

(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2018-538240

(P2018-538240A)

(43) 公表日 平成30年12月27日(2018.12.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C40B 40/02 (2006.01)	C40B 40/02	2G045
C12Q 1/06 (2006.01)	C12Q 1/06	4B029
C12Q 1/68 (2018.01)	C12Q 1/68	4B033
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4B063
A61K 48/00 (2006.01)	A61K 48/00	4B065

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-518954 (P2018-518954)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月11日 (2016.10.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年6月5日 (2018.6.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/056395
 (87) 国際公開番号 WO2017/066172
 (87) 国際公開日 平成29年4月20日 (2017.4.20)
 (31) 優先権主張番号 62/241,466
 (32) 優先日 平成27年10月14日 (2015.10.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

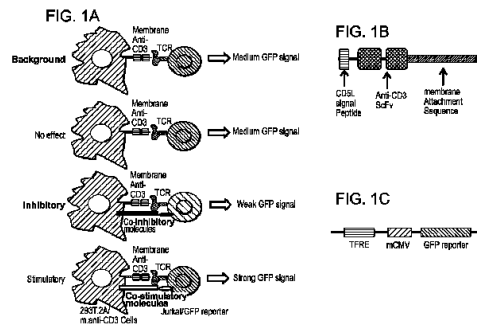
(71) 出願人 593152720
 イェール ユニバーシティー
 Yale University
 アメリカ合衆国 コネチカット 06510,
 ニュー ヘイブン, ウィットニー
 アベニュー 2
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 チェン, リエピン
 アメリカ合衆国 コネチカット 06514,
 ハムデン, カンターベリー ロード 51

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ゲノムスケールのT細胞活性アレイおよびその使用の方法

(57) 【要約】

本発明はゲノムスケールのT細胞活性アレイ (GS-TCAA) およびこれらのアレイを作成する方法およびそれを使用して免疫モジュレーターを同定する方法を提供する。本発明は、T細胞生物学的ネットワークの調節に關与するヒト膜タンパク質の同定を可能にする新規のゲノムスケールのT細胞活性アレイ (GS-TCAA) の開発に少なくとも部分的に基づく。GS-TCAAにより、新しい細胞ベースの蛍光レポーターシステムを使用して、90%を超える全ヒト膜遺伝子についての増殖、抑制、および消耗のような異なるT細胞活性の研究が可能となる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

複数のウェルを含む固体支持構造体を含むゲノムスケールの T 細胞活性アレイ (G S - T C A A) であって、

前記複数のウェルのそれぞれが：

膜結合抗 C D 3 抗体またはその抗原結合性断片を発現する第 1 の細胞であって、複数のヒト膜遺伝子のうちの 1 つによってコードされるタンパク質の前記第 1 の細胞上への提示が可能になるように、前記複数のヒト膜遺伝子をコードする c D N A ライブラリーでトランスフェクトされている、第 1 の細胞；

細胞表面上の受容体およびレポーター遺伝子を発現する第 2 の細胞；

を含み、

前記受容体と前記抗 C D 3 抗体またはその抗原結合性断片との間の相互作用が一次シグナルを提供し、前記第 2 の細胞株の活性を刺激し、

前記レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、前記複数のヒト膜遺伝子のうちの 1 つによってコードされる前記提示されたタンパク質が刺激性共シグナル伝達分子として作用し、前記第 2 の細胞株の活性を刺激することを示し、前記レポーター遺伝子の発現レベルの低下が、前記複数のヒト膜遺伝子のうちの 1 つによってコードされる前記提示されたタンパク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、前記第 2 の細胞株の活性を阻害することを示す、アレイ。

【請求項 2】

前記固体支持構造体がマルチウェルプレートである、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 3】

前記マルチウェルプレートが、96 ウェルプレート、384 ウェルプレートおよび 1536 ウェルプレートからなる群から選択される、請求項 2 に記載のアレイ。

【請求項 4】

前記第 1 の細胞がヒト 293 T 細胞である、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 5】

前記第 1 の細胞が、免疫関連アダプターを発現するヒト 293 T . 2 A 細胞である、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 6】

前記免疫関連アダプターが、D A P 1 0、D A P 1 2、F c R および C D 3 E からなる群から選択される、請求項 5 に記載のアレイ。

【請求項 7】

前記第 2 の細胞が免疫細胞である、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 8】

前記免疫細胞が、骨髄由来サブレッサー細胞 (M D S C) である、請求項 7 に記載のアレイ。

【請求項 9】

前記免疫細胞が T 細胞である、請求項 7 に記載のアレイ。

【請求項 10】

前記 T 細胞が、J u r k a t 細胞、ナイーブ T 細胞、エフェクター T 細胞、消耗 T 細胞、アネルギー性 T 細胞および制御性 T 細胞からなる群から選択される、請求項 9 に記載のアレイ。

【請求項 11】

前記レポーター遺伝子が、細胞毒性関連レポーター構築物、アポトーシス関連レポーター構築物および増殖関連レポーター構築物からなる群から選択される D N A 構築物に含まれる、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 12】

前記細胞毒性関連レポーター構築物が蛍光ベースのレポーター構築物である、請求項 11 に記載のアレイ。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記アポトーシス関連レポーター構築物が、蛍光ベースのレポーター構築物である、請求項 11 に記載のアレイ。

【請求項 14】

前記蛍光ベースのレポーター構築物が、T細胞関連転写応答エレメントと、それに続く最小CMVプロモーターおよびGFPLレポーター遺伝子を含む、請求項 12 または 13 に記載のアレイ。

【請求項 15】

前記T細胞関連転写応答エレメントが、NF- κ B、NF-AT、AP-1、EGFR2、MAPKおよびPI3Kからなる群から選択される、請求項 14 に記載のアレイ。

10

【請求項 16】

前記増殖関連レポーター構築物中のレポーター遺伝子がサイトカイン遺伝子である、請求項 11 に記載のアレイ。

【請求項 17】

前記サイトカインが、IFN- γ 、TNF- α およびIL-10からなる群から選択される、請求項 16 に記載のアレイ。

【請求項 18】

前記複数のヒト膜遺伝子が、受容体遺伝子、免疫グロブリン遺伝子、トランスポーター遺伝子およびシグナル伝達遺伝子から選択される遺伝子を含む、請求項 1 に記載のアレイ。

20

【請求項 19】

前記複数のヒト膜遺伝子が約 1,000 ~ 7,000 の遺伝子を含む、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 20】

前記複数のヒト膜遺伝子が約 2,000 ~ 5,000 個の遺伝子を含む、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 21】

