

(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2013-520208

(P2013-520208A)

(43) 公表日 平成25年6月6日(2013.6.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	4B063
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68	A
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 88 頁)

(21) 出願番号	特願2012-555157 (P2012-555157)	(71) 出願人	506330896 ザ・ボード・オブ・トラスティーズ・オブ ・ザ・レランド・スタンフォード・ジュニ ア・ユニバーシティ THE BOARD OF TRUSTE ES OF THE LELAND ST ANFORD JUNIOR UNIVE RSITY アメリカ合衆国カリフォルニア94306 ，パロアルト，エルカミノリアル1705
(86) (22) 出願日	平成23年2月24日 (2011.2.24)	(74) 代理人	230104019 弁護士 大野 聖二
(85) 翻訳文提出日	平成24年10月19日 (2012.10.19)	(74) 代理人	230111590 弁護士 金本 恵子
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/026117		
(87) 国際公開番号	W02011/106558		
(87) 国際公開日	平成23年9月1日 (2011.9.1)		
(31) 優先権主張番号	61/307,829		
(32) 優先日	平成22年2月24日 (2010.2.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の診断、予後判定、及び処置法

(57) 【要約】

一つの側面において、本発明は被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テ  
ラノーシス (theranosis)、及び/または治療効果 (outcome) の予測法を提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス(theranosis)、及び/または治療効果(outcome)の予測法であって、

(a)前記被験者由来の第一細胞集団由来の第一の細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在(a presence of no modulator)とを接触させる；

(b)前記個体由来の第二細胞集団由来の第二の細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(c)前記第一の細胞及び前記第二の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(d)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む、前記方法。

## 【請求項 2】

前記活性化可能エレメントの測定済み活性化レベルを含む、前記被験者のレスポンスパネルを作り出すことをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記第一細胞集団及び前記第二細胞集団が免疫細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記第一細胞集団由来の前記第一細胞がB細胞であり、前記第二細胞集団由来の前記第二細胞がT細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記B細胞は、モジュレーターがない存在と接触させる、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記B細胞型の少なくとも一つの活性化可能エレメントは、CD69、Stat3、Lck、p-Lck、pZap70/Syk、p13K、Stat5及びホスホ-Stat3からなる群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記T細胞がナイーブ(naive)CD4 T細胞である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記ナイーブCD4 T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントがp-Stat1であり、前記ナイーブCD4 T細胞とIL6とを接触させる、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記被験者由来の第三細胞集団由来の第三の細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；及び前記第三の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する、各段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記第三の細胞がCD8メモリー/エフェクターT細胞である、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメントがp-Lckであり、前記CD8メモリー/エフェクターT細胞をT細胞受容体刺激と接触させる、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記第一細胞集団由来の前記第一細胞がCD4 T細胞であり、前記第二細胞集団由来の前記第二細胞がCD8 T細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記CD4 T細胞及び/またはCD8 T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントは、p-p38、Lck、p-Lck、p-Stat5及びPLC 2からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 4】

前記第一及び/または第二のモジュレーターがサイトカインである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

前記第一及び/または第二のモジュレーターがSTAT経路モジュレーターである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記T細胞が制御性T細胞である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメントがp-Stat5であり、前記制御性T細胞をIL-21 と接触させる、請求項 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 1 8】

自己免疫疾患における疾患活動性を分類する方法であって、

(a)(i)少なくとも一つのモジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在に応答して、複数の免疫細胞集団の一つ以上の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(b)前記一つ以上の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記疾患活動性を分類する、各段階を含む、前記方法。

## 【請求項 1 9】

前記疾患が関節リウマチであり、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントが、CD69、p-Stat5、p-Stat1、p-Lck、p-p38、Lck、p-Stat1、p-Stat3、p-p38、PLC 2、及びp-PLC 2からなる群から選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメント、前記一つ以上の細胞、及び前記モジュレーターまたはモジュレーターがない存在が、表 1、表 2、表 3 または表 4 から選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

## 【請求項 2 1】

前記疾患が全身性エリテマトーデスである、請求項 1 8 に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

前記複数の免疫細胞集団がT細胞集団及びB細胞集団である、請求項 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

p-Stat3の活性化レベルがIFN に応答してナイーブCD8 T細胞集団中で測定され、p-Stat6の活性化がモジュレーターがない存在に応答してB細胞集団中で測定され、p-Stat6の活性化レベルはIL-10に応答してB細胞集団中で測定される、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

p-Stat3の活性化レベルがIFN に応答してナイーブCD8 T細胞集団中で測定され、p-Stat1の活性化がモジュレーターがない存在に応答してナイーブCD8 T細胞集団中で測定され、p-Stat1の活性化レベルはIL-6に応答してナイーブCD4 T細胞集団中で測定される、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

関節リウマチに罹患している被験者の治療に対する反応性(treatment responsiveness)を予測する方法であって、

(a)前記被験者由来のB細胞集団由来のB細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(b)前記被験者由来のCD8 T細胞集団由来のCD8 T細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(c)前記B細胞及び前記CD8 T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(d)前記少なくとも一つの活性化エレメントの活性化レベルをベースとして前記被験者の治療に対する応答を予測する、各段階を含む前記方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 6】

CD69、Stat3、Lck、p-Lck、pZap70/Syk、p13K、Stat5、及びホスホ-Stat3からなる群から選択される活性化可能エレメントの活性化レベルを前記B細胞中で測定する、請求項 2 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 7】

Lck、及びp-PLC 2からなる群から選択される活性化可能エレメントの活性化レベルを前記CD8 T細胞中で測定する、請求項 2 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 8】

前記被験者がオレンシア(Orencia)で処置されているか、または処置される予定である、請求項 2 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 9】

全身性エリテマトーデスに罹患している被験者の疾患活動性(disease activity)における変化を予測する方法であって、

(a)前記被験者由来のCD8 T細胞集団由来のナイーブCD8細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(b)前記被験者由来のB細胞集団由来のB細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(c)前記B細胞及び前記ナイーブCD8 T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(d)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者の疾患活動性における変化を予測する、各段階を含む、前記方法。

## 【請求項 3 0】

p-Stat3の活性化レベルは、IL4、IL6及びIFN からなる群から選択されるモジュレーターに反応して前記B細胞中で測定される、請求項 2 9 に記載の方法。

## 【請求項 3 1】

p-Stat5の活性化レベルは、IFN に反応して前記B細胞中で測定される、請求項 2 9 に記載の方法。

## 【請求項 3 2】

p-Stat6の活性化レベルは、IL10、またはモジュレーターがない存在に反応して前記B細胞中で測定される、請求項 2 9 に記載の方法。

## 【請求項 3 3】

p-Stat1の活性化レベルは、IL-10、IFN 及びIL-6からなる群から選択されるモジュレーターに反応して前記ナイーブCD8 T細胞中で測定される、請求項 2 9 に記載の方法。

## 【請求項 3 4】

p-Stat6の活性化レベルは、IL-15及びIFN からなる群から選択されるモジュレーターに反応して前記ナイーブCD8 T細胞中で測定される、請求項 2 9 に記載の方法。

## 【請求項 3 5】

p-Stat5の活性化レベルは、IL-21に反応して前記ナイーブCD8 T細胞中で測定される、請求項 2 9 に記載の方法。

## 【請求項 3 6】

曲線下面積(area under the curve : AUC)値が0.7より高い、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

前記AUC値が0.8より高い、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 8】

前記AUC値が0.9より高い、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

陽性的中率(positive predictive value)が70%より高い、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 0】

陰性的中率(negative predictive value)が70%より高い、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 4 1】

被験者の自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予測法であって、

(a)前記被験者由来の細胞を少なくとも一つのモジュレーターに暴露する；

(b)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者の自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む、前記方法。

10

## 【請求項 4 2】

前記自己免疫疾患が、関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスである、請求項 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 3】

前記細胞が造血細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

前記少なくとも一つのモジュレーターが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、T細胞受容体架橋抗体(cross-linking antibody)、B細胞受容体架橋抗体、またはそれらの組み合わせである、請求項 4 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 4 5】

前記少なくとも一つのモジュレーターが、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 、IL-4、IL-6、IL-21、IL-10、IL-15、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 6】

前記細胞を二つ以上のモジュレーターに同時にまたは連続して暴露する、請求項 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 7】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメントが、Stat1、Stat3、Stat5、Stat6、Lck、Lyn、Zap70、Syk、PLC $\gamma$ 2、p38、PI3Kまたはそれらの組み合わせである、請求項 4 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 4 8】

二つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルが同時にまたは連続して測定される、請求項 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 9】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することによって、前記細胞において少なくとも一つの経路を特徴付けすることをさらに含む、請求項 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 5 0】

前記細胞における少なくとも一つの経路の機能状態(functional state)を測定することをさらに含む、ここで前記機能状態は、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとする、請求項 4 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 5 1】

一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせの存在または非存在を測定することをさらに含む、請求項 4 1 に記載の方法。

## 【請求項 5 2】

前記一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカーまたはそれらの組み合わせは、タンパク質、糖、脂質、核酸及び代謝産物からなる群から独立して選択される、請求項 5 0 に記載の方法。

## 【請求項 5 3】

50

一つ以上の細胞表面マーカーまたは細胞内マーカーの存在または非存在の測定は、前記細胞表面マーカーまたは前記細胞内マーカーのエピトープの存在または非存在を測定することを含む、請求項50に記載の方法。

【請求項54】

被験者の自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予測は、少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルと、前記一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカーまたはそれらの組み合わせの存在または非存在の両方をベースとする、請求項50に記載の方法。

【請求項55】

前記活性化レベルは、特定の活性化可能エレメントの特定の活性化状態に特異的である結合エレメント(binding element)の結合により決定される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項56】

前記結合エレメントは抗体、組み換えタンパク質または蛍光染料を含む、請求項54に記載の方法。

【請求項57】

前記活性化レベルを測定する段階が、単一細胞中で一つ以上の細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルを測定するためにフローサイトメトリー、免疫蛍光法、共焦点顕微鏡法、免疫組織化学、免疫電子顕微鏡法、核酸増幅、遺伝子アレイ、プロテインアレイ、質量分析法、パッチクランプ、二次元ゲル電気泳動法、ディファレンシャルディスプレイゲル電気泳動法、マイクロスフィアベースの多重タンパク質アッセイ(microsphere-based multiplex protein assay)、ELISA、または無標識細胞アッセイ(label-free cellular assay)を使用することを含む、請求項41に記載の方法。

20

【請求項58】

前記治療効果の予測が、前記自己免疫疾患の活動性(activity)増加の予測を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項59】

前記一つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルの測定によって前記被験者の処置が誘導(guide)される、請求項41に記載の方法。

【請求項60】

前記被験者を処置するのに使用する治療薬の効能は、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして決定される、請求項41に記載の方法。

30

【請求項61】

被験者の自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する方法であって、

(a)前記被験者由来の細胞を少なくとも一つの治療薬に暴露する、ここで前記治療薬は免疫系障害を処置するのに使用される；

(b)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者の自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む、前記方法。

40

【請求項62】

前記自己免疫疾患が関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスである、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

前記細胞が造血細胞である、請求項61に記載の方法。

【請求項64】

前記少なくとも一つの治療薬は、ステロイド剤、たとえばコルチコステロイド；サイトカイン除去生物製剤(depleting biologics)、たとえば抗-TNF、抗-IL1、及び抗-IL6；TNF-遮断薬、たとえばインフリキシマブ(Infliximab)、アダリムマブ(Adalimumab)、及びエタネルセプト(Etanercept)；抗-インターロイキン剤、たとえばアナキンラ(Anakinra)

50

、AMG108、イグラチモド(Iguratimod)、及びアクテムラ(Actemra)；及び抗-B細胞剤、たとえばリツキシマブ(Rituximab)及びエプラツズマブ(Epratuzumab)；抗-共刺激分子薬、たとえばアパタセプト(Abatacept)及びベリムマブ(Belimumab)；免疫寛容原性薬(tolerogenic agent)(B細胞表面DNA受容体を対象にした合成分子)、たとえばLJP 394及びTV-4710；抗-補体タンパク質薬(anti-complement protein agent)、たとえばエクリズマブ(Eculizumab)；T細胞シグナル伝達分子の阻害剤、たとえばCP690550；細胞移動(cell migration)の阻害剤、たとえばケモカイン受容体のアンタゴニスト(Maraviroc、INCB3284)；疾患修飾性抗リウマチ薬、たとえばレフィウノミド(lefiunomide)及びメトトレキサート；サルファサラジン；ヒドロキシクロロキン；アザチオプリン；シクロスポリン；ミノサイクリン；D-ペニシラミン；それらの等価物並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項61に記載の方法。

10

【請求項65】

前記細胞が二種以上の治療薬に同時にまたは連続して暴露される、請求項61に記載の方法。

【請求項66】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメントが、Stat1、Stat3、Stat5、Stat6、Lck、Lyn、Zap70、Syk、PLC 2、P38、PI3Kまたはそれらの組み合わせである、請求項61に記載の方法。

【請求項67】

二種以上の活性化可能エレメントの活性化レベルは同時にまたは連続して測定される、請求項61に記載の方法。

20

【請求項68】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することによって、前記細胞中の少なくとも一つの経路を特徴付けすることをさらに含む、請求項61に記載の方法。

【請求項69】

前記細胞中の少なくとも一つの経路の機能状態を決定することをさらに含み、ここで前記機能状態は、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとする、請求項61に記載の方法。

【請求項70】

前記方法がさらに、一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせの存在または非存在を測定することを含む、請求項61に記載の方法。

30

【請求項71】

前記一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせが、タンパク質、糖、脂質、核酸及び代謝物質からなる群から独立して選択される、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

一つ以上の細胞表面マーカーまたは細胞内マーカーの存在または非存在の測定は、前記細胞表面マーカーまたは前記細胞内マーカーのエピトープの存在または非存在を測定することを含む、請求項70に記載の方法。

40

【請求項73】

被験者の前記自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予測は、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルと、前記一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカーまたはそれらの組み合わせの存在または非存在の両方をベースとする、請求項70に記載の方法。

【請求項74】

前記活性化レベルは、特定の活性化可能エレメントの特定の活性化状態に特異的な結合エレメントの結合によって測定される、請求項70に記載の方法。

【請求項75】

前記結合エレメントが、抗体、組み換えタンパク質、または蛍光染料を含む、請求項77

50

に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記活性化レベルを測定する段階は、単一細胞中で一つ以上の細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルを測定するために、フローサイトメトリー、免疫蛍光法、共焦点顕微鏡法、免疫組織化学、免疫電子顕微鏡法、核酸増幅、遺伝子アレイ、プロテインアレイ、質量分析法、パッチクランプ、二次元ゲル電気泳動法、ディファレンシャルディスプレイゲル電気泳動法、マイクロスフィアベースの多重タンパク質アッセイ、ELISA、または無標識細胞アッセイを使用することを含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記予測は、前記治療薬での処置に対する前記自己免疫疾患の治療効果の予測を含む、請求項 6 1 に記載の方法。

10

【請求項 7 8】

前記予測によって前記被験者の処置が誘導される、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記被験者由来の前記細胞を、少なくとも一つの追加のモジュレーターに同時または連続的に暴露すること、及び前記経路内の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することにより、少なくとも一つの経路を特徴付けることをさらに含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記少なくとも一つのモジュレーターが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、T細胞受容体架橋抗体、B細胞受容体架橋抗体、またはそれらの組み合わせである、請求項 7 9 に記載の方法。

20

【請求項 8 1】

前記少なくとも一つのモジュレーターが、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-21、IL-10、IL-15またはそれらの組み合わせである、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

被験者において自己免疫疾患を処置するための治療標的を同定する方法であって、

(a) 前記被験者由来の細胞を少なくとも一つのモジュレーターに暴露する；

(b) 少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(c) 前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして前記被験者における自己免疫疾患の処置のための一つ以上の治療標的を同定する、各段階を含む、前記方法。

30

【請求項 8 3】

前記自己免疫疾患が、関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスである、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記細胞が造血細胞である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記少なくとも一つのモジュレーターが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、T細胞受容体架橋抗体、B細胞受容体架橋抗体、またはそれらの組み合わせである、請求項 8 2 に記載の方法。

40

【請求項 8 6】

前記少なくとも一つのモジュレーターが、IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-21、IL-10、IL-15またはそれらの組み合わせである、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記細胞が二種以上のモジュレーターに同時にまたは連続的に暴露される、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメントが、Stat1、Stat3、Stat5、Stat6、Lck、Lyn、Zap70、Syk、PLC $\gamma$ 2、P38、PI3Kまたはそれらの組み合わせである、請求項 8 2 に記載

50

の方法。

【請求項 89】

二種以上の活性化可能エレメントの活性化レベルが同時にまたは連続的に測定される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 90】

前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することによって、前記細胞中の少なくとも一つの経路を特徴付けすることをさらに含む、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 91】

前記細胞中の少なくとも一つの経路の機能状態を測定することをさらに含み、ここで前記機能状態は、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとする、請求項 82 に記載の方法。

10

【請求項 92】

前記方法は一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせの存在または非存在を測定することをさらに含む、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 93】

前記一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせは、タンパク質、糖、脂質、核酸及び代謝産物からなる群から独立して選択される、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

一つ以上の細胞表面マーカーまたは細胞内マーカーの存在または非存在の測定は、前記細胞表面マーカーまたは前記細胞内マーカーのエピトープの存在または非存在を測定することを含む、請求項 92 に記載の方法。

20

【請求項 95】

被験者における前記自己免疫疾患の処置のための一つ以上の治療標的の同定は、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルと、前記一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせの存在または非存在とをベースとする、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 96】

前記活性化レベルは、特定の活性化可能エレメントの特定の活性化状態に特異的な結合エレメントの結合により測定する、請求項 82 に記載の方法。

30

【請求項 97】

前記結合エレメントは、抗体、組み換えタンパク質、または蛍光染料を含む、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

前記活性化レベルの測定段階は、単一細胞中で一つ以上の細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルを測定するために、フローサイトメトリー、免疫蛍光法、共焦点顕微鏡法、免疫組織化学、免疫電子顕微鏡法、核酸増幅、遺伝子アレイ、プロテインアレイ、質量分析法、パッチクランプ、二次元ゲル電気泳動法、ディファレンシャルディスプレイゲル電気泳動法、マイクロスフィアベースの多重タンパク質アッセイ、ELISA、または無標識細胞アッセイを使用することを含む、請求項 82 に記載の方法。

40

【請求項 99】

- (a) 活性化可能エレメントの活性化状態を検出し得る結合エレメント、ここで前記活性化可能エレメントの活性化レベルは自己免疫疾患と相関する；
- (b) 被験者における自己免疫疾患の診断、予後判定、テラノーシス、または治療効果の予測において前記結合エレメントを使用するための使用説明書を含むキット。

【請求項 100】

前記結合エレメントが、ペプチド、ポリペプチド、オリゴペプチド、タンパク質または抗体である、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 101】

50

前記結合エレメントがさらに標識エレメントを含む、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 102】

前記標識エレメントが、小分子フルオロフォア (fluorophore)、タンパク質性フルオロフォア、放射性同位体、酵素、抗体、化学発光分子、ピオチン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、発色性色素 (chromogenic dye)、蛍光染料、リン染料 (phosphorous dye)、ルシフェラーゼ、磁性粒子、ベータ-ガラクトシダーゼ、アミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、オキソ基及びチオール基、量子ドット、キレート化若しくはケージ化 (caged) ランタニド、アイソトープタグ、放射線不透過性タグ、高電子密度タグ (electron-dense tag)、放射性同位体、常磁性粒子、アガロース粒子、質量タグ (mass tag)、e-タグ、ナノ粒子及びベシクルタグ (vesicle tag) からなる群から選択される、請求項 101 に記載のキット。 10

【請求項 103】

前記標識エレメントが酵素及び前駆体化合物を含む、請求項 101 に記載のキット。

【請求項 104】

少なくとも一つのモジュレーターをさらに含む、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 105】

前記少なくとも一つのモジュレーターが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN $\gamma$ 、IFN $\beta$ 、T細胞受容体架橋抗体、B細胞受容体架橋抗体、またはそれらの組み合わせである、請求項 104 に記載のキット。

【請求項 106】 20

前記活性化可能エレメントは、Sat1、Stat3、Stat5、Stat6、Lck、Lyn、Zap70、Syk、PLC2、p38、またはPI3Kである、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 107】

一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせに特異的な一つ以上の抗体をさらに含む、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 108】

前記一つ以上の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせは、タンパク質、糖、脂質、核酸及び代謝物質からなる群から独立して選択される、請求項 107 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】 30

【技術分野】

【0001】

クロスリファレンス

本出願は、本明細書中、その全体が参照として含まれる、2010年2月24日出願の米国仮特許出願第61/307,829号の利益を請求する。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究の記載

本発明は、米国国立衛生研究所より支払われた INFLUENZA IMMUNITY : PROTECTIVE MECHANISMS AGAINST A PANDEMIC RESPIRATORY VIRUSのもと、及び米国アレルギー感染病研究所により支払われた SYSTEMS APPROACH TO IMMUNITY AND INFLAMMATIONのもと、連邦政府による支援によりなされた。 40

【背景技術】

【0003】

自己免疫疾患は、外来抗原として生物自身の組織または臓器を認識することに起因し、続いて免疫システムにより攻撃される。この種の疾患は、様々な種類の自己免疫疾患の間で非常に多様であるので、診断及び効果的な処置を複雑にしている。自己免疫疾患の原因も殆ど理解されていないので、主に症状に注目する処置経過となる。処置に対してこの保守的なアプローチをさらに複雑にしているのは、症状が非常に自覚的であるか、または疾患活動性 (disease activity) の相関性が一般的に低い診断手段であるためである。現在のところ、薬剤反応性の可能性による患者亜集団の効率的な階層化 (stratify) はできてい 50

ない。

【0004】

たとえば、全身性エリテマトーデス(Systemic Lupus Erythematosus : SLE)は、多くの臓器を傷つけ、慢性腎不全を誘起し、重篤な病的状態(morbidity)及び死亡率となり得る衰弱性自己免疫疾患である。SLEの特徴は、細胞残屑と免疫複合体を形成し、末端器官へのダメージを引き起こす抗核自己抗体(anti-nuclear autoantibody)の存在である。現在の処置計画では、非特異的免疫抑制及び炎症性症状の管理に限定されている。処置を複雑にしているのは、SLE疾患活動性が高い疾患活動性(フレア : flare)の期間と、日常的で、数週間、数か月、または数年も続く一時的な回復期間を持ち、非常に多様になりえるという事実である。利用可能な治療法の選択肢の多くは生死にかかわるオフターゲットの作用があるので、絶対に必要であるときのみ、且つ最低有効量でのみ使用すべきである。残念なことに他の自己免疫疾患に関しては、疾患活動性を測定する現行法は全体の症状の非常に主観的な評価であり、累積損傷の代表例であるので、現在の免疫活性を直接測定するのではなく、過去の免疫活性を反映している。その結果、かかる方法は病状の変化を予測するにはあまり役に立たず、特に将来のフレアを回避することに関しては、患者の治療計画を効果的に調整するのが難しい。

10

【0005】

関節リウマチ(Rheumatoid arthritis : RA)は、免疫システムにより関節が襲われる慢性的炎症性自己免疫疾患である。これは何もできず、痛みを伴う炎症症状であり、痛みと関節の破壊により実質的に運動性を失うことがある。この疾患は、皮膚、血管、心臓、肺及び筋肉を含む全身の多くの関節外組織にもしばしば影響を及ぼすという点で全身でもある。関節リウマチは診断するのが難しいことがある。症状は人によって異なり、他の人ではそうでもないのに、人によってはずっと重篤になることがある。同じ人でも、症状の範囲全体は徐々に表れて、初期の段階ではほんの幾つかの症状しか存在しないかもしれない。また症状は他のタイプの関節炎及び関節の症状とも似ていることがあるので、除外すべき他の症状に時間をとるかもしれない。さらに、現在、この疾患に関しては信頼できる試験法が一つもない。RAを診断しやすくするために使用される一般的な一試験法は、リウマチ因子、罹患しているほとんどの人の血液中に最終的に存在する抗体に関するものである。特にこの疾患のきわめて早い段階の検査では、RAに罹患しているすべての人が陽性というわけではない。またリウマチ因子の試験で陽性の人の中でも、まだ一度も疾患を発症したことがない人もいる。現在利用可能な処置の選択肢としては、疾患修飾性抗リウマチ薬、B細胞除去性抗体(B-cell depleting antibody)、サイトカイン除去性生物製剤(cytokine depleting biologic)、及び共刺激シグナルの攪乱物質(disruptor)がある。しかしながら、それぞれの処置で、一部の患者でのみ効果があることが証明されただけで、どの薬剤がどの患者にもっとも効果があるかを予測する有効な手段は現在ない。好適な治療計画を同定するために試行錯誤するのは、肉体的及び経済的の両方に関して非常に負担が大きい。

20

30

【0006】

従って、自己免疫疾患に対する診断、予後判定、処置(treatment)、管理(management)及び治療法の開発の優れた手段が必要である。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

一つの側面において、本発明は、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定(prognosis)、テラノーシス(theranosis)、及び/または治療効果(outcome)の予測法を提供する。態様によっては、本方法は、(a)被験者由来の細胞を少なくとも一つのモジュレーターに暴露する；(b)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、被験者の自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む。

50

## 【0008】

態様によっては、本方法は、(a)被験者由来の細胞を少なくとも一つの治療薬に暴露する、ここで前記治療薬は免疫系疾患を処置するのに使用される；(b)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、被験者の自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む。

## 【0009】

さらなる側面では、本方法は、被験者での自己免疫疾患の処置のための治療薬の同定法を提供する。態様によっては、本方法は、(a)被験者由来の細胞を少なくとも一つのモジュレーターに暴露する；(b)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、被験者の自己免疫疾患を処置するための一つ以上の治療薬を同定する、各段階を含む。

10

## 【0010】

上記側面のそれぞれは、さらなる多くの態様を含むことができる。態様によっては、自己免疫疾患は関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスである。態様によっては、細胞は造血細胞である。態様によっては、少なくとも一つのモジュレーターは、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN $\gamma$ 、IFN $\beta$ 、T細胞受容体架橋抗体(cross-linking antibody)、B細胞受容体架橋抗体、またはそれらの組み合わせである。態様によっては、細胞は二つ以上のモジュレーターに同時にまたは連続して暴露される。態様によっては、少なくとも一つの活性化可能エレメントは、Stat1、Stat3、Stat5、Stat6、Lck、Lyn、Zap70、Syk、PLC $\gamma$ 2、p38、PI3Kまたはそれらの組み合わせである。態様によっては、二つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルは同時にまたは連続して測定される。

20

## 【0011】

態様によっては、本方法は、少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することによって、細胞内の少なくとも一つの経路を特徴付けすることをさらに含む。態様によっては、本方法はさらに、細胞内の少なくとも一つの経路の機能状態(functional state)を測定することをさらに含み、ここで前記機能状態は、少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとする。

30

## 【0012】

態様によっては、本方法は、一つ以上の表面細胞マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせの存在または非存在(absence)を測定することをさらに含む。態様によっては、表面細胞マーカー、細胞内マーカー、またはそれらの組み合わせは、タンパク質、糖、脂質、核酸、及び代謝産物からなる群から独立して選択される。態様によっては、一つ以上の表面細胞マーカーまたは細胞内マーカーの存在または非存在の測定は、表面細胞マーカーまたは細胞内マーカーのエピトープの存在または非存在の測定を含む。態様によっては、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予測は、少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルと、一つ以上の表面細胞マーカー、細胞内マーカーまたはそれらの組み合わせの存在または非存在の両方をベースとする。

40

## 【0013】

態様によっては、活性化レベルは、特定の活性化可能エレメントの特定の活性化状態に特異的な結合エレメント(binding element)の結合により測定される。態様によっては、この結合エレメントは抗体、組み換えタンパク質または蛍光染料を含む。態様によっては、活性化レベルの測定は、単一細胞(single cell)中の一つ以上の細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルを測定するために、フローサイトメトリー、免疫蛍光法、共焦点顕微鏡法、免疫組織化学、免疫電子顕微鏡法、核酸増幅、遺伝子アレイ、プロテインアレイ、質量分析法、パッチクランプ、二次元ゲル電気泳動法、ディファレンシャルディスプレイゲル電気泳動法、マイクロスフィアベースの多重タンパク質アッセイ(microsphere-bas

50

ed multiplex protein assay)、ELISA、または無標識細胞アッセイ(label-free cellular assay)を使用することを含む。

【0014】

態様によっては、治療効果の予測は、自己免疫疾患の活動性増加の予測を含む。態様によっては、一つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することにより、前記被験者の処置が誘導(guide)される。

【0015】

態様によっては、細胞は、一つ以上の治療薬に同時にまたは連続して暴露される。態様によっては、本方法は、少なくとも一つの治療薬と少なくとも一つの追加のモジュレーターに細胞を同時にまたは連続して暴露し、経路内の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することにより少なくとも一つの経路を特徴付けする、各段階を含む。態様によっては、少なくとも一つの治療薬は、ステロイド剤、たとえばコルチコステロイド；サイトカイン除去生物製剤(depleting biologics)、たとえば抗-TNF、抗-IL1、及び抗-IL6；TNF-遮断薬、たとえばインフリキシマブ(Infliximab)、アダリムマブ(Adalimumab)、及びエタネルセプト(Etanercept)；抗-インターロイキン剤、たとえばアナキンラ(Anakinra)、AMG108、イグラチモド(Iguratimod)、及びアクテムラ(Actemra)；及び抗-B細胞剤、たとえばリツキシマブ(Rituximab)及びエブラツズマブ(Epratuzumab)；抗-共刺激分子薬(anti-costimulatory molecule agent)、たとえばアバタセプト(Abatacept)及びベリムマブ(Belimumab)；免疫寛容原性薬(tolerogenic agent)(B細胞表面DNA受容体を対象にした合成分子)、たとえばLJP 394及びTV-4710；抗-補体タンパク質薬(anti-complement protein agent)、たとえばエクリズマブ(Eculizumab)；T細胞シグナル伝達分子の阻害剤、たとえばCP690550；細胞移動(cell migration)の阻害剤、たとえばケモカイン受容体のアンタゴニスト(マラビロク(Maraviroc)、INCB 3284)；疾患修飾性抗リウマチ薬、たとえばレフィウノミド(lefiunomide)及びメトトレキサート；サルファサラジン；ヒドロキシクロロキン；アザチオプリン；シクロスポリン；ミノサイクリン；D-ペニシラミン；それらの等価物並びにそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0016】

態様によっては、本発明は、被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する方法を提供し、前記方法は、  
(a)被験者由来の第一細胞集団由来の第一の細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在(a presence of no modulator)とを接触させる；  
(b)前記個体由来の第二細胞集団由来の第二の細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；  
(c)前記第一の細胞及び前記第二の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び  
(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む。態様によっては、本方法はさらに、前記活性化可能エレメントの測定済み活性化レベルを含む、前記被験者のレスポンスパネルを作り出すことをさらに含む。

【0017】

態様によっては、第一細胞集団及び第二細胞集団は免疫細胞である。態様によっては、第一細胞集団由来の第一の細胞はB細胞であり、第二細胞集団由来の第二の細胞はT細胞である。態様によっては、B細胞はモジュレーターがない存在と接触させる。態様によっては、B細胞型における少なくとも一つの活性化可能エレメントは、CD69、Stat3、Lck、p-Lck、pZap70/Syk、p13K、Stat5及びホスホ-Stat3からなる群から選択される。

【0018】

態様によっては、T細胞はナイーブ(naive)CD4 T細胞である。態様によってはナイーブCD4 T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントはp-Stat1であり、前記ナイ

ープCD4<sup>+</sup> T細胞をIL6と接触させる。

【0019】

態様によっては、本方法はさらに、被験者由来の第三細胞集団由来の第三の細胞と、(i)少なくとも第二のモジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在と接触させる；及び第三の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する、各段階をさらに含む。態様によっては、第三の細胞はCD8メモリー/エフェクターT細胞である。

【0020】

態様によっては、少なくとも一つの活性化可能エレメントは、p-Lckであり、CD8メモリー/エフェクターT細胞をT細胞受容体刺激と接触させる。態様によっては、第一細胞集団由来の第一の細胞はCD4<sup>+</sup> T細胞であり、第二細胞集団由来の第二の細胞はCD8<sup>+</sup> T細胞である。態様によっては、CD4<sup>+</sup> T細胞及び/またはCD8<sup>+</sup> T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントは、p-p38、Lck、p-Lck、p-Stat5及びPLC $\gamma$ 2からなる群から選択される。

10

【0021】

態様によっては、モジュレーターはサイトカインである。態様によっては、モジュレーターはSTAT経路モジュレーターである。

【0022】

態様によっては、T細胞は制御性T細胞である。態様によっては、少なくとも一つの活性化可能エレメントはp-Stat5であり、制御性T細胞をIL-21と接触させる。

【0023】

態様によっては、本発明は、自己免疫疾患における疾患活動性を分類する方法であって、(a)(i)少なくとも一つのモジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在に応答して、複数の(a plurality of)免疫細胞集団の一つ以上の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び(b)前記一つ以上の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記疾患活動性を分類する、各段階を含む、前記方法を提供する。

20

【0024】

態様によっては、疾患は関節リウマチであり、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントは、CD69、p-Stat5、p-Stat1、p-Lck、p-p38、Lck、p-Stat1、p-Stat3、p-p38、PLC $\gamma$ 2及びp-PLC $\gamma$ 2からなる群から選択される。

30

【0025】

態様によっては、少なくとも一つの活性化可能エレメント、一つ以上の細胞及びモジュレーターまたはモジュレーターがない存在は、表1、表2、表3または表4から選択される。

【0026】

態様によっては、疾患は全身性エリテマトーデスである。

【0027】

態様によっては、複数の免疫細胞集団はT細胞集団及びB細胞集団である。

【0028】

態様によっては、p-Stat3の活性化レベルは、IFN $\gamma$  に応答してナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞集団で測定され、p-Stat6の活性化はモジュレーターがない存在に応答してB細胞集団で測定され、p-Stat6の活性化レベルはIL-10に応答してB細胞集団で測定される。

40

【0029】

態様によっては、p-Stat3の活性化レベルは、IFN $\gamma$  に応答してナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞集団で測定され、p-Stat1の活性化はモジュレーターがない存在に応答してCD8<sup>+</sup> T細胞集団で測定され、p-Stat1の活性化レベルはIL-6に応答してナイーブCD4<sup>+</sup> T細胞集団で測定される。

【0030】

態様によっては、本発明は、関節リウマチに罹患している被験者の治療に対する反応性(treatment responsiveness)を予測する方法であって、

50

- (a)前記被験者由来のB細胞集団由来のB細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；
- (b)前記被験者由来のCD8<sup>+</sup>T細胞集団由来のCD8<sup>+</sup>T細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；
- (c)前記B細胞及び前記CD8<sup>+</sup>T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び
- (d)前記少なくとも一つの活性化エレメントの活性化レベルをベースとして前記被験者の治療に対する応答を予測する、各段階を含む前記方法を提供する。

## 【0031】

態様によっては、CD69、Stat3、Lck、p-Lck、pZap70/Syk、p13K、Stat5、及びホスホ-Stat3からなる群から選択される活性化可能エレメントの活性化レベルを前記B細胞中で測定する。態様によっては、Lck及びp-PLC $\gamma$ 2からなる群から選択される活性化可能エレメントの活性化レベルは、CD8<sup>+</sup>T細胞中で測定される。

## 【0032】

態様によっては、被験者はオレンシア(Orencia)で処置されているか、または処置される予定である。

## 【0033】

態様によっては、本発明は、全身性エリテマトーデスに罹患している被験者の疾患活動性における変化を予測する方法であって、

- (a)前記被験者由来のCD8<sup>+</sup>T細胞集団由来のナイーブCD8細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；
- (b)前記被験者由来のB細胞集団由来のB細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；
- (c)前記B細胞及び前記ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び
- (d)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者の疾患活動性における変化を予測する、各段階を含む、前記方法を提供する。

## 【0034】

態様によっては、p-Stat3の活性化レベルは、IL4、IL6及びIFN $\gamma$ からなる群から選択されるモジュレーターに反応して前記B細胞中で測定される。態様によっては、p-Stat5の活性化レベルは、IFN $\gamma$ に反応して前記B細胞中で測定される。態様によっては、p-Stat6の活性化レベルは、IL10、またはモジュレーターがない存在に反応して前記B細胞中で測定される。態様によっては、p-Stat1の活性化レベルは、IL-10、IFN $\gamma$ 及びIL-6からなる群から選択されるモジュレーターに反応して前記ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞中で測定される。態様によっては、p-Stat6の活性化レベルは、IL-15及びIFN $\gamma$ からなる群から選択されるモジュレーターに反応して前記ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞で測定される。態様によっては、p-Stat5の活性化レベルは、IL-21に反応して前記ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞中で測定される。

## 【0035】

態様によっては、本発明のどの方法に関しても曲線下面積(area under the curve : AUC)値は0.7より高い。態様によっては、本発明のどの方法に関しても前記AUC値は0.8より高い。態様によっては、本発明のどの方法に関しても前記AUC値は0.9より高い。態様によっては、陽性的中率(positive predictive value)は70%より高い。態様によっては、陰性的中率(negative predictive value)は70%より高い。

## 【0036】

本明細書に記載されるすべての刊行物、特許及び特許出願は、それぞれの刊行物、特許または特許出願が具体的及び個別に参照として示されるのと同程度まで本明細書中、参照として含まれる。

## 【0037】

本発明の新しい特徴は添付の特許請求の範囲に特記する。本発明の特徴及び好都合な点

をよりよく理解するには、本発明の原理が利用される以下の例示的な態様を記載する以下の詳細な記載を参照として得られるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、アパタセプトでの処置をベースとした患者の階層化用のコーナー分類子(corners classifier)を示す図である。

【図2】図2は、図1のコーナー分類子用の受信者動作特性曲線(receiver-operator characteristics curve)を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0039】

#### 定義

本明細書中で使用するように、「テラノーシス(theranosis)」なる用語は、これらに限定されないが、一つ以上の治療薬の選択、用量レベルの変更、投与計画における変更、投与方式における変更、及び製剤の変更を含む、治療計画の選択、保守(maintenance)またはこれに対する変更を管理するために診断方法から得られる結果を使用することを指す。テラノーシスを通知するのに使用される診断法は、疾患(disease)、症状(condition)または症候(symptom)の状態における情報を提供するすべてのものを含みうる。

【0040】

「治療薬」、「治療可能な薬剤(therapeutic capable agent)」または「処置薬(treatment agent)」なる用語は交換可能に使用され、被験者に投与する際になんらかの有益な効果を与える分子または化合物をさす。有益な効果としては、診断決定が可能になること；疾患、症候、疾病または病状の改善；疾患、症候、疾病若しくは症状の発現の減少または予防；並びに一般に疾患、症候、疾病若しくは病状に対抗することが挙げられる。

【0041】

本明細書中で使用するように、「処置(treatment)」若しくは「処置する(treating)」または「緩和する(palliating)」若しくは「改善する(ameliorating)」なる用語は、交換可能に使用される。これらの用語は、これらに限定されないが、治療上の利益及び/または予防上の利益(prophylactic benefit)を含む有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチを指す。治療上の利益とは、処置中の一つ以上の疾患、症状または症候における治療的に関連のあるあらゆる改良点または効果を意味する。予防上の利益に関しては、疾患、症状または症候が表れていないかもしれないが、疾患の生理的症候の一つ以上を訴えている被験者に、あるいは特定の疾患、症状または症候を発症させる危険性のある被験者に組成物を投与することができる。

【0042】

「有効量」または「治療的有効量」なる用語は、有益なまたは所望の効果を得るのに十分である薬剤の量をさす。治療的有効量は、被験者及び処置されている症状、被験者の体重及び年齢、症状の重篤度、投与様式などにより変動するが、これらは当業者により容易に決定することができる。また本用語は、本明細書に記載の画像検査法のいずれかによって検出用画像を提供する用量(dose)に適用する。具体的な用量は、選択された特定の薬剤、従うべき投与計画、他の化合物と組み合わせて投与されるか、投与適時選択(timing of administration)、画像化すべき組織及び実施される物理的輸送系(physical delivery system)に依存して変動する。

【0043】

「被験者(subject)」、「個体(individual)」及び「患者(patient)」なる用語は、脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはヒトを指すために本明細書中で交換可能に使用される。哺乳類としては、ネズミ、サル、ヒト、家畜、スポーツ用動物(sport animal)及びペットなどが挙げられるが、これらに限定されない。in vivoで得られたまたはin vitroで培養された生物学的存在(biological entity)の組織、細胞及びその子孫も含まれる。

【0044】

10

20

30

40

50

本発明は、他の出願及び文章に開示された情報を包含する。以下の特許及び他の刊行物は、本明細書中、その全体が参照として含まれる：Haskellら、Cancer Treatment, 第5版、W.B. Saunders and Co., 2001年；Albertsら、The Molecular Biology of the Cell、第4版、Garland Science、2002年；Vogelstein及びKinzler、The Genetic Basis of Human Cancer、第2版、McGraw Hill、2002年；Michael、Biochemical Pathways、John Wiley and Sons、1999年；Weinberg、The Biology of Cancer、2007年；Immunobiology、Janewayら、第7版、Garland、及びLeroith及びBondy、Growth Factors and Cytokines in Health and Disease、A Multi Volume Treatise、巻1A及び1B、Growth Factors、1996年。

【 0 0 4 5 】

本明細書中、その全体が参照として含まれる特許及び出願としては、以下のものが挙げられる：米国特許第7,381,535号、同第7,393,656号、同第7,695,924号及び同第7,695,926号並びに米国特許出願第10/193,462号；同第11/655,785号；同第11/655,789号；同第11/655,821号；同第11/338,957号；同第12/877,998号；同第12/784,478号；同第12/730,170号；同第12/703,741号；同第12/687,873号；同第12/617,438号；同第12/606,869号；同第12/713,165号；同第12/293,081号；同第12/581,536号；同第12/776,349号；同第12/538,643号；同第12/501,274号；同第12/079,537号；同第12/501,295号；同第12/688,851号；同第12/471,158号；同第12/910,769号；同第12/460,029号；同第12/432,239号；同第12/432,720号；及び同第12/229,476号。これらの参考文献の多くはシングルセル・ネットワークプロフィール分析(single cell network profiling: SCNP)を開示する。本発明の態様によっては有用である市販の試薬、プロトコル、ソフトウェア及び装置は、Becton Dickinsonのウェブサイト：<http://www.bdbiosciences.com/features/products/>及びBeckman Coulterのウェブサイト：<http://www.beckmancoulter.com/Default.asp?bhfv=7>で利用可能である。関連する文献としては、High-content single-cell drug screening with phosphospecific flow cytometry、Kruzicら、Nature Chemical Biology 23巻：132-42頁、2007年；Irishら、FLT3 ligand Y591 duplication and Bcl-2 over expression are detected in acute myeloid leukemia cells with high levels of phosphorylated wild-type p53、Blood 109巻：2589-96頁、2007年；Irishら、Mapping normal and cancer cell signaling networks: towards single-cell proteomics、Nature Rev. Cancer、6巻：146-55頁、2006年；Irishら、Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells、Cell、118巻、1-20頁、2004年7月23日；Schulz、K.R.ら、Single-cell phospho-protein analysis by flow cytometry、Curr Protoc Immunol、第8章：ユニット8.17.1-20、2007年；Kruzic、P.O.ら、Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry、J Immunol. 2005年 1754：2357-65；Kruzic、P.O.ら、Characterization of the murine immunological signaling network with phosphospecific flow cytometry、J Immunol. 175巻：2366-73頁、2005年；Stelzerら、Use of Multiparameter Flow Cytometry and Immunophenotyping for the Diagnosis and Classification of Acute Myeloid Leukemia、Immunophenotyping、Wiley、2000年；並びにKruzic、P.O.及びNolan、G.P.、Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events、Cytometry A.55：61-70、2005年；Hanahan D.、Weinberg、The Hallmarks of Cancer、Cell 100：57-70、2000年；Kruzicら、High content single cell drug screening with phosphospecific flow cytometry、Nat Chem Biol.4：132-42、2008年がある。統計分析の処理原理(guiding principle)は、以下に知見することができる：Begg CB.(1987年)：Biases in the assessment of diagnostic tests、Stat in Med.6、411-423；Bossuyt、P.Mら(2003年)：Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Clinical Chemistry 49、1-6(Ann. Intern. Med.、BMJ and Radiology in 2003にも)；CDRH、FDA(2003年)：Statistical Guidance

10

20

30

40

50

on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests: Draft Guidance (3月、2003年); Pepe MS. (2003年): The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction. Oxford Press.; Zhou X-H, Obuchowski NA, McClish DK. (2002年): Statistical Methods in Diagnostic Medicine. Wiley.

