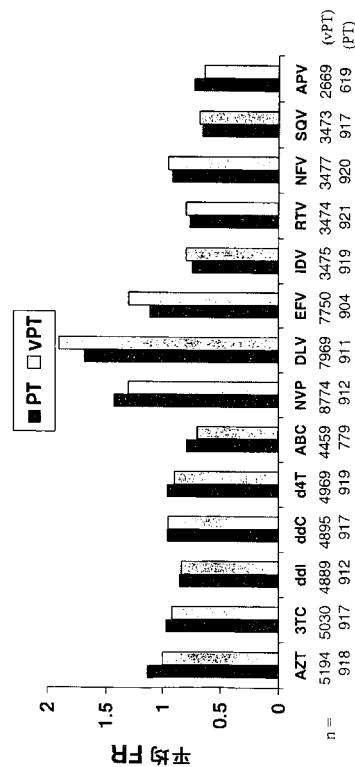


FIGURE 2

【 図 3 】

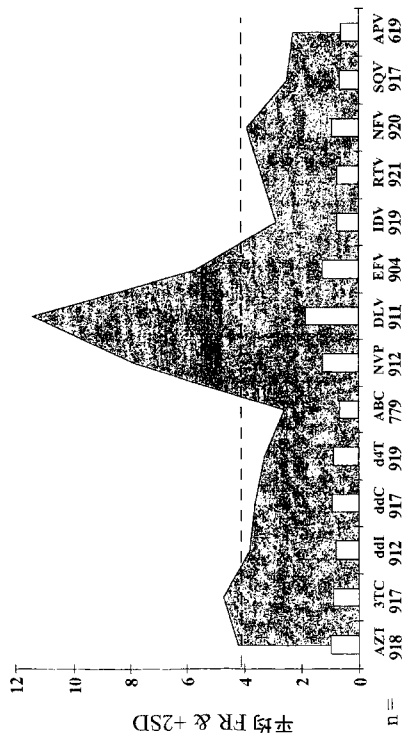


FIGURE 3

【 図 4 】

薬剤	以前の cutoff	新しい cutoff
AZI	4.0	4.0
3TC	4.0	4.5
ddI	4.0	3.5
ddC	4.0	3.5
d4T	4.0	3.0
ABC	4.0	3.0
NVP	4.0	8.0
DLV	4.0	10.0
EFV	4.0	6.0
IDV	4.0	3.0
RTV	4.0	3.5
NFV	4.0	4.0
SQV	4.0	2.5
APV	4.0	2.5

FIGURE 4

【 図 5 】

薬剤	以前の cutoff (%耐性)	新しい cutoff (%耐性)	変化 (%)	相対変化
AZI	33.5	33.5	0.0	0
3TC	47.3	46.0	-1.3	-3
ddI	8.8	11.9	3.0	35
ddC	6.5	8.5	2.0	31
d4T	7.1	12.5	5.4	77
ABC	18.4	25.8	7.4	40
NVP	42.4	36.3	-6.2	-15
DLV	43.7	31.2	-12.5	-29
EFV	32.9	29.8	-3.1	-10
IDV	27.0	29.6	2.6	10
RTV	32.4	33.3	0.9	3
NFV	37.0	37.0	0.0	0
SQV	22.0	25.1	3.1	14
APV	12.6	19.3	6.8	54

FIGURE 5

【 図 6 】

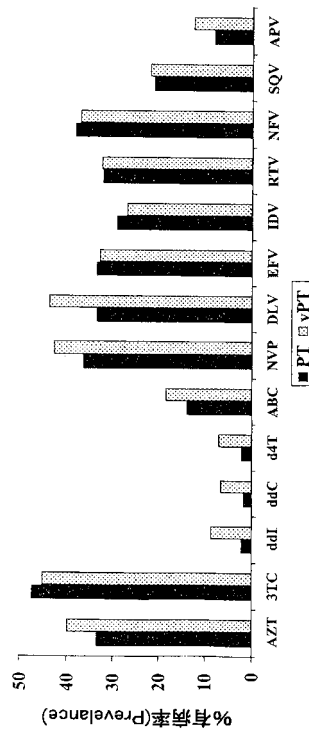


FIGURE 6

【 図 7 】

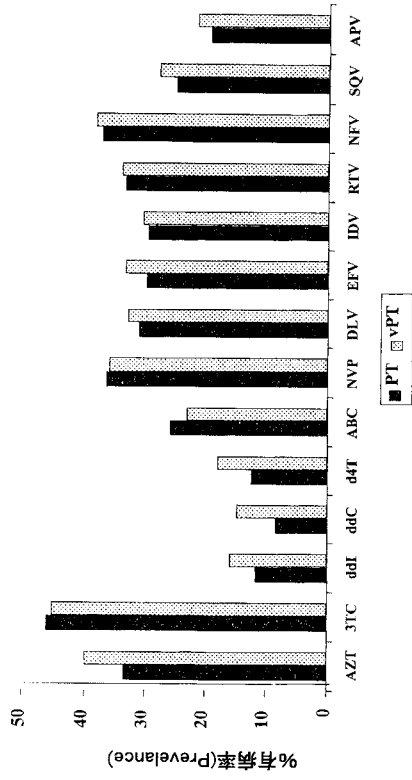


FIGURE 7

フロントページの続き

(72)発明者 ハリガン, リチャード・ピー
カナダ・プリティッシュコロンビア・ブイ6ゼット1ワイ6・バンクーバー・バラードストリート
613-1081・プリティッシュ・コロンビア・センター・フォー・エクセレンス・イン・エイ
チアイブイ/エイズ内

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 特表2000-503849(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/15

C12Q 1/68

WPI