前記複数のヒト膜遺伝子が約 4,000 ~ 7,000 個の遺伝子を含む、請求項 1 に記載のアレイ。

【請求項 22】

前記第 2 の細胞の前記活性が、細胞増殖、細胞抑制、細胞消耗、細胞アポトーシス、および細胞からのサイトカイン放出からなる群から選択される、請求項 1 に記載のアレイ。

30

【請求項 23】

ゲノムスケールのT細胞活性アレイ(GS-TCAA)を作製する方法であって、
複数のウェルを含む固体支持構造体を提供するステップ；
膜結合抗CD3抗体またはその抗原結合性断片を発現する第 1 の細胞を、前記複数のウェルのそれぞれに培養するステップ；

複数のヒト膜遺伝子の 1 つによってコードされたタンパク質の前記第 1 の細胞上への提示が可能となるように、前記複数のヒト膜遺伝子をコードするcDNAライブラリーで前記第 1 の細胞をトランスフェクトするステップ；および

40

細胞表面上の受容体およびレポーター遺伝子を発現する第 2 の細胞を、前記複数のウェルのそれぞれに共培養し、それによってゲノムスケールのT細胞活性アレイを調製するステップ

を含み、

前記受容体と前記抗CD3抗体またはその抗原結合性断片との間の相互作用が、一次シグナルを提供し、前記第 2 の細胞株の活性を刺激し、

前記レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、前記複数のヒト膜遺伝子のうちの 1 つによってコードされる前記提示されたタンパク質が刺激性共シグナル伝達分子として作用し、前記第 2 の細胞株の活性を刺激することを示し、前記レポーター遺伝子の発現レベルの低下が、前記複数のヒト膜遺伝子のうちの 1 つによってコードされる前記提示されたタンバ

50

ク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、前記第2の細胞株の活性を阻害することを示す、方法。

【請求項24】

前記固体支持構造体がマルチウェルプレートである、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記マルチウェルプレートが、96ウェルプレート、384ウェルプレートおよび1536ウェルプレートからなる群から選択される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記第1の細胞がヒト293T細胞である、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記第1の細胞が、免疫関連アダプターを発現するヒト293T、2A細胞である、請求項23に記載の方法。

【請求項28】

前記免疫関連アダプターが、DAP10、DAP12、FcR およびCD3Eからなる群から選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記第2の細胞が免疫細胞である、請求項23に記載の方法。

【請求項30】

前記免疫細胞が骨髄由来サブレッサー細胞(MDSC)である、請求項29に記載のアレイ。

【請求項31】

前記免疫細胞がT細胞である、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

前記T細胞が、Jurkat細胞、ナイーブT細胞、エフェクターT細胞、消耗T細胞、アネルギーT細胞および制御性T細胞からなる群から選択される、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記レポーター遺伝子が、細胞毒性関連レポーター構築物、アポトーシス関連レポーター構築物および増殖関連レポーター構築物からなる群から選択されるDNA構築物に含まれる、請求項23に記載の方法。

【請求項34】

前記細胞毒性関連レポーター構築物が蛍光ベースのレポーター構築物である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記アポトーシス関連レポーター構築物が蛍光ベースのレポーター構築物である、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

前記蛍光ベースのレポーター構築物が、T細胞関連転写応答エレメントと、それに続く最小CMVプロモーターおよびGFPLレポーター遺伝子を含む、請求項34または35に記載のアレイ。

【請求項37】

前記T細胞関連転写応答エレメントが、NF-kB、NF-AT、AP-1、EGR2、MAPKおよびPI3Kからなる群から選択される、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記増殖関連レポーター構築物中のレポーター遺伝子がサイトカイン遺伝子である、請求項33に記載の方法。

【請求項39】

前記サイトカインが、IFN-ガンマ、TNF-アルファおよびIL-10からなる群から選択される、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

10

20

30

40

50

免疫モジュレーターを同定する方法であって、
請求項 1 に記載のゲノムスケールの T 細胞活性アレイ (G S - T C A A) を提供するステップ；

第 1 の細胞中の前記複数のヒト膜遺伝子の 1 つを発現させるステップ、

前記第 1 の細胞と前記第 2 の細胞とを共培養するステップ；

前記第 2 の細胞における前記レポーター遺伝子の発現レベルを検出するステップ；および

前記レポーター遺伝子の発現レベルを、前記複数のヒト膜遺伝子の 1 つでトランスフェクトされていない対照の第 1 の細胞と共培養された対照の第 2 の細胞中の前記レポーター遺伝子の発現レベルと比較するステップ

を含み、

前記レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、前記複数のヒト膜遺伝子のうちの 1 つによってコードされる前記提示されたタンパク質が刺激性共シグナル伝達分子として作用し、前記第 2 の細胞株の活性を刺激することを示し、前記レポーター遺伝子の発現レベルの低下が、前記複数のヒト膜遺伝子のうちの 1 つによってコードされる前記提示されたタンパク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、前記第 2 の細胞株の活性を阻害することを示し、それによって免疫モジュレーターが同定される、方法。

【請求項 4 1】

前記免疫モジュレーターが、 F O L H 1、 F A S、 I L 3 R A、 C D 2 4 8、 T H B D、 B 7 . 1、 G J B 1、 O X 4 0 L、 4 - 1 B B L および B 7 . 2 からなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記免疫モジュレーターが、 F L T 1、 C X C R 6、 S E M A 6 a、 R H C E、 F C R L A、 T N F R S F 1 9、 S E C 2 2 b、 B 3 G N T 1、 N F A M 1 . L Y 6 および G P 1 B A からなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記免疫モジュレーターが、 F L T 1、 S E M A 6 a、 S E C 2 2 b および G P 1 B A からなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 4】

自動化されている、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 5】

ロボット工学を使用して実行される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 6】

ロボット液体ハンドリング技術を使用して実行される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

自動プレートハンドリングシステムを使用して実行される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

in vitro 機能アッセイ、*in vivo* アッセイ、受容体アレイアッセイ、バイオインフォマティクスアッセイ、またはそれらの組合せからなる群から選択されるアッセイを実行することをさらに含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 *in vitro* 機能アッセイが、

前記複数のヒト膜遺伝子の 1 つおよび膜結合抗 C D 3 抗体またはその抗原結合性断片を発現する前記第 2 の細胞を初代 T 細胞と共に培養すること；および

増殖アッセイ、アポトーシスアッセイおよびサイトカイン放出アッセイからなる群から選択される *in vitro* 機能アッセイを実行すること

を含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記初代 T 細胞が、ヒト初代 C D 8 細胞および / またはヒト初代 C D 4 細胞である、請求項 4 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 1】