【0046】

細胞の多重パラメータ解析(multiparametric analysis)により、複数の細胞成分の活性化状態を同時に測定するためのアプローチが提供される。複数の細胞成分の活性化状態は、細胞を細胞外モジュレーターに暴露した後に測定することができ、そうすることで、そのようなモジュレーターが存在しない場合のこれらのネットワークの活性化状態と比較してシグナル伝達ネットワークのシグナル容量(signaling capacity)を測定することができる。タンパク質のよく測定される基底リン酸化状態(basal phosphorylation state)ではなくタンパク質の誘導活性化状態(induced activation status)は、疾病状態に関連した細胞の多くの細胞遺伝学的、エピジェネティックの及び分子変化の結果であるシグナル伝達脱制御(signaling deregulation)を考慮に入れ(、明らかに)するので、いくつかの研究でより情報価値があると示されてきた。たとえば、単一細胞レベルでの多重パラメータ・フローサイトメトリーでは、多数の細胞内シグナル伝達タンパク質の活性化状態を測定し、並びにこれらの分子の活性化状態を複雑な一次細胞集団(primary cell population)内の様々な細胞サブセットに割り付ける。

10

【0047】

タンパク質リン酸化は、移動、アポトーシス、増殖及び分化などの多くの細胞機能を制御する際に重要な翻訳後プロセッシングである。タンパク質の部位特異的リン酸化は、フローサイトメトリーを使用して、蛍光色素が共役結合したホスホ-特異的抗体(fluorochrome-conjugated phospho-specific antibodies)と共に細胞を培養することなどにより検出することができる。近年、ホスホ-フローサイトメトリー(phospho-flow cytometry)は、客観的尺度を使用して再発リスクにより癌患者を階層化するための強力な道具として出現してきた。

20

【0048】

一つの側面において、本発明は、被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する方法を提供する。一態様において、本方法は、(a)被験者由来の細胞を少なくとも一つのモジュレーターに暴露する；(b)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び、(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む。

30

【0049】

態様によっては、本発明は複数の個別の細胞集団内の一つ以上の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化を測定することによって、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する方法を提供する。態様によっては、一つ以上の細胞集団は、一つ以上のモジュレーターの存在、またはモジュレーターがない存在に暴露する。本明細書中で使用する細胞集団は細胞の集団をさし、ここでほとんどの細胞は同一細胞種であるか、同一特徴をもつ。態様によっては、症状(たとえば関節リウマチ)での様々な個別の細胞集団の特徴は、症状に関連するかもしれないメカニズムを反映する細胞ネットワークの混乱(disruption)を示す。態様によっては、これらのネットワークでの混乱は、一つ以上の環境要因を模倣する一つ以上のモジュレーターに複数の個別の細胞集団を暴露することにより明らかにすることができる。

40

【0050】

何年にもわたって、幾つかの症状(たとえば自己免疫疾患)への研究は、単一の細胞型の細胞から構成される原因となる細胞集団を同定することに注力されてきた。しかしながら、幾つかの個別の細胞集団または幾つかの細胞集団間の相互作用が症状の病理(pathology

50

)に寄与しているかもしれない。たとえば、免疫細胞の場合、免疫細胞は調節不全シグナル伝達経路(dysregulated signaling pathway)をもつかもしいので、環境要因に対して欠陥のある(たとえば過活動)応答、またはシグナル伝達因子(たとえばサイトカイン)の産生不全となる。特定の理論に束縛されるつもりはないが、B細胞、T細胞、マクロファージ、好中球、好塩基球及び好酸球など、幾つかの異なる細胞種が免疫系の一部として関与している。これらの細胞型はそれぞれ免疫系で個別の役割をもち、インターロイキン、TNF及びインターフェロンを含むサイトカインと呼ばれる分泌因子を使用して他の免疫細胞とコミュニケーションしている。マクロファージは異物を食菌(phagocytose)し、B及びT細胞による特異的抗原依存性応答並びに他の細胞型による非特異的な応答を刺激するためにサイトカインを使用する、抗原提示細胞(antigen-presenting cell)である。T細胞は様々な因子を分泌して、抗原に反応してB細胞活性化におけるヘルパーT細胞の役割など、特異的抗原に対する免疫応答を連係し、刺激する。好酸球、好中球及び好塩基球の増殖及び活性化も同様にサイトカインに影響を受ける。サイトカインコミュニケーションは局所的で、組織内またはごく近接した細胞間であることが多い。サイトカインはそれぞれ細胞-セットから分泌され、サイトカインを分泌する細胞を含むことが多い、別の標的の細胞セットでの応答を誘発する。

10

#### 【0051】

関節リウマチ(RA)のような症状において、樹状細胞、T細胞及び他の免疫細胞の間の相互作用、並びにサイトカイン及びケモカインの局所産生により起きた影響は、RAの病因に寄与するだろう。これらの細胞はさらに局所細胞(たとえば滑膜細胞)と相互作用する。未知の事象の後、炎症性サイトカインの産生及び局所炎症に反応して、樹状細胞、T細胞及び他の免疫細胞はサイトカイン及びケモカインの局所産生に反応して滑膜に引き付けられる。関節リウマチに罹患している患者の中には、慢性の炎症によって軟骨、骨及び靭帯が破壊されて、関節が変形してしまう者もいる。関節への損傷は疾患の初期に起こることがあり、進行性でありえる。

20

#### 【0052】

従って、症状を上手に診断して診療をするには、ある症状(たとえば自己免疫疾患)の病因に関与するかもしれない様々な個別の細胞集団の活性化状態データの知識が必要になるかもしれない。ネットワーク内で直接または間接的に相互作用するかもしれない様々な個別の細胞集団の活性化状態データを測定すると、ネットワークの状態の指標として役立つ。さらに、この活性化状態データは、ネットワーク内の様々な個別細胞集団内の相互作用に方向性を提供する。またネットワークに関与する細胞集団にわたって情報を提供する。その結果、様々な個別細胞集団の活性化状態データを測定すると、単一細胞の集団の分析よりもより良い症状の指標として役立つかもしれない。

30

#### 【0053】

本発明に関連する自己免疫疾患は、個体自身の組織若しくは共分離(co-segregate)から生じる、及び個体自身の組織若しくは共分離に向けられる疾患若しくは疾病、またはその兆候、またはそれから生じる症状をいう。自己免疫疾患または疾病の例としては、関節炎、たとえば関節リウマチ、急性関節炎、慢性関節リウマチ、痛風性関節炎、急性痛風性関節炎、急性免疫学的関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節炎、II型コラーゲン誘発関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬性関節炎、ステイル病、脊椎関節炎、若年発症関節リウマチ、骨関節炎、慢性進行性関節炎(arthritis chronica progrediente)、変形性関節炎、慢性原発性多発性関節炎(polyarthritis chronica primaria)、反応性関節炎及び剛直性脊椎炎；炎症性過剰増殖性皮膚病(inflammatory hyperproliferative skin disease)；乾癬、たとえば尋常性乾癬、滴状乾癬(guttate psoriasis)、膿疱性乾癬、及び爪乾癬；アトピー、たとえばアトピー性疾患、たとえば花粉症及びジョブ(Job)症候群；皮膚炎、たとえば接触性皮膚炎、慢性接触性皮膚炎、紅皮症、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触性皮膚炎、疱疹状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異性皮膚炎(non-specific dermatitis)、一次刺激性接触性皮膚炎、及びアトピー性皮膚炎；x-連鎖高IgM症候群(x-linked hyper IgM syndrome)；アレルギー性眼内炎

40

50

症性疾患；蕁麻疹、たとえば慢性アレルギー性蕁麻疹、慢性特発性蕁麻疹、及び慢性自己免疫性蕁麻疹；筋炎；多発性筋炎/皮膚筋炎；若年性皮膚筋炎；中毒性表皮壊死症；強皮症、たとえば全身性強皮症；硬化症、たとえば全身性硬化症、多発性硬化症(MS)、脊椎-眼(spino-optical)MS、原発性進行性MS(PPMS)、再発寛解型(relapsing remitting)MS(RRMS)、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化症、動脈硬化症、播種性硬化症(sclerosis disseminata)、及び失調性硬化症(ataxic sclerosis)；視神経脊髄炎(NMO)；炎症性腸疾患(IBD)、たとえばクローン病、自己免疫媒介性消化管疾患、大腸炎、潰瘍性大腸炎、潰瘍性結腸炎、顕微鏡的大腸炎、コラーゲン形成大腸炎、大腸ポリープ症(colitis polyposa)、壊死性小腸大腸炎、全層性大腸炎、及び自己免疫性炎症性腸疾患；腸炎；壊疽性濃皮症；結節性紅斑；原発性硬化症胆管炎；呼吸困難症候群、たとえば成人性または急性呼吸困難症候群(ARDS)；髄膜炎；ブドウ膜の全体または一部の炎症；虹彩炎；脈絡膜炎；自己免疫性血液疾患；リウマチ性脊椎炎；リウマチ性滑膜炎；遺伝性血管浮腫；脳神経障害、たとえば髄膜炎；妊娠性疱疹；妊娠性類天疱瘡；陰囊心因性掻痒症(pruritis scroti)；自己免疫性卵巣機能不全；自己免疫症状による突発性聴力損失；IgE-媒介性疾患、たとえばアナフィラキシー並びにアレルギー性及びアトピー性鼻炎；脳炎、たとえばラムスッセン脳症及び辺縁系及び/または脳幹の脳炎；ブドウ膜炎、たとえば前部ブドウ膜炎、急性前部ブドウ膜炎、肉芽腫性ブドウ膜炎、非肉芽腫性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎、または自己免疫性ブドウ膜炎；ネフローゼ症候群を有するか、または有さない糸球体腎炎(GN)、たとえば慢性または急性糸球体腎炎、原発性GN、免疫介在性GN、膜性GN(膜性腎症)、特発性膜性GNまたは特発性膜性腎症、膜性または膜性増殖性GN(MPGN)、たとえばI型及びII型、並びに急速進行性GN；増殖性腎炎；自己免疫性多発性内分泌性不全症；亀頭炎、たとえば形質細胞限局性亀頭炎；亀頭包皮炎；遠心性環状紅斑；色素異常性固定紅斑；多形性紅斑；環状肉芽腫；光沢苔癬；硬化性委縮性苔癬；ピダール苔癬；棘状苔癬；扁平苔癬；層状魚鱗癬；表皮剥離性角化症；前癌性角化症；壊疽性濃皮症；アレルギー症状及び応答；アレルギー反応；湿疹、たとえばアレルギー性及びアトピー性湿疹、皮脂欠乏性湿疹、汗疱状湿疹、及び汗疱(vesicular palmoplantar eczema)；喘息、たとえば気管支喘息、気管支喘息、及び自己免疫性喘息；T細胞の湿潤、及び慢性炎症性応答を含む症状；妊娠中の胎児A-B-O血液型のような外来性抗原に対する免疫反応；慢性肺炎症性疾患；自己免疫性心筋炎；白血球接着不全症；狼瘡、たとえばループス腎炎、ループス脳炎、小児狼瘡、非腎臓ループス(non-renal lupus)、腎外ループス(extra-renal lupus)、円板状ループス及び円板状紅斑狼瘡(discoid lupus erythematosus)、脱毛症ループス、全身性ループスエリテマトーサス(SLE)、皮膚性SLE、亜急性皮膚性SLE、新生児ループス症候群(NLE)、及び播種性ループスエリテマトーサス(lupus erythematosus disseminatus)；若年性発症型(I型)糖尿病、たとえば小児インスリン依存性糖尿病(IDDM)、成人発症型糖尿病(II型糖尿病)、自己免疫性糖尿病、特発性尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシー、及び糖尿病性大動脈疾患；サイトカイン及びTリンパ球によって媒介される急性及び遅延性過敏症に関連する免疫応答；結核；サルコイドーシス；肉芽腫症、たとえばリンパ腫様肉芽腫症；ウェゲナー肉芽腫症；無顆粒球症；脈管炎(vasculitides)、たとえば脈管炎、大血管脈管炎、リウマチ様多発性筋痛及び巨大細胞性(Takayasu)動脈炎、中血管脈管炎、川崎病、結節性多発動脈炎/結節性動脈周囲炎、顕微鏡的多発脈管炎、免疫脈管炎、CNS脈管炎、皮膚脈管炎、過敏性脈管炎、壊死性脈管炎、全身性壊死性脈管炎、ANCA-関連の脈管炎、Churg-Strauss脈管炎または症候群(CSS)、及びANCA-関連小血管脈管炎；側頭動脈炎；再生不良性貧血；自己免疫性再生不良性貧血；Coombs陽性貧血；Diamond Blackfan貧血；溶血性貧血または免疫性溶血性貧血、たとえば自己免疫性溶血性貧血(AIHA)、悪性貧血(貧血悪性熱(anemia perniosa))；Addison病；真正赤血球性貧血または赤血球無形成(pure red cell aplasia：(PRCA)；第VIII因子欠損症；血友病A；自己免疫性好中球減少症；汎血球減少症；白血球減少症；白血球漏出を含む疾病；CNS炎症性疾患；多臓器損傷症候群、たとえば敗血症、外傷または出血に続発性のもの；抗原-抗体複合体により媒介される疾患；糸球体基底膜抗体病；抗リン脂質抗体症候群；アレルギー性神経炎；ベーチェット病/症候群；キャッスルマン(Castle

man)症候群；グッドパスチャー(Goodpasture)症候群；レイノー(Reynaud)症候群；シェーグレン(Sjogren)症候群；スティーブンス・ジョンソン(Stevens-Johnson)症候群；類天疱瘡、たとえば水泡性類天疱瘡及び皮膚類天疱瘡、天疱瘡、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、天疱瘡粘膜天疱瘡(pemphigus mucus-membrane pemphigoid)、及び紅斑性天疱瘡；自己免疫性多腺内分泌不全症；ライター(Reiter)病または症候群；熱損傷；子癩前症；免疫複合体障害、たとえば免疫複合体腎炎、及び抗体媒介性腎炎；多発性神経障害；慢性腎症、たとえばIgM多発性神経障害及びIgM-媒介性神経症；血小板減少症(たとえば心筋梗塞患者に発症するもの)、たとえば血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、輸血後紫斑病(PTP)、ヘパリン誘発性血小板減少症、自己免疫性または免疫媒介性血小板減少症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、及び慢性または急性ITP；強膜炎、たとえば特発性角膜強膜炎、及び上強膜炎；精巣及び卵巣の自己免疫疾患、たとえば自己免疫性精巣炎及び卵巣炎；原発性甲状腺機能低下症；副甲状腺機能低下症；自己免疫性内分泌疾患、たとえば甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)、または亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブ(Grave)病、多腺性症候群、自己免疫性多腺性症候群、及び多腺性内分泌障害症候群；腫瘍随伴性症候群、たとえば神経性腫瘍随伴性症候群；ランパート・イトン(Lambert-Eaton)筋無力症症候群またはイトン・ランパート(Eaton-Lambert)症候群；スティッフマン症候群または全身硬直性症候群；脳脊髄炎、たとえばアレルギー性脊髄炎、脳脊髄炎性アレルギー、及び実験的アレルギー性脳脊髄炎(experimental allergic encephalomyelitis : EAE)；重症筋無力症、たとえば胸腺腫に関連する重症筋無力症；小脳変性；神経性筋緊張症；眼球クローヌスまたは眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群(OMS)；感覚性ニューロパチー；多巣性運動ニューロパチー；シーハン(Sheehan)症候群；肝炎、たとえば自己免疫性肝炎、慢性肝炎、ルポイド肝炎、巨細胞性肝炎、慢性活動性肝炎及び自己免疫性慢性活動性肝炎；リンパ性間質性肺炎(LIP)；閉塞性細気管支炎(非移植)対NSIP；ギラン・バレー(Guillain-Barre)症候群；ベルジェ(Berger)病(IgA腎症)；突発性IgA腎症；線状IgA皮膚病；急性好中球性皮膚症；角層下膿疱症；一過性棘融解性皮膚症；肝硬変、たとえば原発性胆汁性肝硬変及び肺線維症；自己免疫性腸疾患症候群；セリアック(Celiac)またはコエリアック(Coeliac)病；脂肪便症(グルテン腸症)；難治性スプルー(refractory sprue)；特発性スプルー；クリオグロブリン血症；筋委縮性側索硬化症(ALS)；ルイ・ゲーリック(Lou Gehrig)病)；環状動脈疾患；自己免疫性耳疾患、たとえば自己免疫性内耳疾患(AIED)；自己免疫性難聴；多発性軟骨炎、たとえば難治性または再発または再発性多発性軟骨炎；細胞タンパク症；コーガン(Cogan)症候群/非梅毒性間質性角膜炎(nonsyphilitic interstitial keratitis)；ベル(Bell)麻痺；スイーツ(Sweet)病/症候群；自己免疫性酒さ(rosacea autoimmune)；帯状疱疹に関連する痛み；アミロイド症；非ガン性リンパ球増加症(non-cancerous lymphocytosis)；原発性リンパ水腫、たとえばモノクローナルB細胞リンパ球増加症(たとえば、良性単クローン免疫グロブリン症及び、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance : MGUS)；末梢神経障害；チャンネル病、たとえばてんかん、偏頭痛、不整脈、筋障害、聾、盲目、周期性麻痺、及びCNSのチャンネル病；自閉症；炎症性筋障害；巣状または分節性糸球体硬化症(FSGS)；内分泌性眼症；網膜ブドウ膜炎；網膜絡膜炎；自己免疫性肝疾患；線維筋痛症；多発性内分泌不全；シュミット(Schmidt)症候群；副腎炎；胃萎縮；初老性痴呆；脱髄症、たとえば自己免疫性脱髄症及び慢性炎症性脱髄性多発性神経障害；ドレスラー(Dressler)症候群；円形脱毛症；完全脱毛症；CREST症候群(石灰沈着症、レイノー(Raynaud)現象、食道蠕動低下、強指症、及び毛細管拡張症)；男性及び女性の自己免疫性不妊(たとえば、反生殖細胞抗体(anti-spermatozoan antibodies))；混合性結合組織病；シャーガス(Chagas)病；リウマチ熱；反復流産；農夫肺；多形性紅斑；心切開術後症候群；クッシング(Cushing)症候群；鳥飼病；アレルギー性肉芽腫性脈管炎；良性皮膚リンパ球性脈管炎；アルポート(Alport)症候群；肺胞炎(alveolitis)、たとえばアレルギー性肺胞炎及び線維化肺胞炎；間質性肺炎；輸血反応；ハンセン病；マラリア；サムタ(Samter)症候群；カプラン(Caplan)症候群；心内膜炎；心内膜心筋線維症；びまん性間質性肺線維症；間質性肺線維症(inter

stitial mung fibrosis) ; 肺線維症 ; 特発性肺線維症 ; 嚢胞性線維症 ; 眼内炎 ; 持久性隆起性紅斑 ; 胎児赤芽球症 ; 好酸球筋膜炎 ; シェルマン(Shulman)症候群 ; フェルティ(Felty)症候群 ; フレア炎症(flariasis) ; 毛様体炎、たとえば慢性毛様体炎、異時性毛様体炎、虹彩毛様体炎(急性または慢性)、またはフック(Fuch)毛様体炎 ; ヘノッホ・シェーンライン(Henoch-Schonlein)紫斑病 ; 敗血症 ; 内毒素症 ; 膀胱炎 ; チロキシコーシス(thyroxinosis) ; エバン(Evan)症候群 ; 自己免疫性腺機能不全 ; シデナム(Sydenham)舞蹈病 ; 連鎖球菌感染後腎炎 ; 閉塞性血栓脈管炎 ; 甲状腺中毒症 ; 脊髄ろう(tabes dorsalis) ; 脈絡膜炎 ; 巨細胞多発性筋痛 ; 慢性過敏性肺臓炎 ; 乾性角結膜炎 ; 流行性角結膜炎 ; 特発性ネフローゼ症候群 ; 微小変化型ネフローゼ ; 良性家族性及び虚血性灌流障害 ; 移植器官再灌流 ; 網膜自己免疫 ; 関節炎症 ; 気管支炎 ; 慢性閉塞性気道/肺疾患 ; 珪肺症 ; アフタ ; アフタ性口内炎 ; 動脈硬化性疾患 ; アスペルミオジェネーシス(aspermiogenesis) ; 自己免疫性溶血 ; ベック(Boeck)病 ; クログロブリン血症 ; デュプイトラン(Dupuytren)拘縮 ; 水晶体過敏性眼内炎(endophthalmia phacoanaphylactica) ; アレルギー性腸炎 ; らい性結節性紅斑 ; 特発性顔面神経麻痺 ; リウマチ熱 ;

ハンマン・リッチ(Hamman-Rich)病 ; 感覚神経性聴力障害 ; 発作性ヘモグロビン尿症(haemoglobinuria paroxysmatica) ; 性腺機能不全症 ; 限局性回腸炎 ; 白血球減少症 ; 伝染性単核球症 ; 横断性脊髄炎(traverse myelitis) ; 原発性特発性粘液水腫(primary idiopathic myxedema) ; ネフローゼ ; 交換性眼炎(ophthalmia sympathica) ; 肉芽腫性精巣炎(orchitis granulomatosa) ; 膀胱炎 ; 急性多発性神経根炎 ; 壊疽性膿皮症 ; ケルバン(Quervain)甲状腺炎 ; 後天性脾臓萎縮症(acquired splenic atrophy) ; 非悪性胸腺腫 ; 白斑(vitiligo) ; 毒素性ショック症候群 ; 食中毒 ; T細胞の浸潤を含む症状 ; 白血球粘着不全症(leukocyte-adhesion deficiency) ; サイトカイン及びT-リンパ球により媒介される急性及び遅延型過敏症に関連する免疫応答 ; 白血球漏出を含む症状 ; 多臓器損傷症候群 ; 抗原-抗体複合体により媒介される疾病 ; 抗糸球体基底膜抗体病 ; アレルギー性神経炎 ; 自己免疫性多腺性内分泌不全症 ; 卵巣炎 ; 原発性粘液水腫 ; 自己免疫性萎縮性胃炎 ; 交換性眼炎 ; リウマチ病 ; 混合性結合組織病 ; ネフローゼ症候群 ; 膵島炎(insulinitis) ; 多腺内分泌不全症 ; 多腺性自己免疫症候群I型(polyglandular syndrome) ; 成人発症型特発性上皮小体機能低下症(adult-onset idiopathic hypoparathyroidism: AOH) ; 心筋症、たとえば拡張型心筋症 ; 後天性表皮水疱症(EBA) ; ヘモクロマトーシス ; 心筋炎 ; ネフローゼ症候群 ; 原発性硬化性胆管炎 ; 化膿性または非化膿性副鼻腔炎 ; 急性または慢性副鼻腔炎 ; 篩骨洞炎、前頭洞炎、上顎洞炎、または蝶形骨洞炎 ; 好酸球に関連した疾患、たとえば好酸球増加症、肺湿潤性好酸球増加症、好酸球増加筋痛症候群、レフラー(Löffler)症候群、慢性好酸球肺炎、局所性肺好酸球増加症、気管支肺アスペルギルス症、アスペルギルス腫、または好酸球を含む肉芽腫 ; アナフィキラーシ ; 血清反応陰性脊椎関節炎(seronegative spondyloarthritides) ; 多腺性内分泌性自己免疫疾患 ; 硬化性胆管炎 ; 慢性皮膚粘膜炎ガンジダ症 ; ブルトン(Bruton)症候群 ; 乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症 ; ウィスコット・アルドリッチ(Wiskott-Aldrich)症候群 ; 運動失調末梢血管拡張症候群 ; 血管拡張症 ; 膠原病に関連した自己免疫疾患、リウマチ、神経性疾患、リンパ節炎、血圧応答の低下、血管機能不全、組織損傷、心血管虚血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、及び血管新生を伴う疾患 ; アレルギー性過敏性疾患 ; 糸球体腎炎(glomerulonephritides) ; 再灌流障害 ; 虚血性再灌流障害(ischemic re-perfusion disorder) ; 心筋または他の組織の再灌流障害 ; リンパ腫気管支炎 ; 炎症性皮膚疾患 ; 急性炎症性成分による皮膚症 ; 多臓器不全 ; 水疱症 ; 腎皮質壊死症 ; 急性化膿性髄膜炎または他の中枢神経の炎症性疾患 ; 眼及び眼窩炎症疾患 ; 顆粒球輸血関連症候群 ; サイトカイン誘発毒性 ; ナルコレプシー ; 急性の重篤な炎症 ; 慢性難治性炎症 ; 腎盂炎 ; 動脈内膜過形成 ; 消化性潰瘍 ; 弁膜炎 ; 及び子宮内膜症が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0054】

態様によっては、本方法はさらに自己免疫疾患の診断法を提供する。他の態様では、本方法は自己免疫疾患の分類法を提供する。分類化としては、疾患のサブタイプ、病態、疾患活動性レベル及び処置に対する応答の決定が挙げられるが、これらに限定されない。他

10

20

30

40

50

の態様では、起こりうる疾患に関連する治療効果(outcome)の可能性に関して予測をする。ある態様では、予測は自己免疫疾患の活動性の先行きに関する。予測された活性の将来的な推移(future course)は、疾患活動性の上昇若しくは低下における変化でありえるか、または活性の将来的な推移は、分析時の活性レベルと実質的に同様のままであると予測することができる。態様によっては、疾患活動性における有意変化の将来的な発現(onset)に関する予測は、活性における変化の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12週間以上前にされる。態様によっては、疾患活動性における有意変化の将来的な発現に関する予測は、活性における変化の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11か月以上前にされる。

【0055】

態様によっては、予測は、一つ以上の処置に対する応答の可能性に関してなされる。予測され得る処置としては、被験者がまだ受けていない処置または、被験者が今処置を受けている処置における変化が挙げられる。変化としては、用量、服薬スケジュール、投与経路及び/または追加の処置との組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。態様によっては、予測によって被験者が受ける処置の選択または変更が誘導される。

【0056】

態様によっては、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノース、及び/または治療効果の予測法は、一人の被験者に関して少なくとも二つの時間点で実施する。被験者は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、50、100、150、200回以上、本発明の方法を受けることができる。本発明の方法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、若しくは24時間未満、約、またはそれ以上の間隔で；1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14日未満、約、またはそれ以上の間隔で；1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、若しくは14週間未満、約、またはそれ以上の間隔で；1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、若しくは14か月未満、約、またはそれ以上の間隔で；及び1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14年未満、約、またはそれ以上の間隔で、被験者で繰り返すことができる。それぞれの繰り返しは、被験者の「時間点(time point)」を表す。態様によっては、本発明の方法は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14日未満、約、またはそれ以上の間隔で；1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、若しくは14週間未満、約、またはそれ以上の間隔で；1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、若しくは14か月未満、約、またはそれ以上の間隔で；1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14年未満、約、またはそれ以上の間隔で、被験者の人生を含み、被験者をモニターするために使用される。態様によっては、被験者に関して二つ以上の時間点を比較する。態様によっては、被験者は治療薬による処置を受けている。態様によっては、処置される被験者で使用される治療薬の効能の測定は、二つ以上の時間点を比較することをベースとする。

【0057】

態様によっては、被験者由来の細胞が暴露されるモジュレーターは治療薬であり、ここで前記治療薬は自己免疫疾患を処置するのに使用されるものである。自己免疫疾患を処置するのに使用される治療薬としては、自己免疫疾患の処置をするために設計されたもの、処置で使用されるもの、処置で有益な効果があることが判明したもの、または処置でおそらく有益な効果があるだろうというすべてのものを含み得る。自己免疫疾患を処置するのに使用される治療薬の非限定的な種類としては、生物学的または化学的化合物、たとえば単一または複雑な有機若しくは無機分子、ペプチド、ペプチド模倣薬、タンパク質、小分子、アプタマー(aptamer)、核酸分子、及び抗体が挙げられる。自己免疫疾患を処置するのに一般的に使用される治療薬の例としては、ステロイド類、たとえばコルチコステロイド；サイトカイン除去生物製剤(cytokine depleting biologics)、たとえば抗-TNF、抗-IL1、及び抗-IL6；TNF-遮断薬、たとえばインフリキシマブ(Infliximab)、アダリムマブ(Adalimumab)、及びエタネルセプト(Etanercept)；抗-インターロイキン薬、たとえばアナキンラ(Anakinra)、AMG108、イグラチモド(Iguratimod)、及びアクテムラ(Actemra)；抗-B細胞薬、たとえばリツキシマブ(Rituximab)及びエプラツズマブ(Epratuzumab)；抗-共刺激性分子薬(anti-costimulatory molecule agent)、たとえばアバタセプト(A

10

20

30

40

50

batacept)及びベリムマブ(Belimumab)；寛容原性薬(tolerogenic agent)(B細胞表面DNA受容体に向けられた合成分子)、たとえばLJP 394及びTV-4710；抗-補体タンパク質薬(anti-complement protein agent)、たとえばエクリツマブ(Eculizumab)；T細胞シグナル伝達分子の阻害剤、たとえばCP690550；細胞移動の阻害剤、たとえばケモカイン受容体のアンタゴニスト(マラビロク(Maraviroc)、INCB3284)；疾患修飾性抗リウマチ薬(disease-modifying anti-rheumatic drug)、たとえばレフィウノミド(lefiunomide)及びメトトレキセート；スルファサラジン；ヒドロキシクロロキン；アザチオプリン；シクロスポリン；ミノサイクリン；D-ペニシラミン；それらの等価物；及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。態様によっては、細胞は、二種以上の治療薬に同時にまたは連続して暴露される。さらなる態様では、細胞は一つ以上の治療薬と一つ以上の追加のモジュレーターに同時にまたは連続して暴露される。

10

## 【0058】

別の側面では、本発明は、被験者における自己免疫疾患の処置用の治療薬を同定する方法を提供する。一態様において、本方法は、(a)前記被験者由来の細胞を少なくとも一つのもジュレーターに暴露する；(b)少なくとも一つの前記活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び、(c)前記少なくとも一つの前記活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者における自己免疫疾患の処置のための一つ以上の治療ターゲットを同定する、各段階を含む。態様によっては、一つ以上の治療ターゲットを同定することは、活性化可能エレメントのレベル若しくはレベルにおける変化と、自己免疫疾患の活性化レベルの存在、非存在、ステージ、サブタイプ、活性レベル、及び/または活性化レベルにおける変化との間の相関関係を同定することを含む。態様によっては、相関関係は、可能性のある治療ターゲットとして、活性化可能エレメント、前記活性化可能エレメントに関連する分子、前記活性化可能エレメントと直接若しくは間接的に相互作用する分子、活性化可能エレメントにより調節されているか、若しくは調節された分子、及び/または同一若しくは関連する経路内の他の活性化エレメントを表すことができる。態様によっては、一つ以上の治療ターゲットに向けられた治療薬は、単一の治療ターゲットに特異的に、二つ以上の治療ターゲットに特異的に、一つ以上の治療ターゲットに非特異的に、同定された治療ターゲットの一つ以上、及び/または治療及び非治療ターゲットの組み合わせを含む複数の治療ターゲットに作用することができる。治療ターゲットは、個別に、組み合わせ、同時に及び/または連続して標的化することができる。

20

30

## 【0059】

サンプル及びサンプリング

本方法は、個体由来の一つ以上のサンプル分析を包含する。個体は多細胞生物であり；態様によっては、前記個体は動物、たとえば哺乳類である。態様によっては、前記個体はヒトである。

## 【0060】

サンプルは、一つ以上の細胞の分析ができる任意の好適なタイプでありえる。サンプルは個体から一回または複数回得ることができる。複数のサンプルは、個体の様々な場所(たとえば、血液サンプル、骨髄及び/またはリンパ節サンプル)で、様々な時間(たとえば、処置への応答をモニターするために採取するか、病状の再来をモニターするために採取される一連のサンプル)またはこの任意の組み合わせから得ることができる。サンプルの種類、場所及びサンプリング時間をベースとしたこれら及び他の可能なサンプリングの組み合わせにより、前病的細胞(pre-pathological cell)または病的細胞の存在の検出、処置応答の測定、及び疾患のモニタリングも可能になる。

40

## 【0061】

サンプルが一連のもの、たとえば処置後に得られた一連の血液サンプルとして得られる場合、サンプルは、固定間隔、もっとも最近の単数若しくは複数種類のサンプルの状態によって、または個体の他の特徴によって、またはそれらのある組み合わせによって決定される間隔で得ることができる。たとえばサンプルは、約1、2、3、若しくは4週間の間隔で、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、若しくは11か月の間隔で、約1、2、3、4、5、若し

50

くは5年以上の間隔で、またはそれらのある組み合わせの間隔で得ることができる。この間隔は、個体からのサンプリングの利用可能性及びサンプリング設備の利用可能性によって正確ではないかもしれないが、本発明は目的とする間隔の計画に対応する好適な間隔が含まれる。たとえば、癌の処置を受けている個体は、処置後最初の6か月から1年の間は比較的頻繁に(たとえば毎月または3か月ごと)サンプル採取(たとえば採血)することができ、そして処置後、もし異常が見つからなければ、その後は頻度をより少なく(たとえば6か月から1年の間に)することができる。しかし、もし介入期間、またはサンプリングの間のいずれかで何らかの異常または他の証拠が見つければ、サンプリング間隔を変更することができる。

#### 【0062】

一般に、もっとも容易に得られるサンプルは流体(fluid)サンプルである。流体サンプルとしては、正常及び病理学的体液及びそれらの吸引液(aspirate)が挙げられる。流体サンプルは臓器及び腔の洗液(洗浄及び灌流)も含む。体液としては、全血、骨髄液、滑液(synovial fluid)、脳脊髄液、唾液、汗、涙、精液、唾(sputum)、粘液(mucus)、月経血、母乳、尿、リンパ液、羊水、胎盤液及び浸出物(effusion)、たとえば心嚢水、関節滲出液、胸水、及び腹腔水(腹水)が挙げられる。洗液は、多くの臓器、体腔、通路、管、及び腺から得ることができる。洗浄しえる部位としては、肺(気管支洗浄)、胃(胃洗浄)、胃腸管(胃腸洗浄)、結腸(結腸洗浄)、膣、膀胱(膀胱洗浄)、乳管(管洗浄)、口腔、鼻、鼻腔(sinus cavity)、及び腹腔(腹腔洗浄)が挙げられる。態様によっては、前記サンプル(単数または複数)は血液である。