前記受容体アレイアッセイが、前記免疫モジュレーターの相互作用タンパク質を同定するために実行される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記受容体アレイが：

複数のウェルを含む固体支持構造体

を含み、前記複数のウェルのそれぞれが：

複数の受容体遺伝子の 1 つによってコードされる受容体の前記細胞上での提示が可能になるように、前記複数の受容体遺伝子をコードする c D N A ライブラリーでトランスフェクトされた細胞；

タグと融合した免疫モジュレーターを含む組換えタンパク質；

前記タグに特異的な蛍光標識された抗体

を含み；

検出可能な蛍光シグナルが、前記免疫モジュレーターが前記受容体と相互作用することの指標である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記タグが、マウス I g G 2 a F c タグ、ヒト I g G 1 F c タグ、F L A G タグおよび 6 x H i s タグからなる群から選択される、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記免疫モジュレーターが前記免疫モジュレーターの全長タンパク質である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記免疫モジュレーターが、前記免疫モジュレーターの細胞外ドメインである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記 i n v i v o アッセイが、前記免疫モジュレーターを自己免疫疾患またはがんの動物モデルに投与することを含む、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記動物モデルが、ヒトメラノーマ細胞および腫瘍反応性 T 細胞を注射された N O D - s c i d I L 2 R ガンマ^{n u 1 1} マウスモデルである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記動物モデルがヒト化マウスモデルである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記ヒト化マウスモデルが、免疫患者由来の異種移植（免疫 P D X）モデルである、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

それを必要とする対象における自己免疫疾患またはがんを治療する方法であって、請求項 4 0 に記載の方法によって同定された免疫モジュレーターの有効量を前記対象に投与し、それにより前記対象における自己免疫疾患またはがんを治療することを含む、方法。

【請求項 6 1】

それを必要とする対象における自己免疫疾患またはがんを治療する方法であって、請求項 4 0 に記載の方法によって同定された免疫モジュレーターの調節物質の有効量を前記対象に投与し、それにより前記対象における自己免疫疾患またはがんを治療することを含む、方法。

【請求項 6 2】

前記免疫モジュレーターが、F O L H 1、F A S、I L 3 R A、C D 2 4 8、T H B D、B 7 . 1、G J B 1、O X 4 0 L、4 - 1 B B L および B 7 . 2 からなる群から選択される、請求項 6 0 または 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記免疫モジュレーターが、F L T 1、C X C R 6、S E M A 6 a、R H C E、F C R

10

20

30

40

50

L A、T N F R S F 1 9、S E C 2 2 b、B 3 G N T 1、N F A M 1 . L Y 6 および G P 1 B A からなる群から選択される、請求項 6 0 または 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記免疫モジュレーターの調節物質が、前記免疫調節物質の発現レベルおよび/または活性レベルを上昇させる、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記免疫モジュレーターの調節物質が、前記免疫調節物質の発現レベルおよび/または活性レベルを低下させる、請求項 6 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2015年10月14日に出願された米国仮特許出願第62/241,466への優先権の利益を主張し、当該出願の内容全体は、本明細書において参考として援用される。

【背景技術】

【0 0 0 2】

共シグナル伝達表面受容体-リガンド経路は、T細胞の生物学的ネットワークを厳密に制御するT細胞の活性化および阻害に必須である。過去の10年間で、この分野は、共シグナル伝達分子および経路を標的とし、自己免疫疾患および種々のがんを含む多くの疾患と闘う免疫調節治療アプローチの開発を見てきた。PD-1/B7-H1(PD-L1)経路を標的とする抗体の臨床試験およびFDA規制当局の承認が最近成功したことにより、広い範囲の進行したヒトがんにおける最小の有害作用を伴う前例のない臨床的応答がもたらされた(Brahmer, JRら、N Engl J Med 366巻(26号):2455~2465頁、2012年;Topalian, SLら、N Engl J Med 366巻(26号):2443~2454頁、2012年)。この治療のタイプは、有効性、毒性、および耐久性に関して他の治療よりも優れており、がん治療のための腫瘍部位T細胞免疫調節戦略の利点を代表する(Sznol MおよびChen L、Clin Cancer Res 19巻(5号):1021~1034頁、2013年)。しかしながら、この興奮させる応答にもかかわらず、がん患者の大部分は抗PD-1療法に応答しない。したがって、原発性および後天性免疫耐性にどのような他の因子が関わるか(Sznol MおよびChen L、Clin Cancer Res 19巻(5号):1021~1034頁、2013年)、PD-1/B7-H1経路の他にどのような追加機構が免疫回避の原因であるかを決定する強い必要性がある。ヒト細胞表面分子がどのようにT細胞応答を調節するかについての包括的な理解は、新規の免疫モジュレーターの同定を助け、新しい免疫療法剤の開発に重要な方向性を示す。

20

30

【0 0 0 3】

膜タンパク質は、細胞の機能において重要な役割を果たす。伝達は最も重要な役割の1つであり、細胞表面タンパク質は、受容体として作用し、細胞間でシグナルを伝えるか、あるいは内部および外部環境間で相互作用を媒介することができる。細胞が情報を収集し、シグナルを中継する手段として役立つのに加え、膜タンパク質は、トランスポーターとしても機能することができ、細胞膜を渡る物質の交換を制御することに関与している。膜タンパク質は、そのより接近可能な性質のため、治療薬の標的として特に興味深い。しかしながら、ほとんどのヒト膜タンパク質の免疫機能についてはほとんど知られておらず、ゲノムレベルでT細胞活性をアッセイするための十分に確立されたシステムはない。したがって、成功率を広げ、抗腫瘍および自己免疫療法を十分に活用するため、薬物潜在性を有する新規の免疫調節膜タンパク質を同定することができる組成物および方法については、進行中で未だ対処されていない必要性が存在する。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0 0 0 4】

50

【非特許文献1】Brahmer, JRら、N Engl J Med 366巻(26号):2455~2465頁、2012年

【非特許文献2】Topalian, SLら、N Engl J Med 366巻(26号):2443~2454頁、2012年

【非特許文献3】Sznol MおよびChen L、Clin Cancer Res 19巻(5号):1021~1034頁、2013年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、T細胞生物学的ネットワークの調節に關与するヒト膜タンパク質の同定を可能にする新規のゲノムスケールのT細胞活性アレイ(GS-TCAA)の開発に少なくとも部分的に基づく。GS-TCAAにより、新しい細胞ベースの蛍光レポーターシステムを使用して、90%を超える全ヒト膜遺伝子についての増殖、抑制、および消耗のような異なるT細胞活性の研究が可能となる。このアプローチは、ヒト細胞表面分子がどのようにしてT細胞応答を調節するかについて包括的な理解を提供し、新規の免疫モジュレーターの同定を援助する。GS-TCAAを用いて、自己免疫疾患およびがん中存在する未知の共シグナル伝達分子および経路を同定することによって、治療について標的化、同定および開発を行うことができる。

10

【0006】

したがって、一態様では、本発明は、複数のウェルを含む固体支持構造体を含むゲノムスケールのT細胞活性アレイ(GS-TCAA)であって、複数のウェルのそれぞれが：膜結合抗CD3抗体またはその抗原結合性断片を発現する第1の細胞であって、複数のヒト膜遺伝子の1つによってコードされるタンパク質の第1の細胞上の提示が可能になるように、複数のヒト膜遺伝子をコードするcDNAライブラリーでトランスフェクトされている、第1の細胞；細胞表面上の受容体およびレポーター遺伝子を発現する第2の細胞を含み；受容体と抗CD3抗体またはその抗原結合性断片との間の相互作用が、一次シグナルを提供し、第2の細胞株の活性を刺激し、レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、複数のヒト膜遺伝子の1つによってコードされる提示されたタンパク質が刺激性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を刺激することを示し、レポーター遺伝子の発現レベルの低下が、複数のヒト膜遺伝子の1つによってコードされる提示されたタンパク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を阻害することを示す、アレイを含む。

20

30

【0007】

一部の実施形態では、固体支持構造体はマルチウェルプレートである。他の実施形態では、マルチウェルプレートは、96ウェルプレート、384ウェルプレートおよび1536ウェルプレートからなる群から選択される。

【0008】

一部の実施形態では、第1の細胞はヒト293T細胞である。他の実施形態では、第1の細胞は、免疫関連アダプターを発現するヒト293T、2A細胞である。一部の実施形態では、免疫関連アダプターは、DAP10、DAP12、FcR およびCD3Eからなる群から選択される。

40

【0009】

一部の実施形態では、第2の細胞は免疫細胞である。他の実施形態では、免疫細胞は骨髓由来プレッサー細胞(MDSC)である。一部の実施形態では、免疫細胞はT細胞である。一部の実施形態では、T細胞は、Jurkat細胞、ナイーブT細胞、エフェクターT細胞、消耗T細胞(exhausted T cell)、アネルギーT細胞および制御性T細胞からなる群から選択される。

【0010】

一部の実施形態では、レポーター遺伝子は、細胞毒性関連レポーター構築物、アポトーシス関連レポーター構築物および増殖関連レポーター構築物からなる群から選択されるD

50

NA構築物に含まれる。他の実施形態では、細胞毒性関連レポーター構築物は蛍光ベースのレポーター構築物である。一部の実施形態では、アポトーシス関連レポーター構築物は蛍光ベースのレポーター構築物である。一部の実施形態では、蛍光ベースのレポーター構築物は、最小CMVプロモーターおよびGFPレポーター遺伝子が後に続くT細胞関連転写応答エレメントを含む。他の実施形態では、T細胞関連転写応答エレメントは、NF-kb、NF-AT、AP-1、EGR2、MAPKおよびPI3Kからなる群から選択される。一部の実施形態では、増殖関連レポーター構築物の中のレポーター遺伝子は、サイトカイン遺伝子である。一部の実施形態では、サイトカインは、IFN-ガンマ、TNF-アルファおよびIL-10からなる群から選択される。

【0011】

一部の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子は、受容体遺伝子、免疫グロブリン遺伝子、トランスポーター遺伝子およびシグナル伝達遺伝子から選択される遺伝子を含む。一部の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子は、約1,000~7,000個の遺伝子を含む。他の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子は、約2,000~5,000個の遺伝子を含む。さらに別の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子は、約4,000~7,000個の遺伝子を含む。

【0012】

一部の実施形態では、第2の細胞の活性は、細胞増殖、細胞抑制、細胞消耗、細胞アポトーシス、および細胞からのサイトカイン放出からなる群から選択される。

【0013】

一態様では、本発明は、ゲノムスケールのT細胞活性アレイ(GS-TCAA)を作製する方法であって、複数のウェルを含む固体支持構造体を提供するステップと；膜結合抗CD3抗体またはその抗原結合性断片を発現する第1の細胞を複数のウェルのそれぞれに培養するステップと；複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされるタンパク質の第1の細胞上への提示が可能になるように、複数のヒト膜遺伝子をコードするcDNAライブラリーで第1の細胞をトランスフェクトするステップ；および、細胞表面の受容体を発現する第2の細胞とレポーター遺伝子とを複数のウェルのそれぞれの中で共培養し、そのことにより、ゲノムスケールのT細胞活性アレイを調製するステップを含む、方法であって、受容体と抗CD3抗体またはその抗原結合性断片との間の相互作用が、一次シグナルを提供し、第2の細胞株の活性を刺激し、レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされる提示されたタンパク質が刺激性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を刺激することを示し、レポーター遺伝子の発現レベルの低下が、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされる提示されたタンパク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を阻害することを示す。

【0014】

一部の実施形態では、固体支持構造体はマルチウェルプレートである。一部の実施形態では、マルチウェルプレートは、96ウェルプレート、384ウェルプレートおよび1536ウェルプレートからなる群から選択される。

【0015】

一部の実施形態では、第1の細胞はヒト293T細胞である。他の実施形態では、第1の細胞は、免疫関連アダプターを発現するヒト293T.2A細胞である。一部の実施形態では、免疫関連アダプターは、DAP10、DAP12、FcR およびCD3Eからなる群から選択される。

【0016】

一部の実施形態では、第2の細胞は免疫細胞である。他の実施形態では、免疫細胞は骨髄由来サブレッサー細胞(MDSC)である。一部の実施形態では、免疫細胞はT細胞である。一部の実施形態では、T細胞は、Jurkat細胞、ナイーブT細胞、エフェクターT細胞、消耗T細胞、アネルギーT細胞および制御性T細胞からなる群から選択される。