10

20

#### 【0063】

固体組織サンプルは、単独でまたは流体サンプルと併せて使用することもできる。固体サンプル、たとえば外科手術標本、生体検査、及び組織搔爬(tissue scraping)、たとえば頬搔爬(cheek scraping)は、当技術分野で公知の任意の方法により得ることができる。外科手術標本としては、試験的、美容的、再建的、または治療的手術の間に得られたサンプルが挙げられる。生体検査標本は、咬合(bite)、ブラシ、コーン、コア、細胞学的、吸引、内視鏡的、切除、試験的、細針、切開、経皮、穿孔、定位固定(stereotactic)及び表面生検などの多くの方法により得ることができる。

#### 【0064】

態様によっては、サンプルは血液サンプルである。態様によっては、サンプルは骨髄サンプルである。態様によっては、サンプルはリンパ節サンプルである。態様によっては、サンプルは脳脊髄液である。態様によっては、血液、骨髄、脳脊髄液及びリンパ節サンプルの一つ以上の組み合わせを使用する。

30

#### 【0065】

一つ以上の細胞若しくは細胞型、または一つ以上の細胞若しくは細胞型を含むサンプルは、身体サンプルから単離することができる。細胞は、遠心分離、洗脱(elutriation)、密度勾配分離、アフェレーシス(apheresis)、親和性選択、選り分け(panning)、FACS、ハイパック(Hypaque)を使用する遠心分離、抗体を付着させた固体単体(電磁ビーズ、カラム中のビーズ、または他の表面)などにより分離することができる。特定の細胞型で識別されたマーカーに特異的な抗体を使用することにより、比較的均種(homogeneous)の細胞集団を得ることができる。あるいは、異種(heterogeneous)細胞集団を使用することができる。細胞はフィルターを使用しても分離することができる。たとえば、所望の細胞型またはクラスを選択する孔径を含むように作製されているフィルターに、全血を適用することもできる。米国特許出願第09/790,673号に開示されているように、赤血球細胞を溶血した後、孔径5~10 $\mu$ mのフィルターを使用することにより、希釈した全血から珍しい病原性細胞を濾別することができる。一度サンプルが得られたら、短期間、好適な培地中に直接、凍結または維持することができる。本発明の方法に従って使用するための一つ以上の細胞を単離するための方法は、標準的な方法に従って及び当技術分野で十分に確立されたプロトコルに従って実施される。米国特許出願シリアル番号第61/048,886号；同第61/048,920号；及び同第61/048,657号も参照されたい。また、上記のBD及びBCIなどの会社からの市

40

50

販品も参照されたい。米国特許第7,381,535号及び同第7,393,656号も参照されたい。上記特許及び特許出願のすべては、上記参照文献に含まれる。

【0066】

態様によっては、細胞は、収集後、ウシ胎児血清、ウシ血清、ヒト血清、ブタ血清、ウマ血清若しくはヤギ血清などの血清の存在下または非存在下で、活性化可能エレメント(たとえばRPMI、DMEM)の活性化レベルを明らかにするのに好適な培地で培養する。血清が培地中に存在する場合には、0.0001%~30%の範囲のレベルで存在することができる。

【0067】

モジュレーター

態様によっては、本方法はモジュレーターを使用する。モジュレーターは、細胞のシグナル伝達ネットワークに影響を与えうる活性化剤、治療薬、阻害剤または化合物である。モジュレーターは、広範な種類の環境的刺激及び入力(input)の形態をとることができる。態様によっては、細胞をモジュレーターに暴露する。細胞のモジュレーターへの暴露としては、細胞を取り巻く環境にモジュレーターを導入すること、細胞の環境の物理的パラメーターを変えること、及び細胞とモジュレーターとを接触させることを挙げることができる。態様によっては、モジュレーターは、単独でまたは細胞、細胞自身、ウイルス及び生物学的及び非生物学的複合体(たとえばビーズ、プレート、ウイルス外皮、抗原提示分子、たとえば組織適合性複合体)と関連して、成長因子、サイトカイン、接着分子、薬剤、治療薬、ホルモン、小分子、ポリヌクレオチド、抗体、天然の化合物、ラクトン、化学療法薬、免疫モジュレーター(immune modulator)、糖、プロテアーゼ、イオン、反応性酸素種、放射線、物理的パラメーター、たとえば熱、低温、UV照射、ペプチド及びタンパク質フラグメントを含む群から選択される。モジュレーターの例としては、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN、IFN、T細胞受容体(TCR)架橋性抗体、B細胞受容体(BCR)架橋性抗体SDF-1、FLT-3L、IGF-1、M-CSF、SCF、PMA、タブシガルギン(Thapsigargin)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、エトポシド、AraC、ダウノルピシン、スタウロスポリン、ベンジルオキシカルボニル-Val-Ala-Asp(OMe)フルオロメチルケトン(ZVAD)、レナリドミド、EPO、アザシタジン(azacitadine)、デシタピン(decitabine)、LPS、TNF-、及びCD40Lが挙げられるが、これらに限定されない。態様によっては、モジュレーターは活性化因子(activator)である。態様によっては、モジュレーターは阻害物質(inhibitor)である。態様によっては、モジュレーターは、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、ホスファターゼ阻害剤、及び薬理的試薬が挙げられる。レスポンスパネル(response panel)は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN、IFN、T細胞受容体架橋性抗体、B細胞受容体架橋性抗体SDF-1、FLT-3L、IGF-1、M-CSF、SCF、PMA、タブシガルギン、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、エトポシド、AraC、ダウノルピシン、スタウロスポリン、ベンジルオキシカルボニル-Val-Ala-Asp(OMe)フルオロメチルケトン(ZVAD)、レナリドミド、EPO、アザシタピン、デシタピン、LPS、TNF-、及びCD40Lの少なくとも一つから構成される。TCR架橋性抗体の例としては、抗-CD3及び抗CD28抗体が挙げられるが、これらに限定されない。BCR架橋性抗体の例としては、抗-IgG、抗-IgM、抗-カッパ、及び抗-ラムダ抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0068】

モジュレーション(modulation)は、様々な環境で実施することができる。態様によっては、集めた直後に細胞をモジュレーターに暴露する。混合の細胞集団がある場合には、細胞の精製はモジュレーション後に実施する。態様によっては、全血を集め、これにモジュレーターを添加する。態様によっては、単一の細胞または単一の細胞の精製画分をプロセッシングした後で、細胞をモジュレーションする。代表例としては、全血を集め、リンパ球の濃縮画分(enriched fraction)を処理し、次いでこれをモジュレーターに暴露する。モジュレーションは、細胞を二つ以上のモジュレーションに暴露することを含み得る。たとえば態様によっては、細胞は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10種のモジュレーターに暴露する。態様によっては、細胞を少なくとも二つのモジュレーターに暴露し、

10

20

30

40

50

ここで一つのモジュレーターは活性化因子であり、及び一つのモジュレーターは阻害物質であり、少なくとも一つのモジュレーターは阻害物質であるか、または少なくとも一つのモジュレーターは活性化因子である。態様によっては、細胞は二つ以上のモジュレーターに同時にまたは連続して暴露される。態様によっては、一つ以上のモジュレーターの作用を、モジュレーションに対する応答レベルを特徴付けするために、未処理細胞(一つ以上のモジュレーターに暴露されていない細胞)と比較する。本明細書中、参照として含まれる米国特許出願第61/048,657号を参照されたい。

【0069】

態様によっては、細胞は集めた後で好適な培地中で培養してから、モジュレーターに暴露する。態様によっては、培地は増殖培地(growth media)である。態様によっては、増殖培地は血清を含みうる複合培地である。態様によっては、増殖培地は血清を含む。態様によっては、血清は、ウシ胎児血清、ウシ血清、ヒト血清、ブタ血清、ウマ血清及びヤギ血清からなる群から選択される。態様によっては、血清レベルは0.0001%~30%を変動する。態様によっては、増殖培地は化学的に定義された最小培地であり、血清を含まない。態様によっては、細胞は分化誘導性培地(differentiating media)で培養する。

10

【0070】

モジュレーターとしては、化学的及び生物学的物質、並びに物理的または環境刺激が挙げられる。モジュレーターは、細胞外にまたは細胞内に作用することができる。化学的及び生物学的モジュレーターとしては、成長因子、サイトカイン、神経伝達物質、接着分子、ホルモン、小分子、無機化合物、ポリヌクレオチド、抗体、天然の化合物、レクチン、ラクトン、化学療法薬、生物反応修飾物質、糖、プロテアーゼ、及びフリーラジカルが挙げられる。モジュレーターとしては、細胞若しくは植物抽出物、細胞若しくは腺分泌物、生理液(physiologic fluid)、たとえば血清、羊水または毒液(venom)を含み得る複合体または未定義の生物学的組成物が挙げられる。物理的及び環境刺激としては、電磁気、紫外線、赤外線または微粒子放射線、酸化還元電位及びpH、栄養物の存在または非存在、温度変化、酸素分圧の変化、イオン濃度の変化並びに酸化的ストレスの適用が挙げられる。モジュレーターは内因性または外因性でありえ、単一細胞への暴露濃度及び期間、または他のモジュレーターと組み合わせ若しくは連続して使用するかどうかに依存して、様々な作用を生み出しえる。モジュレーターは、一種以上の中間の生体分子との相互作用を通して間接的に、または活性化可能エレメントに直接作用することができる。間接的モジュレーションとしては、遺伝子発現の変更(alteration)を含み、ここで発現された遺伝子産物は活性化可能エレメントであるか、または活性化可能エレメントのモジュレーターである。

20

30

【0071】

態様によっては、モジュレーターは阻害剤である。態様によっては、阻害剤は、細胞の細胞経路(たとえばシグナル伝達カスケード)に関与する複数の因子または細胞因子の阻害剤である。態様によっては、阻害剤はホスファターゼ阻害剤である。ホスファターゼ阻害剤の例としては、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、siRNA、miRNA、カンタリジン(Cantharidin)、(-)-p-プロモテトラミソール、ミクロシスチン(microcystin)LR、オルトバナジウム酸ナトリウム、過バナジウム酸ナトリウム、硫酸バナジル、ナトリウムオキシジペルオキシ(1,10-フェナントリン)バナデート、ビス(マルトラト)オキシバナジウム(IV)、モリブデン酸ナトリウム、過モリブデン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、イミダゾール、フッ化ナトリウム、 $\beta$ -グリセロホスフェート、ポリリン酸ナトリウム十水和物、カリキュリンA、ディスコデルミア・カリックス(Discodermia calyx)、bpV(phen)、mpV(pic)、DMHV、シペルメトリン、デフォスタチン(Dephostatin)、オカダ酸(Okadaic Acid)、NIPP-1、N-(9,10-ジオキソ-9,10-ジヒドロ-フェナントレン-2-イル)-2,2-ジメチル-プロピオンアミド、 $\beta$ -プロモ-4-ヒドロキシアセトフェノン、4-ヒドロキシフェナシルBr、 $\beta$ -プロモ-4-メトキシアセトフェノン、4-メトキシフェナシルBr、 $\beta$ -プロモ-4-(カルボキシメトキシ)アセトフェノン、4-(カルボキシメトキシ)フェナシルBr、及びビス(4-トリフルオロメチルスルホンアミドフェニル)-1,4-ジイソプロピルベンゼン、フェニルアルシンオキシド、ピロリジンジチオ

40

50

カルバメート及びフッ化アルミニウムが挙げられるが、これらに限定されない。

【0072】

活性化可能エレメント

態様によっては、本発明は、一つ以上のモジュレーターとの処置前及び/または後に、一つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する方法に関する。一つ以上のモジュレーターとの処置の際に細胞中の活性化可能エレメントの活性化により、症状の経過を予測するため、リスクグループを識別するため、二次的な合併症が発症したり、危険な副作用に苦しんだりするリスク増加を予測するため、個体の治療法を選択するため、個体の治療法に対する応答を予測するため、個体において治療の効能を測定するため、及び個体の予後判定をするための指標などとして使用することができる症状において、有効な経路を明らかにすることができる。

10

【0073】

態様によっては、細胞内の活性化可能エレメントの活性化レベルは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のモジュレーターに細胞を暴露することにより測定される。態様によっては、細胞内の活性化可能エレメントの活性化レベルは、モジュレーターの少なくとも一つが阻害剤である、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のモジュレーターに細胞を暴露することにより測定される。他の態様では、細胞の活性化可能エレメントの活性化レベルは、モジュレーターの少なくとも一つが活性化剤である、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のモジュレーターに細胞を暴露することにより測定される。態様によっては、細胞の活性化可能エレメントの活性化レベルは、モジュレーターが阻害剤または活性化剤である、別のモジュレーターまたは阻害剤に細胞を暴露することにより測定される。態様によっては、細胞の活性化可能エレメントの活性化レベルは、阻害剤及び活性化剤に細胞を暴露することにより測定される。態様によっては、細胞の活性化可能エレメントの活性化レベルは、二つ以上のモジュレーターに細胞を暴露することにより測定される。

20

【0074】

態様によっては、細胞の集団の表現型プロフィールは、細胞の集団を別々の培地中の複数のモジュレーターに暴露する際に、活性化可能エレメントの活性レベルを測定することにより決定される。モジュレーターの非限定的な例としては、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、T細胞受容体(TCR)架橋性抗体、B細胞受容体(BCR)架橋性抗体、SDF-1 $\alpha$ 、FLT-3L、IGF-1、M-CSF、SCF、PMA、タプシガルギン、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、エトポシド、AraC、ダウノルピシン、スタウロスポリン、ベンジルオキシカルボニル-Val-Ala-Asp(OMe)フルオロメチルケトン(ZVAD)、レナリドミド、EPO、アザシタジン、デシタピン、LPS、TNF $\alpha$ 、及びCD40L及び/またはそれらの組み合わせが挙げられる。TCR架橋性抗体の例としては、抗-CD3及び抗CD28抗体が挙げられるが、これらに限定されない。BCR架橋性抗体の例としては、抗-IgG、抗-IgM、抗-カッパ、及び抗-ラムダ抗体が挙げられるが、これらに限定されない。態様によっては、細胞の集団の表現型プロフィールを使用して本明細書に記載の集団を分類する。

30

【0075】

本発明の方法及び組成物は、細胞経路におけるすべての活性化可能エレメントの状態、またはかかる活性化可能エレメントの収集を調べ、プロフィール分析するのに使用することができる。単一または複数の明確な経路は(連続的に若しくは同時に)プロフィール分析することができるか、または単一の経路内、若しくは複数の経路にわたって(連続的に若しくは同時に)活性化可能エレメントのサブセットを調べることができる。

40

【0076】

当業者には理解されるように、広範な種類の活性化事象での使用法を知見することができる。通常、基本的要件は、何らかの兆候(「活性化状態インジケータ(activation state indicator)」という)により、好ましくは標識化結合エレメントの変化した結合により、または検出可能な生物学的活性における変化(たとえば、活性化状態は測定可能で、非活性化状態における活性化の欠失(lack)と比較しえる酵素活性をもつか、細胞周期が特

50

定の点で停止し、DNA集積の特異的なレベルとなる)により定量可能な活性化可能エレメントにおける変化となるという点である。

【0077】

個体の活性化可能エレメントの活性化レベルは、活性化エレメントの相対量を表す。活性化レベルは、高活性化/低活性化/活性なし若しくは「オンまたはオフ」状態などの活性化状態と関連したカテゴリ群に区分されるか、または数値で表すことができる。どのメカニズムにもプロセスに限定されるものではないが、代表例として、タンパク質上の個々のリン酸化可能部位は、タンパク質を活性化または失活させることができる。さらに、アダプタータンパク質のリン酸化は、異なる(distinct)細胞のシグナル伝達経路の他の成分/タンパク質との相互作用を促進し得る。本明細書において、細胞構成成分の一部である活性化可能エレメントに適用する際に「オン」及び「オフ」なる用語は、前記活性化可能エレメントの状態であって、それが一部となっている細胞構成成分の全体の状態ではないことを記載するために使用する。通常、細胞は特定の活性化可能エレメントと共に複数の特定のタンパク質または他の構成成分を有し、この複数のタンパク質または構成成分は通常、その個体の活性化可能エレメントがオン状態である幾つかのタンパク質若しくは構成成分と、その個体の活性化可能エレメントがオフ状態である他のタンパク質若しくは構成成分とをもつ。それぞれの活性化可能エレメントの活性化状態は、特異的活性化状態を認識する結合エレメントを使用することによって測定されるので、活性化可能エレメントの総数の幾つかの画分を表す結合エレメントにより認識される、特異的活性化状態の活性化可能エレメントであるものだけが、結合エレメントと結合して測定可能なシグナルを生成するだろう。単一細胞で活性化される特定のタイプの個々の活性化可能エレメントの合計に対応する測定可能なシグナルは、その細胞における活性化可能エレメントの「活性化レベル(activation level)」である。

10

20

【0078】

特定の活性化可能エレメントの活性レベルは、個々の細胞で変動しえるので、複数の細胞を分析すると、活性レベルには分布が伴う。この分布は、ガウス分布としても公知の正規分布でありえるか、別の型の正規分布でありえる。様々な細胞集団は、集団間で区別するのに役立つ様々な分布をもちえる。

【0079】

態様によっては、細胞を分類するための基準は、一つ以上の特異的な活性化可能エレメントの活性レベルの分布が、異なる表現型の間で異なるだろうということである。細胞または細胞集団でみられる一つ以上の活性化可能エレメントの特定の活性レベルまたは、より典型的には活性レベルの範囲は、細胞または細胞集団が特有の表現型に属するという指標である。活性化可能エレメントを含まないかもしれない生体分子の細胞レベル(たとえば発現レベル)などの他の測定法も、活性化可能エレメントの活性レベルに加えて細胞を分類するのに使用することができる；これらのレベルも、活性化可能エレメントと同様に分布を伴う。従って、場合により細胞または細胞集団の活性化可能エレメントを含むか、または含まない一つ以上の生体分子のレベルと連動して、一つ以上の活性化可能エレメントの単数または複数種類の活性化レベルを使用して、細胞または細胞集団を種類に分類することができる。個々の単一細胞の細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルがわかったら、これら一つ以上のクラス、たとえば表現型に対応するクラスに分類することができる。ある一つのクラスはあるクラスの細胞を包含し、ここで細胞はそれぞれ、一つ以上の細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルと同一または実質的に同じ公知の活性化レベル、または活性化レベルの範囲をもつ。たとえば、5つの細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルを分析する場合、一つ以上の細胞内活性化可能エレメントを包含する所定の細胞クラスは、これら5つのエレメントそれぞれの活性化レベルまたは活性化レベル範囲に基づいて構築することができる。活性化レベルは分布として存在することができ、且つ細胞を分類するのに使用する特定のエレメントの活性化レベルは分布の特定の点でありえ、より典型的には分布の一部でありえると考えられる。

30

40

【0080】

50

細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルに加えて、細胞を分類するために細胞内または細胞外生体分子、たとえばタンパク質のレベルを単独で使用、または活性化可能エレメントの活性化状態と組み合わせて使用することができる。さらに、追加の細胞エレメント、たとえばRNA、DNA、糖、代謝産物などの生体分子または分子複合体を、本発明に包含される細胞の分類における活性化状態または発現レベルと組み合わせて使用することができる。

【0081】

態様によっては、細胞構成成分の状態に影響を及ぼす他の特徴も使用して、細胞を分類することができる。例としては、生体分子の転座(translocation)若しくはそれらの代謝回転速度の変化及び生体分子複合体の形成と解離が挙げられる。そのような複合体としては、多タンパク質複合体、多脂質複合体、ホモ-若しくはヘテロ二量体またはオリゴマー、及びその組み合わせが挙げられる。他の特徴としては、たとえば細胞を細胞外プロテアーゼに暴露することによる、または生体分子の細胞内タンパク質切断由来のタンパク質切断が挙げられる。

10

【0082】

細胞外マーカー、表面マーカー、細胞内マーカー、核抗原、酵素活性、タンパク質発現及び局在化、細胞周期分析、染色体分析、細胞容積、及び核のサイズ及び粒度、または他の際立った特徴のようなモルフォロジック特徴の存在または非存在などの追加のエレメントも細胞を分類するのに使用することができる。細胞表面マーカー及び細胞内マーカーの非限定的な例としては、タンパク質、糖、脂質、核酸及び代謝産物が挙げられる。たとえば、B細胞は、CD19、CD20、CD22またはCD23などの細胞表面マーカーの発現をベースとしてさらに細分することができる。細胞の分類に有用なマーカーの他の非限定的な例としては、CD3、CD4、CD8、CD19、CD25、CD33、CD45RA、CD69、及びFoxp3が挙げられる。細胞は、一つ以上のマーカーの存在、非存在、高レベルまたは低レベルに関して分類することができる。マーカーは単独または組み合わせて使用することができる。たとえば、細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のマーカーを使用して分類することができる。

20

【0083】

あるいは、所定のクラスの細胞は、細胞外または細胞内マーカー、同様の遺伝子発現プロファイル、核抗原、酵素活性、タンパク質発現及び局在化、細胞周期分析、染色体分析、細胞容積、及び核のサイズ及び粒度または他の際立った細胞の特徴のようなモルフォロジック特徴の存在または一つ以上の所定のクラスを含むことができる共有の特徴をベースとして集約または分類することができる。

30

【0084】

態様によっては、一つ以上の細胞の生理学的状態は、細胞経路における一つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルを調べ、プロファイル分析することにより測定される。態様によっては、細胞は複数の活性化可能エレメントの活性化レベルに従って分類される。態様によっては、細胞は複数の活性化可能なエレメントの活性化レベルに従って分類される。態様によっては、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の活性化可能なエレメントは、細胞シグナル伝達経路で分析することができる。態様によっては、細胞の一つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルは、症状と相関する。態様によっては、症状は自己免疫疾患である。態様によっては、細胞は造血細胞である。さらなる態様では、症状と相関することが知見される活性化レベルは、被験者の症状の分類、診断、予後判定、テラノーシスまたは予測インジケータとして使用される。このように、特定の分類、診断、予後判定、テラノーシスまたは予測に関連する新しいマーカーを識別する。

40

【0085】

態様によっては、サンプル中の単一細胞の一つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する。活性化可能エレメントを含みえる細胞構成成分としては、タンパク質、糖、脂質、核酸及び代謝産物が挙げられるが、これらに限定されない。活性化可能エレメントは、細胞構成成分の一部、たとえばリン酸化を受けうるタンパク質中のアミノ酸残基であるか、細胞構成成分それ自体、たとえば転座、コンフォメーションの変化(pHやイオ

50

ン濃度の変化による)により、タンパク質切断、ユビキチン化を介した分解などにより活性化されるタンパク質でありうる。活性化時、活性化可能エレメントの共有結合修飾(たとえば、リン酸化などの活性化可能エレメントへの分子または基の結合)またはコンフォメーション変化など、活性化可能なエレメントに変化がおきる。そのような変化は通常、活性化可能エレメントを含む細胞構成成分の生物学的、生化学的、または物理的特性の変化の一因となる。活性化可能エレメントを含む細胞構成成分の状態は、ある程度まで、必ずしも完全というわけではないが、細胞構成成分の特定の活性化可能エレメントの状態により測定される。たとえば、タンパク質は多くの活性化可能エレメントを有することができ、これらのエレメントの特定の活性化状態は全体としてタンパク質の活性化状態を決定することができる；単一の活性化可能エレメントの状態は必ずしも決定的ではない。他のタンパク質の結合、pH、イオン濃度、他の細胞構成成分との相互作用などの追加の因子も細胞構成成分の状態に影響を及ぼしうる。

10

**【0086】**

態様によっては、単一細胞中の複数の細胞内活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する。態様によっては、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または10個を超える細胞内活性化可能エレメントを測定する。

**【0087】**

活性化可能エレメントの活性化状態は、生体分子の化学的付加または修飾から得ることができ、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、メチル化、ビオチン化、グルタミル化(glutamylatation)、グリシル化、ヒドロキシル化、異性化、プレニル化、ミリストイル化、リポイル化、ホスホパンテテイル化(phosphopantetheinylation)、硫酸化、ISG化(ISGylation)、ニトロシル化、パルミトイル化、SUMO化(SUMOylation)、ユビキチン化、NEDD化(neddylatation)、シトルリン化、アミド化、及びジスルフィド結合形成、ジスルフィド結合還元などの生化学的プロセスが挙げられる。生体分子の他の利用可能な化学付加または修飾としては、タンパク質カルボニルの形成、タンパク質側鎖、たとえばo-チロシン、クロロ-、ニトロチロシン及びジチロシンなどの直接修飾、並びに糖及び脂質誘導体との反応に由来するタンパク質付加物が挙げられる。他の修飾は、非共有結合、たとえばリガンドまたは、アロステリック調節因子(allosteric modulator)の結合でありえる。

20

**【0088】**

共有結合修飾の一例は、アミノ酸の側鎖のヒドロキシル基とホスフェート基の置換である(リン酸化)。特異的なタンパク質基質を認識し、そのタンパク質基質上のセリン、トレオニン、またはチロシン残基のリン酸化を触媒する広範な種類のタンパク質が公知である。かかるタンパク質は通常、「キナーゼ」とよばれる。リン酸化され得る基質タンパク質は、リン酸化タンパク質(リン酸化後)と称されることが多い。一度リン酸化されると、基質リン酸化タンパク質は、基質タンパク質を特異的に認識するタンパク質ホスファターゼの作用によりヒドロキシル化残基に戻されるリン酸化残基をもちうる。タンパク質ホスファターゼは、セリン、トレオニン、またはチロシン残基上のヒドロキシル基によるホスフェート基の置換を触媒する。キナーゼ及びホスファターゼの作用により、タンパク質は多くの残基上で可逆的にリン酸化されて、それによりその活性が調節され得る。従って、活性化可能タンパク質における一つ以上のホスフェート基の存在または非存在は、本発明の好ましい読み取り(readout)である。

30

40

**【0089】**

活性化可能タンパク質の共有結合修飾の別例は、ヒストンのアセチル化である。様々なアセチラーゼ及びデアセチラーゼの活性により、ヒストンタンパク質のDNA結合機能は厳重に制御されている。さらに、ヒストンアセチル化及びヒストン脱アセチル化は、悪性腫瘍の進行と関係していた。Nature、429巻：457-63頁、2004年を参照されたい。

**【0090】**

活性化の別の形は、活性化可能エレメントの開裂(cleavage)を含む。たとえば、タンパク質調節の一つの形としては、ペプチド結合のタンパク質切断がある。ランダムまたは間違っただタンパク質切断はタンパク質の活性に不利でありえ、多くのタンパク質は、特異

50

的なペプチド結合を認識して切断するプロテアーゼの作用により活性化される。多くのタンパク質は前駆体タンパク質またはプロタンパク質(pro-protein)から誘導され、これは特異的ペプチド結合のタンパク質切断の後、タンパク質の成熟アイソフォーム(mature isoform)を生じさせる。多くの成長因子はこのようにして合成且つプロセッシングされ、タンパク質の成熟アイソフォームは通常、前駆体形によっては示されていない生物学的活性をもつ。多くの酵素はこのように合成且つプロセッシングされ、タンパク質の成熟アイソフォームは通常酵素的に活性であり、タンパク質の前駆体形は酵素的に不活性である。この種の調節は通常、可逆的ではない。従って、タンパク質分解的に活性化されたタンパク質の活性を阻害するためには、「再付着(reattachment)」以外のメカニズムを使用しなければならない。たとえば、多くのタンパク質分解的に活性化されたタンパク質は比較的短命であり、その代謝回転は効率的にシグナルを失活させる。阻害剤も使用することができる。タンパク質分解的に活性化される酵素には、セリン及びシステインプロテアーゼがあり、それぞれカテプシン及びカスパーゼがある。「チモーゲン(zymogen)」として公知の他の多くのタンパク質分解的に活性化された酵素も、活性化可能エレメントとして本発明で有用性が知見される。

10

#### 【0091】

別の態様では、活性化可能エレメントの活性化には、エレメントのプレニル化が挙げられる。本明細書中で使用される「プレニル化」及びその文法的等価物は、任意の脂質基のエレメントへの付加を意味する。プレニル化の一般的な例としては、ファルネシル基、ゲラニルゲラニル基の付加、ミリストイル化、及びパルミトイル化が挙げられる。通常、これらの基は活性化可能エレメントにチオエーテル結合を介して付着するが、他の付着法も使用することができる。

20

#### 【0092】

別の態様では、活性化可能エレメントの活性化は、活性化可能エレメントの分子内クラスタリング(intermolecular clustering)として検出される。本明細書中で使用される「クラスタリング」または「多量体化」及びその文法的等価物は、一つ以上のシグナル変換エレメントの任意の可逆的または不可逆的会合(association)を意味する。クラスターは、2、3、4個などのエレメントから構成され得る。二つのエレメントのクラスターは二量体という。3個以上のエレメントのクラスターは通常、オリゴマーといい、それぞれの数のクラスターはそれ自体の記号表示をもち、たとえば3個のエレメントのクラスターは三量体であり、4個のエレメントのクラスターは四量体といった具合である。クラスターは同一エレメントまたは異なるエレメントから構成される。同一エレメントのクラスターは「ホモ」クラスターといい、異なるエレメントのクラスターは「ヘテロ」クラスターという。従って、2-アドレナリン受容体の場合と同様に、クラスターはホモ二量体であることができる。あるいは、クラスターは、CABA B-Rの場合と同様に、ヘテロ二量体でありえる。他の態様では、TNF の場合のようにホモ三量体であるかまたは、アポトーシスを調節するために膜-結合及び可溶性CD95により形成されるものなどのヘテロ三量体である。さらなる態様では、サイトロロピン放出性ホルモン受容体の場合のようにクラスターはホモ-オリゴマーであるか、TGF $\beta$  1の場合のようにヘテロ-オリゴマーである。

30

#### 【0093】

態様によっては、エレメントの活性化またはシグナル伝達能力(signaling potential)は、エレメントのクラスタリングが誘導される実際のメカニズムとは関係なく、クラスタリングにより媒介される。たとえば、エレメントは活性化されて(a)リガンド(自然に存在するまたは合成リガンドを含むリガンド)に結合することにより膜結合受容体として、(b)他の表面分子に結合することにより膜結合受容体として、または(c)リガンドに結合している細胞内(非膜結合)受容体として、クラスタリングすることができる。

40

#### 【0094】

別の態様では、活性化可能エレメントは、細胞表面受容体などのリガンド結合の際にクラスタリングする膜結合受容体エレメント(membrane bound receptor element)である。本明細書中で使用するように、「細胞表面受容体」とは、細胞表面で発生し、細胞外環

50

境と相互作用し、直接若しくは間接的に細胞活性を調節できるような方法で細胞内部の環境に関して情報を(シグナルを介して)(たとえば、細胞内二次情報伝達因子活性若しくは特異的プロモーターからの転写を経て)交換して、特異的な遺伝子の転写を起こす分子を指す。受容体エレメントの一つの種類としては、リガンドが結合すると活性化されてクラスタリングする、膜結合タンパク質またはタンパク質の複合体が挙げられる。当技術分野では公知のように、これらの受容体エレメントは様々な形態をもちうるが、一般的にこれらは少なくとも三つのドメインを含む。第一に、これらの受容体はリガンド結合ドメインをもち、これは細胞外でまたは細胞内のいずれか、通常、前者(細胞外)に位置することができる。第二に、これらの受容体は膜結合ドメイン(通常、膜貫通ドメイン)をもち、これは7回貫通型ドメイン(seven pass transmembranedomain)(Gタンパク質共役受容体に関連して以下に記載)の形態または、脂質それ自体が脂質二重層に挿入する際に、膜が会合できる受容体のアミノ酸の一つに、ミリスチル化などの脂質修飾の形態をとりえる。最後に、受容体はシグナル伝達ドメインをもち、これは受容体の下流効果の伝播(propagate)に關与する。

#### 【0095】

かかる受容体エレメントの例としては、ホルモン受容体、ステロイド受容体、サイトカイン受容体、たとえばIL1-、IL-、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、CCR5、CCR7、CCR-1-10、CCL20、ケモカイン受容体、たとえばCXCR4、接着受容体及び成長因子受容体、たとえばこれらに限定されないが、PDGF-R(血小板由来成長因子受容体)、EGF-R(上皮性成長因子受容体)、VEGF-R(血管内細胞増殖因子)、uPAR(ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体)、ACHR(アセチルコリン受容体)、IgE-R(免疫グロブリンE受容体)、エストロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体、インテグリン受容体(1、2、3、4、5、6、1、2、3、4、5、6)、MAC-1(2及びcd11b)、V33、オピオイド受容体(ミュー及びカッパ)、FC受容体、セロトニン受容体(5-HT、5-HT6、5-HT7)、 $\alpha$ -アドレナリン受容体、インスリン受容体、レプチン受容体、TNF受容体(組織-壊死因子)、スタチン受容体、FAS受容体、BAFF受容体、FLT3リガンド受容体、GMCSF受容体、及びフィブロネクチン受容体が挙げられる。

#### 【0096】

一態様において、活性化可能エレメントはサイトカイン受容体である。サイトカイン類は、インターロイキン、インターフェロン、及びコロニー-刺激因子を包含する細胞間コミュニケーションの可溶性伝達物質(mediator)のファミリーである。サイトカイン類の特徴は、その多面発現性(pleiotropy)及び機能的重複性(functional redundancy)である。独特のスーパーファミリーを構築するサイトカイン受容体の大部分は、固有のタンパク質チロシンキナーゼドメインをもたないが、通常、受容体刺激は受容体自身を含む細胞内タンパク質の迅速なチロシンリン酸化を引き起こす。サイトカイン受容体スーパーファミリーの多くのメンバーは、Jakタンパク質チロシンキナーゼファミリーを活性化し、転写因子のSTATファミリーのリン酸化が起こる。IL-2、IL-4、IL-7及びインターフェロンは全て、Jakキナーゼを活性化することが知見された(Frankら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92巻:7779-7783頁、1995年); Scharfeら、Blood 86巻:2077-2085頁、1995年); (Baconら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92巻:7307-7311頁、1995年); 及び(Sakatsumeら、J. Biol. Chem. 270巻:17528-17534頁、1995年)。Jakリン酸化の下流の事象も解明された。たとえば、IL-2にTリンパ球を暴露すると、転写(STAT)タンパク質、STAT1、STAT1、及びSTAT3、並びに二つのSTAT-関連タンパク質、p94及びp95の転写のシグナルトランスデューサー及びアクチベーターのリン酸化を引き起こすことが知見された。STATタンパク質は核に移行して、特異的DNA配列に結合し、このことはIL-2が特異的な遺伝子を活性化しえるというメカニズムは免疫細胞機能に關与することを示唆する(Frankら、上掲)。Jak3は、IL-2、IL-4、及びIL-7サイトカイン受容体のガンマ鎖に結合する(Fujiiら、Proc. Natl. Acad. Sci. 92巻:5482-5486頁、1995年及びMussoら、J. Exp. Med. 181巻:1425-1431頁、1995年)。Jakキナーゼは、成長ホルモン、エリスロポエチン及びIL-6などのサイトカイン受容体を介して情報伝達する多くのリガンドにより活性化されることが知見され

た(Kishimoto, Stem cells Suppl. 12巻:37-44頁、1994年)。好ましい活性化可能エレメントは、Stat1、Stat3、Stat5、Stat6、Lck、Lyn、Zap70、Syk、PLC 2、p38、PI3K、S6、Akt、Erk、CREB、及びNF- $\kappa$ Bを含むタンパク質群から選択されるが、これらに限定されない。

#### 【0097】

一態様において、活性化可能エレメントは、腫瘍壊死因子アルファ受容体などの神経成長因子受容体スーパーファミリーのメンバーである。腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$  またはTNF- $\alpha$ ) は、活性化マクロファージ及びリンパ球によりおもに産生されるが、内皮細胞及び他の細胞型でも発現される多面発現性サイトカイン(pleiotropic cytokine)である。TNF- $\alpha$  は炎症性、免疫原性、及び病態生理学的反応の主な伝達物質である(Grell、Mら、Cell、83巻:793-802頁、1995年)。TNFの異なる二つの形状、26kDa膜発現形と、26kDa形のタンパク質切断に由来する可溶性17kDaサイトカインとが存在する。可溶性TNFポリペプチドは長さ157アミノ酸であり、主に生物学的活性分子である。TNF- $\alpha$  は、高親和性細胞表面受容体との相互作用を介してその生物学的作用を及ぼす。二つの異なる膜TNF- $\alpha$  受容体はクローン化され、キャラクタリゼーションされた。これらは55kDa種のp55 TNF-Rと、75kDa種のp75 TNF-Rである(Corcoran、A.Eら、Eur. J. Biochem、223巻:831-840頁、1994年)。この二つのTNF受容体は、アミノ酸レベルで28%類似性を示す。これは細胞外ドメインに制限され、それぞれ約40アミノ酸である、4つの繰り返しシステインリッチモチーフからなる。それぞれのモチーフは保存された位置に4から6つのシステインを含む。Dayhoff分析から、それぞれの受容体の最初の3つの繰り返しの中で最も高いサブユニット間類似性を示す。この特徴的な構造は、他の多くの受容体及び細胞表面分子と共有され、これはTNF-R/神経成長因子受容体スーパーファミリーを含む(Corcoran、A.Eら、Eur. J. Biochem.、223巻:831-840頁、1994年)。

#### 【0098】

一態様において、活性化可能エレメントは受容体チロシンキナーゼである。受容体チロシンキナーゼは、その細胞外ドメインの構造類似性と、その細胞質ドメイン中のチロシンキナーゼ触媒領域の構成とをベースとしてサブグループに分けることができる。サブグループI(上皮細胞増殖因子(EGF)受容体様)、II(インスリン受容体様)及びEPH/ECKファミリーは、システインリッチ配列を含む(Hiraiら、(1987年)Science 238巻:1717-1720頁並びに、Lindberg及びHunter、(1990年)Mol. Cell. Biol. 10巻:6316-6324頁)。これら三種類の受容体チロシンキナーゼのキナーゼ領域の機能ドメインは、隣接配列(contiguous sequence)としてコードされる(Hanksら、(1988年)Science 241巻:42-52頁)。サブグループIII(血小板由来成長因子(PDGF)受容体様)及びIV(線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体)は、その細胞外ドメイン中に免疫グロブリン(Ig)-様の折り畳みをもつこと、並びに関連しないアミノ酸の可変伸縮(variable stretch)により二つの部分に分けられたキナーゼドメインをもつものとして特徴付けされる(Yanden及びUllrich(1988年)、Ann. Rev. Biochem.、57巻、443-478頁;並びにHanksら、(1988年)上掲)。

#### 【0099】

もっとも多数の公知メンバーをもつファミリーは、Ephファミリーである(ファミリーの最初のメンバーはもともとはエリスロポエチン産生性肝細胞ガン細胞株から単離されている)。プロトタイプ、Eph受容体(Hiraiら、(1987年)Science 238:1717-1720頁)の記載以来、二種を超える種で発見されたオルソログ受容体(orthologous receptor)を除いても、このファミリーについては少なくとも10のメンバーに関して配列が報告されてきた。追加の部分配列、及び新しいメンバーが報告される速度から、このファミリーはさらに大きいことが示唆される(Maisonpierreら、(1993)Oncogene 8巻:3277-3288頁;Andresら、(1994) Oncogene 9巻:1461-1467頁;Henkemeyerら、(1994年) Oncogene 9:1001-1014頁;Ruizら、(1994) Mech. Dev. 46巻:87-100頁;Xuら、(1994年)Development 120巻:287-299頁;Zhouら、(1994年) J. Neurosci. Res. 37巻:129-143頁;並びにTuzi及びGullick(1994) Br. J. Cancer 69巻:417-421頁の参照文献)。注目すべきことに、Ephファミリーメンバーは多数であるにもかかわらず、これらの分子は全て、公知のリガ