。

10

20

30

40

50

【0017】

一部の実施形態では、レポーター遺伝子は、細胞毒性関連レポーター構築物、アポトーシス関連レポーター構築物および増殖関連レポーター構築物からなる群から選択されるDNA構築物に含まれる。他の実施形態では、細胞毒性関連レポーター構築物は蛍光ベースのレポーター構築物である。一部の実施形態では、アポトーシス関連レポーター構築物は蛍光ベースのレポーター構築物である。一部の実施形態では、蛍光ベースのレポーター構築物は、最小CMVプロモーターおよびGFPLレポーター遺伝子が後に続くT細胞関連転写応答エレメントを含む。他の実施形態では、T細胞関連転写応答エレメントは、NF-kb、NF-AT、AP-1、EGR2、MAPKおよびPI3Kからなる群から選択される。一部の実施形態では、増殖関連レポーター構築物の中のレポーター遺伝子は、サイトカイン遺伝子である。一部の実施形態では、サイトカインは、IFN-ガンマ、TNF-アルファおよびIL-10からなる群から選択される。

10

【0018】

一部の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子は、受容体遺伝子、免疫グロブリン遺伝子、トランスポーター遺伝子およびシグナル伝達遺伝子から選択される遺伝子を含む。一部の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子は、約1,000~7,000個の遺伝子を含む。他の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子は、約2,000~5,000個の遺伝子を含む。さらに別の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子は、約4,000~7,000個の遺伝子を含む。

20

【0019】

一部の実施形態では、第2の細胞の活性は、細胞増殖、細胞抑制、細胞消耗、細胞アポトーシス、および細胞からのサイトカイン放出からなる群から選択される。

【0020】

本発明の一態様は、免疫モジュレーターを同定する方法であって、本明細書に記載のようにゲノムスケールのT細胞活性アレイ(GS-TCAA)を提供するステップ；第1の細胞の中の複数のヒト膜遺伝子の1つを発現させるステップ、第1の細胞および第2の細胞を共培養するステップ；第2の細胞中のレポーター遺伝子の発現レベルを検出するステップ；およびレポーター遺伝子の発現レベルを対照の第2の細胞中のレポーター遺伝子の発現レベルと比較するステップであって、対照の第2の細胞が、複数のヒト膜遺伝子の1つでトランスフェクトされていない対照の第1の細胞と共培養されている、ステップを含み、レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされる提示されたタンパク質が刺激性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を刺激することを示し、レポーター遺伝子の発現レベルの減少が、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされる提示されたタンパク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を阻害することを示し、それによって免疫モジュレーターが同定される。

30

【0021】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、FOLH1、FAS、IL3RA、CD248、THBD、B7.1、GJB1、OX40L、4-1BBLおよびB7.2からなる群から選択される。他の実施形態では、免疫モジュレーターは、FLT1、CXCR6、SEMA6a、RHCE、FCRLA、TNFRSF19、SEC22b、B3GNT1、NFAM1.LY6およびGP1BAからなる群から選択される。一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、FLT1、SEMA6a、SEC22bおよびGP1BAからなる群から選択される。

40

【0022】

一部の実施形態では、本方法は自動化される。他の実施形態では、本方法はロボット工学を用いて実行される。一部の実施形態では、本方法はロボット液体操作技術を使用して実行される。他の実施形態では、本方法は自動プレート操作システムを使用して実行される。

【0023】

50

一部の実施形態では、本方法は、*in vitro*機能アッセイ、*in vivo*アッセイ、受容体アレイアッセイ、バイオインフォマティクスアッセイ、またはそれらの組合せからなる群から選択されるアッセイを実行することをさらに含む。

【0024】

一部の実施形態では、*in vitro*機能アッセイは、複数のヒト膜遺伝子の1つおよび膜結合抗CD3抗体またはその抗原結合性断片を発現する第2の細胞を初代T細胞と共に培養するステップ；および増殖アッセイ、アポトーシスアッセイおよびサイトカイン放出アッセイからなる群から選択される*in vitro*機能アッセイを実行することを含む。一部の実施形態では、初代T細胞は、ヒト初代CD8細胞および/またはヒト初代CD4細胞である。

10

【0025】

一部の実施形態では、受容体アレイアッセイは、免疫モジュレーターの相互作用タンパク質を同定するために実行される。他の実施形態では、受容体アレイは：複数のウェルを含む固体支持構造体を含み、複数のウェルのそれぞれが：複数の受容体遺伝子のうちの1つによってコードされる受容体の細胞上での提示が可能になるように、複数の受容体遺伝子をコードするcDNAライブラリーでトランスフェクトされた細胞；タグと融合した免疫モジュレーターを含む組換えタンパク質；タグに特異的な蛍光標識された抗体を含み；検出可能な蛍光シグナルは、免疫モジュレーターが受容体と相互作用することの指標である。

20

【0026】

一部の実施形態では、タグは、マウスIgG2aFcタグ、ヒトIgG1Fcタグ、FLAGタグおよび6xHisタグからなる群から選択される。一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、免疫モジュレーターの全長タンパク質である。他の実施形態では、免疫モジュレーターは、免疫モジュレーターの細胞外ドメインである。

【0027】

一部の実施形態では、*in vivo*アッセイは、自己免疫疾患またはがんの動物モデルに免疫モジュレーターを投与することを含む。一部の実施形態では、動物モデルは、ヒトメラノーマ細胞および腫瘍反応性T細胞を注射されたNOD-scidIL2Rガンマ^{0/11}マウスモデルである。他の実施形態では、動物モデルはヒト化マウスモデルである。さらに別の実施形態では、ヒト化マウスモデルは、免疫患者由来の異種移植（免疫PDX）モデルである。

30

【0028】

本発明の1つの態様は、本明細書に記載の方法によって同定された有効量の免疫モジュレーターを対象に投与し、それにより対象における自己免疫疾患またはがんを治療することを含む、それを必要とする対象における自己免疫疾患またはがんを治療する方法を提供する。

【0029】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、FOLH1、FAS、IL3RA、CD248、THBD、B7.1、GJB1、OX40L、4-1BBLおよびB7.2からなる群から選択される。他の実施形態では、免疫モジュレーターは、FLT1、CXCR6、SEMA6a、RHCE、FCRLA、TNFRSF19、SEC22b、B3GNT1、NFAM1.LY6およびGP1BAからなる群から選択される。

40

【0030】

本発明の別の態様は、本明細書に記載の方法によって同定された免疫モジュレーターの調節物質の有効量を対象に投与し、それにより、対象における自己免疫疾患またはがんを治療することを含む、それを必要とする対象における自己免疫疾患またはがんを治療する方法を特徴とする。

【0031】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、FOLH1、FAS、IL3RA、CD248、THBD、B7.1、GJB1、OX40L、4-1BBLおよびB7.2から