ンドをもたないオーファン受容体として同定された。

【0100】

本明細書中で使用するように、「Eph受容体」または「Eph-型受容体」なる用語は受容体チロシンキナーゼのある種類をさし、少なくとも11個のパラログ(paralogue)遺伝子を含むが、多くのオルソログ(orthologue)、たとえば様々な種由来のホモログなどがこのクラスに存在する。通常、Eph受容体は、相同性により関連付けられた受容体の個別の群であり、容易に認識可能で、たとえばN末端近くのシステイン残基の特徴的な間隔と、二つのフィブロネクチン型III繰り返しとを有する細胞外ドメインを特徴とする(Hiraiら、(1987年)Science 238巻：1717-1720頁；Lindbergら(1990) Mol. Cell Biol. 10：6316-6324頁；Chanら、(1991年) Oncogene 6：1057-1061頁；Maisonpierreら、(1993年)Oncogene 8：3277-3288頁；Andresら、(1994年) Oncogene 9：1461-1467頁；Henkemeyerら、(1994年)Oncogene 9：1001-1014頁；Ruizら、(1994年)Mech. Dev. 46：87-100頁；Xuら、(1994年) Development 120：287-299頁；Zhouら、(1994年) J. Neurosci. Res. 37：129-143頁；並びにTuzi及びGullick(1994年)Br. J. Cancer 69：417-421頁に参照される文献)。代表的なEph受容体としては、eph、elk、eck、sek、mek4、hek、hek2、eek、erk、tyro1、tyro4、tyro5、tyro6、tyro11、cek4、cek5、cek6、cek7、cek8、cek9、cek10、bsk、rtk1、rtk2、rtk3、myk1、myk2、ehk1、ehk2、pagliaccio、htk、erk及びnuk受容体が挙げられる。

10

【0101】

別の態様では、受容体エレメントは、ヘマトポエチン受容体スーパーファミリーのメンバーである。ヘマトポエチン受容体スーパーファミリーは、本明細書中、三つのドメイン構造：活性化リガンドを結合する細胞外ドメイン、短い膜貫通セグメント、及び細胞質に残るドメインをもつ、一回膜貫通型受容体を定義するのに使用される。これらの受容体の細胞外ドメインは、約200~210アミノ酸を含む細胞外リガンド結合ドメイン内に低いけれども有意な相同性をもつ。相同領域は、領域のN-末端の半分に4つのシステイン残基と、膜貫通ドメインのちょうど外側に位置するTrp-Ser-X-Trp-Ser(W SXWS)モチーフとを特徴とする。これらの受容体のさらなる構造的及び機能的な詳細は、Cosman、D.ら、(1990年)により提供される。IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、成長因子GM-CSF、G-CSF、M-CSF及びエリスロポエチンの受容体は、たとえばこの受容体ファミリーのメンバーとして同定された。

20

30

【0102】

さらなる態様において、受容体エレメントは、白血球機能抗原-1(Leukocyte Function Antigen-1：LFA-1)以外のインテグリンである。受容体のインテグリンファミリーのメンバーは、種々の 及び サブユニットから構成されるヘテロ二量体として機能し、細胞の細胞骨格と細胞外マトリックスの間の相互作用を媒介する(Giancotti及びRuoslahti、Science 285、1999年8月13日に再検討)。この 及び サブユニットの様々な組み合わせは、広範な種類のリガンド特異性を引き起こし、これは細胞型特異性因子の存在によりさらに増強されえる。インテグリンクラスタリング(integrin clustering)は、RAS、MAPキナーゼ及びホスファチジルイノシタール-3-キナーゼなどの多くの細胞内シグナルを活性化することが公知である。一態様において、受容体エレメントは以下のインテグリン：1、 2、 3、 4、 5、 6、 1、 2、 3、 4、 5、 及び 6から選択される インテグリンと インテグリンから構成されるヘテロ二量体(LFA-1以外)であるか、MAC-1( 2及びcd11b)、または V 3である。

40

【0103】

一態様において、活性化可能エレメントは細胞内接着分子(intracellular adhesion molecule：ICAM)である。ICAM-1、-2、及び-3は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属している細胞接着分子である。これらの受容体はそれぞれ、一回膜貫通ドメインをもち、Ig-ループに構造が似た細胞外結合ドメインを介して 2インテグリンに全てが結合する(Signal Transduction、Gompertsら編、Academic or government Press Publishers、2002年、第14章、318-319頁)。

50

## 【0104】

別の態様では、活性化可能エレメントは、他の表面分子と接触することによりシグナル伝達するためにクラスター(cluster)する。上記の受容体とは対照的に、これらにエレメントは他の表面分子と接触することによりシグナル伝達するためにクラスターし、通常、リガンドとして第二の細胞の表面に存在する分子を使用する。この種の受容体は、細胞-細胞接着及び免疫認識(immunorecognition)などの細胞-細胞相互作用で重要である。かかる受容体エレメントの例としては、CD3(T細胞受容体複合体)、BCR(B細胞受容体複合体)、CD4、CD28、CD80、CD86、CD54、CD102、CD50及びICAM1、2及び3がある。

## 【0105】

別の態様では、受容体エレメントはT細胞受容体複合体(T cell receptor complex: TCR)である。TCRは二つの異なるヘテロ二量体、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、または $\gamma$ 、 $\delta$ のいずれかとして生じ、そのいずれも非多形的CD3ポリペプチド、 $\zeta$ 、 $\eta$ で表される。CD3ポリペプチド、特に $\zeta$ 及びその変異体は、細胞内シグナル伝達に重要である。TCRヘテロ二量体を発現する細胞はほとんどのリンパ領域(compartment)で優勢であり、典型的なヘルパーまたは細胞毒性T細胞応答に参与する。ほとんどの場合において、TCRリガンドは、クラスIまたはクラスII MHC分子に結合したペプチド抗原である(Fundamental Immunology、第四版、W. E. Paul編、Lippincott-Raven Publishers、1999年、第10章、341-367頁)。

## 【0106】

別の態様では、活性化可能エレメントはGタンパク質共役受容体の大きなファミリーのメンバーである。Gタンパク質共役受容体はクラスタリング可能であることが報告された(Kroegerら、J Biol Chem 276:16、12736-12743頁、2001年4月20日; Baiら、J Biol Chem 273:36、23605-23610頁、1998年9月4日; Rochevilleら、J Biol Chem 275(11)、7862-7869頁、2000年3月17日)。本明細書中で使用するように、Gタンパク質共役受容体及びその文法的等価物は、ヘテロ三量体の「Gタンパク質」に結合する受容体のファミリーをさす。多くの異なるGタンパク質が受容体と相互作用することが公知である。Gタンパク質シグナル伝達系は、三つの成分: 受容体自体、GTP-結合タンパク質(Gタンパク質)、及び細胞内標的タンパク質を含む。細胞膜はスイッチボードとして機能する。受容体と同タイプのGタンパク質上で機能している場合には、様々な受容体を介して到着するメッセージは単一の効果を生成することができる。他方、単一受容体を活性化するシグナルは、受容体が様々な種類のGタンパク質上で機能する場合には、またはGタンパク質が様々なエフェクター上で機能できる場合には、二つ以上の効果を生成することができる。

## 【0107】

その休止状態では、アルファ( $\alpha$ )、ベータ( $\beta$ )及びガンマ( $\gamma$ )サブユニットからなるGタンパク質は、ヌクレオチド・グアノシン三リン酸(GDP)と複合体形成し、受容体と接触する。ホルモンまたは他の一次情報伝達因子が受容体と結合すると、受容体はコンフォメーションを変え、これによりGタンパク質との相互作用を変化させる。これによりサブユニットがGDPを放出するのを促し、より大量のヌクレオチド・グアノシン三リン酸(GTP)がこれを置き換え、Gタンパク質を活性化する。次いでGタンパク質は解離して、まだ複合体化しているベータ及びガンマサブユニットからサブユニットを分離する。経路に依存して、GサブユニットまたはG複合体がエフェクターと相互作用する。次いでエフェクター(酵素であることが多い)は不活性前駆体分子を活性「二次情報伝達因子」に転換し、これは細胞質内に拡散し、代謝カスケード(metabolic cascade)を始動する。数秒後、GはGTPをGDPに転換し、これによりそれ自体を不活化させる。次いで不活化GはG複合体と再会合しえる。

## 【0108】

数千とまでいかなくても、数百の受容体がヘテロ三量体Gタンパク質を介してメッセージを運び、そのうちの少なくとも17個の異なる形態が単離されている。最大可変性はサブユニットで知見され、数種の異なる $\alpha$ 及び $\beta$ 構造体が報告されている。さらに多くの異なるGタンパク質依存性エフェクターがある。ほとんどのGタンパク質共役受容体は、細胞膜を7回通過する一本のタンパク質鎖から構成される。かかる受容体は7回膜貫通型受容体(s

10

20

30

40

50

even transmembrane receptor : STR)と称されることが多い。同一リガンドを結合する多くの異なる受容体を含む、百を超える様々なSTRが知見されており、もっと多くのSTRが発見されるのを待っているようである。さらに、天然のリガンドが知られていないSTR関しても識別されており；これらの受容体は上記のように、「オーファン(orphan)」Gタンパク質共役受容体という。例としては、Neoteら(1993年)Cell 72巻、415頁；Koubara、F EBS Lett . (1993年)321巻、173頁；及びBirkenbachら、(1993年)J . Virol . 67巻、2209頁によりクローン化された受容体が挙げられる。

#### 【 0 1 0 9 】

Gタンパク質共役結合体の公知のリガンドとしては、以下のものが挙げられる：プリン及びヌクレオチド類、たとえばアデノシン、cAMP、ATP、UTP、ADP、メラトニンなど；生体アミン類(及び関連する天然のリガンド)、たとえば5-ヒドロキシトリプタミン、アセチルコリン、ドーパミン、アドレナリン、ヒスタミン、ノルアドレナリン、チラミン/オクトパミン及び他の関連化合物；ペプチド類、たとえば副腎皮質刺激ホルモン(acth)、メラニン細胞刺激ホルモン(msh)、メラノコルチン、ニューロテンシン(nt)、ボンベシン及び関連ペプチド類、エンドセリン、コレシストキニン、ガストリン、ニューロキニンb(nk3)、無脊椎動物のタキキニン様ペプチド、サブスタンスk(nk2)、サブスタンスp(nk1)、神経ペプチドy(npy)、甲状腺刺激ホルモン放出因子(trf)、ブラジキニン、アンギオテンシンi i、ベータ-エンドルフィン、c5aアナフィラトキシン(anaphalatoxin)、カルシトニン、ケモカイン類(インタークリンともいう)、コルチコトロピン放出因子(crf)、ダイノルフィン、エンドルフィン、fmlp及び他のホルミル化ペプチド、ホリトロピン(fsh)、菌類の交配フェロモン(fungal mating pheromone)、ガラニン、胃抑制ポリペプチド受容体(gastric inhibitory polypeptide receptor : gip)、グルカゴン様ペプチド(glps)、グルカゴン、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(gnrh)、成長ホルモン放出ホルモン(ghrh)、昆虫利尿剤ホルモン、インターロイキン-8、ロイトロピン(leutropin)(lh/hcg)、メトエンケファリン、オピオイドペプチド、オキシトシン、副甲状腺ホルモン(pth)及びpthrp、下垂体アデニルシクラーゼ活性化ペプチド(pituitary adenylyl cyclase activating peptide : pacap)、セクレチン、ソマトスタチン、トロンピン、チロトロピン(tsh)、血管作用性小腸ペプチド(vip)、パソプレッシン、パソトシン；エイコサノイド、たとえばip-プロスタサイクリン、pg-プロスタグランジン、tx-トロンボキサン；レチナール(retinal)ベースの化合物、たとえば脊椎動物(vertebrate)11-cisレチナール、無脊椎動物(invertebrate)11-cisレチナール及び他の関連化合物；脂質及び脂質ベースの化合物、たとえばカンナビノイド、アナンダマイド、リゾホスファチジン酸、血小板活性化因子、ロイコトリエンなど；興奮性アミノ酸及びイオン、たとえばカルシウムイオン及びグルタメート。

#### 【 0 1 1 0 】

Gタンパク質共役受容体の例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない： 1-アドレナリン受容体、 1B-アドレナリン受容体、 2-アドレナリン受容体、 2B-アドレナリン受容体、 1-アドレナリン受容体、 2-アドレナリン受容体、 3-アドレナリン受容体、 m1アセチルコリン受容体(AChR)、m2 AChR、m3 AChR、m4 AChR、m5 AChR、D1ドーパミン受容体、D2ドーパミン受容体、D3ドーパミン受容体、D4ドーパミン受容体、D5ドーパミン受容体、A1アデノシン受容体、A2aアデノシン受容体、A2bアデノシン受容体、A3アデノシン受容体、5-HT1a受容体、5-HT1b受容体、5HT1-様受容体、5-HT1d受容体、5HT1d-様受容体、5HT1dベータ受容体、サブスタンスK(ニューロキニンA)受容体、fMLP受容体(FPR)、fMLP-様受容体(FPRL-1)、アンギオテンシンII型1受容体、エンドセリンETA受容体、エンドセリンETB受容体、トロンピン受容体、成長ホルモン-放出ホルモン(GHRH)受容体、血管作用性小腸ペプチド受容体、オキシトシン受容体、ソマトスタチンSSTR1及びSSTR2、SSTR3、カンナビノイド受容体、卵胞刺激ホルモン(FSH)受容体、ルトロピン(leutropin)(LH/HCG)受容体、甲状腺刺激ホルモン(TSH)受容体、トロンボキサンA2受容体、血小板活性化因子(PAF)受容体、C5aアナフィラトキシン受容体、CXCR1(IL-8受容体A)、CXCR2(IL-8受容体B)、デルタオピオイド受容体、カッパオピオイド受容体、mip-1アルファ/RANTES受容体(CRR1)、ロドプシン、レッドオプシン(Red opsin)、グリーンオブ

シン(Green opsin)、ブルーオプシン(Blue opsin)、代謝型グルタミン酸mGluR1-6、ヒスタミンH2受容体、ATP受容体、神経ペプチドY受容体、アミロイドタンパク質前駆体受容体、インスリン様成長因子II受容体、ブラジキニン受容体、性腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体、コレシストキニン受容体、メラノサイト刺激ホルモン受容体、抗利尿性ホルモン受容体、グルカゴン受容体及び副腎皮質刺激ホルモンII受容体。さらに、細胞へのHIVウイルス接着には少なくとも5つの受容体(CC及びCXCR受容体)が関与している。HIVの二つの主要な補助受容体(co-receptor)は、CXCR4、フュージン受容体(fusin receptor)、LESTR、SDF-1受容体)及びCCR5(m-trophic)である。受容体の追加の例としては、以下のヒト受容体：メラトニン受容体1a、ガラニン受容体1、ニューロテンシン受容体、アデノシン受容体2a、ソマトスタチン受容体2及びコルチコトロピン放出因子受容体1が挙げられるが、これらに限定されない。他のGタンパク質共役受容体(GPCR)は当技術分野で公知である。

10

#### 【0111】

一態様において、Lnkは測定すべきタンパク質である。造血幹細胞(HSC)は、多能性の祖先(pluripotential progenitor)を介して様々な造血細胞を生じさせる。分化系列が決定された前駆細胞(Lineage-committed progenitor)は、成人期を通して血液産生を担う。HSCまたは前駆細胞の増殖は、様々な血液疾患の処置に潜在的に強力なアプローチを表す。動物モデル研究から、Lnkが造血系のシグナル伝達経路の広範な阻害剤として作用することが示された。Lnkは、様々なシグナル変換タンパク質中のホスホ-チロシンを結合するSrcホモロジー-2(SH2)を含む、幾つかの構造モチーフを共有するタンパク質のファミリーに属するアダプタータンパク質である。SH2ドメインは幾つかのサイトカイン受容体(すなわちMpl、EpoR、c-Kit、IL-3R及びIL7R)のLnk-媒介負の調節に欠かせない。従って、Lnkのサイトカイン受容体への結合を阻害すると、受容体の下流シグナル伝達を高め、サイトカインへの暴露の応答で血液生成が改善されるかもしれない(すなわち、貧血患者でのエリスロポエチン)(Guellerら、Adaptor protein Lnk associates with Y568 in c-Kit. 1: Biochem J. 2008年6月30日)。Ba/F3-MPLW515L細胞におけるLnkの過剰発現によりサイトカイン非依存性増殖を阻害する一方、UT7-MPLW515L細胞におけるLnkの抑制は増殖を促進することが知見された。Lnkは、これらの細胞においてJak2、Stat3、Erk、及びAktの活性化を遮断する(Geryら、Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative neoplasms, Blood, 1巻 2007年11月、110巻、9号、3360-3364頁)。

20

30

#### 【0112】

一態様において、活性化可能エレメントは、クラスタリングしえる細胞内受容体である。この種のエレメントは膜結合性ではない。その代り、これらは細胞内マトリックス中に自由に拡散し、そこで可溶性リガンドに結合してからクラスタリング及びシグナル変換する。すでに記載されたエレメントとは対照的に、この種の多くのメンバーは、クラスタリング後にDNAを結合してRNA転写での変化に直接影響を与える。

#### 【0113】

別の態様では、クラスタリング可能な細胞内受容体はペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)である。PPARは親油性化合物に応答性の可溶性受容体であり、脂肪酸代謝に参与する種々の遺伝子を誘導する。三つのPPARサブタイプ、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、及びPPAR $\gamma$ は、リガンド結合及びレチノイドX受容体とのヘテロ二量体形成後にDNAに結合することが判明した(Summanasekeraら、J Biol Chem、M211261200、2002年12月13日)。

40

#### 【0114】

別の態様では、活性化可能エレメントは核酸である。核酸の活性化及び失活は、これらに限定されないが、不活性リーダー配列の開裂並びに、構造的または機能的変化を誘導する共有または非共有結合修飾などの様々な方法で起きうる。たとえば、多くの触媒的RNA、たとえばハンマーヘッド型リボザイムは、開裂が起きるまでリボザイムの触媒活性を失活させる不活性リーダー配列をもつように設計することができる。共有結合修飾の例は、DNAのメチル化である。メチル化による不活性化は、たとえば、リンパ腫におけるSTAT調

50

節SOCS遺伝子などの特定の遺伝子のサイレンシングにおける要因であることが知見された (Chimら(2004年)、Leukemia 18巻:356-358頁)。

【0115】

別の態様では、活性化可能エレメントは小分子、糖、脂質または、活性化アイソフォームをもちうる他の天然に存在する若しくは合成化合物である。さらに、先に指摘したように、これらのエレメントの活性化は、一つの形から別の形に切り替えることを含まなくてよいが、化合物の存在または非存在として検出できる。たとえば、cAMP(環状アデノシン一リン酸)の活性化は、非環状AMPから環状AMPへの転換ではなく、cAMPの存在として検出することができる。

【0116】

活性化エレメントを含み得るタンパク質の例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：キナーゼ、ホスファターゼ、脂質シグナル伝達分子(lipid signaling molecule)、アダプター/骨格タンパク質、サイトカイン、サイトカイン調節剤(cytokine regulator)、ユビキチン化酵素、接着分子、細胞骨格/収縮性タンパク質、ヘテロ三量体Gタンパク質、低分子量GTPase、グアニンヌクレオチド交換因子、GTPase活性化タンパク質、カスパーゼ、アポトーシスに關与するタンパク質、細胞周期調節剤、分子シャペロン、代謝酵素、小胞トランスポータータンパク質(vesicular transport protein)、ヒドロキシラーゼ、イソメラーゼ、デアセチラーゼ、メチラーゼ、デメチラーゼ、癌抑制遺伝子、プロテアーゼ、イオンチャンネル、分子トランスポーター、転写因子/DNA結合因子、転写制御因子及び翻訳制御因子。活性化可能エレメントの例、活性化エレメントの活性化状態及び活性化レベルの測定法は、本明細書中、参照として含まれる、米国特許公開番号第20060073474号、表題"Methods and compositions for detecting the activation state of multiple proteins in single cells"及び米国特許公開番号第20050112700号、表題"Methods and compositions for risk stratification"に記載されている。米国特許出願シリアル番号第61/048,886号；同第61/048,920号；及びShulzら、Current Protocols in Immunology、2007年、78巻：8.17.1-20頁も参照されたい。

【0117】

態様によっては、タンパク質は、以下のものからなる群から選択される：HER受容体、PDGFR受容体、Kit受容体、FGF受容体、Eph受容体、Trk受容体、IGF受容体、インスリン受容体、Met受容体、Ret、VEGF受容体、TIE1、TIE2、FAK、Jak1、Jak2、Jak3、Tyk2、Src、Lyn、Fyn、Lck、Fgr、Yes、Csk、Abl、Btk、ZAP70、Syk、IRAK、cRaf、ARaf、BRAF、Mos、Limキナーゼ、ILK、Tpl、ALK、TGF受容体、BMP受容体、MEKK、ASK、MLK、DLK、PAK、Mek1、Mek2、MKK3/6、MKK4/7、ASK1、Cot、NIK、Bub、Myt1、Wee1、カゼインキナーゼ、PK1、SGK1、SGK2、SGK3、Akt1、Akt2、Akt3、p90Rsk、p70S6キナーゼ、Prk、PKC、PKA、ROCK1、ROCK2、オーロラ(Aurora)、CaMK、MNK、AMPK、MELK、MARK、Chk1、Chk2、LKB-1、MAPKAPK、Pim1、Pim2、Pim3、IKK、Cdk、Jnk、Erk、IKK、GSK3、GSK3、Cdk、CLK、PKR、PI3-キナーゼクラス1、クラス2、クラス3、mTor、SAPK/JNK1,2,3、p38、PKR、DNA-PK、ATM、ATR、受容体タンパク質チロシンホスファターゼ(RPTP)、LARホスファターゼ、CD45、非受容体チロシンホスファターゼ(NPRTP)、SHP、MAPキナーゼホスファターゼ(MKP)、二重特異性ホスファターゼ(DUSP)、CDC25ホスファターゼ、低分子量チロシンホスファターゼ、アイアブセント(Eyes absent)(EYA)チロシンホスファターゼ、スリングショット(Slingshot)ホスファターゼ(SSH)、セリンホスファターゼ、PP2A、PP2B、PP2C、PP1、PP5、イノシトールホスファターゼ、PTEN、SHIP、ミオチューブラリン、イノシトールリン脂質キナーゼ、ホスホリパーゼ(phospholipase)、プロスタグランジン合成酵素、5-リボキシゲナーゼ、スフィンゴシンキナーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、アダプター/骨格タンパク質、Shc、Grb2、BLNK、LAT、PI3-キナーゼのB細胞アダプター(BCAP)、SLAP、Dok、KSR、MyD88、Crk、CrkL、GAD、Nck、Grb2関連バインダー(GAB)、Fas関連デスドメイン(death domain)(FADD)、TRADD、TRAF2、RIP、T-細胞リンパ性白血病ファミリー、IL-2、IL-4、IL-8、IL-6、インターフェロン、インターフェロン、サイトカインシグナル伝達の

10

20

30

40

50

サブレッサー(SOC)、Cbl、SCFユビキチン化リガーゼ複合体、APC/C、接着分子、インテグリン、免疫グロブリン様接着分子、セレクチン、カドヘリン、カテニン、接着斑キナーゼ(focal adhesion kinase)、p130CAS、ホドリン、アクチン、パキシリン、ミオシン、ミオシン結合タンパク質、チューブリン、eg5/KSP、CENP、 $\alpha$ -アドレナリン受容体、ムスカリン受容体、アデニルシクラーゼ受容体、低分子量GTPase、H-Ras、K-Ras、N-Ras、Ran、Rac、Rho、Cdc42、Arf、RAB、RHEB、Vav、Tiam、Sos、Dbl、PRK、TSC1,2、Ras-GAP、Arf-GAP、Rho-GAP、カスパーゼ、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、Bcl-2、Mcl-1、Bcl-XL、Bcl-w、Bcl-B、A1、Bax、Bak、Bok、Bik、Bad、Bid、Bim、Bmf、Hrk、Noxa、Puma、IAPs、XIAP、Smac、Cdk4、Cdk6、Cdk2、Cdk1、Cdk7、サイクリンD、サイクリンE、サイクリンA、サイクリンB、Rb、p16、p14Arf、p27KIP、p21CIP、分子シャペロン、Hsp90、Hsp70、Hsp27、代謝酵素、アセチル-CoAカルボキシラーゼ、ATPクエン酸リアーゼ、一酸化窒素シンターゼ、カベオリン、輸送タンパク質に必要なエンドソーム輸送選別複合体(endosomal sorting complex required for transport: ESCRT)タンパク質、小胞タンパク質ソーティング(Vsps)、ヒドロキシラーゼ、プロリル-ヒドロキシラーゼPHD-1、2及び3、アスパラギン・ヒドロキシラーゼFIHトランスフェラーゼ、Pin1プロリルイソメラーゼ、トポイソメラーゼ、デアセチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、サーチュイン、ヒストンアセチラーゼ、CBP/P300ファミリー、MYSTファミリー、ATF2、DNAメチルトランスフェラーゼ、ヒストンH3K4デメチラーゼ、H3K27、JHDM2A、UTX、VHL、WT-1、p53、Hdm、PTEN、ユビキチンプロテアーゼ、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化剤(uPA)及びuPA受容体(uPAR)システム、カテプシン、メタロプロテイナーゼ、エステラーゼ、ヒドロラーゼ、セパララーゼ、カリウムチャネル、ナトリウムチャネル、多剤耐性タンパク質、P-糖タンパク質、ヌクレオシド輸送体、Ets、Elk、SMAD、Rel-A(p65-NFKB)、CREB、NFAT、ATF-2、AFT、Myc、Fos、Sp1、Egr-1、T-bet、 $\beta$ -カテニン、HIF、FOXO、E2F、SRF、TCF、Egr-1、 $\beta$ -カテニン、FOXO、STAT1、STAT3、STAT4、STAT5、STAT6、p53、WT-1、HMGA、pS6、4EPB-1、eIF4E-結合タンパク質、RNAポリメラーゼ、開始因子、伸長因子。

10

20

30

40

50

#### 【0118】

本発明の態様によっては、本明細書に記載の方法は、たとえば細胞経路における活性化可能エレメントの活性化レベルの測定に使用される。方法及び組成物は、細胞経路中の活性化可能エレメントの活性化レベルに従って細胞を分類するために提供される。細胞は造血細胞でありえる。造血細胞の例としては、多能性造血幹細胞、顆粒球系列前駆細胞(granulocyte lineage progenitor)または誘導細胞、単球系列前駆細胞または誘導細胞、マクロファージ系列前駆細胞または誘導細胞、巨核細胞系列前駆細胞または誘導細胞及び赤血球系列前駆細胞または誘導細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0119】

##### シグナル伝達経路

態様によっては、本発明の方法は、シグナル伝達経路中の活性化可能エレメントの状態を測定するために使用される。態様によっては、細胞は、本明細書に記載のように、一つ以上のシグナル伝達経路中の一つ以上の活性化可能エレメントの活性化レベルに従って分類される。シグナル伝達経路及びそのメンバーについては記載されてきた。Hunter T.、Cell、2000年1月7日100(1)巻：13-27頁を参照されたい。代表的なシグナル伝達経路としては、以下の経路及びそのメンバーが挙げられる：Ras、Raf、MEK、ERK及びelkを含むMAPキナーゼ経路；PI-3-キナーゼ(PI3K)、PDK1、Akt及びBadを含むPI3K/Akt経路；IKK、IkBを含むNF- $\kappa$ B経路；frizzled受容体(frizzled receptor)、ベータ-カテニン、APC及び他の補因子及びTCFを含むWnt経路；Lck及びZap70を含むT細胞受容体(TCR)経路；並びにLyn、Syk、及びPLC-2を含むB細胞受容体(BCR)経路(Cell Signaling Technology、Inc. 2002年カタログ231-279頁及びHunter T.、上掲を参照されたい)。本発明の態様によっては、アッセイされる関連した活性化可能エレメント(または調べられているシグナル伝達タンパク質)は、MAPキナーゼ、Akt、NFkB、WNT、RAS/RAF/MEK/ERK、JNK/SAPK、p38 MAPK、Srcファミリーキナーゼ、JAK/STAT、TCR、BCR、及び/またはPKCシグナル伝達経路のメ

ンバーである。これら及び他の経路の機能状態は、関連する変換カスケード内で一つの段階から別の段階へシグナルを運ぶ能力の典型である。シグナル変換は、カスケード内のプロセスの所定の段階の活性化可能エレメントが調節されるとき、所定の段階で進行する。

#### 【0120】

態様によっては、本発明の方法は、本明細書中に記載のものを含む当技術分野で公知のシグナル伝達経路中のシグナル伝達タンパク質及び/または活性化可能エレメントの状態を測定するために使用される。本発明の範囲内のシグナル伝達タンパク質の代表的なタイプとしては、キナーゼ、キナーゼ基質(すなわちリン酸化基質)、ホスファターゼ、ホスファターゼ基質、結合タンパク質(たとえば14-3-3)、受容体リガンド及び受容体(細胞表面受容体チロシンキナーゼ及び核受容体)が挙げられるが、これらに限定されない。キナーゼ及びタンパク質結合ドメインは、たとえば十分に記載されてきた(たとえばCell Signaling Technology, Inc.、2002年のカタログ "The Human Protein Kinases" 及び "Protein Interaction Domains" 254-279頁を参照されたい)。

10

#### 【0121】

核因子-カッパB(NF- $\kappa$ B)経路：核因子-カッパB(NF- $\kappa$ B)転写因子及びこれらを活性化するシグナル伝達経路は、先天性及び適応免疫反応の中心的な進行役である。哺乳類細胞には、5つのNF- $\kappa$ Bファミリーメンバー、RelA(p65)、RelB、c-Rel、p50/p105(NF- $\kappa$ B1)及びp52/p100(NF- $\kappa$ B2)があり、様々なNF- $\kappa$ B複合体はそのホモ及びヘテロ二量体から形成される。殆どの細胞型で、NF- $\kappa$ B複合体はNF- $\kappa$ Bの阻害剤(I $\kappa$ B)として公知の阻害タンパク質のファミリーにより細胞質に保持される。NF- $\kappa$ Bの活性化は通常、I $\kappa$ Bキナーゼ(IKK)複合体によるI $\kappa$ Bのリン酸化を含み、これによりI $\kappa$ Bユビキチン化され、それに続いて分解される。これによりNF- $\kappa$ Bが放出され、自由に核に移行することができる。NF- $\kappa$ Bにより調節される遺伝子としては、プログラム細胞死、細胞接着、増殖、先天性及び適応免疫反応、炎症、細胞-ストレス反応及び組織リモデリング(tissue remodeling)を制御するものが挙げられる。しかしながら、これらの遺伝子の発現は、他の多くのシグナル伝達及び転写因子経路の活性と密接に調和している。従って、NF- $\kappa$ B活性化の結果(outcome)は、その誘導の性質及び細胞状況に依存する。たとえば、NF- $\kappa$ B活性は癌遺伝子及び腫瘍抑制因子により調節され得、アポトーシス及び増殖を刺激するか阻害することが明らかになってきた。本明細書中、そのすべての目的に関して参照として含まれるPerkins、N、Integrating cell-signaling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. Reviews : Molecular Cell Biology . 2007年1月 ; 8(1) : 49-62頁を参照されたい。本明細書中、そのすべての目的に関して参照として含まれる、Hayden、M. のSignaling to NF- $\kappa$ B . Genes & Development . 2004年 ; 18巻 : 2195-2224頁を参照されたい。本明細書中、そのすべての目的に関して参照として含まれるPerkins、N. Good Cop、Bad Cop : The Different Faces of NF- $\kappa$ B . Cell Death and Differentiation . 2006年 ; 13巻 : 759-772頁を参照されたい。

20

30

#### 【0122】

ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-K)/AKT経路：PI3-Kは広範な種類の細胞表面受容体により活性化されて、脂質二次情報伝達物質(メッセンジャー)ホスファチジルイノシトール3,4-ビスホスフェート(PIP<sub>2</sub>)及びホスファチジルイノシトール3,4,5-トリホスフェート(PIP<sub>3</sub>)を生成する。受容体チロシンキナーゼの例としては、これらに限定されないが、以下のもの：FLT3リガンド、EGFR、IGF-1R、HER2/neu、VEGFR、及びPDGFRが挙げられる。PI3Kにより生成された脂質二次情報伝達物質(lipid second messenger)は、多種多様な細胞機能を制御する。標的タンパク質へのPI3,4P<sub>2</sub>及びPI3,4,5P<sub>3</sub>の特異的結合は、これらの標的タンパク質内に存在するプレックストリン相同性(PH)ドメインを介して媒介される。PI3-Kの一つの重要な下流エフェクターはAkt、セリン/トレオニンキナーゼであり、これはそのPHドメインがPI3,4P<sub>2</sub>及びPI3,4,5P<sub>3</sub>と反応するときに活性化して、Aktを細胞膜に補充する(recruitment)。完全に活性化するために、Aktはトレオニン308で3-ホスファチジルイノシトール-依存性タンパク質キナーゼ-1(PDK-1)により、セリン473で幾つかのPDK2キナーゼによりリン酸化される。次いでAktはPI3Kの下流で作用して、たとえばこ

40

50

れらに限定されないが、フォークヘッドボックス(forkhead box)転写因子、Bad、GSK-3、I- B、mTOR、MDM-2、及びS6リボソームサブユニットなどの多くの基質のリン酸化を制御する。これらのリン酸化事象は順に、細胞生存、細胞増殖、膜輸送、グルコース恒常性、代謝及び細胞運動性を媒介する。PI3K経路の調節解除(deregulation)は、成長因子受容体における変異の活性化、PI3-K遺伝子(たとえばPIK3CA)における変異の活性化、脂質ホスファターゼ(たとえばPTEN)における機能変異の欠失、Aktのアップレギュレーション、または結節性硬化症(TSC1/2)の機能障害(impairment)により生じる。これらすべての事象は、高い生存及び増殖に結びついている。本明細書中、そのすべての目的に関して参照として含まれる、Vivanco、I.、The Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT Pathway in Human Cancer. Nature Reviews: Cancer、2002年7月; 2巻: 489-501頁及びShaw、R. Ras、PI(3)K and mTOR signaling controls tumor cell growth. Nature. 2006年5月; 441巻: 424-430頁、Maroneら、Biochimica et Biophysica Acta、2008年; 1784巻、159-185頁を参照されたい。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 2 3 】

タンパク質キナーゼC(PKC)シグナル伝達経路: セリン/トレオニンキナーゼのPKCファミリーは、受容体チロシンキナーゼ、G-タンパク質共役受容体及び細胞質チロシンキナーゼの活性化後にシグナル伝達経路を媒介する。PKCファミリーメンバーの活性化は、細胞増殖、分化、生存、免疫機能、侵入、移行及び血管新生と関連している。PKCシグナル伝達経路の中断(disruption)は腫瘍発生及び薬剤耐性に関連していた。PKCアイソフォームは細胞機能において特有且つ重複した役割をもつ。PKCはもともとは、リン脂質及びカルシウム依存性タンパク質キナーゼとして同定された。哺乳類PKCスーパーファミリーは、その構造的な差及び関連する補因子必要要件をベースとして4つのサブグループ: cPKC(従来のPKC)アイソフォーム(、I、II及び)、これはCa<sup>2+</sup>及びDAG(ジアシルグリセロール)の両方に応答する; nPKC(新PKC)アイソフォーム(、及び)、これはCa<sup>2+</sup>に感受性であるが、DAGに依存性である; 不定形(atypical)PKC(aPKC、/、)、これらは補因子には応答性ではないが、他の脂質及びタンパク質-タンパク質相互作用により活性化され得る; 及び関連PKN(タンパク質キナーゼN)ファミリー(たとえばPKN1、PKN2及びPKN3)に分けられる13の異なるアイソフォームからなり、これらのメンバーは低分子量GTPaseによる制御にかけられる。これらの様々な生物学的機能と調和して、PKCアイソフォームは、その構造、組織分布、細胞内局在性、活性化モード及び基質特異性の点で異なる。そのキナーゼの最大活性化の前に、PKCはホスホイノシチド依存性キナーゼ1(PDK-1)により構造的に提供されるプライミング(priming)リン酸化を要求する。リン脂質DAGは、不活性酵素が結合する阻害基質(擬基質)の放出及びPKC活性化を伴う細胞膜の在来型PKCの親和性を高めることにより、PKCの活性化に中心的な役割を有する。次いで活性化PKCは一連のキナーゼをリン酸化及び活性化する。PKC活性化後の下流事象はあまり理解されていないが、MEK-ERK(マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ-細胞外シグナル調節キナーゼ)経路は、重要な役割をもつものと考えられている。PI3K-Akt経路におけるPKCの関与を支持する証拠もある。PKCアイソフォームはおそらく、細胞のシグナル変換をし易くする多タンパク質複合体の一部を形成するのだろう。幾つかのファミリーメンバーの調節不全(dysregulation)について多くの報告がなされている。

#### 【 0 1 2 4 】

マイトジェン活性化タンパク質(MAP)キナーゼ経路: MAPキナーゼは、多くの細胞経路に関与するシグナルと、様々なリガンド及び細胞刺激に応答して機能を変換する(Lawrenceら、Cell Research(2008年)18巻: 436-442頁)。MAPKによるシグナル伝達は、個々のタンパク質の活性または局在化、遺伝子の転写及び高い細胞周期エントリーなどの特定の事象に影響を与え、胚形成及び分化などの複雑なプロセスを指揮する変化を促進する。MAPKの異常または不適切な機能は、癌から炎症性疾患、肥満及び糖尿病に及ぶ疾患で同定されてきている。MAPKは一連の3つ以上のタンパク質キナーゼからなるタンパク質キナーゼカスケードにより活性化される: MAPKキナーゼキナーゼ(MAP3K)はMAPKキナーゼ(MAP2K)をS/T残基上で二重リン酸化により活性化し; 次いでMAP2Kは、Y及びT残基上で二重リン酸化に

よりMAPKを活性化し、次いでMAPKはセレクトS/T残基、通常続いてプロリン残基上で標的基質をリン酸化する。ERK1/2カスケードにおいて、MAP3Kは通常、Rafファミリーのメンバーである。多種多様なMAP3Kがp38及びc-Jun N-末端キナーゼ/ストレス-活性化タンパク質キナーゼ(JNK/SAPK)MAPKグループの上流に存在し、これは通常、細胞ストレスへの応答を伴う。活性化刺激の下流では、キナーゼカスケードは、経路中で低分子量Gタンパク質、MAP4K、細胞骨格の組み合わせまたはMAP3Kのオリゴマー化により刺激されえる。ERK1/2経路では、Rasファミリーメンバーは通常、Rafタンパク質に結合し、活性化並びに経路の他の下流メンバーの続く活性化を導く。