50

なる群から選択される。他の実施形態では、免疫モジュレーターは、FLT1、CXCR6、SEMA6a、RHCE、FCRLA、TNFRSF19、SEC22b、B3GNT1、NFAM1、LY6およびGP1BAからなる群から選択される。一部の実施形態では、免疫モジュレーターの調節物質は、免疫調節物質の発現レベルおよび/または活性レベルを上昇させる。他の実施形態では、免疫モジュレーターの調節物質は、免疫調節物質の発現レベルおよび/または活性レベルを低下させる。

【0032】

本発明は、特許請求の範囲に記載された本発明の範囲を限定するものではない以下の図面および詳細な説明によって説明される。

【図面の簡単な説明】

10

【0033】

【図1】図1Aは、ゲノムスケールのT細胞活性アレイ(GS-TCAA)の基本原則を図示的に表す図である。簡潔には、膜結合抗ヒトCD3抗体ScFv(293T、2A/m抗CD3)を安定に発現する293T、2A細胞は、Jurkat/レポーター細胞においてT細胞活性化を刺激し、検出可能なGFPシグナルを生成する。cDNAライブラリーからの個々の膜遺伝子のトランスフェクションは、潜在的にT細胞活性の結果に影響を及ぼす。分子が有効でない場合、GFPシグナルは同様のままである。分子が刺激性である場合、より強いGFPシグナルが検出される。分子が阻害性である場合、より弱いGFPシグナルが観察される。図1Bは、CD5L遺伝子のシグナルペプチド配列を含み、抗CD3 ScFvおよび膜付着配列により隣接されている膜結合抗ヒトCD3抗体ScFv構築物を、図示的に表す図である。図1Cは、T細胞関連転写因子応答エレメント(TFRE)に続いて最小CMVプロモーターおよびGFPレポーター遺伝子を含むGFPレポーター構築物を、図示的に表す図である。

20

【0034】

【図2】図2Aは、m抗CD3構築物でトランスフェクトされた293T、2A細胞およびGFPレポーターを発現するJurkat細胞を、T細胞活性に刺激性である膜遺伝子を検出するために用いる有効性を示す図である。簡潔には、293T、2A細胞は、mock構築物(ctrl)、他のT細胞関連膜遺伝子(例えば、B7.2、B7-H1、B7-H3およびB7-H4)を有するかまたは有さないm抗CD3プラスミドでトランスフェクトし、その後、精製ヒトT細胞またはPBMと共培養した。チミジン取り込み(thymidine incorporation)によって示されたT細胞増殖が、48時間後に現れた。図2Bは、m抗CD3プラスミドトランスフェクションを伴うまたは伴わない293T、2A細胞をJurkat/NF-Kb GFP細胞と共に共培養したとき、共培養の12時間後、GFPシグナルがm抗CD3を有する細胞においてのみ検出されたことを示す画像である。1536イメージングプレートにおいてデータを取得した。

30

【0035】

【図3】図3は、GS-TCAAからT細胞活性に対する刺激または阻害機能のいずれかで同定された膜遺伝子を示す一連の画像である。簡潔には、293T、2A細胞を、mock構築物(ctrl)、他のT細胞関連膜遺伝子を有するかまたは有さないm抗CD3プラスミドでトランスフェクトし、その後、Jurkat/NF-Kb GFP細胞と共に共培養した。共培養の12時間後にGFPシグナルが検出された。1536イメージングプレートにおいてデータを取得した。

40

【0036】

【図4】図4は、T細胞活性に対する刺激または阻害機能のいずれかを有するGS-TCAAから同定された膜遺伝子を示す図である。簡潔には、293T、2A細胞に、mock構築物(ctrl)、他のT細胞関連膜遺伝子を有するかまたは有さないm抗CD3プラスミドをトランスフェクトし、その後、Jurkatと共培養した。IFN-放出を定量化した。

【0037】

【図5】図5は、GS-TCAAヒットの代表的な分析を示すグラフである。T細胞活性

50

に対して刺激機能を有する膜遺伝子でトランスフェクトされた細胞は、対照よりも高い GFP 値を持ち、T 細胞活性に対して阻害機能を有する膜遺伝子でトランスフェクトされた細胞は、より低い GFP 値をもたらした。

【0038】

【図6】図6は、オンコミンデータベース (Oncomine、Thermo Fisher) の分析による様々なタイプのがんにおける FLT1 の示差的発現を示すグラフである。

【0039】

【図7】図7は、オンコミンデータベース (Oncomine、Thermo Fisher) の分析による様々なタイプのがんにおける SEMA6a の示差的発現を示すグラフである。

10

【0040】

【図8】図8は、オンコミンデータベース (Oncomine、Thermo Fisher) の分析による様々なタイプのがんにおける SEC22b の示差的発現を示すグラフである。

【0041】

【図9】図9は、オンコミンデータベース (Oncomine、Thermo Fisher) の解析による様々なタイプのがんにおける GP1BA の示差的発現を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

20

【0042】

本発明は、新規の免疫モジュレーター、例えば T 細胞を調節する免疫モジュレーターを同定するために使用することができる新規なゲノムスケールの T 細胞活性アレイ (GS-TCAA) の開発に少なくとも部分的に基づく。GS-TCAA は、新しい細胞ベースの蛍光レポーターシステムを使用した、全ヒト膜遺伝子の 90% より多くにおける増殖、抑制、および消耗のような異なる T 細胞活性の研究を可能にする。このアプローチは、ヒト細胞表面分子がどのように T 細胞応答を調節し、新規な免疫モジュレーターの同定を援助するかについての包括的な理解を提供する。GS-TCAA を用いて、治療は、自己免疫疾患およびがんが存在する未知の共シグナル伝達分子および経路を同定することによって、標的化、同定および開発することができる。

30

【0043】

したがって、本発明は、一実施形態では、ゲノムスケールの T 細胞活性アレイ (GS-TCAA)、およびゲノムスケールの T 細胞活性アレイ (GS-TCAA) の作製方法を提供する。本発明の別の実施形態では、ゲノムスケールの T 細胞活性アレイ (GS-TCAA) を使用する免疫モジュレーターの同定に関する方法を含む。さらなる実施形態では、本発明は、免疫モジュレーターおよび/または免疫モジュレーターの調節物質を対象に投与することによって、自己免疫疾患またはがんを治療するための方法および組成物を含む。

I. 定義

【0044】

本発明をより容易に理解できるように、特定の用語を最初に定義する。

40

【0045】

本明細書中で他に定義されない限り、本発明に関連して使用される科学技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。しかしながら、用語の意味および範囲は明確であるべきであるが、潜在的な曖昧性がある場合は、本明細書において提供される定義が任意の辞書または外的な定義よりも優先される。

【0046】

本明細書において他に指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、本発明を記載する文脈における用語「1つの (a)」および「1つの (an)」および「その (the)」ならびに同様の参照対象の使用は (特に以下の特許請求の範囲の文脈におい

50

て)、単数形および複数形の両方(すなわち、1つまたは複数)を包含するものと解釈されるべきである。用語「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」および「含む(containing)」は、他に注釈がない限り、オープンエンドの用語(すなわち、「を含むが、これらに限定されない」という意味)として解釈されるべきである。本明細書における値の範囲の記述は、本明細書中に他の指示がない限り、記述された、またはその範囲内に入るそれぞれ別個の値を個別に参照する省略的な方法として役立つように意図されているのみであり、それぞれ別個の値は、あたかも個別に記述されているかのように本明細書に組み込まれる。本明細書中に提供される範囲は、範囲内の全ての値についての省略表現であると理解される。例えば、1から50の範囲とは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50からなる群から、任意の数、数字の組合せを含むかまたは10~40、20~50、5~35、等からなる群からの部分範囲を含むことと理解される。

10

20

30

40

50

【0047】

本明細書に記載されているように、用語「ウェル」は、一般的に、容器の中の有界領域のことを指し、離散的であっても(例えば、単離された試料を提供するため)、または1つまたは複数の他の有界領域と通じていても(例えば、ウェル内の1つまたは複数の試料間の流体連絡を提供するため)よい。例えば、基板上で増殖した細胞は、通常、生細胞のための培養培地を含むこともできるウェルの中に含まれる。基板は、プラスチック、ガラスなどのような任意の適した材料を含むことができる。プラスチックは、*in vitro*での細胞の維持および/または増殖のために従来から使用されている。

【0048】

「マルチウェルプレート」は、アレイ中に複数のウェルを含む基板の一例である。本発明において有用なマルチウェルプレートは、様々な標準的なフォーマット(例えば、2、4、6、24、96、384、または1536個などのウェルを有するプレート)の任意のものであり得るが、以下でさらに詳細に記載される非標準フォーマットであってもよい。

【0049】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞」は、原核細胞および真核細胞を含む。一実施形態では、本発明のアレイおよび方法における使用に適した細胞は、細菌細胞である。別の実施形態では、本発明のアレイおよび方法における使用に適した細胞は、酵母細胞のような真菌細胞である。別の実施形態では、本発明のアレイおよび方法における使用に適した細胞は、鳥類細胞または哺乳動物細胞のような脊椎動物細胞である。好ましい実施形態では、本発明のアレイおよび方法における使用に適した細胞は哺乳動物細胞である。

【0050】

本明細書で使用される場合、用語「免疫細胞」は、造血起源であり、免疫応答において役割を果たす細胞を含む。免疫細胞には、自然免疫系の細胞および適応免疫系の細胞が含まれる。免疫細胞としては、例えば、B細胞およびT細胞のようなリンパ球；ナチュラルキラー細胞；単核球、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好塩基球、および顆粒球のような骨髄細胞が挙げられる。

【0051】

一実施形態では、免疫細胞は自然免疫系の細胞である。「自然免疫系」は、より特異的な適応免疫系が特異的抗体および/またはT細胞を産生することができるまで、薬剤への身体の応答を制御する非特異的免疫系である(Modlinら、N. Engl. J. Med 1999年、340巻：1834~1835頁)。自然免疫系は、一般に、食細胞(例えば、好中球、単核球およびマクロファージ)；炎症性メディエーターを放出する細胞(例えば、好塩基球、肥満細胞および好酸球)；ナチュラルキラー細胞(NK細胞)；および樹状細胞(DC)を含む。対照的に、「適応性のある」または「獲得された免疫系」は、その応答

において非常に特異的である。それは、病原体の感染に対する適応として個体の生存期間中に起こるため、適応系と呼ばれる。適応免疫は、ワクチン（抗原）に应答するものとして、もしくは抗体を投与することによって、人工的に獲得することができ、または感染によって自然に獲得することができる。

【0052】

本明細書中で使用される場合、「抗原提示細胞」は、その表面上に主要組織適合複合体（MHC）と複合体化した外来抗原を提示し、その後、T細胞受容体を用いてT細胞によって認識される細胞を指す。抗原提示細胞は、MHC分子を構成的に発現する細胞（例えば、Bリンパ球、単核球、樹状細胞、およびランゲルハンス細胞）ならびにMHC分子を構成的に発現しない他の抗原提示細胞（例えば、ケラチノサイト、内皮細胞、星状細胞、線維芽細胞、および希突起膠細胞）を含む。

10

【0053】

本明細書中で使用される場合、用語「T細胞」（すなわち、Tリンパ球）は、哺乳動物（例えばヒト）からの胸腺細胞、未成熟T細胞、成熟T細胞などを含むT細胞系統内の全ての細胞を含むことが意図される。T細胞は、CD4またはCD8のいずれかを発現し、その両方ではなく、およびT細胞受容体を発現する成熟T細胞を含む。本明細書に記載の様々なT細胞集団は、それらのサイトカインプロファイルおよびその機能に基づいて定義することができる。

【0054】

本明細書中で使用される場合、用語「ナイーブT細胞」は、同種抗原に曝露されていないT細胞であって、そのため活性化されていない細胞または記憶細胞を含む。ナイーブT細胞は循環的（cycling）ではなく、ヒトナイーブT細胞はCD45RA+である。ナイーブT細胞が抗原を認識し、抗原の量、投与経路および投与のタイミングに依存するが、これらに限定されない追加のシグナルを受ける場合、それらは増殖し、様々なT細胞のサブセット、例えばエフェクターT細胞に分化し得る。

20

【0055】

本明細書中で使用される場合、用語「エフェクターT細胞」は、抗原を排除するように機能する（例えば、他の細胞の活性化を調節するサイトカインの産生によって、または細胞傷害活性によって）T細胞を含む。用語「エフェクターT細胞」は、Tヘルパー細胞（例えば、Th1およびTh2細胞）および細胞傷害性T細胞を含む。Th1細胞は、遅延型過敏性应答およびマクロファージ活性化を仲介するが、Th2細胞は、B細胞への補助を提供し、アレルギー应答において重要である（MosmannおよびCoffman、1989年、Annu.Rev.Immunol. 7巻、145～173頁；PaulおよびSeder、1994年、Cell 76巻、241～251頁；ArthurおよびMason、1986年、J. Exp. Med. 163巻、774～786頁；Paliardら、1988年、J.Immunol. 141巻、849～855頁；Finkelmanら、1988年、J Immunol. 141巻、2335～2341頁）。