#### 【 0 1 2 5 】

Ras/RAF/MEK/ERK経路：RAS/Raf/MAPKカスケードの在来型活性化は、細胞表面での受容体チロシンキナーゼへのリガンド結合後に起きるが、無数の他の受容体も同様に、インテグリン、サーペントイン受容体、ヘテロ三量体G-タンパク質及びサイトカイン受容体を活性化する能力をもつ。概念的には線状であるが、かなりのクロストークがRas/Raf/MAPK/Erkキナーゼ(MEK)/Erk MAPK経路と他のMAPK経路、並びに他のシグナル伝達経路との間で起きる。多くの細胞機能におけるRas/Raf/MEK/Erk MAPK経路のきわめて重要な役割は、形質転換細胞の成長と腫瘍形成におけるカスケードの重要性にある。従って、MAPK経路は治療標的に関する強力な研究の焦点であった。多くの受容体チロシンキナーゼは、MAPKシグナル伝達を開始することができる。その細胞質ドメイン内でリン酸化事象を活性化した後、これらはsrc-相同性2(SH2)ドメイン-含有シグナル伝達分子のドッキング部位を提供する。そのうち、Grb2などのアダプタータンパク質は、SOS-1またはCDC25などのグアニンヌクレオチド交換因子を細胞膜に集める。グアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor)は、細胞膜でRasタンパク質と相互作用して、コンフォメーション変化と、RASに結合したGDPをGTPに交換するのを促進する。K-Ras、N-Ras、及びH-Rasなどの多くのRasアイソフォームについて記載されてきた。Ras活性化の停止は、RasGTPのRasGDPへの加水分解時におきる。Rasタンパク質は本来、低GTPase活性である。従って、GTPase活性は、GTPase-活性化タンパク質、たとえばNF-1 GTPase活性化タンパク質/ニューロフィブロミン及びp120 GTPase活性化タンパク質により刺激されて、長期化されたRas刺激シグナル伝達を防ぐ。Ras活性化はMAPKカスケード活性化の最初の段階である。Ras活性化後、Raf(A-Raf、B-Raf、またはRaf-1)をRasに結合することにより細胞膜に集め、完全に理解されていない多数の補因子とリン酸化とを含む複雑なプロセスで活性化する。Rafタンパク質は、多数のセリン残基のリン酸化によりMEK1及びMEK2を直接活性化する。MEK1及びMEK2は、続いてErk1及びErk2のトレオニン及びチロシン残基をリン酸化して活性化する、それ自体チロシン及びトレオニン/セリン二重特異性キナーゼである。MEK1/2はErkタンパク質以外に公知の標的をもたないが、Erkは、Elk-1、c-Ets1、c-Ets2、p90RSK1、MNK1、MNK2、及びTOBを含む複数の標的をもつ。Erkの細胞機能は多様であり、細胞増殖、生存、有糸分裂及び移動の制御が挙げられる。本明細書中、そのすべての目的に関して全体が参照として含まれる、McCubrey、J.、"Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance"、*Biochimica et Biophysica Acta*. 2007年；1773巻：1263-1284頁、Friday及びAdjei、*Clinical Cancer Research*(2008年)14巻、342-346頁。

#### 【 0 1 2 6 】

c-Jun N-末端キナーゼ(JNK)/ストレス活性化タンパク質キナーゼ(SAPK)経路：c-Jun N-末端キナーゼは(JNKs)は、当初は、セリン/トレオニンタンパク質キナーゼのファミリーとして記載され、さまざまなストレス刺激により活性化され、c-Jun転写因子のN-末端転写活性化ドメインをリン酸化することができた。このリン酸化により、哺乳類動物中のc-Jun依存性転写事象を促進する。さらなる研究から、三つのJNK遺伝子(JNK1、JNK2及びJNK3)及びそのスプライス形、並びにJNK活性化を導く一連の外部刺激が明らかになった。JNK1及びJNK2はユビキタスであるが、JNK3は比較的脳に限定されている。JNKの主MAP2K上流は、MEK4(MKK4)及びMEK7(MKK7)である。JNK/SAPKを活性化する能力をもつMAP3Kとしては、MEKK(MEKK1、-2、-3及び-4)、混合系統キナーゼ(mixed lineage kinase)(MLK、たと



により、及び上皮増殖因子受容体(EGFR)などの細胞表面受容体のリガンド活性化により媒介することができる。これらの相互作用は、Src内での細胞間相互作用を中断して、タンパク質が潜在的な基質及び下流シグナル伝達分子と相互作用することができるオープンコンフォメーションに導く。Srcは、チロシン残基Y530の脱リン酸化により活性化することもできる。最大Src活性化は、触媒ドメインに存在するチロシン残基Y419(ヒトタンパク質にある)の自己リン酸化を要求する。増加したSrc活性は、EGFR、HER2、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)、線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)、血管内皮細胞増殖因子受容体、エフリン、インテグリン、若しくはFAKなどの上流増殖因子受容体の過剰発現による脱制御により、または高い転写により生じることがある。あるいは、ヒトの腫瘍によっては、負Srcレギュレーター、Cskの低い発現を示すものがある。Srcキナーゼの増加レベル、増加活性、及び遺伝子異常は、充実性腫瘍形成及び白血病の両方に関与していた。Ingley、E .、Src family kinases: Regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008年; 1784巻56-65頁は、本明細書中、そのすべての目的に関して参照として含まれる。Benati and Baldari.、*Curr Med Chem*. 2008年; 15(12)巻: 1154-65頁、Finn(2008年)*Ann Oncol*. 5月16日は、本明細書中、そのすべての目的に関して参照として含まれる。

10

## 【0129】

ヤヌスキナーゼ(Janus kinase: JAK)/シグナル伝達性転写因子(Signal transducers and activators of transcription: STAT)経路: JAK/STAT経路は、非常に広範なサイトカイン受容体、成長因子受容体、及びG-タンパク質共役受容体由来のシグナルを媒介する際に重要な役割を果たす。シグナル伝達性転写因子(STAT)タンパク質は、非常に広範なサイトカイン受容体、成長因子受容体、及びG-タンパク質共役受容体由来のシグナルを媒介する際に重要な役割を果たす。STATは、細胞質ゾル情報伝達因子及び核転写因子の両方として機能することにより、サイトカイン受容体刺激と遺伝子転写とを直接結び付ける。ヤヌスキナーゼ(JAK)-STAT経路では、リガンド結合による受容体二量体化により、JAKファミリーキナーゼ(JFK)活性化、続いて受容体のチロシンリン酸化が起き、これによりSH2ドメインを介してSTATが集められ、保存されたチロシン残基のリン酸化が導かれる。チロシンリン酸化STATは二量体を形成し、核に移行し、特異的DNAエレメントに結合して標的遺伝子転写を活性化し、これにより細胞増殖、分化及びアポトーシスの調節を導く。全体のプロセスは、タンパク質チロシンホスファターゼ、チロシンシグナル伝達のサブレッサー及び活性化STATのタンパク質阻害剤により多レベルで緊密に制御される。哺乳類では、STATファミリーの7つのメンバー(STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b及びSTAT6)が同定された。JAKは二つの対称的なキナーゼ様ドメインを含む。C-末端JAK相同性1(JH1)ドメインはチロシンキナーゼ機能をもつが、直近のJH2ドメインは酵素的には不活性であり、JH1の活性を調節すると考えられている。四つのJAKファミリーメンバー: JAK1、JAK2、JAK3及びチロシンキナーゼ2(Tyk2)がある。発現は、JAK1、JAK2及びTYK2に関してはユビキタスであるが、JAK3に関しては造血細胞に限定されている。JAKタンパク質おける変異は、幾つかの骨髄性悪性腫瘍に関して記載されてきた。具体例としては、これらに限定されないが、以下のものが挙げられる: 体細胞JAK3(たとえばJAK3A572V、JAK3V722I、JAK3P132T)及び融合JAK2(たとえばETV6-JAK2、PCM1-JAK2、BCR-JAK2)変異は急性巨核球性白血病及び急性白血病/慢性骨髄性白血病、JAK2(V617F、JAK2エキソン12変異)及び、骨髄増殖性疾患及び骨髄増殖性の新生物と関連したMPL(MPLW515L/K/S、MPLS505N)変異についてそれぞれ記載されてきた。JAK2変異、主にJAK2V617Fは、常に真性赤血球増加症(PV)と関連する。またこの変異は本態性血小板血症(ET)または原発性骨髄線維症(PMF)の患者の多くで発生している(Tefferi n.、*Leukemia & Lymphoma*、2008年3月; 49(3)巻: 388-397頁)。STATは、srcファミリーキナーゼメンバーにより、及び腫瘍形成性Flt3リガンド-ITDによりJAK-非依存性に活性化することができる(Hayakawa及びNaoe、*Ann N Y Acad Sci*. 2006年11月; 1086巻: 213-22頁; Choudharyら、*Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3 ligand-ITD*. *Blood*(2007年)110巻(1)号、370-4頁)。STATの変異はヒト腫瘍では記載されなかったが、STAT1、STAT3及びSTAT5などのファミリーの幾

20

30

40

50

つかのメンバーの活性は、様々なヒト腫瘍及び白血病で調節不全にされる。STAT3及びSTAT5は、チロシン上で構成的なリン酸化により発がん能(oncogene potential)を獲得し、その活性は、形質転換された表現型を維持するのに必要なことが知見された。これは、STAT3のチロシンリン酸化がJAK-非依存性であり、変異及びSrcを介して活性化されたEGF受容体により媒介される肺がんで知見された(Alvarezら、Cancer Research、Cancer Res 2006年；66巻)。STAT5リン酸化は、白血病幹細胞を長期保持するのに必要であることも知見された。(Schepersら、"STAT5 is required for long-term maintenance of normal and leukemic human stem/progenitor cells." Blood (2007)、110(8)巻、2880-2888頁)。STAT3及びSTAT5とは対照的に、STAT1は細胞増殖及び血管新生を負に調節するので、腫瘍形成を阻害する。腫瘍抑制特性と一致して、STAT1及び下流標的は、様々なヒト腫瘍では減少することが知見された(本明細書中、そのすべての目的に関して参照として含まれる、Rawlings、J. The JAK/STAT signaling pathway. J of Cell Science. 2004年；117(8)巻：1281-1283頁)。

10

【0130】

#### 結合エレメント

本発明の態様によっては、活性化エレメントの活性化レベルを測定する。一態様では、活性化可能エレメントの活性化状態に特異的な結合エレメントと細胞集団由来の細胞とを接触させることによってこの測定を行う。「結合エレメント」なる用語は、任意の分子、たとえば活性化可能エレメントの別の活性化状態に優先して活性化可能エレメントの活性化状態を測定しえるペプチド、核酸、小有機分子が挙げられる。結合エレメント及び結合エレメントの標識は、米国特許出願シリアル番号第/048,886号；同第61/048,920号及び同第61/048,657号に示されている。

20

【0131】

態様によっては、結合エレメントはペプチド、ポリペプチド、オリゴペプチドまたはタンパク質である。ペプチド、ポリペプチド、オリゴペプチドまたはタンパク質は、天然に存在するアミノ酸及びペプチド結合、または合成ペプチド模倣構造から形成することができる。従って、本明細書中で使用する「アミノ酸」、または「ペプチド残基」なる用語は、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸の両方を包含する。たとえば、ホモ-フェニルアラニン、シトルリン及びノルロイシンは、本発明の目的に関するアミノ酸と考えられる。側鎖は、(R)または(S)立体配置のいずれかをとりえる。態様によっては、アミノ酸は(S)またはL-立体配置である。天然に存在しない側鎖を使用する場合、in vivo分解を避けたり、または遅延させたりするために非アミノ酸置換基を使用することができる。天然には存在しないアミノ酸を含むタンパク質は、合成することができるか、場合によっては組み換え技術によって合成することができる。本明細書中、いずれも参照として含まれる、van Hestら、FEBS Lett 428(1-2)68-70、1998年5月22日及びTangら、Abstr. Pap Am. Chem. S218:U138 パート2、1999年8月22日を参照されたい。

30

【0132】

本発明の方法を使用して、抗原的に検出可能であり、且つサンプル中に存在する他の活性化可能エレメントと抗原的に識別可能である、サンプル中の任意の特定の活性化可能エレメントを検出するのに使用することができる。たとえば、本発明の活性化状態-特異的抗体を本発明の方法で使用して、複雑な細胞集団のサブセットまたはサブ集団の異なるシグナル伝達カスケード；及び可能性のあるシグナル伝達階層におけるタンパク質の活性化(たとえばキナーゼ活性化)の順序(ordering)を同定することができる。従って態様によっては、一つ以上のポリペプチドの発現及びリン酸化を、本発明の方法を使用して検出及び定量する。態様によっては、細胞経路の細胞成分である一つ以上のポリペプチドの発現及びリン酸化を、本発明の方法を使用して検出及び定量する。本明細書中で使用するように、「活性化状態-特異的抗体(activation state-specific antibody)」または「活性化状態抗体(activation state antibody)」またはその文法的等価物は、対応する及び特異的抗原に特異的に結合する抗体を指す。好ましくは、対応する及び特異的抗原は、活性化可能エレメントの特異的な形状である。好ましくは、活性化状態-特異的抗体の結合は、

40

50

特異的な活性化可能エレメントの特異的活性化状態を示す。

【0133】

態様によっては、結合エレメントは抗体である。態様によっては、結合エレメントは活性化状態-特異的抗体である。

【0134】

「抗体」なる用語は、完全長抗体及び抗体フラグメントを包含し、任意の生物由来の天然に存在する抗体、改変抗体(engineered antibody)、または以下さらに定義する実験的、治療的若しくは他の目的のために組み換え技術により産生した抗体をさすことができる。抗体フラグメントの例としては、当技術分野で公知であるように、たとえばFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFvまたは、組み換えDNA技術を使用して初めから新たに合成したか、若しくは全抗体の修飾により産生した他の抗体の抗原-結合配列がある。「抗体」なる用語は、モノクローナル及びポリクローナル抗体を含む。抗体は、アンタゴニスト、アゴニスト、中和、阻害または促進でありえる。これらはヒト化(humanized)、グリコシル化、固体単体に結合することができ、他の変異体を有することができる。結合エレメントとしての抗体に関するさらなる情報に関しては、米国特許出願シリアル番号第61/048,886号；同第61/048,920号及び同第61/048,657号を参照されたい。

10

【0135】

活性化状態特異的抗体を使用してキナーゼ活性を測定することができるが、キナーゼ活性を測定するための追加の手段を本発明により提供する。たとえば、タンパク質キナーゼにより特異的に認識され、それによりリン酸化される基質は公知である。そのようなリン酸化基質に特異的に結合するが、そのような非リン酸化基質には結合しない抗体(ホスホ-基質抗体)を使用して、サンプル中の活性化キナーゼの存在を測定することができる。

20

【0136】

活性化可能エレメントの活性化アイソフォームの抗原性は、活性化可能エレメントの非活性化アイソフォームの抗原性と、または異なる活性化状態のアイソフォームの抗原性を区別する。態様によっては、エレメントの活性化アイソフォームは、エレメントの非活性化アイソフォームには存在しないエピトープをもつか、またはその逆である(vice versa)。態様によっては、この差は、リン酸塩部分などの部分をエレメントに共有結合的に付加することによるか、タンパク質切断を介するエレメント中の構造的変化により、またはエレメントのコンフォメーション変化を誘発して、抗原的に区別可能な方法でエレメントが同一配列を提示させることによる。態様によっては、かかるコンフォメーション変化により、エレメントの活性化アイソフォームが生じて、非活性化アイソフォームには存在しない少なくとも一つのエピトープを提示するか、エレメントの非活性化アイソフォームにより生じる少なくとも一つのエピトープを提示しない。態様によっては、区別可能な抗体のエピトープはエレメントの活性部位の中心にあるが、当技術分野で公知のように、エレメントの一つの領域のコンフォメーション変化によって同様にエレメントの他の領域にも変更を生じることがある。

30

【0137】

その多くが市販されている(たとえば、Cell Signaling Technology、www.cellsignal.comまたはBecton Dickinson、www.bd.comを参照されたい)多くの抗体が製造され、それらはタンパク質のリン酸化アイソフォームに特異的に結合するが、タンパク質の非リン酸化アイソフォームには特異的に結合しない。そのような多くの抗体は、可逆的にリン酸化されるシグナル変換タンパク質の研究に関して生産されてきた。特に、タンパク質のリン酸化、活性化アイソフォームに特異的に結合するそのような多くの抗体が生産されてきた。本明細書の方法で分析し得るタンパク質の例としては、これらに限定されないが、以下のものが挙げられる：キナーゼ、HER受容体、PDGF受容体、FLT3受容体、Kit受容体、FGF受容体、Eph受容体、Trk受容体、IGF受容体、インスリン受容体、Met受容体、Ret、VEGF受容体、TIE1、TIE2、エリスロポエチン受容体、トロンプオエチン受容体、CD114、CD116、FAK、Jak1、Jak2、Jak3、Tyk2、Src、Lyn、Fyn、Lck、Fgr、Yes、Csk、Abl、Btk、ZAP70、Syk、IRAK、cRaf、ARaf、BRAF、Mos、Limキナーゼ、ILK、Tpl、ALK、TGF受容体、BM

40

50

P受容体、MEKK、ASK、MLK、DLK、PAK、Mek1、Mek2、MKK3/6、MKK4/7、ASK1、Cot、NIK、Bub、Myt1、Weel、カゼインキナーゼ、PDK1、SGK1、SGK2、SGK3、Akt1、Akt2、Akt3、p90Rsk、p70S6キナーゼ、Prk、PKC、PKA、ROCK1、ROCK2、オーロラ(Aurora)、CaMK、MNK、AMPK、MELK、MARK、Chk1、Chk2、LKB-1、MAPKAPK、Pim1、Pim2、Pim3、IKK、Cdk、Jnk、Erk、IKK、GSK3、GSK3、Cdk、CLK、PKR、PI3-キナーゼクラス1、クラス2、クラス3、mTOR、SAPK/JNK1,2,3、p38、PKR、DNA-PK、ATM、ATR、ホスファターゼ、受容体タンパク質チロシンホスファターゼ(RPTP)、LARホスファターゼ、CD45、非受容体チロシンホスファターゼ(NPRTP)、SHP、MAPキナーゼホスファターゼ(MKP)、二重特異性ホスファターゼ(DUSP)、CDC25ホスファターゼ、低分子量チロシンホスファターゼ、アイアブセント(Eyes absent)(EYA)チロシンホスファターゼ、スリングショット(Slingshot)ホスファターゼ(SSH)、セリンホスファターゼ、PP2A、PP2B、PP2C、PP1、PPS、イノシトールホスファターゼ、PTEN、SHIP、ミオチューブラリン、脂質シグナル伝達、ホスホイノシチドキナーゼ、ホスホリパーゼ、プロスタグランジン合成酵素、5-リポキシゲナーゼ、スフィンゴシンキナーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、アダプター/骨格タンパク質、Shc、Grb2、BLNK、LAT、PI3-キナーゼのB細胞アダプター(BCAP)、SLAP、Dok、KSR、MyD88、Crk、CrkL、GAD、Nck、Grb2関連バインダー(GAB)、Fas関連デスドメイン(FADD)、TRADD、TRAF2、RIP、T-細胞白血病ファミリー、サイトカイン、IL-2、IL-4、IL-8、IL-6、インターフェロン、インターフェロン、サイトカイン調節剤、サイトカインシグナル伝達のサブレッサー(SOC)、ユビキチン化酵素、Cbl、SCFユビキチン化リガーゼ複合体、APC/C、接着分子、インテグリン、免疫グロブリン様接着分子、セレクチン、カドヘリン、カテニン、接着斑キナーゼ、p130CAS、細胞骨格/収縮性タンパク質、ホドリン、アクチン、パキシリン、ミオシン、ミオシン結合タンパク質、チューブリン、eg5/KSP、CENP、ヘテロ三量体Gタンパク質、-アドレナリン受容体、ムスカリン受容体、アデニルシクラーゼ受容体、低分子量GTPases、H-Ras、K-Ras、N-Ras、Ran、Rac、Rho、Cdc42、Arfs、RAB、RHEB、グアニンヌクレオチド交換因子、Vav、Tiam、Sos、Dbl、PRK、TSC1,2、GTPase活性化タンパク質、Ras-GAP、Arf-GAP、Rho-GAP、カスパーゼ、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、アポトーシスに関与するタンパク質、Bcl-2、Mcl-1、Bcl-XL、Bcl-w、Bcl-B、Al、Bax、Bak、Bok、Bik、Bad、Bid、Bim、Bmf、Hrk、Noxa、Puma、IAP、XIAP、Smac、細胞周期調節剤、Cdk4、Cdk6、Cdk2、Cdk1、Cdk7、サイクリンD、サイクリンE、サイクリンA、サイクリンB、Rb、p16、p14Arf、p27KIP、p21CIP、分子シャペロン、Hsp90、Hsp70、Hsp27、代謝酵素、アセチル-CoAカルボキシラーゼ、ATPクエン酸リアーゼ、一酸化窒素シンターゼ、小胞輸送タンパク質、カベオリン、エンドソーム輸送選別複合体(endosomal sorting complex required for transport: ESCRT)タンパク質、小胞タンパク質ソーティング(Vsp)、ヒドロキシラーゼ、プロリル-ヒドロキシラーゼPHD-1、2及び3、アスパラギン・ヒドロキシラーゼFIHトランスフェラーゼ、イソメラーゼ、Pin1プロリルイソメラーゼ、トポイソメラーゼ、デアセチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、サーチユイン、アセチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、CBP/P300ファミリー、MYSTファミリー、ATF2、メチラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、デメチラーゼ、ヒストンH3K4デメチラーゼ、H3K27、JHDM2A、UTX、腫瘍抑制遺伝子、VHL、WT-1、p53、Hdm、PTEN、プロテアーゼ、ユビキチンプロテアーゼ、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター(uPA)及びuPA受容体(uPAR)系、カテプシン、メタロプロテイナーゼ、エステラーゼ、加水分解酵素、セパラゼ、イオンチャネル、カリウムチャネル、ナトリウムチャネル、分子トランスポーター、多剤耐性タンパク質、P-糖タンパク質(P-Glycoprotein)、ヌクレオシドトランスポーター、転写因子/DNA結合タンパク質、Ets、Elk、SMAD、Rel-A(p65-NFkB)、CREB、NFAT、ATF-2、AFT、Myc、Fos、Spl、Egr-1、T-bet、-カテニン、HIF、FOXO、E2F、SRF、TCF、Egr-1、-FOXO、STAT1、STAT3、STAT4、STAT5、STAT6、p53、WT-1、HMG A、翻訳のレギュレーター、pS6、4EPB-1、eIF4E-結合タンパク質、転写のレギュレーター、RNAポリメラーゼ、開始因子、伸長因子。態様によっては、タンパク質はS6である。

10

20

30

40

50

## 【0138】

態様によっては、抗体全体ではなく活性化状態抗体のエピトープ-認識フラグメント(ep

itope-recognizing fragment)を使用する。態様によっては、エピトープ-認識フラグメントは固定されている。態様によっては、エピトープを認識する抗体軽鎖を使用する。エピトープを認識する抗体軽鎖遺伝子産物をコードする組み換え核酸を使用して、当技術分野で公知の組み換え技術によりかかる抗体フラグメントを産生することができる。

#### 【0139】

態様によっては、活性化エレメントの活性化状態の評価は質量分析を使用して行う。活性化エレメントの活性化状態は、定量的質量分析を使用して測定することができる。定量的質量分析の一つの型は、細胞培地中のアミノ酸による安定な同位体の標識化である(SILAC)。SILACを使用して活性化を定量的に評価できるようにするには、細胞を軽質培地(light medium)(たとえば、天然に生じるアミノ酸、リジン及びアルギニンの放射線的に中性の形を含むもの)または重質培地(heavy medium)(たとえば、天然に生じる炭素12を炭素13同位体で完全に置換したリジンとアルギニンを含むもの)のいずれかで成長させる。SILAC法についてはさらに米国特許出願シリアル番号第11/368,996号及び同第11/314,323号、並びに米国特許第7,300,753号及び同第6,906,320号に記載されている。12、14、16、18、20、22、24、30、36、48、または72時間を超えて細胞を培養した後、好適な炭素同位体は成長培地から細胞タンパク質へ取り込まれる。このようにして培養した細胞を処理して、本明細書に記載する方法のいずれかを使用して活性化可能エレメントにて単離及び質問(query)する。たとえば、抗体を使用して、標的のタンパク質を免疫沈降させることができる。単離したタンパク質は、定量的質量分析を使用して一つ以上の修飾に関して同定、定量及び/または測定することができる。重質-及び軽質-標識化細胞から得られたサンプルのプールを使用して、質量分析を同時に使用して重質及び軽質ペプチドを検出することができる。この同時検出により、重質及び軽質ペプチドの直接的定量比較が可能になる。態様によっては、細胞の一集団(たとえば重質標識化)をモジュレーターで処置するが、細胞の他の集団(たとえば軽質標識化)はモジュレーターとの接触を受けない。識別可能に(differentially)標識化し、処理した細胞集団は、SILACを使用して定量的に比較することができる。

#### 【0140】

態様によっては、濃縮段階(enrichment step)は実施せず、SILAC分析は、全細胞の溶解物で直接実施する。任意の測定変化でもロバスト(robust)であるように確実にするために、逆に標識化することでSILAC手順を繰り返すことができる。

#### 【0141】

態様によっては、活性化可能エレメントの活性化状態の評価は、マイクロ流体画像血球計算法(microfluidic image cytometry : MIC)を使用して行う。マイクロ流体法などのマイクロスケールの方法は、最小サンプル/試薬利用、操作可能な忠実度(operational fidelity)、高スループット、費用効率性、並びにマイクロスケールの環境への試薬及びサンプルの輸送に対する詳細な制御という固有の好都合な点を提供する。態様によっては、マイクロ流体画像サイトメトリーは、複数のマイクロ流体細胞培養チャンバを含む細胞アレイチップを包含し、ここでそれぞれのチャンバは約20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、350、400、450、または500nLの容積をもつ。マイクロチャンネルは、様々な試薬及び培地を使用するマイクロ流体細胞培養チャンバ内で細胞接触を制御するために、当技術分野で公知のリソグラフィー法を使用してチップ上でエッチングすることができる。

#### 【0142】

細胞は、マイクロ流体細胞培養チャンバ内に設置し、本明細書に記載の方法のマイクロスケールバージョンを使用して処置することができる。たとえば、一つ以上の活性化可能エレメントの活性化状態は、免疫細胞化学を使用してマイクロ流体細胞培養チャンバ内で細胞を評価することができる。他の態様では、細胞は免疫細胞化学を使用して分析する。これらの方法の免疫標識後、細胞内の活性化可能エレメントの活性化状態を、公知の顕微鏡ベースの画像収集法を使用して視覚化することができる。

#### 【0143】

本発明の別の態様では、タンパク質結合エレメントの芳香族アミノ酸を他の分子で置き換えることができる。米国特許出願シリアル番号第61/048,886号；同第61/048,920号及び同61/048,657号を参照されたい。

#### 【0144】

態様によっては、活性化状態-特異的結合エレメントは、活性化可能タンパク質上の標的構造に結合する認識構造を含むペプチドである。様々な認識構造が当技術分野で公知であり、ファージディスプレイライブラリーなど当技術分野で公知の方法を使用して製造することができる(たとえば、本明細書中、それぞれ参照として含まれるGururajら、*Chem. Biol.* (2000年)7巻：515-27ページ；Houimelら、*Eur. J. Immunol.* (2001年)31巻：353-45頁；Cochranら、*J. Am. Chem. Soc.* (2001年)123巻：625-32頁；Houimelら、*Int. J. Cancer* (2001年)92巻：748-55頁を参照されたい)。さらに、フルオロフォアを本発明の方法で使用するそのような抗体につけることができる。

10

#### 【0145】

様々な認識構造が当技術分野で公知であり(たとえば、本明細書中、それぞれ参照として明白に含まれる、Cochranら、*J. Am. Chem. Soc.* (2001年)123巻：625-32頁；Boerら、*Blood*(2002年)100巻：467-73頁など)、当技術分野で公知の方法を使用して産生することができる(たとえば、本明細書中、それぞれ参照として明白に含まれる、Boerら、*Blood*(2002年)100巻：467-73頁；Gualilloら、*Mol. Cell Endocrinol.* (2002年)190巻：83-9頁を参照されたい)、たとえば、活性化可能タンパク質上に標的構造に対して親和性をもつポリマーなどの、認識構造を産生するためのコンビナトリアルケミストリー法などがある(たとえば、本明細書中、それぞれ参照として明白に含まれる、Barnら、*J. Comb. Chem.* (2001年)3巻：534-41頁；Juら、*Biotechnol.* (1999年)64巻：232-9頁を参照されたい)。別の態様では、活性化状態-特異的抗体は、リン酸化されている特異的な活性化可能タンパク質のアイソフォームにのみ結合し、リン酸化されていないか非リン酸化されているときは、この活性化可能タンパク質のアイソフォームには結合しないタンパク質である。別の態様では、活性化状態-特異的抗体は、細胞内であり且つ細胞外ではない活性化可能タンパク質のアイソフォームにのみ結合するタンパク質であるか、またはその逆の場合である。態様によっては、認識構造は、抗-ラミニン単鎖抗体フラグメント(scFv)である(たとえば、本明細書中、それぞれ参照として明白に含まれる、Sanzら、*Gene Therapy*(2002年)9巻：1049-53頁；Tseら、*J. Mol. Biol.* (2002年)317巻：85-94頁を参照されたい)。

20

30

#### 【0146】

態様によっては、結合エレメントは核酸である。「核酸」なる用語は、核酸類似体、たとえばホスホルアミド(phosphoramidate)(Beaucageら、*Tetrahedron* 49(10)巻：1925頁(1993年)及びその中の参考文献；Letsinger、*J. Org. Chem.* 35巻：3800頁(1970年)；Sprinzlら、*Eur. J. Biochem.* 81巻：579頁(1977年)；Letsingerら、*Nucl. Acids Res.* 14巻：3487頁(1986年)；Sawaiら、*Chem. Lett.* 805巻(1984年)、Letsingerら、*J. Am. Chem. Soc.* 110巻：4470頁(1988年)；及びPauwelsら、*Chemica Scripta* 26巻：141 (1986))、ホスホロチオエート(Magら、*Nucleic Acids Res.* 19巻：1437頁(1991年)及び米国特許第5,644,048号)、ホスホロジチオエート(Briuら、*J. Am. Chem. Soc.* 111巻：2321頁(1989年)、O-メチルホスホロアミジテ結合(Eckstein、*Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press)、並びにペプチド核酸主鎖及び結合(Egholm、*J. Am. Chem. Soc.* 114：1895(1992年)；Meierら、*Chem. Int. Ed. Engl.* 31巻：1008頁(1992年)；Nielsen、*Nature*、365巻：566頁(1993年)；Carlssonら、*Nature* 380：207(1996年)、これらは全て本明細書中、参照として含まれる)が挙げられる。他の類似体核酸としては、正の主鎖(positive backbone)をもつもの(Denpcyら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92：6097(1995年)；非イオン性主鎖(米国特許第5,386,023号、同第5,637,684号、同第5,602,240号、同第5,216,141号及び同第4,469,863号；Kiedrowskiら、*Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30：423(1991年)；Letsingerら、*J. Am. Chem. Soc.* 110：4470(1988年)；Letsingerら、*Nucleoside & Nucleotide* 13：1597(1994年)；第2章及び3章、ASC Symposium Series 580、"Carbohydrate Modifications in Antisense

40

50

Research", Ed. Y. S. Sanghui及びP. Dan Cook; Mesmaekerら、Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395(1994年); Jeffsら、J. Biomolecular NMR 34: 17(1994年); Tetrahedron Lett. 37: 743(1996年))並びに非-リボース主鎖(たとえば米国特許第5,235,033号及び同第5,034,506号、並びに第6及び7章、ASC Symposium Series 580、"Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui及びP. Dan Cook)が挙げられる。一つ以上の炭素環式糖(carbocyclic sugar)を含む核酸は、核酸の定義内にも含まれる(Jenkinsら、Chem. Soc. Rev. (1995年)169-176頁参照)。幾つかの核酸類似体はRawls、C & E News 1997年6月2日35頁に記載されている。これらの参考文献は全て、明白に参照として含まれる。リボース-ホスフェート主鎖の修飾は、標識などの追加の部分が付加しやすくするために、または生理学的環境中でそのような分子の安定性及び半減期を高めるために使用することができる。

10

## 【0147】

態様によっては、結合エレメントは小さい有機化合物(small organic compound)である。結合エレメントは、化学的に修飾し得る一連の基質から合成することができる。本明細書中で使用する「化学的に修飾された」とは、従来の化学反応並びに酵素反応を包含する。これらの基質は通常、これらに限定されないが、アルキル基(たとえばアルカン、アルケン、アルキン及びヘテロアルキル)、アリール基(たとえばアレーン及びヘテロアリール)、アルコール、エーテル、アミン、アルデヒド、ケトン、酸、エステル、アミド、環式化合物、複素環式化合物(プリン、ピリミジン、ベンゾジアゼピン、ベータ-ラクタム、テトラサイクリン、セファロsporin及び糖)、ステロイド(たとえばエストロゲン、アンドロゲン、コルチゾン、エクダイソン(ecodysone)など)、アルカロイド(たとえば麦角(ergot)、ビンカ(vinca)、クラレ(curare)、ピロリジン、及びマイトマイシン)、有機金属化合物、ヘテロ原子を保持する化合物、アミノ酸及びヌクレオシドが挙げられる。化学(酵素的を含む)反応を部分上で実施して、次いで本発明で使用し得る新しい基質または結合エレメントを形成することができる。

20

## 【0148】

態様によっては、結合エレメントは糖である。本明細書中で使用する糖なる用語は、一般式(CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>をもつ任意の化合物である。糖の例としては、二糖、三糖及びオリゴ糖、並びに、グリコーゲン、セルロース及びスターチなどの多糖類が挙げられる。

30

## 【0149】

態様によっては結合エレメントは脂質である。本明細書中で使用するように、脂質なる用語は、非極性有機溶媒に溶解性である任意の水に不溶性の有機分子を包含するものとする。脂質の例としては、ステロイド類、たとえばコレステロール、及びリン脂質、たとえばスフィンゴミエリンがある。

40

## 【0150】

活性化可能なエレメント、活性化可能なエレメントの活性化状態及び活性化レベルの測定法は、本明細書中、その内容が参照として含まれる、米国特許出願公開番号第20060073474号、表題 "Methods and compositions for detecting the activation state of multiple proteins in single cells" 及び米国特許出願公開番号第20050112700号、表題 "Methods and compositions for risk stratification" に記載されている。

## 【0151】

標識

本発明の方法及び組成物は、標識(label)、標識エレメント(labeling element)またはタグを含む結合エレメントを提供する。標識または標識エレメントとは、直接(すなわち、一次標識)または間接的に(すなわち二次標識)検出し得る分子を意味する。たとえば標識は、可視化及び/または測定することができるか、あるいはその存在または非存在がわかるように同定することができる。結合エレメント及び結合エレメント用の標識は、米国特許出願シリアル番号第/048,886号; 同第61/048,920号及び同第61/048,657号にみられる。

50

## 【0152】

化合物は、検出可能なシグナル、たとえば放射性同位体、フルオロフォア、酵素、抗体、粒子、たとえば磁性粒子、化学発光性分子、質量分析により検出可能な分子、または特異的な結合分子などを提供する標識に直接または間接的に結合(conjugate)することができる。特異的な結合分子としては、ペア、たとえばビオチンとストレプトアビジン、ジゴキシンとアンチジゴキシンなどが挙げられる。標識の例としては、光学蛍光性または色素生成染料、たとえば標識、標識酵素及び放射性同位体が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の態様によっては、これらの標識は結合エレメントに共役結合することができる。

## 【0153】

態様によっては、一つ以上の結合エレメントを特徴的に標識する。二つの活性化状態に特異的な抗体の例を使用して、「特徴的に標識する(uniquely labeled)」により、第一の活性化エレメントを認識する第一の活性化状態抗体は第一の標識を含み、第二の活性化エレメントを認識する第二の活性化状態抗体は第二の標識を含み、ここで、前記第一及び第二の標識は検出可能及び識別可能であるので、前記第一の抗体及び第二の抗体を特徴的に(uniquely)標識化できる。

## 【0154】

通常、標識は四つの種類：(a)同位体標識、これは放射性同位体または重質同位体であることができる；(b)磁性、電気、熱標識；(c)着色、光学標識、たとえば発光、リン及び蛍光染料または部分；並びに(d)結合パートナーに分けられる。標識は、酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼなど)及び磁性粒子も含むことができる。態様によっては、検出標識は一次標識(primary label)である。一次標識は、フルオロフォアなどの直接検出することができるものである。

## 【0155】

標識としては、蛍光染料または部分などの光学標識が挙げられる。フルオロフォアは、「小分子」フルオライト(fluor)または、タンパク性のフルオライト(たとえば緑色蛍光タンパク質及びそのすべての変異体)のいずれかであり得る。

## 【0156】

態様によっては、活性化部位特異性抗体は、Chattopadhyay、P.K.ら、「Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry」、Nat. Med. 12、972-977(2006年)に開示されているように、量子ドットで標識する。量子ドット標識は、Invitrogen、ホームページ<http://probes.invitrogen.com/products/qdot/>から市販されている。

## 【0157】

量子ドット標識化抗体は、単独で 사용할 ことができるか、有機蛍光色素 - 利用可能な標識の総数を増やすためにコンジュゲート抗体と組み合わせて使用することができる。標識化抗体の数が増加するにつれて、公知細胞集団の細分類(subtyping)能力も増加する。さらに、活性化状態-特異的抗体は、Erkki、J.らの「Lanthanide chelates as new fluorochrome labels for cytochemistry」、J. Histochemistry Cytochemistry、36：1449-1451頁、1988年、及び米国特許第7,018,850号、「Salicylamide-Lanthanide Complexes for Use as Luminescent Markers」に開示されているようにキレート化またはケージド(caged)ランタニドを使用して標識することができる。蛍光を検出する他の方法、たとえば量子ドット法(たとえば、本明細書中、それぞれ明白に参照として含まれる、Goldmanら、J. Am. Chem. Soc. (2002年)124巻：6378-82頁；Pathakら、J. Am. Chem. Soc. (2001年)123：4103-4頁；及びRemadeら、Proc. Natl. Sci. USA(2000年)18：553-8頁を参照されたい)並びに共焦点顕微鏡法も使用することができる。

## 【0158】

態様によっては、活性化可能エレメントは、TannerらのSpectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy、2007年3月；62(3)巻：188-195頁に開示されているように、誘導結合プラズマ質量分析装置(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer: ICP

10

20

30

40

50

-MS)に好適なタグを使用して標識される。

【0159】

あるいは、以下詳細に記載する、FRETをベースとする検出系を使用することができる。FRETは、本発明で、たとえば二つのFRET標識の近接性が活性化により変化するクラスタリングまたは多量体化(multimerization)を含む活性化状態の検出において利用法が見いだされる。態様によっては、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)対のメンバーである少なくとも二つの蛍光標識を使用する。

【0160】

本発明の方法及び組成物は、標識酵素を使用することもできる。標識酵素(label enzyme)とは、検出可能な産生物を産生する標識酵素基質の存在下で反応し得る酵素を意味する。本発明で使用するための好適な標識酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びグルコースオキシダーゼが挙げられるが、これらに限定されない。そのような基質の使用法は当技術分野でよく知られている。標識酵素の存在は、通常、識別可能な産生物を産生する標識酵素基質との反応の酵素的触媒作用により明らかになる。そのような産生物は、不透明で、たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼとテトラメチルベンゼジン(benzedine)との反応物があり、様々な色をもち得る。他の標識酵素基質、たとえばルミノール(Luminol)(Pierce Chemical Co.より入手可能)は、蛍光反応生成物を産生するように開発されている。標識酵素基質で標識酵素を識別する方法は当技術分野で公知であり、多くの市販キットが利用可能である。様々な標識酵素を使用する例及び方法は、本明細書中、それぞれ参照として全体が含まれるSavageら、Previews 247:6-9(1998年)、Young、J. Virol. Methods 24:227-236頁(1989年)に記載されている。

10

20

【0161】

放射性同位体とは、任意の放射性同位体分子を意味する。本発明で使用するのに好適な放射性同位体としては $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 及び $^{131}\text{I}$ が挙げられるが、これらに限定されない。標識として放射性同位体を使用するのは、当技術分野でよく知られている。

【0162】

すでに記載したように、標識は、間接的に検出することができる。すなわち、タグが結合対のパートナーである。「結合対のパートナー(partner of a binding pair)」とは、第一及び第二の部分の一方をさし、ここで前記第一及び第二の部分は互いに特異的結合親和性をもつ。本発明で使用するための好適な結合対としては、抗原/抗体(たとえば、ジゴキシゲニン/抗-ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル(DNP)/抗-DNP、ダンシル-X-抗-ダンシル、フルオレセイン/抗-フルオレセイン、ルシファーイエロー(lucifer yellow)/抗-ルシファーイエロー、及びローダミン抗-ローダミン)、ビオチン/アビジン(またはピチオン/ストレプトアビジン)及びカルモジュリン結合タンパク質(CBP)/カルモジュリンが挙げられるが、これらに限定されない。他の好適な結合対としては、ポリペプチド、たとえばFLAG-ペプチド[Hoppら、BioTechnology、6:1204-1210(1988年)]; KT3エピトープペプチド[Martinら、Science、255:192-194(1992年)]; チューブリンエピトープペプチド[Skinnerら、J. Biol. Chem.、266:15163-15166(1991年)]; 及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ[Lutz-Freyermuthら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87:6393-6397(1990年)]並びにそれぞれに対する抗体が挙げられる。当業者には理解されるように、結合対パートナーは、本明細書中に使用するように標識以外の適用で使用することができる。

30

40

【0163】

当業者には理解されるように、一つの結合対のパートナーは、別の結合対のパートナーでもあり得る。たとえば、抗原(第一の部分)は、第一の抗体(第二の部分)に結合することができ、これは順に第二の抗体(第三の部分)の抗原でありえる。そのような状況により、それぞれに対して結合対パートナーである仲介の第二の部分を介して第一の部分と第三の部分とを間接的に結合することができる。

【0164】

当業者には理解されるように、結合対のパートナーは、上記のように標識を含むことが

50

できる。このことにより、標識を含む結合パートナーの結合時にタグが間接的に標識化できることは理解されよう。今述べたように、結合対のパートナーであるタグに標識を結合することは、本明細書中、「間接標識化(indirect labeling)」という。

#### 【0165】

「表面基質結合分子(surface substrate binding molecule)」または「付着タグ(attachment tag)」及びその文法的等価物は、特異的な表面基質に対して結合親和性をもつ分子を意味し、この基質は通常、表面に適用される、含まれるまたは付着される結合対のメンバーである。好適な表面基質結合分子及びその表面基質としては、ポリ-ヒスチジン(poly-his)またはポリ-ヒスチジン-グリシン(poly-his-gly)タグ及びニッケル基質；グルタチオン-Sトランスフェラーゼタグ及びその抗体基質(Pierce Chemicalより入手可能)；flu HAタグポリペプチド及びその抗体12CA5基質[Fieldら、Mol. Cell. Biol.、8：2159-2165(1988年)]；c-mycタグ並びにこれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体基質[Evanら、Molecular and Cellular Biology、5：3610-3616(1985年)]；及び単純疱疹ウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体基質[Paborskyら、Protein Engineering、3(6)：547-553(1990年)]が挙げられるが、これらに限定されない。通常、本発明で有用な表面結合基質分子としては、ニッケル基質に結合するポリヒスチジン構造(His-tag)、抗体を含む表面基質に結合する抗原、アビジン基質に結合するハプテン(たとえばビオチン)、及びカルモジュリンを含む表面基質に結合するCBPが挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0166】

本発明で有用な別の活性化状態インジケータは、そのような活性化の結果を表示することにより活性化を検出できるものである。たとえば、基質のリン酸化を使用して、その基質のリン酸化に関与するキナーゼの活性化を検出することができる。同様に、基質の開裂は、そのような開裂に関与するプロテアーゼの活性化のインジケータとして使用することができる。結合エレメントに関して上記の標識及びタグなど、検出可能なシグナルへのそのようなインジケータの結合が可能な方法は、当技術分野で公知である。たとえば、基質の開裂により、クエンチング部分を除去することができ、それによって先にクエンチされた標識から検出可能なシグナルを産生することができる。

20

#### 【0167】

##### 検出

本発明の方法を実施する場合に、一つ以上の活性化可能エレメントの状態の検出は、人、たとえば研究室の技術者により実施することができる。あるいは、一つ以上の活性化可能エレメントの状態の検出は、自動システムを使用して実施することができる。いずれの場合でも、本発明の方法に従って使用するための一つ以上の活性化可能エレメントの状態の検出は、当技術分野で十分に確立された標準的な方法及びプロトコルに従って実施する。

30

#### 【0168】

一つ以上の活性化可能エレメントは、当該活性化可能エレメントの存在を検出及び/または定量する任意の方法により検出及び/または定量することができる。そのような方法としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫組織化学、共焦点顕微鏡法を任意に用いる免疫蛍光組織化学、逆相アッセイ、均一系酵素免疫測定法、及び関連する非酵素的方法、ウエスタンブロット、全細胞染色、免疫電子顕微鏡法、核酸増幅、遺伝子アレイ、タンパク質アレイ、質量分析、バッチクランプ、二次元ゲル電気泳動、ディファレンシャルディスプレイゲル電気泳動、マイクロスフィアベースの多重タンパク質アッセイ(multiplex protein assay)、無標識細胞アッセイ及びフローサイトメトリーなどが挙げられる。米国特許第4,568,649号は、シンチレーションカウンティングを使用するリガンド検出システムを記載する。これらの方法は、修飾タンパク質パラメーターに特に有用である。タンパク質及び他の細胞決定因子(determinant)の細胞読み取りは、蛍光または、他のタグ付けレポーター分子を使用して得ることができる。フローサイトメトリー法は、細胞内パラメーターを測定するのに有用である。代表的な方

40

50

法については、上記特許及び特許出願を参照されたい。

【0169】

態様によっては、本発明は、単一細胞についての活性化可能エレメントの活性化プロフィールを測定する方法を提供する。この方法は、少なくとも二つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとしてフローサイトメトリーにより細胞を分析することを含み得る。結合エレメント(たとえば活性化状態-特異的抗体)を使用して、活性化可能エレメント活性化レベルをベースとして細胞を分析し、以下に記載のように検出することができる。あるいは、上記の非結合エレメントシステムを本発明で記載の任意のシステムに使用することができる。

【0170】

細胞のシグナル伝達状態の検出は、結合エレメント及び標識を使用して実施することができる。細胞のシグナル伝達状態は、当技術分野で公知の種々の方法により検出することができる。これらは通常、結合エレメント、たとえば抗体、及び標識、たとえば検出エレメントを形成するための蛍光色素を含む。検出エレメントは、上記作用因子(agent)の両方を必要とはしないが、両方の性質をもつ一つのユニットであり得る。これら及び他の方法は、本明細書中、そのすべてが参照として含まれる、米国特許第7,381,535号及び同第7,393,656号並びに米国特許出願シリアル番号第10/193,462号；同第11/655,785号；同第11/655,789号；同第11/655,821号；同第11/338,957号；同第61/048,886号；同第61/048,920号；及び同第61/048,657号に十分に記載されている。

【0171】

本発明の一態様において、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24を超え、若しくは48以下、またはそれ以上の時間、細胞を抗体及び標識と接触させることにより、シグナル対ノイズ比を高めることは有利である。

【0172】

本発明の方法及び組成物で蛍光標識成分を使用するとき、様々な種類の蛍光モニタリングシステム、たとえばサイトメトリー測定装置システムを本発明の実施に使用し得ると考えられる。態様によっては、フローサイトメトリーシステムは、ハイスループットスクリーニング、たとえば96ウェルまたはそれ以上のマイクロタイタープレート専用のシステムで使用される。蛍光材料上でアッセイを実施する方法は当技術分野で公知であり、たとえば、以下の文献に記載されている：Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press(1983年)；Herman, B., Resonance energy transfer microscopy in: Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture、Part B, Methods in Cell Biology, vol. 30, Taylor, D. L. & Wang, Y.-L. 編、San Diego: Academic Press(1989年)、219-243頁；Turro, N. J., Modern Molecular Photochemistry, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. (1978年)、296-361頁。

【0173】

サンプル中の蛍光は、蛍光光度計を使用して測定することができる。通常、第一の波長をもつ励起源からの励起波長は励起光学機械(excitation optic)を通過する。励起光学機械により、励起放射がサンプルを励起させる。それに応じて、サンプル中の蛍光タンパク質が、励起波長とは異なる波長をもつ放射線を放出する。次いで収集光学機械(collection optic)が、サンプルからの放出を集める。装置としては、走査している間にサンプルを特定の温度に保持するための温度制御器を含むことができる。一態様に従って、多軸トランスレーションステージ(multi-axis translation stage)は、暴露されるべき様々なウェルを配置するために、複数のサンプルを保持するマイクロタイタープレートを動かす。多軸トランスレーションステージ、温度制御器、自動焦点機能、並びに画像及びデータ収集電子機器は、好適にプログラムしたデジタルコンピューターにより管理することができる。コンピューターはまた、アッセイの間に集めたデータを、表示用の別のフォーマットに変換することもできる。通常、公知のロボットシステム及びコンポーネントを使用することができる。

10

20

30

40

50

## 【0174】

蛍光を検出する他の方法も使用することができる。たとえば、量子ドット法(たとえば、本明細書中それぞれ明白に参照として含まれる、Goldmanら、J. Am. Chem. Soc. (2002年)124:6378-82頁; Pathakら、J. Am. Chem. Soc. (2001年)123:4103-4頁; 及びRemadeら、Proc. Natl. Sci. USA(2000年)18:553-8頁を参照されたい)並びに共焦点顕微鏡法がある。通常、フローサイトメトリーは、個々の細胞がレーザービームの進路を通ることを含む。細胞についての、任意の蛍光分子または細胞内に知見される任意の蛍光分子の励起及びビーム散乱により、光電子増倍管チューブにより検出して、読み取り可能な出力、たとえばサイズ、粒度、または蛍光強度を作成する。

## 【0175】

本発明の方法の検出、分類または単離段階は、蛍光標示細胞分取(fluorescence-activated cell sorting: FACS)法を伴ってもよく、ここでFACSを使用して特定の表面マーカを含む集団から細胞を選択できるか、または選択段階は、標的細胞捕捉及び/またはバックグラウンド除去のための回復可能な支持体として磁氣的に応答性粒子の使用を伴ってもよい。様々なFACSシステムが当技術分野で公知であり、本発明の方法で使用することができる(本明細書中、それぞれが明白に参照として含まれる、たとえばPCT国際特許出願国際公開第WO99/54494号、1999年4月16日出願; 米国特許出願シリアル番号第20010006787号、2001年7月5日出願を参照されたい)。

## 【0176】

態様によっては、FACSセルソーター(たとえば、FACSVantage(商標)セルソーター、Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, カリフォルニア)を使用して、モジュレーターに応答する活性化可能エレメント中の活性化レベルの上昇の存在下または非存在下で、その活性化プロフィール(ポジティブ細胞)に基づいた細胞を選別(sort)し、収集する。市販の他のフローサイトメーターとしては、いずれもBecton Dickinson製のLSR II及びCanto IIが挙げられる。フローサイトメーターに関する追加の情報に関しては、Shapiro, Howard M., Practical Flow Cytometry, 第4版、John Wiley & Sons, Inc., 2003年を参照されたい。

## 【0177】

態様によっては、細胞を最初に、特異的活性化可能エレメントの特異的活性化状態に向けられた蛍光標識化活性化状態-特異的結合エレメント(たとえば抗体)と接触させる。そのような態様において、それぞれの細胞上で結合している結合エレメントの量は、細胞を含む小滴を、セルソーター内を通過させることにより測定することができる。ポジティブ細胞を含む小滴に電磁電荷を与えることにより、細胞を他の細胞から分離することができる。次いでポジティブに選択した細胞は無菌の収集容器に集めることができる。これらの細胞選別手順の詳細は、例えば、本明細書中、その全体が参照として含まれる、FACSVantage(商標)、訓練用マニュアル、特にセクション3-11から3-28及び10-1から10-17に記載されている。検出システムに関して参照され、含まれる特許、特許出願及び文献を参照されたい。

## 【0178】

ダウノルピシン及びエンザスタウリンなどの蛍光化合物は、その広範囲な蛍光発光スペクトルのため、フローサイトメトリーベースの生物学的アッセイでは扱いにくい。これらの化合物は、パラホルムアルデヒドのような試薬で固定した後、細胞中にトラップして、フローサイトメーター上に知見される一つ以上のレーザーにより励起する。これらの化合物の蛍光発光は、多重PMT検出器で検出されることが多く、これが多重パラメーター・フローサイトメトリーでの使用を複雑にしている。この問題を避ける方法は、関連する生物学的マーカを測定するのに使用するPMT検出器からの化合物の蛍光発光を代償する(compensate)ことである。これは、蛍光化合物の発光最大付近にバンドパスフィルターのついたPMT検出器と、コンペンセーションマトリックスを計算するときコンペンセーション対照(コントロール: control)として化合物と共に培養した細胞とを使用して実施する。蛍光化合物と共に培養した細胞は、パラホルムアルデヒドで固定され、次いで100%メタノ

10

20

30

40

50

ールで洗浄され、透過処理される。メタノールを洗浄し、細胞を標識化していない固定/パーム化(permed)細胞と混合して、蛍光性及びネガティブ細胞集団との混合物からなるコンペンセーション対照をつくる。

#### 【0179】

別の態様では、ポジティブ細胞を、活性化可能エレメントのアイソフォームの存在をベースとして細胞の磁気分離(magnetic separation)を使用して選別することができる。そのような分離法では、ポジティブに選択すべき細胞を最初に特異的な結合エレメント(たとえば、活性化可能エレメントのアイソフォームと結合する抗体または試薬)と接触させる。次いで細胞を、特異的な結合エレメントと結合する試薬と結合する回収可能な(retrievable)粒子(たとえば、磁気応答性粒子)と接触させる。細胞結合エレメント-粒子複合体を次いで、たとえば磁場を使用して、ノン-ポジティブ細胞または標識化していない細胞から物理的に分離することができる。磁気応答性粒子を使用する場合、ポジティブ細胞または標識化細胞は、磁場を使用して容器内に保持することができるが、ネガティブ細胞は除去される。これら及び同様の分離手順は、例えば、本明細書中、その全体が参照として含まれる、Baxter Immunotherapy Isolex訓練用マニュアルに記載されている。

10

#### 【0180】

態様によっては、単一細胞の受容体エレメント活性化状態プロフィールの測定法を提供する。この方法は、細胞の集団を提供し、フローサイトメトリーにより細胞の集団を分析することを含む。好ましくは、細胞を少なくとも二つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして分析する。態様によっては、複数の活性化可能エレメントの活性化状態抗体を使用して、複数のエレメントの活性化レベルを同時に測定する。

20

#### 【0181】

態様によっては、少なくとも二つのエレメントの活性化レベルをベースとしたフローサイトメトリーによる細胞分析は、表面マーカーの存在、粒度及び細胞サイズなどの他のフローサイトメトリー読み取り可能な出力の決定と組み合わせ、複数のエレメントの活性化レベルと、単一細胞のフローサイトメトリーにより測定可能な他の細胞の性質との間の相関関係を提供する。

#### 【0182】

理解されるように、本発明は、シグナル変換におけるエレメントクラスタリング事象の順位付けを提供する。特に、本発明により、当業者は、単一細胞内の多様なエレメントのクラスタリングと活性化レベルとの相関関係をベースとして、エレメントクラスタリング及び活性化階層(activation hierarchy)を構築することができる。順序付けは、単一の時間点での細胞若しくは細胞集団の活性化レベルと対照とを比較することにより、または他の細胞から生じる亜集団を観察するために多数の時間点において細胞を比較することにより実施できる。

30

#### 【0183】

本発明は、細胞集団内に細胞サブセットの存在を測定する有益な方法を提供する。理想的には、細胞間でのシグナル伝達の分散(バリエーション:variance)が、シグナル変換事象及びその中での変化を定性的にも定量的にも確実に遮蔽(mask)しないように、シグナル変換経路を同種の細胞集団で評価する。究極の同種系は単一細胞であるので、本発明により細胞の個々の評価が可能になり、真の違いを有意な方法で特定できる。

40

#### 【0184】

従って、本発明は、より大きな細胞集団内で細胞サブセットを区別する方法を提供する。本明細書中に概説したように、これらの細胞サブセットは、集団内の別のサブセットと比較して、変化した生物学的特徴(たとえば活性化レベル、モジュレーターに対する変化した応答)を示すことが多い。たとえば、本明細書中で概説したように、本発明の方法により、一次(primary)細胞集団、たとえば末梢血単核細胞から、他のサブセットと比較して変化した応答(たとえば症状の存在に関連した応答)を示す細胞のサブセットを識別できる。さらに、この種の評価は、様々な活性化状態、モジュレーターに対する変化した応答、細胞系統、細胞分化状態等の間を区別する。

50

## 【0185】

理解されるように、これらの方法は、末梢血単核細胞またはナイーブ及びメモリーリンパ球などの複雑な細胞集団における人工的な症状及び刺激条件の両方に関する異なるシグナル伝達カスケードの識別法を提供する。

## 【0186】

必要により、細胞はコラゲナーゼ、ディスパーゼなどの好適なプロテアーゼを使用して酵素消化法により、単一細胞懸濁液に分散させる。分散または懸濁に好適な溶液を使用する。そのような溶液は通常、低濃度、通常5~25mMの許容可能な緩衝液と組み合わせて、ウシ胎児血清または他の天然に存在する因子を好都合に補った平衡塩類溶液、たとえば生理食塩水、PBS、ハンクス液などである。好都合な緩衝液としては、HEPES1リン酸塩緩衝液、乳酸塩緩衝液などがある。細胞は3%パラホルムアルデヒドで固定することができ、当業者に公知のように、及び本明細書に記載の方法に従って、通常、氷冷メタノール；0.1%サポニン、3%BSAを含むHEPES-緩衝PBSで透過処理し、アセトン中 - 200 で2分間カバ

10

## 【0187】

態様によっては、一つ以上の細胞が96ウェルプレートまたは他の市販のマルチウェルプレートに含まれる。別の態様では、反応混合物または細胞はサイトメトリー測定装置内にある。本発明で有用な他のマルチウェルプレートとしては、384ウェルプレート及び1536ウェルプレートが挙げられるが、これらに限定されない。本発明で有用な反応混合物または細胞を含む他の容器は当業者には明らかであろう。

20

## 【0188】

活性化可能エレメントの活性化レベル若しくは活性、またはそのような活性化レベル若しくは活性化の変形を検出するためのアッセイの成分添加は、アッセイする活性に好適な条件下で、連続して、または所定の様式でまたは組分け(grouping)することができる。そのような条件は、本明細書中に記載されているか、当業者に公知である。さらに、詳細なガイダンスを以下に提供する(実施例などを参照されたい)。

## 【0189】

態様によっては、活性化可能エレメントの活性化レベルは、誘導プラズマ質量分析装置(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer: ICP-MS)を使用して測定する。特異的エレメントで標識した結合エレメントは活性化可能物に結合する。細胞をICPに導入すると、アトマイズされ、イオン化される。活性化可能エレメントに結合された標識化結合エレメントを含む細胞の元素組成が測定される。結合エレメント上の標識に対応するシグナルの存在及び強度は、その細胞上の活性化可能エレメントのレベルを表示する(Tannerら、Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy、2007年3月；62(3)：188-195頁)。

30

## 【0190】

当業者には理解されるように、本発明の方法及び組成物は、フローサイトメトリー分析法に加えて様々な他のアッセイフォーマットにおける使用法を知見する。たとえば、DNAマイクロアレイは、様々な供給源(Affymetrix、Santa Clara、CA)から市販されているか、これらは知られているアレイヤー(arrayer)(Perkin Elmer)を使用して研究室でカスタムできる。さらにプロテインチップ及び合成法は公知である。これらの方法及び材料は、あらかじめ考えられたアレイでチップに活性化状態結合エレメントを張り付ける目的に適用することができる。態様によっては、そのようなチップは複数のエレメント活性化状態結合エレメントを含み、細胞表面に存在するエレメントに関してエレメント活性化状態プロフィールを測定するのに使用される。

40

## 【0191】

態様によっては、チップはこの場合、通常標識化されていない複数の「第二セットの結合エレメント」を含む。そのようなチップはサンプル、好ましくは細胞抽出物と接触され、エレメント活性化状態特異的結合エレメントを含む複数の第二の結合エレメントをサンドイッチアッセイで使用して、サンプル中の複数の活性化エレメントの存在を同時に測定

50

する。好ましくは、複数の活性化状態-特異的結合エレメントはそれぞれ、検出し易くするために特徴的に(uniquely)標識化される。

【0192】

態様によっては、共焦点顕微鏡法を使用して、個々の細胞の活性化プロフィールを検出することができる。共焦点顕微鏡法は、空間的にろ過した(spatially-filtered)個々の検査サンプルの点から光を連続して集めることに依存し、次いでこれを電子的に処理して検査サンプルの拡大像とする。共焦点顕微鏡法に含まれるシグナル処理は、単一細胞内で標識化結合エレメントを検出する追加の能力を持っているので、この態様において、細胞は一つ以上の結合エレメントで標識化することができる。態様によっては、共焦点顕微鏡法に関連して使用される結合エレメントは蛍光標識にコンジュゲートした抗体であるが、他のタンパク質または核酸などの他の結合エレメントも可能である。

10

【0193】

態様によっては、本発明の方法及び組成物は、「イン-セル・ウエスタンアッセイ(In-Cell Western Assay)」と併せて使用することができる。そのようなアッセイにおいて、細胞は、最初に標準的な組織培養法を使用して標準的な組織培養フラスコで成長させる。最適密度まで成長したら、成長培地を除去し、細胞を洗浄し、トリプシン処理する。次いで細胞を計数し、好適な数の細胞を移動するのに十分な容積をマイクロウェルプレート(たとえば、Nunc(商標)96マイクロウェル(商標)プレート)にアリコートをとる。次いで個々のウェルを完全培地で最適密度まで培養すると、培地を無血清培地と取り換える。この時点で対照はそのままにしておき、実験ウェルは、モジュレーター、たとえばEGFと培養する。モジュレーターと培養後、細胞を固定して、調査する活性化エレメントに対する標識化抗体で染色する。細胞を標識化したら、プレートは、本明細書中、その全体が参照として含まれる「the Odyssey Operator's Manual、バージョン1.2」に記載の技術に従って、オデッセイ・イメージャー(Odyssey Imager ; LiCor, Lincoln Nebr)などのイメージャーを使用してスキャンすることができる。マルチウェルプレートのスキャンから得られたデータは、以下に記載のように分析し、活性化プロフィールを測定することができる。

20

【0194】

態様によっては、検出は高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、たとえば逆相HPLCにより行い、さらなる側面では検出は質量分析法による。

30

【0195】

フローサイトメトリーまたはキャピラリー電気泳動のフォーマットは、磁気及び他のビーズ、粒子、細胞並びに生物を個別に捕捉するのに使用することができる。

【0196】

柔軟なハードウェア及びソフトウェアにより、多くの用途に装置を適応させることができる。ソフトウェアプログラムモジュールにより、方法の作成、修正及び運転ができる。このシステム診断モジュールにより、装置の配置、正しい接続及びモーター運転が可能になる。カスタマイズした用具、実験器具、粒子、細胞及び生物移動パターン(organism transfer pattern)により、様々な適用を実施することができる。データベースにより方法及びパラメーターを保存することができる。ロボット及びコンピューターインターフェースにより、装置間のコミュニケーションが可能になる。

40

【0197】

態様によっては、本発明の方法は液体を取り扱う構成要素の使用を包含する。液体取扱いシステムは、任意の数の構成要素を含むロボットシステムを含むことができる。さらに、本明細書に概説した任意またはすべての段階は自動化することができる。よって、たとえば、システムは完全または一部自動化することができる。米国特許出願シリアル番号第61/048,657号を参照されたい。

【0198】

当業者には理解されるように、一つ以上のロボットアーム；マイクロプレートの位置を定めるためのプレートハンドラー；非二次汚染プレート(non-cross contamination pla

50

te)上のウェルの蓋を外したり取り替えたりするための蓋またはキャップの自動化ハンドラー；使い捨てチップでサンプルを分配させるためのチップアセンブリ；サンプルを分配するための洗浄可能なチップアセンブリ；96ウェル充填ブロック；冷却試薬ラック；マイクロタイタープレートピペット位置(場合により冷却される)；プレート及びチップ用のスタッキングタワー；及びコンピューターシステムを含む、広範な構成要素を使用することができるが、これらに限定されない。

【0199】

完全自動化(robotic)またはマイクロ流体システムとしては、スクリーニングアプリケーションの全段階を実施するために、ハイスループットピペティングを含む、自動化液体-、粒子-、細胞-及び生物操作が挙げられる。これには、液体、粒子、細胞、及び生物操作、たとえば吸引、分配、混合、希釈、洗浄、正確な容積移動；ピペットチップの回収及び廃棄；並びに単一サンプルを吸引したのから複数回送達するために同一容積を繰り返しピペティングすることが挙げられる。これらの操作は、二次汚染のない液体、粒子、細胞及び生物の移動である。この装置は、マイクロプレートサンプルをフィルター、膜、及び/またはドータープレート(daughter plate)への自動複製、高密度移動、フルプレート段階希釈、及び高性能操作(high capacity operation)を実施する。

10

【0200】

態様によっては、化学的に誘導体化された粒子、プレート、カートリッジ、試験管、磁性粒子、またはアッセイ成分に対する特異性をもつ他の固相マトリックスを使用する。マイクロプレート、試験管または任意の固相マトリックスの結合表面としては、非極性表面、高い極性をもつ表面、共役結合を促進するための修飾デキストランコーティング、抗体コーティング、融合タンパク質若しくはペプチドを結合するための親和性媒体、組み換えタンパク質A若しくはGなどの表面固定タンパク質、ヌクレオチド樹脂若しくはコーティング、及び他の親和性マトリックスが挙げられ、本発明で有用である。

20

【0201】

態様によっては、マルチウェルプレート、マルチチューブ、ホルダー、カートリッジ、ミニチューブ、ディープウェルプレート、微量遠心管、凍結バイアル(cryovial)、スクエアウェルプレート、フィルター、チップ、光ファイバー、ビーズ、及び他の固相マトリックス、または様々な容量をもつプラットフォームは、容量追加用にアップグレード可能なモジュラープラットフォームに適合する。このモジュラープラットフォームとしては、可変速オービタルシェーカー、並びにソースサンプル、サンプル及び試薬希釈用のマルチポジション・ワークデスク、アッセイプレート、サンプル及び試薬リザーバ、ピペットチップ、及びアクティブウォッシュ・ステーションが挙げられる。態様によっては、本発明の方法は、プレートリーダーの使用も含む。

30

【0202】

態様によっては、サーモサイクラー(thermocycler)及び温度調節システムを制御ブロックまたはプラットフォームなどの熱交換の温度を安定させるために使用して、サンプルを0 ~100 で正確に温度制御して培養する。

【0203】

態様によっては、一つまたは複数の磁気プローブ、アフィニティープローブのついた交換可能なピペットヘッド(一つ若しくはマルチチャネル)、またはピペッターで、液体、粒子、細胞及び生物をロボット制御して操作する。マルチウェルまたはマルチチューブ磁気分離器またはプラットフォームは、単一または多サンプルフォーマットで液体、粒子、細胞、及び生物を操作する。

40

【0204】

態様によっては、器具類は検出器を含み、これは、標識及びアッセイに依存して広範な種類の検出器でありえる。態様によっては、有用な検出器としては、マルチチャンネル蛍光(単数または複数種類の)顕微鏡；一波長及び二波長エンドポイント並びに運動能力に関する蛍光、紫外線及び可視分光光度検出、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、発光、消光、二光子励起、及び強度再分配を提供するためのプレートリーダー；データ及びイメージを

50

捕捉し、定量化可能なフォーマットに転換するためのCCDカメラ；並びにコンピュータワークステーションが挙げられる。

【0205】

態様によっては、ロボット装置としては、バスを通してメモリーと入力/出力装置のセット(たとえばキーボード、マウス、モニター、プリンターなど)とコミュニケーションする中央処理ユニットが挙げられる。以下に概説するように、本発明の多重化装置用のCPUに加えて、及びこれに代わることができる。中央処理ユニット、メモリー、入力/出力装置、及びバスの間の一般的な相互作用は当技術分野で公知である。従って、実施すべき実験に依存して、様々な手順をCPUメモリーに保存することができる。

【0206】

これらのロボットによる流体取扱いシステムは、任意の数の様々な試薬、たとえば緩衝液、試薬、サンプル、洗浄液、アッセイ成分、たとえば標識プローブを使用することができる。

【0207】

ゲーティング及び分析

本発明の態様によっては、モジュレーターとの処置後、混合集団のサンプル中の特異的な細胞集団(たとえば芽細胞のみ)を分析するために様々なゲーティングストラテジー(gating strategy)を使用することができる。これらのゲーティングストラテジーは、それぞれの細胞型で発現された一つ以上の特異的な表面マーカーの存在をベースとすることができる。態様によっては、第一のゲートにより細胞ダブルット(doublet)を排除して、ユーザーがシングレット(singlet)を分析できるようにする。以下のゲーティングは、死細胞と生細胞とを識別し、続いて生細胞をゲーティングしてこれらを例えば骨髓芽細胞(myeloid blast)、単球、及びリンパ球に分類することができる。二次元等高線図表現、二次元ドットプロット表現(two-dimensional dot plot representation)及び/またはヒストグラムを使用することにより、たとえば非ゲーティングサンプル、骨髓芽細胞、単球、顆粒球、リンパ球、及び/または他の細胞型における活性化可能エレメント上のG-CSFなどの潜在的なモジュレーターの作用を研究するために、明確に比較することができる。たとえば、Stat5及びStat3リン酸化の二次元等高線図表現(Jakキナーゼの下流細胞内読み取り)(X及びY軸)を使用することにより、被験者サンプル内の様々な細胞集団中におけるJak/Statシグナル伝達経路のモジュレーターの効果を研究するために比較することができる。G-CSFなどのモジュレーターに応答するStat3及びStat5の両方におけるリン酸化における変化及び基底リン酸化レベルを比較することができる。G-CSFは、Stat3及びStat5リン酸化の両方における増加を媒介し、このシグナル伝達は、同時に(p-Stat3及びp-Stat5の両方における増加をもつ亜集団)または個別に(p-Stat3またはpStat5どちらかの単独における増加をもつ亜集団)発生することができる。ゲーティングの好都合な点は、複雑なヒトサンプルにおける芽細胞などの特異的な亜集団(sub-population)における様々な活性化可能エレメント作用のさらに明確な像及びより詳細な結果が得られるということである。

【0208】

態様によっては、本発明は、細胞の集団において一つ以上の経路を特徴付けすることにより、症状の分類、診断、テラノーシス、予後判定及び/または症状を処置するための治療薬を投与後の治療効果を予測する方法を提供する。一つ以上の経路の特徴付けは、細胞集団を一つ以上のモジュレーターに暴露し、前記細胞集団中の少なくとも一つの細胞の活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することにより実施することができる。データは種々の測定基準を使用して分析することができる。測定基準の例としては、

(1)非刺激(unstimulated)の蛍光色素-抗体染色サンプルと、刺激剤で処理も染色もされていないサンプルとの間のメジアン蛍光値の対数の差を測定すること( $\log(\text{MFI}(\text{非刺激染色})) - \log(\text{MFI}(\text{ゲート化非染色}))$ ) ;

(2)刺激蛍光色素-抗体染色サンプルと、刺激剤で処理も染色もされていないサンプルとの間のメジアン蛍光値の対数の差を測定すること( $\log(\text{MFI}(\text{刺激染色})) - \log(\text{MFI}(\text{ゲート化非染色}))$ ) ;

10

20

30

40

50

(3) 刺激化蛍光色素-抗体染色サンプルと、非刺激化蛍光色素-抗体染色サンプルとの間の変化を測定すること、 $\log(\text{MFI}(\text{刺激染色})) - \log(\text{MFI}(\text{非刺激染色}))$ 、「メジアン蛍光色素強度における倍率変化(fold change in median fluorescence intensity)」ともいう

；  
(4) 一つ以上の単位次元で複数の集団を測定する等高線図の4ゲート(Quadrant Gate)中の細胞の割合を測定すること；

(5) バックグラウンドより上のポジティブの割合を得るために蛍光体ポジティブである集団のMFIを測定すること；及び

(6) 大標本集団及び亜集団分析用に多様式及び拡張測定基準を使用することが挙げられる。他の可能な測定基準としては、第三色分析(third-color analysis)(3Dプロット)；様々なマーカーのポジティブ及び相対的発現；年齢、人種、細胞遺伝学的状態、突然変異状態、芽細胞の割合(blast percentage)、CD34+の割合、再発の回数、生存などが挙げられるが、これらに限定されない様々なパラメータに関する個々の患者ベースの臨床分析が挙げられる。別の態様では、データを分析する他の方法、たとえば第三色分析(3Dプロット)があり、これはCytobank 2Dと似ているが、色に第三のDを加える。別の態様では、ユーザーは表面マーカーを基にして亜集団中のシグナル伝達を分析することができる。たとえばユーザーは、CD34+CD38-またはCD34+CD33-発現細胞により「幹細胞集団」；またはFlt3の受容体の発現をベースとして同定した(単数または複数種類の)ドラッグトランスポートポジティブ細胞、またはCD33、CD45、HLA-DR、CD11bをベースとした複数の白血病性サブクローンを見て、それぞれの亜集団におけるシグナル伝達を分析することができる。別の態様では、ユーザーは、転写因子若しくは他の細胞内タンパク質などの細胞内マーカーをベースとして、機能アッセイをベースとして、または他の蛍光マーカーをベースとしてデータを分析することができる。

#### 【0209】

フローサイトメトリーを使用する態様によっては、データ分析前に、当該集団及びこれらの集団を特徴付けする方法を決定する。たとえば、データ分析用に集団を同定する少なくとも二つの一般的な方法がある。一つは、(i)「個々のサンプルまたはサブセット(試験中の被験者)についてのパラメーターセットの「アウトサイド-イン(outside-in)比較」である。このより一般的な場合では、当該標的に対して同種であるとみなされる異なるセットを作り出すような方法で、細胞集団を同種または系統でゲーティングする。サンプルレベルでの比較の例は、患者の免疫細胞のシグナル伝達プロファイルの同定及び、これらのプロファイルと臨床反応の非ランダム分散との相関関係であろう。これはアウトサイド-インアプローチとみなされている。というのも、当該集団は、そのプロファイルを他の集団にマッピングし、比較する前に事前に定義されているためである。二つ目は、(ii)異種集団中の個々の細胞のレベルにおけるパラメーターの「インサイド-アウト(inside-out)」比較である。この一つの例としては、特定の条件下における混合造血細胞のシグナル伝達状態マッピングであり、続いてコンピューター的に同定した細胞クラスターを系統特異的マーカーと比較することである。これは、分類前に特異的集団の存在を推定していないので、単一細胞研究へのインサイド-アウト研究と考えることができるだろう。このアプローチの考えうる欠点は、少なくとも初期に、複数の一時的なマーカーを列挙しなければならないかもしれない、及び単一細胞表面エピトープと決してアクセス可能でないかもしれない集団を作るという点である。結果として、そのような集団の生物学的意義は判別しにくい。この慣例に従わないアプローチの一つの好都合な点は、系統または細胞型の間に潜在的に偶発的な差を引き出すことなく、細胞集団を偏りなく追跡することである。

#### 【0210】

これらの方法はそれぞれ、単一細胞レベルで大量の多重パラメーターを送達するフローサイトメトリーの能力を利用する。ある症状(たとえば自己免疫疾患)に関連した細胞に関しては、データの第三の「メタ-レベル(meta-level)」が存在する。というのも、症状に関連する細胞(たとえば免疫細胞)は、通常、単一の実体として処理され、従来法に従って分類されるからである。これらの方法は、臓器若しくは原発組織、分化の程度、増殖指数

10

20

30

40

50

、転移拡散、及び被験者に関する遺伝的若しくは代謝データを含んでいた。

【0211】

態様によっては、本発明は、コンディションシグナル伝達スペースをマッピングするためのバリエーションマッピング(variance mapping)法を使用する。これらの方法は、推定上正常な対照と独立して症状を比較することができるので、これにより症状の生物学的研究に有意な発達を示す。従来の示差状態分析法(differential state analysis method)(たとえば、DNAマイクロアレイ、減算的ノーザンブロッティング)は通常、正常な対照、一般的に隣接し、理論的に形質転換されていない組織(theoretically untransformed tissue)と、それぞれの患者サンプル由来の症状に関連する細胞との比較に依存する。あるいは、これらは、複数のクラスタリング及び群への再クラスタリング、そして表現型に従って患者サンプルをさらに階層化することに依存する。対照的に、症状状態のバリエーションマッピングでは、最初に症状のサンプルとそれ自体とを、次いで親症状集団とを比較する。その結果、症状の中で最も多様性をもつ活性化状態が、示差状態分析法におけるコパラメーターを提供する。多様な一連の症状の場合、この方法により、研究者は、症状と提案された正常な対照との間の差に対して、示差病態病理学の基礎をなす分子事象(たとえば、治療薬に対する自己免疫疾患応答)を識別することができる。

10

【0212】

態様によっては、バリエーションマッピングを使用して患者サンプルのシグナル伝達スペースをプロフィール分析するとき、モジュレーターに対するシグナル伝達応答が同じようである症状は、組織または元の細胞タイプにかかわらず、一緒にグループ分けされる。同様に、システムマーカーまたは原発組織に基づいて比較的類似すると考えられる二つの症状は、環境刺激を解釈するための多様な能力を持ちえ、二つの異なる群にプロフィール分析されるだろう。

20

【0213】

シグナル伝達プロフィール分析の群を同定したとき、臨床応答、遺伝子変異の存在及びタンパク質発現レベルなどの他の因子が、群の中で無確率的に分散しているかどうかを決定するのが有用であることが多い。実験または文献がアレイ化フローサイトメトリー実験においてそのような仮説を示唆する場合、スチューデントt-検定及び $\chi^2$ 検定などの単純な統計的検定で判断することができる。同様に、実験の中で二つの変動要因が関連していると考えられる場合、直線回帰による $r^2$ 相関係数を使用してこの関係の程度を表す。

30

【0214】

活性化可能エレメントの分析例は、本明細書中、その内容が参照として含まれる、米国特許出願公開第20060073474号、タイトル「Methods and compositions for detecting the activation state of multiple proteins in single cells」及び米国特許出願公開第20050112700号、タイトル「Methods and compositions for risk stratification」に記載されている。

【0215】

フローサイトメトリーの進歩により、最高13個の連立パラメーター(simultaneous parameter)を個々の細胞に列挙することができ(De Rosaら、2001年)、ゲノム及びプロテオミクスデータ・サブセットの研究に移行している(Krutzik及びNolan、2003; Perez及びNolan、2002年)。同様に他の技術(たとえばマイクロアレイ)における進歩により、多重活性化可能エレメントの同定が可能である。パラメーター、エピトープ及びサンプル数が増加するにつれ、実験の複雑さ及びデータ分析の課題が急速に増大してきた。刺激パネルの開発により付加層(additional layer)のデータの複雑性が加わり、これにより実験条件のセットが増える中で活性化可能エレメントの研究が可能になる。Krutzikら、Nature Chemical Biology、2008年2月を参照されたい。多重パラメーターの分析法は当技術分野で公知である。ゲーティング分析に関しては、米国特許出願シリアル番号第61/079,579号を参照されたい。

40

【0216】

フローサイトメトリーを使用する態様によっては、フローサイトメトリー実験を実施し

50

、結果は、これらに限定されないが、評価し易くするためにヒートマップまたはヒストグラムなどのグラフィカルツール及び分析を使用して倍率変化として表す。あるセットのフローサイトメトリサンプルにおける変化を比較する一つの一般的な方法は、一つのパラメーターのヒストグラムを同一プロット上に重ね合わせることである。フローサイトメトリ実験は理想的には、実験サンプルを比較する参照サンプルを含む。参照サンプルは、正常及び/または症状に関連する細胞を含むことができる。視覚化ツールに関しては、米国特許出願シリアル番号第61/079,537号を参照されたい。

#### 【0217】

患者は、様々な測定基準を使用して臨床上の問題を知らせるノード(node)をベースとして階層化される。応答なし(No Response : NR)対完全応答(Complete Response : CR)の患者の間で患者を階層化するためには、統計的有意性(たとえばp-値若しくは曲線より下の面積)またはその生物学的関連性に従って、ノードの優先順位付けをすることができる。態様によっては、階層化は、コーナー分類子(corners classifier)を使用することにより達成される。この分類子は、p変数を使用することができるアルゴリズムであり、ここでX1、Xpはシグナル伝達ノード値における活性化レベル及び倍率変化である。N人の患者を二つのクラス、クラス0及びクラス1に階層化することは、二つのクラス間の境界線を定義するX変数の空間に領域Rを定義することにより達成される。この分類子を使用する主な目的は、それぞれの被験者がサイズn0及びn1の正確に一つのクラス、たとえば活動性疾患若しくは十分にコントロールされた疾患に分類されること、及びこの二つのクラスがp変数の一つ以上によって空間において隔てられることである。コーナー分類子は、二つの独立したサンプルが同一確率分布である場合、X変数における順位情報だけを使用して試験することにより、マン-ホイットニー-ウィルコクソン(Mann-Whitney-Wilcoxin)検定と類似性をもつ。態様によっては、閾値は一つの変数に対して設定され、クラス0及びクラス1の被験者は閾値の反対側に分類されると考えられる。複数の変数を組み合わせることにより、クラス1からクラス0を表すX-次元の空間が作成される。

#### 【0218】

##### ノード

態様によっては、ノードは、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予想で使用される。本明細書中で使用するように、「ノード(node)」なる用語は、活性化可能エレメントの活性化レベルを測定するために使用されるモジュレーター及び分子について記載する。たとえば、ノードは[活性化可能エレメント、モジュレーター]に関して表すことができる。態様によっては、ノードは、マーカー及び/または細胞型データ、たとえば[活性化可能エレメント、モジュレーター、細胞型]も包含することができる。さらなる態様では、ノードは、たとえば[測定された応答、基底、細胞型]などのモジュレーターの非存在下、細胞型で測定された活性化可能エレメントの基底レベルについて記載することができる。本明細書中で記載された態様の幾つかにおいて、ノードは、活性化可能エレメントに関連した状態特異的エピトープに結合するモジュレーター及び標識化抗体を含む。本明細書中で使用する「ノード状態データ(node state data)」とは、一つ以上の細胞中の活性化可能エレメントの応答を測定するために使用される分子のシグナルに相当する定量データ(すなわち、「ノード状態」、「活性化レベル」)をさす。ノード状態データは、生のシグナルデータの任意の特徴を定量化する生シグナルデータまたは測定基準(「ノード状態測定基準(node state metrics)」)であり得る。ノード状態測定基準は、他の細胞から産生されたシグナルデータに対する相対値として生シグナルデータを表現することができる(たとえばモジュレーターで処理していない細胞)。ノードは、活性化可能エレメントとモジュレーターとの任意の組み合わせでありえる。ノードは、活性化エレメント、モジュレーターと細胞型の任意の組み合わせでもありえ、ここで細胞型は先行する方法のいずれかにより決定され、一つ以上のマーカーに関して表現することができる。

#### 【0219】

自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス及び/または治療効果の予測に有

用なノードとしては、自己免疫疾患の活性レベルにおける、存在、非存在、段階、サブタイプ、活性化レベル、薬剤反応性、進行、及び/または変化に対する所定の相関関係をもつ任意のものが挙げられる。相関関係は、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を超えるか、またはそれより高くてもよい。ノードは単独または組み合わせて使用することができる。ノードの組み合わせとしては、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上のノードの任意の組み合わせが挙げられる。態様によっては、ノードの組み合わせにより、自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノシス、及び/または治療効果の予測での有用性を改善する。態様によっては、ノードの組み合わせは、組み合わせた個々のノードよりも、自己免疫疾患の活性化レベルにおける存在、非存在、段階、サブタイプ、活性化レベル、薬剤反応性、進行、及び/または変化に対し高い相関関係をもつ。ノードの組み合わせの相関関係は、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を超えるか、またはそれより高くてもよい。相関関係は、活性または不活性状態の一つ以上の活性化可能エレメントのレベルを含むことができる。相関関係としては、活性と不活性アイソフォームの両方を組み合わせる、活性化可能エレメントの全タンパク質レベルも含みえる。

10

#### 【0220】

自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノシス、及び/または治療効果の予測で有用なノードの例としては、[Stat3、IL4、B細胞]、[Stat1、IL10、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat3、IL6、B細胞]、[Stat3、IL4、B細胞]、[Stat1、IFN $\gamma$ 、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat1、IL6、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat6、IL15、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat3、IFN $\gamma$ 、B細胞]、[Stat5、IFN $\gamma$ 、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat5、IFN $\gamma$ 、B細胞]、[Stat5、IL21、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat1、IFN $\gamma$ 、CD4-CD45RA-細胞]、[Stat6、IFN $\gamma$ 、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat6、IL6、CD4+CD45RA+細胞]、[Stat1、IL10、単球]、[Stat5、IL10、単球]、[Stat3、IFN $\gamma$ 、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat6、IL10、B細胞]、[Stat1、基底、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat6、基底、B細胞]、[CD69、基底、CD19+B細胞]、[Stat5、IL21、制御性T細胞]、[Stat1、IL6、CD4+T細胞]、[Lck、TCR共役抗体、CD8+T細胞]、[p38、基底、メモリー及びエフェクターCD4+T細胞]、[Lck、全タンパク質、CD8+T細胞]、[Stat5、IL15、CD4+T細胞]、[PLC $\gamma$ 2、基底、CD4+T細胞]、[PLC $\gamma$ 2、TCR共役抗体、CD4+T細胞]、[Stat3、基底、B細胞]、[PLC $\gamma$ 2、基底、CD8+T細胞]、[Stat3、IFN $\gamma$ 、CD4+メモリー及びエフェクターT細胞]、[Stat3、IL10、CD8+メモリー及びエフェクターT細胞]、[Stat3、IL10、単球]、[Stat3、IFN $\gamma$ 、制御性T細胞]、[Lck、TCR共役抗体、CD4+メモリー/エフェクターT細胞]、[Stat5、IL2、CD4+メモリー及びエフェクターT細胞]、[Stat1、IL6、CD4+CD45RA+細胞]、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

#### 【0221】

##### 方法

本発明の態様は、たとえば関節リウマチ及びSLEを診断、予測または疾患処置の治療決定を提供するために使用することができる。本発明の一つの側面は、免疫細胞とモジュレーターと接触させるか、またはモジュレーターと接触させない；細胞内の一つ以上の活性化可能エレメントの活性化状態を測定する；及び前記活性化状態をベースとして細胞を分類する、各段階を含む。

40

#### 【0222】

態様によっては、本発明は、新薬の開発につながるような標的(new druggable target)の疾患処置、予測及び同定法のための、分析、薬剤スクリーニング、診断、予後判定用の方法及び組成物、並びにキットに関する。

#### 【0223】

態様によっては、本発明は実験データを分析する方法も含む。態様によっては、サンプル(たとえば臨床サンプル)に存在する細胞の生理学的状態を、たとえば上記薬剤の幾つかを使用して治療するための症状の診断若しくは予後判定、患者の選択において使用して、処置をモニターする、治療計画を変更する、さらに薬剤の一つ若しくは組み合わせとして投与しえる治療薬の選択を最適化する、及び新薬の開発につながるような標的を同定する

50

。したがって、一連の治療の前及び、その治療にわたる様々な時に得られたデータに従って、治療計画を個別調整し、逃えることができ、これによって各人に合った計画を提供する。態様によっては、化合物を細胞と接触させて、化合物に対する応答を分析する。

#### 【0224】

態様によっては、本発明は、自己免疫症状をもつか、その疑いのある個体から誘導したサンプルを分類するための方法に関する。本発明により、症状の予後判定的及び治療的に関連するサブグループを同定すること並びに、個体の臨床経過を予測することができる。本発明の方法は、これらに限定されないが、リスクグループを帰属する方法、再発の高い危険性を予測する方法、疾患活動性(disease activity)(たとえばフレア)増加の高まる危険性を予測する方法、二次的合併症を発症する高まる危険性を予測する方法、個体の治療を選択する方法、個体の治療に対する応答の期間を予測する方法、個体における治療効能を測定する方法、及び個体の予後判定を測定する方法を含む、自己免疫性状態に悩む個人の処置で有用なツールを提供する。本発明は、自己免疫状態の経過、たとえば個体が高い疾患活動性または低い疾患活動性をもつかどうかを予測するための予後判定インジケータとして機能しえる方法を提供する。別の態様では、本発明は処置、予後判定または予測などを含む、情報を実行に移すことができるように、患者の臨床管理の助けになるように情報を医師に提供する。

10

#### 【0225】

態様によっては、本発明は、被験者の様々な個別の免疫細胞集団を分析することにより、被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する方法を提供する。態様によっては、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予測は、被験者由来の第一の個別の免疫細胞集団と少なくとも第一のモジュレーターと接触させるか、またはモジュレーターと接触させない、被験者由来の第二の個別の免疫細胞集団由来の第二の免疫細胞と少なくとも第二のモジュレーターと接触させるか、またはモジュレーターと接触させない、前記第一の免疫細胞及び第二の免疫細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する、前記活性化可能エレメントの測定済み活性化レベルを含む被験者の応答パネルを作成する、及び被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス及び/または治療効果を予測することに関して決定する、ここで前記決定は前記応答パネルをベースとする、各段階を含む方法により決定する。態様によっては、活性化可能エレメント、免疫細胞型及びモジュレーターの組み合わせは、表1、2、3及び4に列記した活性化可能エレメント、免疫細胞型及びモジュレーターの組み合わせから選択される。

20

30

#### 【0226】

一つ以上のモジュレーターを用いた処置の際に細胞における活性化可能エレメントの活性化により、症状の経過を予測する、リスクグループを同定する、二次的な合併症を発症する高まる危険性を予測する、個体の治療を選択する、個体に関して治療の応答を予測する、個体において治療の効能を測定する、及び個体に関して予後判定を測定するためのインジケータなどとして使用しえる、症状における実施可能な経路(operative pathway)を明らかにすることができる。態様によっては、本発明は、単一の免疫細胞及び/または複数の様々な個別の免疫細胞集団における複数の経路を特徴付けする方法に関する。代表的な経路としては、JAK/STAT MAPK及びPI3K-Akt経路が挙げられる。態様によっては、経路の特徴付けは、個体の症状の進行を診断、予後判定または決定することと相関している。態様によっては、経路の特徴付けは、個体における処置に対する応答を予測することまたは処置を選択することと相関している。態様によっては、経路の特徴付けは、新薬の開発につながるような標的を発見することと相関している。

40

#### 【0227】

態様によっては、本発明は、個別の培地で細胞集団を複数のモジュレーターに暴露する、個別の培地それぞれからの細胞集団中の活性化可能エレメントの活性化レベルにおける増加の存在または非存在を測定する、及び個別の培地それぞれからの活性化可能エレメン

50

トの活性化における増加の存在または非存在をベースとして細胞集団を分類することにより、細胞集団の表現型プロフィールを測定する方法に関する。態様によっては、複数の活性化可能エレメントの活性化レベルにおける増加の存在または非存在を測定する。態様によっては、活性化可能エレメントはそれぞれ特定の経路に属し、活性化可能エレメントの活性化レベルを使用して特定の経路をそれぞれ特徴付けする。態様によっては、複数の経路は、個別の培地で細胞集団を複数のモジュレーターに暴露する、個別の培地のそれぞれからの細胞集団中の複数の活性化可能エレメントの活性化レベルにおける増加の存在または非存在を測定する、ここで前記活性化可能エレメントは特徴付けされる経路内にある、及び前記複数の経路の特徴付けをベースとして細胞集団を分類することにより、特徴付けされる。態様によっては、複数の活性化可能エレメントは、様々な個別の免疫細胞集団で分析される。

#### 【0228】

態様によっては、本発明は、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予測法を提供し、ここで前記方法は、

(a)被験者由来の第一細胞集団由来の第一の細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(b)前記個体由来の第二細胞集団由来の第二の細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(c)前記第一の細胞及び前記第二の細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む。態様によっては、本方法はさらに、活性化可能エレメントの所定の活性化レベルを含む、被験者の応答パネルを作ることを含む。態様によっては、第一細胞集団及び第二細胞集団は免疫細胞である。態様によっては、本方法はさらに、被験者由来の第三細胞集団由来の第三細胞と、(i)少なくとも第二のモジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；及び前記第三細胞における少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定することを含む。態様によっては、第一及び/または第二モジュレーターはサイトカインである。態様によっては、第一及び/または第二モジュレーターはSTAT経路モジュレーターである。

#### 【0229】

態様によっては、本発明は、被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する方法を提供し、前記方法は、

(a)被験者由来のB細胞集団由来のB細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(b)前記個体由来のT細胞集団由来のT細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(c)前記B細胞及び前記T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む。態様によっては、前記B細胞はモジュレーターがない存在と接触させる。態様によっては、B細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントは、CD69、Stat3、Lck、p-Lck、pZap70/Syk、p13K、Stat5、及びホスホ-Stat3からなる群から選択される。態様によっては、前記T細胞はナイーブCD4 T細胞である。態様によっては、ナイーブCD4 T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントはp-Stat1であり、前記ナイーブCD4 T細胞をIL6と接触させる。

#### 【0230】

態様によっては、本方法はさらに、被験者由来のCD8 T細胞集団由来のCD8 T細胞と、

10

20

30

40

50

(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；及び前記CD8<sup>+</sup>T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する、各段階を含む。態様によっては、前記CD8<sup>+</sup>T細胞は、メモリー/エフェクターT細胞である。態様によっては、少なくとも一つの活性化可能エレメントはp-Lckであり、CD8メモリー/エフェクターT細胞をT細胞受容体刺激と接触させる。態様によっては、前記T細胞は制御性T細胞である。態様によっては、少なくとも一つの活性化可能エレメントはp-Stat5であり、制御性T細胞をIL-21と接触させる。

【0231】

態様によっては、本発明は、被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する方法を提供し、ここで前記方法は、

(a)被験者由来のCD4<sup>+</sup>T細胞集団由来のCD4<sup>+</sup>T細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；  
 (b)前記個体由来のCD8<sup>+</sup>T細胞集団由来のCD8<sup>+</sup>T細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；  
 (c)前記CD4<sup>+</sup>T細胞及び前記CD8<sup>+</sup>T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(c)前記少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測する、各段階を含む。態様によっては前記CD4<sup>+</sup>T細胞及び/またはCD8<sup>+</sup>T細胞中の少なくとも一つの活性化可能エレメントは、p-p38、Lck、p-Lck、p-Stat5、及びPLC 2からなる群から選択される。

【0232】

態様によっては、本発明は、自己免疫疾患における疾患反応性を分類する方法であって、

(a)(i)少なくとも一つのモジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在に応答して、複数の免疫細胞集団において一つ以上の細胞における少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(b)一つ以上の細胞における少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、疾患活動性を分類する、各段階を含む、前記方法を提供する。態様によっては、前記疾患は関節リウマチであり、前記少なくとも一つの活性化可能エレメントは、CD 69、p-Stat5、p-Stat1、p-Lck、p-p38、Lck、p-Stat1、p-Stat3、p-p38、PLC 2、及びp-PLC 2からなる群からなる群から選択される。態様によっては、活性化可能エレメント、免疫細胞型及びモジュレーターの組み合わせは、表1、2、3及び4に列記されている、活性化可能エレメント、免疫細胞型、およびモジュレーターの組み合わせから選択される。態様によっては、前記疾患は、全身性エリトマトーデスであり、複数の免疫細胞集団はT細胞集団及びB細胞集団である。

【0233】

態様によっては、p-Stat3の活性化レベルは、IFN $\gamma$  に応答するナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞集団で測定され、p-Stat6の活性化は、モジュレーターがない存在に応答してB細胞集団で測定され、p-Stat6の活性化の活性化レベルは、IL-10に応答してB細胞集団で測定される。

【0234】

態様によっては、p-Stat3の活性化レベルは、IFN $\gamma$  に応答してナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞集団で測定され、p-Stat1の活性化の活性化レベルは、モジュレーターがない存在に応答してナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞集団で測定され、P-Stat1の活性化の活性化レベルはIL-6に応答してナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞集団で測定される。

【0235】

態様によっては、本発明は、個体における自己免疫疾患に関して、診断、予後判定、進行を測定、処置に対する応答を予測、または処置を選択する方法を提供し、前記方法は、(1)前記個体における関節リウマチまたは全身性エリトマトーデスに関連する一つ以上の免疫細胞を、(a)モジュレーターの存在下若しくはモジュレーターの非存在下で、少なく

とも三つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；(b)前記活性化可能エレメントの前記活性化レベルをベースとして一つ以上の免疫細胞を分類する、各段階を含む方法により分類する；及び

(2)前記一つ以上の免疫細胞の前記分類をベースとして、前記個体における関節リウマチまたは全身性エリトマトーデスに関する診断、予後判定、進行、処置に対する応答または処置の選択の決定を実施する、各段階を含む。態様によっては、活性化可能エレメントの少なくとも一つは、STAT経路由来の活性化可能エレメントである。態様によっては、活性化可能エレメントの少なくとも一つはサイトカイン経路由来の活性化可能エレメントである。

#### 【0236】

態様によっては、本発明は、疾患活動性を分類する(categorize)方法であって、

(a)免疫細胞において少なくとも三つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；

(b)前記活性化可能エレメントの前記活性化レベルをベースとして前記一つ以上の免疫細胞を分類する；及び

(c)前記免疫細胞の分類をベースとして、前記疾患活動性を分類する、各段階を含む前記方法を提供する。態様によっては、疾患は関節リウマチであり、少なくとも三つの活性化可能エレメントの一つ以上は、CD69、p-Stat5、p-Stat1、p-Lck、p-p38、Lck、p-Stat1、p-Stat3、p-p38、PLC 2、p-PLC 2からなる群から選択される。態様によっては、疾患は全身性エリトマトーデスであり、少なくとも三つの活性化可能エレメントの一つ以上は、Stat1、Stat3、Stat5、及びStat6からなる群から選択され、モジュレーターは、IL4、IL6、IL10、IL15、IFN $\gamma$ 、及びIFN $\alpha$ からなる群から選択される。

#### 【0237】

態様によっては、本発明は、関節リウマチに罹患している被験者の治療に対する反応性を予測する方法であって、

(a)被験者由来のB細胞集団由来のB細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(b)被験者由来のCD8<sup>+</sup>T細胞集団由来のCD8<sup>+</sup>T細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(c)前記B細胞及びCD8<sup>+</sup>T細胞における少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(d)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、被験者の治療に対する反応性を予測する、各段階を含む前記方法を提供する。態様によっては、CD69、Stat3、Lck、p-Lck、pZap70/Syk、p13K、Stat5、及びホスホ-Stat3からなる群から選択される活性化可能エレメントの活性化レベルは、B細胞で測定される。態様によっては、Lck、及びp-PLC 2からなる群から選択される活性化可能エレメントの活性化レベルは、CD8<sup>+</sup>T細胞で測定される。態様によっては、前記処置はオレンシアである。

#### 【0238】

態様によっては、本発明は、全身性エリトマトーデスに罹患した被験者における疾患活動性における変化を予測する方法であって、

(a)被験者由来のCD8<sup>+</sup>T細胞集団由来のナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(b)被験者由来のB細胞集団由来のB細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(c)前記B細胞及びナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞における少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルを測定する；及び

(d)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、被験者における疾患活動性における変化を予測する、各段階を含む、前記方法を提供する。態様によっては、p-Stat3の活性化レベルは、IL4、IL6、及びIFN $\gamma$ からなる群から選択されるモジュレーターに応答してB細胞で測定される。態様によっては、p-Stat5の活性化レベルは、

10

20

30

40

50

IFN に応答してB細胞で測定される。態様によっては、p-Stat6の活性化レベルはIL10、またはモジュレーターがない存在に応答してB細胞で測定される。態様によっては、p-Stat1の活性化レベルは、IL-10、IFN、及びIL-6からなる群から選択されるモジュレーターに応答してナイーブCD8 T細胞で測定される。態様によっては、p-Stat6の活性化レベルは、IL-15、及びIFN からなる群から選択されるモジュレーターに応答して、ナイーブCD8 T細胞で測定される。態様によっては、p-Stat5の活性化レベルは、IL-21に応答してナイーブCD8 T細胞で測定される。

#### 【0239】

態様によっては、活性化可能エレメント及び/またはノードは、表1、2、3または4に列記された活性化可能エレメント、モジュレーター及び細胞型から選択される。態様によっては、活性化可能エレメント、モジュレーター及び細胞型の組み合わせは、表1に列記されたものから選択される。態様によっては、活性化可能エレメント、モジュレーター及び細胞型の組み合わせは、表2に列記されたものから選択される。態様によっては、処置はオレンシアであり、活性化可能エレメント、モジュレーター及び細胞型の組み合わせは表3に列記したものから選択される。態様によっては、処置はプレドニゾンであり、活性化可能エレメント、モジュレーター及び細胞型の組み合わせは表4に列記したものから選択される。

#### 【0240】

態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対する応答を予測する方法を提供し、ここで前記陽性的中率(positive predictive value: PPV)は、60、70、80、90、95、または99.9%より高い。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対する応答を予測する方法を提供し、ここで前記PPVは70%以上である。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対する応答を予測する方法を提供し、ここで前記PPVは85%以上である。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対する応答を予測する方法を提供し、ここで前記PPVは95%以上である。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対する応答を予測する方法を提供し、ここで前記陰性的中率(negative predictive value: NPV)は、60、70、80、90、95、または99.9%より高い。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対する応答を予測する方法を提供し、ここで前記NPVは70%より高い。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対する応答を予測する方法を提供し、ここで前記NPVは85%より高い。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対する応答を予測する方法を提供し、ここで前記NPVは95%より高い。

#### 【0241】

態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対して診断、予後判定、進行を測定または応答を予測する方法を提供し、ここで前記AUC値は0.5、0.6、0.7、0.8または0.9より高い。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対して診断、予後判定、進行を測定または応答を予測する方法を提供し、ここで前記AUC値は0.7より高い。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対して診断、予後判定、進行を測定または応答を予測する方法を提供し、ここで前記AUC値は0.8より高い。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患の処置に対して診断、予後判定、進行を測定または応答を予測する方法を提供し、ここで前記AUC値は0.9より高い。

#### 【0242】

態様によっては、本発明は追加の発現マーカーと組み合わせ、細胞中の活性化可能エレメントの活性化レベルにおける増加の存在または非存在を測定することにより、細胞を分類する方法に関する。態様によっては、本明細書中で記載する発現マーカー、たとえばCD3、CD4、CD19、Foxp3、CD25、CD33、CD45RA、CD69、及びリンタンパク質pStat1(pY701)、pStat3(pY705)、pStat5(pY694)、pLck(pY505)、及びpZap70(pY319)/pSyk(pY352)、ホスホ-PLC 2、他などを、レスポnder( responder)及び非レスポnderの分類にも使用することができる。発現マーカーは、多種多様な方法を使用して、たとえばフローサイトメトリデータ(上記参照の文献及び特許出願を参照されたい)由来のノードを使用して検出することができる。他の一般的な方法は発現アレイ(Affymetrix、Santa Clara、CAより市

10

20

30

40

50

販)、taqman(ABI、Foster City、CAより市販)、SAGE(Genzyme、Cambridge、MAより市販)、配列決定法(Helicos、454、US Genomics、Pacific Bio、Ion Torrent、及びLife Technologiesからの市販品を参照されたい)並びに他の一般的に公知のアッセイを使用する。Golubら、Science 286巻:531-537頁(1999年)を参照されたい。発現マーカーは、細胞が機能的アポトーシス(functional apoptosis)の影響を受けているかどうかを知るために非刺激化細胞で測定される。これにより、疾患の処置及び予後判定に関する関係(implications)が提供される。この仮説の元で、薬物トランスポーターの量は、患者の応答と関連し、非レスポナーは、レスポナー(responder)と比較して(薬剤を細胞外へ移動させるための)薬物トランスポーターのレベルがより高いかもしれない。

#### 【0243】

態様によっては、本発明は細胞集団と、成長因子、マイトジェン及びサイトカインからなる群から選択される受容体により媒介されるシグナル伝達に影響を与える少なくとも一つのモジュレーターとを接触させることにより、細胞集団を分類する方法に関する。態様によっては、本発明は、細胞集団と、SDF-1、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-6、IL-27、G-CSF、FLT-3L、IGF-1、M-CSF、SCF、PMA、及びタブシガルギンからなる群から選択される受容体により媒介されるシグナル伝達に作用する少なくとも一つのモジュレーターとを接触させる；細胞中の複数の活性化可能エレメントの活性化状態を測定する；並びに前記活性化状態及び発現レベルをベースとして細胞を分類することにより、細胞集団を分類する方法に関する。態様によっては、また細胞集団は、細胞の成長を遅延させたり停止させたり及び/または細胞のアポトーシスを誘導する少なくとも一つのモジュレーターに別の培地中で暴露される。

#### 【0244】

態様によっては、細胞集団は免疫シグナル伝達を妨げる少なくとも一つのモジュレーターにも暴露される。態様によっては、免疫シグナル伝達を妨げるモジュレーターは、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、ステロイド系の薬、及び免疫疾患-修飾剤(immune disease-modifying agent)からなる群から選択される。

#### 【0245】

NSAIDとしては、これらに限定されないが、イブプロフェン(Advil(登録商標)、Motrin(登録商標)、Nuprin(登録商標))及びナプロキセン(Alleve(登録商標))が挙げられ、他の多くのもの、たとえばメロキシカム(Mobic(登録商標))、エトドラク(Lodine(登録商標))、ナブメトン(Relafen(登録商標))、スリンダク(Clinoril(登録商標))、トレメンチン(Tolactin(登録商標))、コリンマグネシウムサリチル酸(Trilasate(登録商標))、ジクロフェナク(Cataflam(登録商標)、Voltaren(登録商標)、Arthrotec(登録商標))、ジフルシナル(Dolobid(登録商標))、インドメタシン(Indocin(登録商標))、ケトプロフェン(Orudis(登録商標))、Oruvail(登録商標))、オキサプロジン(Daypro(登録商標))、及びピロキシカム(Feldene(登録商標))などが処方箋により利用可能である。NSAIDとしては、炎症を制御するのにも効果的であるCOX-2阻害剤としても公知の薬剤が挙げられる。COX-2阻害剤としては、セレコキシブ、セレブレックス(Celebrex)(登録商標)；エトリコキシブ、アルコキシア(Arcoxia)(登録商標)；及びルミラコキシブ、プレキシジェ(Prexige)(登録商標)が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0246】

ステロイド薬剤としては、プレドニゾン、及びピスホスホネート、たとえばアレンドロネート(Fosamax(登録商標))、リセドロネート(Actonel(登録商標))、及びイバンドロネート(Boniva(登録商標))が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0247】

免疫性疾患-修飾剤としては、メトトレキセート(Rheumatrex(登録商標))、Trexall(登録商標)、ヒドロキシクロロキン(Plaquenil(登録商標))、スルファサラジン(Azulfidine(登録商標))、レフルノミド(Arava(登録商標))が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0248】

エタネルセプト(Enbrel(登録商標))、アダリムマブ(Humira(登録商標))、及びインフリ

10

20

30

40

50

キシマブ(Remicade(登録商標))、アパタセプト(Orencia(登録商標))、リツキシマブ(Rituxan(登録商標))、アナキンラ(Kineret(登録商標))、アザチオプリン(Imuran(登録商標))、シクロホスファミド、及びシクロスポリンA(Neoral(登録商標)、Sandimmune(登録商標))。

【0249】

本発明の別の態様はさらに、モジュレーターIL-3、IL-4、GM-CSF、EPO、LPS、TNF- $\alpha$ 、及びCD40Lを使用することを包含する。態様によっては、細胞集団は免疫細胞集団である。

【0250】

態様によっては、症状に関連した細胞または細胞の組み合わせ以外の細胞を、たとえばリスクグループを識別する、増加した疾患活動性の増加したリスクを予測する、二次合併症を発症する増加したリスクを予測する、個体に関して治療法を選択する、個体に関して治療に対する応答を予測する、個体における治療の効果を測定する、及び/または個体の予後判定をする際に、使用する。すなわち症状に関連する細胞以外の細胞は、実際には症状のプロセスを反映している。

【0251】

態様によっては、本発明は、単一細胞レベルで自己免疫疾患における様々な因子に対するリタンパク質応答をモニターするための多重パラメーター・フローサイトメトリーを実施する方法を提供する。これらと相互作用するシグナル伝達カスケードのリン脂質メンバー、キナーゼ及びホスファターゼは、細胞内で増殖シグナルを開始し、制御するのに必要である。タンパク質リン酸化単独の基底レベルとは別に、これらのネットワーク経路における重要な薬剤分子の効果を研究して、特徴的な自己免疫疾患ネットワークプロフィールを見分け、このプロフィールは遺伝子及び疾患の治療効果と相関する。リン-タンパク質応答の単一細胞測定により、リン-タンパク質ネットワークのシグナル伝達ポテンシャルにおけるシフトが明らかになり、シグナル伝達の多次元分子プロフィールにより細胞ネットワーク表現型の分類が可能になる。米国特許第7,393,656号を参照されたい。Irishら、Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. Cell. 2004年、118巻、1-20頁も参照されたい。

【0252】

フローサイトメトリーは、10,000個もの比較的小さいサンプルサイズから臨床設定で有用であり、有意量の統計的に扱い易い多次元シグナル伝達データを産生することができるので、表現型に關与する重要な細胞サブセットを明らかにすることができる。米国特許第7,381,535号及び同第7,393,656号を参照されたい。Krutzikら、2004年も参照されたい。

【0253】

従って、態様によっては、本発明は、個体における自己免疫性疾患の診断、予後判定、進行の測定、処置に対する応答の予測または処置の選択法を提供し、前記方法は以下の段階を含む。態様によっては、本発明は、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/又は治療効果の予測法を提供し、前記方法は、

(a)被験者由来の第一細胞集団由来の第一の細胞と、(i)少なくとも第一モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(b)個体由来の第二細胞集団由来の第二細胞と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない存在とを接触させる；

(c)前記第一細胞と第二細胞における少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをフローサイトメトリーを使用して測定する；及び

(c)少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをベースとして、前記被験者における自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予測をする、各段階を含む。態様によっては、前記第一細胞集団及び第二細胞集団は免疫細胞である。態様によっては、本方法はさらに、被験者由来の第三細胞集団と、(i)少なくとも第二モジュレーター若しくはそのフラグメント、または(ii)モジュレーターがない

存在とを接触させる、及び前記第三細胞における少なくとも一つの活性化可能エレメントの活性化レベルをフローサイトメトリーにより測定することを含む。

【0254】

キット

態様によっては、本発明は、被験者における自己免疫疾患の分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果の予測用のキットを提供する。態様によっては、本発明は、自己免疫疾患を処置するための治療薬を投与後に、被験者において自己免疫疾患を分類、診断、予後判定、テラノーシス、及び/または治療効果を予測するためのキットを提供する。態様によっては、本キットは、シグナル伝達分子用の一つ以上のモジュレーター、阻害剤、特異的結合エレメントを含み、一つ以上の治療薬をさらに含み得る。本キットはさらに、細胞状態及びその生理学的状態のデータ分析用のソフトウェアパッケージを含むことができ、これはテストプロフィールとの比較及び、上記の他の分析との比較用の参照プロフィールを含むことができる。本キットはさらに、上記用途のいずれかで使用するための使用説明書も含むことができる。

10

【0255】

本発明により提供されるキットは、リン-特異的抗体などの本明細書中で記載の一つ以上の状態-特異的結合エレメントを含みえる。キットは、本発明で有用な他の試薬、たとえばモジュレーター、定着剤(fixative)、容器、プレート、緩衝液、治療薬、使用説明書などを含むことができる。

20

【0256】

態様によっては、本キットは、動的状態変化、タンパク質修飾、リン酸化、メチル化、アセチル化、ユビキチン化、SUMO化(SUMOylation)または活性化可能エレメントの切断を認識する一つ以上の抗体を含む。本発明のキットにより提供される抗体及び他の結合エレメントにより識別される活性化可能エレメントの例としては、これらに限定されないが、以下のものが挙げられる：タンパク質、キナーゼ、HER受容体、PDGF受容体、FLT3受容体、Kit受容体、FGF受容体、Eph受容体、Trk受容体、IGF受容体、インスリン受容体、Met受容体、Ret、VEGF受容体、TIE1、TIE2、エリスロポエチン受容体、トロンプオエチン受容体、CD114、CD116、FAK、Jak1、Jak2、Jak3、Tyk2、Src、Lyn、Fyn、Lck、Fgr、Yes、Csk、Abl、Btk、ZAP70、Syk、IRAK、cRaf、ARaf、BRAF、Mos、Limキナーゼ、ILK、Tpl、ALK、TGF受容体、BMP受容体、MEKK、ASK、MLK、DLK、PAK、Mek1、Mek2、MKK3/6、MKK4/7、ASK1、Cot、NIK、Bub、Myt1、Weel、カゼインキナーゼ、PDK1、SGK1、SGK2、SGK3、Akt1、Akt2、Akt3、p90Rsk、p70S6キナーゼ、Prk、PKC、PKA、ROCK1、ROCK2、オーロラ(Aurora)、CaMK、MNK、AMPK、MELK、MARK、Chk1、Chk2、LKB-1、MAPKAPK、Pim1、Pim2、Pim3、IKK、Cdk、Jnk、Erk、IKK、GSK3、GSK3、Cdk、CLK、PKR、PI3-キナーゼクラス1、クラス2、クラス3、mTor、SAPK/JNK1,2,3、p38、PKR、DNA-PK、ATM、ATR、ホスファターゼ、受容体タンパク質チロシンホスファターゼ(RPTP)、LARホスファターゼ、CD45、非受容体チロシンホスファターゼ(NPRTP)、SHP、MAPキナーゼホスファターゼ(MKP)、二重特異性ホスファターゼ(DUSP)、CDC25ホスファターゼ、低分子量チロシンホスファターゼ、アイズアブセント(Eyes absent : EYA)チロシンホスファターゼ、スリングショット・ホスファターゼ(SSH)、セリンホスファターゼ、PP2A、PP2B、PP2C、PP1、PPS、イノシトールホスファターゼ、PTEN、SHIP、ミオチューブラリン、脂質シグナル伝達性(lipid signaling)、ホスホイノシチドキナーゼ、ホスホリパーゼ、プロスタグランジンシンターゼ、5-リボキシゲナーゼ、スフィンゴシンキナーゼ、スフィンゴミエリナーゼ、アダプター/骨格タンパク質、Shc、Grb2、BLNK、LAT、PI3-キナーゼ用のB細胞アダプター(BCAP)、SLAP、Dok、KSR、MyD88、Crk、CrkL、GAD、Nck、Grb2関連バインダー(GAB)、Fas関連デスドメイン(FADD)、TRADD、TRAF2、RIP、T-細胞白血病ファミリー、サイトカイン、IL-2、IL-4、IL-8、IL-6、インターフェロン、インターフェロン、サイトカイン調節剤、サイトカインシグナル伝達サプレッサー(SOC)、ユビキチン化酵素、Cbl、SCFユビキチン化リパーゼ複合体、APC/C、接着分子、インテグリン、免疫グロブリン様接着分子、セレクチン、カドヘリン、カテニン、焦点接着キナーゼ(focal adhesion kinase)、p130CAS、細胞骨格/

30

40

50

収縮性タンパク質、ホドリン、アクチン、パキシリン、ミオシン、ミオシン結合タンパク質、チューブリン、eg5/KSP、CENP、ヘテロ三量体Gタンパク質、 $\alpha$ -アドレナリン受容体、ムスカリン受容体、アデニルシクラーゼ受容体、低分子量GTPase、H-Ras、K-Ras、N-Ras、Ran、Rac、Rho、Cdc42、Arf、RAB、RHEB、グアニンヌクレオチド交換因子、Vav、Tiam、Sos、Dbl、PRK、TSC1,2、GTPase活性化タンパク質、Ras-GAP、Arf-GAP、Rho-GAP、カスパーゼ、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、アポトーシスに関するタンパク質、Bcl-2、Mcl-1、Bcl-XL、Bcl-w、Bcl-B、A1、Bax、Bak、Bok、Bik、Bad、Bid、Bim、Bmf、Hrk、Noxa、Puma、IAP、XIAP、Smac、細胞周期調節因子、Cdk4、Cdk6、Cdk2、Cdk1、Cdk7、サイクリンD、サイクリンE、サイクリンA、サイクリンB、Rb、p16、p14Arf、p27KIP、p21CIP、分子シャペロン、Hsp90、Hsp70、Hsp27、代謝酵素、アセチル-CoAカルボキシラーゼ、ATPクエン酸リアーゼ、一酸化窒素シンターゼ、小胞トランスポータータンパク質、カベオリン、エンドソーム輸送選別複合体(endosomal sorting complex required for transport:ESCRT)タンパク質、小胞タンパク質ソーティング(Vsps)、ヒドロキシラーゼ、プロリル-ヒドロキシラーゼPHD-1、2及び3、アスパラギンヒドロキシラーゼFIHトランスフェラーゼ、イソメラーゼ、Pin1プロリルイソメラーゼ、トポイソメラーゼ、デアセチラーゼ、ヒストンデアセチラーゼ、サーチュイン、アセチラーゼ、ヒストンアセチラーゼ、CBP/P300ファミリー、MYSTファミリー、ATF2、メチラーゼ、DNAメチルトランスフェラーゼ、デメチラーゼ、ヒストンH3K4デメチラーゼ、H3K27、JHDM2A、UTX、腫瘍抑制遺伝子、VHL、WT-1、p53、Hdm、PTEN、プロテアーゼ、ユビキチンプロテアーゼ、ウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーター(uPA)及びuPA受容体(uPAR)系、カテプシン、メタロプロテイナーゼ、エステラーゼ、加水分解酵素、セパラゼ、イオンチャンネル、カリウムチャンネル、ナトリウムチャンネル、分子トランスポーター、多剤耐性タンパク質、P-糖タンパク質(P-Glycoprotein)、ヌクレオシドトランスポーター、転写因子/DNA結合タンパク質、Ets、Elk、SMAD、Rel-A(p65-NFKB)、CREB、NFAT、ATF-2、AFT、Myc、Fos、Spl、Egr-1、T-bet、 $\beta$ -カテニン、HIF、FOXO、E2F、SRF、TCF、Egr-1、 $\beta$ -FOXO STAT1、STAT3、STAT4、STAT5、STAT6、p53、WT-1、HMG A、翻訳のレギュレーター、S6、pS6、4EPB-1、eIF4E-結合タンパク質、転写のレギュレーター、RNAポリメラーゼ、開始因子、伸長タンパク質。

10

20

30

40

50

#### 【0257】

本発明により提供されるキットは、本明細書中に記載の一つ以上のモジュレーターを含みえる。モジュレーターの非限定的な例としては、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IL-27、GM-CSF、G-CSF、IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$ 、T細胞受容体(TCR)架橋性抗体、B細胞受容体(BCR)架橋性抗体SDF-1、FLT-3L、IGF-1、M-CSF、SCF、PMA、タプシガルギン(Thapsigargin)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、エトポシド、AraC、ダウノルビシン、スタウロスポリン、ベンジルオキシカルボニル-Val-Ala-Asp(OMe)フルオロメチルケトン(ZVAD)、レナリドミド、EPO、アザシタジン、デシタピン、LPS、TNF $\alpha$ 、及びCD40Lが挙げられる。TCR架橋性抗体の例としては、抗-CD3及び抗CD28抗体が挙げられるが、これらに限定されない。BCR架橋抗体の例としては、抗-IgG、抗-IgM、抗-カップ、及び抗-ラムダ抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0258】

本発明により提供されるキットは一つ以上の標識エレメント(labeling element)を含むことができる。標識エレメントの非限定的な例としては、小分子フルオロフォア、タンパク質性フルオロフォア、放射性同位体、酵素、抗体、化学発光分子、ビオチン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、発色性色素(chromogenic dye)、蛍光染料、リン染料(phosphorous dye)、ルシフェラーゼ、磁性粒子、ベータ-ガラクトシダーゼ、アミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、オキソ基及びチオール基、量子ドット、キレート化若しくはケージ化ランタニド、アイソトープタグ、放射線不透過性タグ、高電子密度タグ、放射性同位体、常磁性粒子、アガロース粒子、質量タグ(mass tag)、e-タグ、ナノ粒子及びベシクルタグ(vesicle tag)が挙げられる。

#### 【0259】

本発明の状態-特異的結合エレメントは、直接または間接的に固体担体及び/または検出可能な基に共役結合することができる。試薬は緩衝剤及び安定化剤、たとえば多糖類などの補助剤(ancillary agent)も含むことができる。キットはさらに、必要により、検出可能な基がメンバー(たとえば酵素基質)であるシグナル伝達系の他のメンバー、試験におけるバックグラウンドの影響を低減させるための試薬、対照(コントロール)試薬、試験を実施するための装置などを含むことができる。キットは、試験を実施するための印刷された使用説明書のシートと共に、単一容器内にすべての容器を含んだような、任意の好適な状態で包装することができる。

#### 【0260】

態様によっては、本発明のキットにより、経路のシグナル伝達を変えることを含む、自己免疫疾患に罹患している被験者由来の細胞及び組織の臨床検出、分類、診断、予後判定、テラノーシス、治療効果の予測及びスクリーニングに好適である、IHC及びフローサイトメトリーなどの高精度の細胞アッセイ法により活性化可能エレメントを検出することができる。

10

#### 【0261】

そのようなキットはさらに、一つ以上の治療薬を含むことができる。キットはさらに、試験プロフィールと比較するための参照プロフィールを含むことができる、生理学的状態のデータ分析用のソフトウェアパッケージを含むことができる。

#### 【0262】

そのようなキットは、科学的な参考文献、パッケージに挿入する材料、臨床試験結果、及び/またはこれらのものの概要などの情報も含むことができ、これらは組成物の活性及び/または好都合な点を示したり立証したり、及び/または用量、投与、副作用、薬物間相互作用、またはヘルスケア提供者に有用な他の情報を記載する。そのような情報は、たとえばヒト臨床試験をベースとした研究及びin vivoモデルを含む実験動物を使用した研究等、様々な研究結果をベースとすることができる。本明細書中に記載のキットは、医師、看護師、薬剤師、処方する職員(formulary official)などを含む医療従事者に提供され、市販されるか及び/または販売促進される。キットは、態様によっては、直接消費者に市販することができる。

20

#### 【実施例】

#### 【0263】

以下の実施例は本発明の様々な態様を例示する目的のために提示されたものであり、本発明をいかなる様式にも限定するものではない。本発明は、本明細書に記載の方法と共に、好ましい態様の現在の代表例であり、例示的であり、本発明の範囲を限定するものではない。本発明における変更及び他の使用は、請求の範囲により定義された本発明の趣旨の中に包含され、当業者には考えることができよう。

30

#### 【0264】

##### 実施例1：関節リウマチにおける疾患活動性をモニターする

5mLから10mLの採血を被験者から集めた。4時間以内に、血液をフィコール調整して、赤血球及び他の血液細胞から白血球(通常500~1000万個の細胞)を単離した。白血球は、90%ウシ胎児血清(FCS)、10%ジメチルスルホキシド(DMSO)中で凍結保存した。あとで被験者のサンプルを37℃で融解し、培地(5%FCSを含むRPMI)で二回洗浄した。あるいは細胞は凍結せずに新鮮なまま使用することができる。細胞を37℃で1時間放置して戻した。細胞を0.5~100万個細胞でアリコートを取り、37℃で5~15分間、モジュレーターに暴露した(すなわち刺激した)。モジュレーターへの暴露には、記載のモジュレーターのいずれの使用も含まれ、飽和用量(たとえば50ng/mL)で実施した。B細胞受容体(BCR)の刺激は、10ug/mLで15分間、抗-IgG、抗-IgM、抗-カッパ、及び抗-ラムダ(BD Biosciences)を添加して実施した。T細胞受容体(TCR)刺激は、氷上に細胞を15分間置き、次いでマウス抗-CD3及び抗-CD28(BD Biosciences)10ug/mLを添加して10分間実施した。細胞を冷PBSで洗浄して遊離抗体を除去し、細胞は、抗-マウス抗体10ug/mL(Cruz Biotechnology)を含む培地のあらかじめ温めておいた試験管に移し、そこでTCR刺激を5~15分間実施した。

40

50

## 【0265】

モジュレーターへの暴露後、細胞をeBioscience FcγR3染色緩衝液セットで30分間、固定化及び透過処理し、細胞を活性化状態に保存した。細胞は表面マーカーCD3、CD4、CD19 (BD Biosciences)及びT制御性転写因子(T regulatory transcription factor)Foxp3(eBioscience)で染色した。サイトカインに暴露したサンプルは二回目に、400uL氷冷メタノールで-20℃、1時間透過処理した。次いで、これらを暴露した一つ以上のモジュレーターに従って、細胞に固有のバーコードをつけた。たとえば、二つのスクシンイミジルエステル-コンジュゲートフルオロフォアPacific Orange及びAlexa 750(Invitrogen)を使用すると、20を超える組み合わせを使用して様々なサイトカインまたはTCR及びBCR刺激細胞集団のそれぞれを標識することができる。バーコーディング (barcoding) に関するさらなる情報については、Krutzikら(2006年)、Nature Methods 3:361-368頁を参照されたい。

10

## 【0266】

洗浄後、細胞を、リン-タンパク質pStat1(pY701)(Cell Signaling)、pStat3(pY705)、pStat5(pY694)、pLck(pY505)、及びpZap70(pY319)/pSyk(pY352)(BD Biosciences)を認識する抗体に加えて、表面タンパク質CD25、CD33、CD45RA、及びCD69(BD Biosciences)を検出するために抗体で100uL染色容積中で染色した。次いで固定され、透過処理され、染色された細胞をBD LSR IIフローサイトメーターで分析した。データ分析は、FlowJo 8.8.6(Tree Star)を使用して実施することができる。各サンプルは、前方と側方散乱をベースとして細胞上にゲーティングした。単球はCD33染色をベースとしてゲーティングし、リンパ球集団を残した。次いでリンパ球及び単球は、集団を暴露する一つ以上のモジュレーターを示すバーコードに従ってゲーティングした。リンパ球はさらにCD3+CD4+CD45RA+、CD3+CD4+CD45RA-、CD3+CD4-CD45RA+、CD3+CD4-CD45RA-、CD3+CD4+CD25hi Foxp3+制御性T細胞、及びCD19+B細胞に分けた。それぞれの細胞サブセットに関して、リン-タンパク質のメジアン蛍光強度(median fluorescent intensity: MFI)を測定した。さらに、基底(すなわちモジュレーターに暴露されていない)に対する刺激(すなわちモジュレーターに暴露された)の倍率変化(fold change)(または活性化)を、シグナル伝達ノードそれぞれの刺激、リン-タンパク質、細胞サブセット組み合わせについて計算した。MFI及び倍率変化の値として表されたデータを用いて、被験者を上記のようにコーナー分類子を使用して階層化した。

20

30

## 【0267】

関節リウマチに罹患している被験者から集めたサンプルを使用して、上記手順を続けて実施した。疾患活動性は、二つのノード[CD69 MFI、基底(basal)、CD19+B細胞]及び[ホスホ-Stat5 MFI、IL21、制御性T細胞]を使用して分類した。この実施例において、高い疾患スコアをもつ被験者は2D分類子の右下の空間にあるのに対し、低い疾患スコアをもつ被験者はこの空間の外側にある。健康状態質問書(Health Assessment Questionnaire: HAQ)のスコアが0.75以上をもつものと定義された、活性RAをもつ12人の被験者サンプルにおいて、このノードの組み合わせは正確に11人の被験者を階層化した。さらに低い疾患活動性をもつ31人の被験者のうちたったの一人しかこのノードの組み合わせを使用して捕捉されなかった。このノード組み合わせ階層化子(stratifier)または分類子(classifier)も、内部相互検定(internal cross-validation)のブートストラッピング(bootstrapping)/バギング(bagging)アプローチを使用して測定されるように有効であった。この検定は、再サンプリング(元のデータセットと交換してランダムサンプルを選択)することにより実施した。その結果、二つ以上のサンプルが含まれたこともあったが、他のサンプルは除外された。バギングとは、コーナー分類子をブートストラップ再サンプルに適合させ、次いでこれらのサンプルの疾患活動性を予測する際の精度のためにランダムサンプリングにおいて除外されたこれらのサンプルを使用するために分類子を使用することをいう。1000個のブートストラップ再サンプル後、各被験者は疾患活動性に関する予測リストをもち、多数決を取った。再サンプリング後、その予想力を維持した分類子は、人為的な結果(artifact)により影響を受けたものではなく、それぞれの変数において疾患の影響により影響

40

50

を受けたようである。

【0268】

上記分類子に、[ホスホ-Stat1 MFI、IL6、ナイーブCD4+T細胞]または[ホスホ-Lck、5分、TCR刺激、CD8+メモリー/エフェクターT細胞]ノードのいずれかを加えると、疾患活動性の測定精度が向上した。疾患活動性スコア(Disease Activity Score : DAS28-4)により測定されたような疾患活動性を測定する際に精度を示す他の有用な分類子は、以下のノード組み合わせを含んでいた[ホスホ-p38 MFI、基底、CD4+メモリー/エフェクターT細胞]、[Lck MFI、全タンパク質、CD8+メモリー及びエフェクターT細胞]、[ホスホ-Stat5、IL15、CD4+メモリー及びエフェクターT細胞]；及び[PLC 2、基底、CD4+T細胞]、[Lck MFI、全タンパク質、CD8+メモリー及びエフェクターT細胞]、[ホスホ-Stat5、IL15、CD4+メモリー及びエフェクターT細胞]。DAS28及びHAQスコアの予想用に評価した追加のノードはそれぞれ表1及び2に示し、以下に記載のように受信者動作特性(receiver-operator characteristic : ROC)曲線に関する曲線下面積(area under curve)の値を含む。これらのノード及び分類子は、疾患活動性を評価するために、及び/または自己免疫疾患を分類するために他の被験者に適用することができる。

10

【0269】

【表1】

表1. DAS28の予想分類子で使用されるノードと回数

DAS 分類子におけるノード (83 分類子)	分類子の数	合計 AUC	平均 AUC
IL15, CD4+CD45RA-, pStat5	26	21.1	0.81
非刺激(Unstim), CD4-CD45RA+, pPI3K	23	19.23	0.84
全(total), CD4-CD45RA-, tLck	17	14.03	0.83
全, CD4-CD45RA+, tLck	18	13.77	0.77
非刺激, CD4+CD45RA-, pp38	15	11.38	0.76
TCR 5', CD4+CD45RA+, pPLCgII	14	10.94	0.78
全, CD19, tStat3	11	8.77	0.8
IL2 0.2ng, Tregs, pStat5	7	5.82	0.83
IL27, CD4-CD45RA+, pStat1	6	4.83	0.81
TCR 15', CD4-CD45RA+, pZap70/pSyk	5	3.7	0.74
IL2, CD4+CD45RA-, pStat5	4	3.09	0.77
IL21, Tregs, pStat5	3	2.53	0.84
TCR 5', CD4+CD45RA+, pLck	3	2.41	0.8
TCR 5', CD4+CD45RA+, pPI3K	3	2.38	0.79
IL15, CD4-CD45RA-, pStat5	3	2.26	0.75
IFNa, CD4-CD45RA-, pStat1	3	2.23	0.74
IL21, CD4-CD45RA+, pStat5	3	2.18	0.73
全, CD4+CD45RA-, tLck	3	2.17	0.72
IFNa, CD4+CD45RA-, pStat3	2	1.66	0.83
TCR 5', CD4+CD45RA-, pPLCgII	2	1.65	0.83
全, CD19, tLck	2	1.62	0.81
IFNa, CD19+, pStat1	2	1.54	0.77
IL27, CD4-CD45RA+, pStat3	2	1.54	0.77
IL15, Tregs, pStat5	2	1.5	0.75
TCR 5', CD4+CD45RA-, pLck	2	1.43	0.71
IL10, CD4-CD45RA-, pStat3	2	1.3	0.65

20

30

40

【0270】

【表 2】

IL10, CD4+CD45RA-, pStat3	1	0.92	0.92
IFNa, CD4-CD45RA-, pStat5	1	0.9	0.9
IFNa, CD4-CD45RA-, pStat3	1	0.89	0.89
IL7, CD4-CD45RA+, pStat5	1	0.88	0.88
TCR 5', CD4+CD45RA-, pp38	1	0.88	0.88
非刺激, CD19+, pZap70/pSyk	1	0.88	0.88
IL7, Tregs, pStat5	1	0.87	0.87
IL21, CD4+CD45RA-, pStat3	1	0.87	0.87
全, CD4-CD45RA-, CD69	1	0.85	0.85
非刺激, CD19+, pPI3K	1	0.84	0.84
IL6, 単球, pStat3	1	0.84	0.84
非刺激, CD19+, pLck	1	0.84	0.84
非刺激, CD4+CD45RA+, pPI3K	1	0.83	0.83
TCR 5', CD4+CD45RA+, pp38	1	0.83	0.83
IL6, CD4+CD45RA-, pStat3	1	0.83	0.83
非刺激, 単球, pStat3	1	0.83	0.83
IL27, 単球, pStat3	1	0.83	0.83
IL21, CD4+CD45RA+, pStat5	1	0.82	0.82
全, CD4+CD45RA-, CD69	1	0.78	0.78
TCR 15', CD4+CD45RA+, pZap70/pSyk	1	0.77	0.77
TCR 5', Tregs, pPI3K	1	0.76	0.76
全, CD4-CD45RA+, CD69	1	0.75	0.75
TCR 5', CD4+CD45RA-, pPI3K	1	0.74	0.74
IL21, CD4+CD45RA+, pStat3	1	0.72	0.72

10

20

【 0 2 7 1 】

## 【表 3】

表 2. HAQ スコアの予想分類子で使用されるノード及び回数

HAQ 分類子におけるノード (72 分類子)	分類子 の数	合計 AUC	平均 AUC
IL21, Tregs, pStat5	24	20.92	0.87
全, CD19, CD69	21	18.33	0.87
非刺激, Tregs, pZap70/pSyk	10	8.6	0.86
IL27, CD4+CD45RA-, pStat1	10	8.51	0.85
IL21, CD4+CD45RA-, pStat3	9	8.29	0.92
IL21, CD4+CD45RA+, pStat5	6	5.11	0.85
全, CD4-CD45RA-, CD69	6	5.07	0.84
IL6, CD4+CD45RA+, pStat1	6	4.99	0.83
IL21, CD4-CD45RA+, pStat5	5	4.61	0.92
IL27, CD4+CD45RA+, pStat1	5	4.12	0.82
TCR 5', CD4-CD45RA+, pLck	4	3.61	0.9
IL2 0.2ng, Tregs, pStat5	4	3.45	0.86
IL27, CD4-CD45RA-, pStat1	4	3.12	0.78
TCR 5', CD4+CD45RA+, pLck	3	2.63	0.88
IL2-GMCSF, CD4-CD45RA+, pStat5	3	2.55	0.85
IL27, Tregs, pStat1	3	2.48	0.83
IL10, CD4+CD45RA+, pStat3	3	2.45	0.82
全, CD19, tLck	3	2.45	0.82
IL27, CD4+CD45RA+, pStat3	3	2.44	0.81
IL21, CD4+CD45RA-, pStat5	2	1.84	0.92
TCR 5', Tregs, pPLCgII	2	1.72	0.86
TCR 5', Tregs, pZap70/Syk	2	1.69	0.84
BCR, CD19+, pZap70/Syk	2	1.69	0.84

10

20

【 0 2 7 2 】

30

【表4】

TCR 5', CD4+CD45RA+, pZap70/pSyk	2	1.67	0.84
TCR 15', Tregs, pZap70/Syk	2	1.65	0.83
TCR 5', Tregs, pLck	2	1.65	0.82
IFNa, CD4+CD45RA+, pStat5	2	1.59	0.79
TCR 5', CD4-CD45RA-, pp38	2	1.48	0.74
非刺激, CD4+CD45RA-, pZap70/pSyk	1	0.93	0.93
IFNa, CD4-CD45RA+, pStat5	1	0.93	0.93
TCR 5', CD4-CD45RA+, pp38	1	0.93	0.93
TCR 5', CD4-CD45RA-, pLck	1	0.9	0.9
非刺激, CD4-CD45RA+, pp38	1	0.9	0.9
IL6, Tregs, pStat1	1	0.9	0.9
非刺激, Tregs, pPLCgII	1	0.9	0.9
TCR 5', CD4+CD45RA+, pPLCgII	1	0.9	0.9
GM-CSF, 単球, pStat5	1	0.89	0.89
IL7, CD4+CD45RA+, pStat5	1	0.89	0.89
TCR 5', CD4+CD45RA-, pPLCgII	1	0.89	0.89
IFNa, Tregs, pStat5	1	0.87	0.87
全, CD4+CD45RA-, CD69	1	0.87	0.87
IL2, CD4+CD45RA+, pStat5	1	0.87	0.87
TCR 5', CD4+CD45RA+, pPI3K	1	0.86	0.86
IFNa, CD4+CD45RA-, pStat5	1	0.85	0.85
IFNa, CD19+, pStat3	1	0.84	0.84
全, CD4+CD45RA+, CD69	1	0.84	0.84
TCR 5', CD4-CD45RA+, pPI3K	1	0.83	0.83
非刺激, CD4-CD45RA-, pStat1	1	0.82	0.82
非刺激, CD4+CD45RA-, pStat1	1	0.81	0.81
IFNa, CD19+, pStat1	1	0.8	0.8
非刺激, Tregs, pLck	1	0.8	0.8
TCR 5', CD4+CD45RA-, pZap70/pSyk	1	0.79	0.79
BCR, CD19+, pLck	1	0.78	0.78
非刺激, Tregs, pStat5	1	0.78	0.78
IFNa, CD4+CD45RA+, pStat3	1	0.75	0.75
TCR 5', CD4+CD45RA-, pPI3K	1	0.72	0.72
IL15, CD4-CD45RA+, pStat5	1	0.72	0.72
IL10, CD4-CD45RA-, pStat3	1	0.7	0.7
IL7, Tregs, pStat5	1	0.66	0.66

10

20

30

## 【0273】

## 実施例2：治療計画により関節リウマチの患者を分類する

40

本発明は、特異的な薬剤の分子機構、または作用モードをよりよく理解するために薬剤開発会社によりツールとして使用することができる。本実施例において、本発明を使用して薬剤ブレドニゾン及びオレンシア(Abatecept)を調査することができる。サンプルを集め、実施例1と同様に処理した。およそ半分がオレンシアを摂取している、女性RA患者39人の研究では、特異的細胞特徴が処置群で高かったことを示した。分類子オレンシア-1は、ノードの組み合わせ[ホスホ-Stat3 MFI、基底、B細胞]、[Lck MFI、全タンパク質、CD8+ナイーブT細胞]、[ホスホ-PLC 2MFI、基底、CD8+T細胞]により定義した。モデルは正確に21人の処置被験者のうち20人を予想し、たった一人だけが偽陽性であった。バギング/ブートストラッピング相互検定により、この分類子の予想力(predictive power)を確認した。実際、モデルは、特定の細胞型において、オレンシアが患者により低い基底活性化

50

(lower basal activated)PLC 2及びStat3と、Lckのより高いタンパク質レベルを生じさせやすいことを示す。

【0274】

本発明を開発している間に、シグナル伝達データから形成した多くのモデルがその予想力に関して評価された。図1のモデルをとると、受信者動作特性(ROC)曲線として知られる関数を使用してy-軸に真陽性率とx-軸に偽陽性率をプロットすることができる(図2)。記載したように、相互検定は、すべてのサンプルがサンプリングされるわけではないように無作為にサンプリングすることにより実施し、次いでモデルをベースとして除外サンプルの種類を予測した。1000回再サンプリングした後、それぞれの被験者に関して大多数の予測(たとえば $p1 > 1/2$ 、ここで $p1$ は被験者リストのクラス1断定(assertion)の画分である)は出力予測であった。ROC曲線は、予測を基底とするために可能性のある値を通して進行することにより機能する(たとえば $p1 > 0.00$ 、 $p1 > 0.12$ 、 $p1 > 1.00$ )。低い閾値を設定することにより、真陽性率は1.00でありえるが、偽陽性率は許容できないほど高くなりえる。ROC曲線は、一連の値にわたってこの閾値を可視化する方法を提供し、モデルに関して最適性能を同定する。この分析は標準より下のモデルから最適モデルを識別する場合に有用である。

10

【0275】

図2は、曲線下面積(AUC)により示唆されるように、オレンシアを摂取している患者から現れたコーナー分類子(図1)は、非常に高い予想力のモデルであることを示す。無作為性をベースとするモデルは、対角線の外観をしていて(図2に示されている)、AUCは0.5である。オレンシア-1分類子モデルは成功モデルで、AUCは0.9244である。AUC0.8627の内部相互検定下で十分に実施されたオレンシア使用の追加の分類子は、ノード[ホスホ-Lck MFI、TCR刺激、CD8+T細胞]、[Lck MFI、全タンパク質、CD8+T細胞]、[log倍率ホスホStat3、IFN、制御性T細胞]を含む。オレンシア及びプレドニゾンで処置した被験者の分類用に評価した追加のノードは、それぞれ表3及び4に示す。これらの方法は、作用の可能なモード及び追加の薬剤標的を同定するために、他の薬物治療を受けている被験者に適用することができる。

20

【0276】

## 【表 5】

表 3. 女性ドナーにおけるオレンシア使用の予想分類子で使用されるノード及び回数

オレンシア女性におけるノード (31 分類子)	分類子の数	合計 AUC	平均 AUC
全, CD4-CD45RA+, tLck	20	17.25	0.86
IFNa, CD4+CD45RA-, pStat3	14	12.18	0.87
TCR 5', CD4-CD45RA+, pLck	14	12.08	0.86
IL21, CD4-CD45RA+, pStat3	5	4.5	0.9
非刺激, CD4-CD45RA+, pPLCgII	5	4.47	0.89
IL15, CD4-CD45RA-, pStat5	4	3.54	0.88
IL21, CD19+, pStat3	4	3.47	0.87
非刺激, CD4+CD45RA-, pPLCgII	2	1.83	0.92
非刺激, CD19+, pStat3	2	1.79	0.89
IFNa, CD4-CD45RA+, pStat3	2	1.73	0.86
非刺激, CD4-CD45RA-, pStat3	2	1.71	0.85
TCR 5', CD4+CD45RA+, pPI3K	2	1.71	0.85
IFNa, CD19+, pStat3	2	1.69	0.84
IL27, 単球, pStat3	1	0.9	0.9
IL6, 単球, pStat3	1	0.9	0.9
IFNa, CD4+CD45RA-, pStat1	1	0.89	0.89
IFNa, CD4-CD45RA+, pStat1	1	0.89	0.89
BCR, CD19+, pZap70/pSyk	1	0.88	0.88
TCR 5', CD4+CD45RA+, pLck	1	0.82	0.82

10

20

【 0 2 7 7 】

## 【表 6】

表 4. 女性ドナーにおけるプレドニゾン使用の予想分類子のノード及び回数

プレドニゾン女性におけるノード (28 分類子)	分類子番号	Combined AUC	平均 AUC
IL10, CD4-CD45RA-, pStat3	18	14.47	0.8
IL10, CD4+CD45RA+, pStat3	8	6.6	0.82
TCR 15', CD4+CD45RA-, pLck	7	6.07	0.87
IFNa, 単球, pStat5	6	4.98	0.83
IFNa, Tregs, pStat3	5	3.84	0.77
IL10, 単球, pStat3	4	3.19	0.8
IL2, CD4+CD45RA-, pStat5	2	1.76	0.88
非刺激, CD4-CD45RA-, pPLCgII	2	1.63	0.81
IFNa, CD4+CD45RA+, pStat5	2	1.63	0.81
IFNa, CD19+, pStat5	2	1.56	0.78
BCR, CD19+, pZap70/pSyk	1	0.9	0.9
IL21, CD4-CD45RA+, pStat5	1	0.89	0.89
IFNa, CD19+, pStat3	1	0.87	0.87
BCR, CD19+, pLck	1	0.86	0.86
IL15, Tregs, pStat5	1	0.86	0.86
非 刺 激 , CD4-CD45RA+, pZap70/pSyk	1	0.85	0.85
IL10, CD4-CD45RA+, pStat3	1	0.85	0.85
TCR 15', CD4-CD45RA+, pLck	1	0.83	0.83
非刺激, CD4-CD45RA+, pLck	1	0.82	0.82
IL10, Tregs, pStat3	1	0.79	0.79
非刺激, Tregs, pLck	1	0.78	0.78
IL6, CD4+CD45RA+, pStat1	1	0.74	0.74

10

20

## 【 0 2 7 8 】

## 実施例 3 : 疾患活動性における変化を予測する

全身性エリトマトーデス(SLE)における疾患活動性は、全身性エリトマトーデス疾患活動性指数(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index : SLEDAI)及び/または医師総合評価(Physician Global Assessment : PGA)に関して表されることが多い。これらの尺度、及び複数回で被験者から集めたサンプルを使用して、本発明の方法は、少なくとも90日前に、上昇する疾患活動性(たとえばフレア)レベルを客観的に予測するノードを同定することができる。90日離して二回に分けて血液サンプルを患者から集め、疾患活動性をそれぞれの時間点で点をつけた。サンプルは実施例1と同様に処理した。変性、活性化レベル測定及び分析は、本明細書に記載の通りに実施した。シグナル伝達ノードの幾つかに関しては、特定の細胞型における特定の刺激に対するシグナル伝達応答は、疾患活動性で増加を示した患者では高く、[Stat3、IL4、B細胞]、[Stat1、IL10、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat3、IL6、B細胞]、[Stat3、IL4、B細胞]、[Stat1、IFN、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat1、IL6、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat6、IL15、CD4-CD45RA+細胞](SLEDAI  $\geq$  3、90日)、及び[Stat3、IFN、B細胞](SLEDAI  $\geq$  3、90日)を含んでいた。他のシグナル伝達ノードに関しては、特定の細胞型において特定の刺激に対するシグナル伝達応答は、疾患活動性で増加を示した患者では低く、[Stat5、IFN、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat5、IFN、B細胞]、[Stat5、IL21、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat1、IFN、CD4-CD45RA-細胞]、[Stat6、IFN、CD4-CD45RA+細胞]、[Stat6、IL6、CD4+CD45RA+細胞](SLEDAI  $\geq$  3、90日)、[Stat1、IL10、単球]、及び[Stat5、IL10、単球](SLEDAI  $\geq$  3、90日)を含んでいた。さらに、本方法は、両方の時間点で測定可能な疾患の非存在と相関したノードを識別し、ノード[S

30

40

50

tat3、IFN、CD4-CD4RA+]で増加したシグナル伝達応答を含み、二つのノード[Stat6、IL10、B細胞]及び[Stat6、基底、B細胞]において低下したシグナル伝達応答を含む。

【0279】

これらのシグナル伝達ノードの対付加利用(pairwise use)により、その相関関係の強度を所望の臨床的相関まで高めた。たとえば、フレアを予測する能力を大いに高めた。以下の三つのノードと同定されたMFI閾値とを組み合わせると、90日目までにフレアを起こしたすべての被験者を含むが、90日目までにフレアを起こさなかった被験者は一人も含まない三次元シグナル伝達スペースの領域を規定する[Stat1、IL6、CD4+CD45RA+細胞](MFI > 1207)、[Stat1、基底、CD4-CD45RA+細胞](MFI > 83.9)、及び[Stat6、IFN、CD4-CD45RA+細胞](MFI < 108)。同様に、二つの変動可能なコーナー分類子は、最初の採血時点でSLE DAIスコアがゼロであり、90日以内にSLEDAIが上昇しなかった12人の被験者のうち11人を捕捉したが、二つの時点のうち少なくとも一つに関して0を超えるSLEDAIスコアをもつ29人の患者のうち一人しか捕捉しなかった：[Stat6、基底、B細胞](MFI < 83.1)及び[Stat3、IFN、CD4-CD45RA+細胞](MFI > 337)。これらの分類子は、他の被験者から集めたデータに適用して、疾患活動性または少なくとも90日前にフレアを予測するための基準を提供することができる。

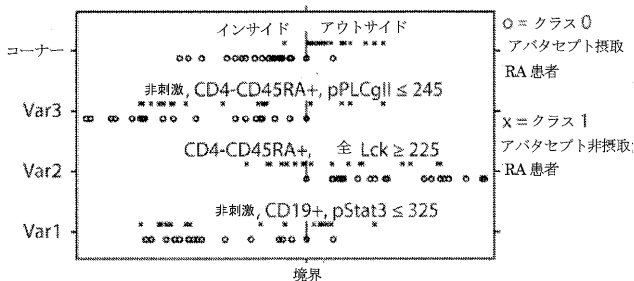
10

【0280】

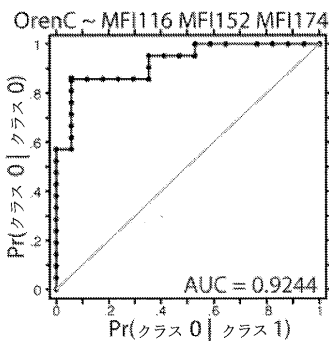
本発明の好ましい態様について示し記載してきたが、当業者にはかかる態様は単なる例示としてのみ提供されるものであることは理解されよう。多くの変更、変化及び置換が、本発明から逸脱することなく実施されることは当業者には理解されよう。本明細書に記載された態様に対する様々な変更は本発明の実施をするうえで使用できると理解すべきである。以下に記載の請求の範囲は本発明の範囲を定義し、これらの請求の範囲内の方法及び構造並びにその等価物はこの請求の範囲によって網羅されるものである。

20

【図1】



【図2】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 11/26117

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68, G01N 33/53 (2011.01) USPC - 435/6, 435/7.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC - 435/6, 435/7.2  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) PubWEST - PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Dialog Classic Files - 654, 652, 3349, 348, 35, 65, 155; USPTO Web Page; Google Scholar; Search terms - diagnosis, autoimmune disease, rheumatoid arthritis, SLE, prognosis, outcome prediction, response of therapy, cell marker activation, therapeutic target, biomarker, CD4, CD8, B cells, T cells, T-regulatory c		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2008/0182262 A1 (PEREZ et al.) 31 July 2008 (31.07.2008) para [0002], [0006], [0009], [0011], [0013], [0019], [0021], [0026], [0030], [0038], [0045], [0051], [0066], [0067], [0071], [0087], [0099], [0112], [0115], [0119], [0154], [0156], [0207], [0214], [0237], [0241], [0253]-[0256], [0273], [0285], [0301], [0314], [0317], [0341], claim 28, abstract	1-7, 9, 10, 12-15, 18, 20, 41, 43-60, 82, 84-98  8, 11, 16, 17, 19, 21-35, 42, 83
Y	US 2010/0009364 A1 (FANTL et al.) 14 January 2010 (14.01.2010) para [0007], [0010], [0017], [0049], [0085], [0086], [0237], [0301], abstract	8, 11, 17, 23, 24, 27, 33-35
Y	US 2008/0274118 A1 (AUKERMAN et al.) 06 November 2008 (06.11.2008) para [0001], [0005], [0013], [0018], [0020], [0024], abstract	16, 17, 19, 21-35, 42, 83
Y	US 2009/0148462 A1 (CHEVRIER et al.) 11 June 2009 (11.06.2009) para [0007], [0349]	28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 11 July 2011 (11.07.2011)		Date of mailing of the international search report <b>27 JUL 2011</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/26117

**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.: 36  
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:  
Claim 36 is indefinite and lacks clarity in that the limitation of the "area under the curve (AUC) value higher than 0.7" lacks an antecedent basis in any preceding claim and does not provide defined parameters of an ordinate or abscissa values from which the curve is generated.
  
3.  Claims Nos.: 37-40  
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:

Group I: Claims 1-17 and 25-36, drawn to a method, the method comprising: a) contacting a first cell from a first cell population from said subject with: (i) at least a first modulator or a fragment thereof, or (ii) a presence of no modulator; b) contacting a second cell from a second cell population from said individual with: (i) at least a second modulator or a fragment thereof, or (ii) a presence of no modulator; c) determining an activation level of at least one activatable element in said first cell and said second cell; and e) classifying, diagnosing, prognosing, theranosing, and/or predicting an outcome of said autoimmune disease in said subject based on said activation level of said at least one activatable element.

Group II: Claims 18-24 and 41-60, drawn to a method, the method comprising: (a) exposing a cell from the subject to at least one modulator; (b) determining an activation level of at least one activatable element; and, (c) classifying, diagnosing, prognosing, theranosing, and/or predicting an outcome of an autoimmune disease in the subject based on the activation level of the at least one activatable element.

--please see extra 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.: 1-36, 41-60, and 82-98
  
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/US 11/26117

Continuation of:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group III: Claims 61-81, drawn to a method, the method comprising: (a) exposing a cell from the subject to at least one therapeutic agent, wherein the therapeutic agent is used to treat an immune system disorder; (b) determining the activation level of at least one activatable element; and (c) classifying, diagnosing, prognosing, theranosing, and/or predicting an outcome of the autoimmune disease in the subject based on the activation level of the at least one activatable element.

Group IV: Claims 82-98, drawn to a method, the method comprising: (a) exposing a cell from the subject to at least one modulator; (b) determining an activation level of at least one activatable element; and, (c) identifying one or more therapeutic targets for the treatment of the autoimmune disease in the subject based on the activation level of the at least one activatable element.

Group V: Claims 99-108, drawn to a kit.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the inventions listed as Groups I-V is the determination of an activation state of an activatable element, or binding elements for carrying out the detection. This special technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by US 2009/0269773 A1 to Fanti et al. (published October 29, 2009), which teaches a method comprising determining an activation level of an intracellular activatable element in single cells from a sample (para [0003]). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

Another special technical feature of the inventions listed as Groups I-II and IV is the exposure of a cell from the subject to at least one modulator, which also fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by Fanti (para [0009]). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

Another special technical feature of the inventions listed as Groups I-III is the classifying, diagnosing, prognosing, theranosing, and/or predicting an outcome of said autoimmune disease in said subject based on said activation level of said at least one activatable element, which also fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by Fanti (para [0002]-[0003]; para [0300] - "characterization of immune cells specifically related to the pathogenesis of autoimmune diseases"). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

Further, the special technical feature of the inventions listed as Group I is the step of b) contacting a second cell from a second cell population from said individual with: (i) at least a second modulator or a fragment thereof, or (ii) a presence of no modulator. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups II-V. The special technical feature of the inventions listed as Group III is exposing a cell from the subject to at least one therapeutic agent. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-II and IV-V. The special technical feature of the inventions listed as Group IV is the step of identifying one or more therapeutic targets for the treatment of the autoimmune disease in the subject based on the activation level of the at least one activatable element. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-III and V. The special technical feature of the inventions listed as Group V is a kit comprising binding element and instructions for use. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I-IV.

Unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by the claimed inventions. With out a shared special technical feature, the inventions of Groups I-V lack unity with one another.

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100106840  
弁理士 森田 耕司

(74)代理人 100105991  
弁理士 田中 玲子

(74)代理人 100119183  
弁理士 松任谷 優子

(74)代理人 100114465  
弁理士 北野 健

(74)代理人 100156915  
弁理士 伊藤 奈月

(72)発明者 ヘイル, マシュー, ピー.  
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア州 スタンフォード, シーシーエスアール 3 2 2  
0, キャンパス ドライブ 2 6 9

(72)発明者 ブタケック, ジェイソン  
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア州 スタンフォード, シーシーエスアール 3 2 2  
0, キャンパス ドライブ 2 6 9

(72)発明者 ノラン, ゲリー, ピー.  
アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 カリフォルニア州 スタンフォード, シーシーエスアール 3 2 0  
5, キャンパス ドライブ 2 6 9

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ79 QQ96 QR32 QR48 QR54 QR56  
QR66 QR77 QS32 QS33 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013520208A5</a>	公开(公告)日	2014-04-10
申请号	JP2012555157	申请日	2011-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	该利兰·斯坦福初级大学董事会		
[标]发明人	ヘイルマシュービー プタケックジェイソン ノランゲリーピー		
发明人	ヘイル,マシュー,ビー. プタケック,ジェイソン ノラン,ゲリー,ピー.		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/564 C12Q1/6883 C12Q2600/118 G01N33/5047 G01N2800/102 G01N2800/104 G01N2800/52 G01N2800/56		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR54 4B063/QR56 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 松任谷裕子 北野 健		
优先权	61/307829 2010-02-24 US		
其他公开文献	JP2013520208A		

#### 摘要(译)

在一个方面，本发明提供了一种用于预测受试者自身免疫疾病的分类，诊断，预后，血栓形成和/或治疗结果的方法。[选择图]无