30

【0056】

本明細書中で使用される場合、用語「制御性T細胞」は、低レベルのIL-2、IL-4、IL-5およびIL-12を産生するT細胞を含む。制御性T細胞は、エフェクターT細胞よりも低いレベルではあるものの、TNF、TGF、IFN-、およびIL-10を産生する。TGFは制御性T細胞によって産生される主なサイトカインであるが、サイトカインはTh1またはTh2細胞よりも低いレベル、例えばTh1またはTh2細胞よりも一桁低いレベルで産生される。制御性T細胞は、細胞のCD4+CD25+集団において見出すことができる（例えば、WaldmannおよびCobbold、2001年、Immunity. 14巻：399頁を参照のこと）。制御性T細胞は、培地内において活性化シグナル（例えば、抗原および抗原提示細胞またはMHCの背景で抗原を模倣するシグナル、例えば、抗CD3抗体プラス抗CD28抗体）で刺激されたTh1、Th2、またはナイーブT細胞の増殖およびサイトカイン産生を活発に抑制する。

40

【0057】

本明細書中で使用される場合、用語「消耗T細胞」は、T細胞機能の段階的かつ進行的

50

な喪失を特徴とする機能不全のT細胞を指し、応答する細胞が物理的に欠失することが結果的にあり得る。消耗T細胞は、慢性感染症およびがんの間に生じ得る。例えば、消耗は、慢性リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染の際によく定義されており、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルス感染を含む重大な公衆衛生上の懸念がある多くの慢性感染の後に起こる抗原持続の条件下で一般に発生する（例えば、John Wherry、Nature Immunology 12巻、492～499頁、2011年を参照されたい）。

【0058】

本明細書中で使用される場合、用語「アネルギー性T細胞」とは、機能的に不活性化され、完全共刺激の存在下で抗原に遭遇しても生産的応答を開始することができないT細胞を指す（例えば、Macian F.ら、Curr Opin Immunol. 2004年、16巻（2号）：209～16頁）。T細胞アネルギーは、リンパ球が抗原遭遇の後、本質的に機能的に不活性化されるが、反応性低下状態で長期間生存し続ける耐性機構である。CD4+およびCD8+細胞の両方に影響を及ぼすT細胞アネルギーのモデルは、2つの広いカテゴリーに分類される。1つは、クローンアネルギーであり、主に増殖停止状態であるが、他方は、適応耐性または*in vivo*アネルギーであり、増殖およびエフェクター機能のより一般的な阻害を表す（例えば、Schwartz RH. Annu Rev Immunol. 2003年；21巻：305～34頁を参照されたい）。

10

【0059】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫モジュレーター」は、免疫系を調節することができるGS-TCAAを用いて同定された任意の分子を指す。例えば、本発明のアレイおよび方法によって同定された免疫モジュレーターは、T細胞活性を調節する分子である。例えば、免疫モジュレーターは、T細胞活性を上昇させ得るか、またはT細胞活性を低下させ得る。免疫モジュレーターは、自己免疫疾患および/またはがんを治療するために使用され得る。

20

【0060】

本明細書で使用される場合、用語「免疫モジュレーターの調節物質」は、上に記載のような免疫モジュレーターの発現および/または活性を調節することができる任意の薬剤を指す。免疫モジュレーターの調節物質は、免疫モジュレーターの発現および/または活性を上昇または低下させることができる。一実施形態では、免疫モジュレーターの調節物質は、免疫モジュレーターに直接作用し、例えば、それは免疫モジュレーターに結合し、その機能を活性化または阻害させる抗体である。免疫モジュレーターの調節物質もまた、自己免疫疾患および/またはがんを治療するために使用され得る。

30

【0061】

用語「培養する」は、様々な種類の培地上または培地中の細胞または生物体の*in vitro*増殖を指す。培地中で増殖された細胞の子孫は、親細胞と完全に同一ではない（すなわち、形態学的に、遺伝的に、または表現型的に）ことがあり得ることは理解される。

【0062】

本明細書で使用する用語「相互作用する」は、例えば蛍光ベースの検出方法、酵母ツーハイブリッドアッセイ、クロマチン免疫沈降、または共免疫沈降を用いて検出することができるような、分子間の検出可能な相互作用を含むことが意味される。用語「相互作用する」は、分子間の「結合」相互作用を含むこともまた意味する。相互作用は、実際には、タンパク質-タンパク質またはタンパク質-核酸であり得る。

40

【0063】

用語「トランスフェクション」は、核酸、タンパク質または他の巨大分子が発現されるかまたは細胞内で生物学的機能を有するように、核酸、タンパク質または他の巨大分子の標的細胞への送達を意味するために、本明細書において使用される。

【0064】

用語「蛍光」は、より短い波長の光子の分子吸収によって引き起こされる光の放出である「蛍光」（または「フォトルミネッセンス」）を発することができる任意の物質または

50

薬剤を指す。したがって、蛍光は、フルオロフォアから発するより長い波長の蛍光「発光」とは異なる「励起光源」に依存する。蛍光発光を検出するためには、発光にのみ応答し、励起光には応答しない検出器が必要である。

II. ゲノムスケールのT細胞活性アレイ (GS-TCAA)

【0065】

一態様では、本発明は、ゲノムスケールのT細胞活性アレイ (GS-TCAA) を特徴とする。本発明のアレイは、複数のウェルを含む固体支持構造体を含み、複数のウェルのそれぞれは、第1の細胞および第2の細胞を含む。第1の細胞は、膜結合抗CD3抗体またはその抗原結合性断片を発現し、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされたタンパク質の第1の細胞上での提示が可能になるように、複数のヒト膜遺伝子をコードするcDNAライブラリーでトランスフェクトもされている。第2の細胞は、第1の細胞上に提示される抗CD3抗体またはその抗原結合性断片と相互作用する受容体をその細胞表面上に発現し、第2の細胞の活性を刺激する一次シグナルを提供する。さらに、第2の細胞はレポーター遺伝子を発現し、レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、第1の細胞にトランスフェクトされた複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされる提示されたタンパク質が刺激性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を刺激することを示し、レポーター遺伝子の発現レベルの低下が、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされる提示されたタンパク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を阻害することを示す。

10

【0066】

本発明で使用される固体支持構造体は、培養細胞を保持し、増殖を可能にさせることに適した任意の支持体であり得る。固体支持体として使用されるために適した材料には、プラスチック、ガラス、ポリマー、金属などが含まれるが、これらに限定されない。一実施形態では、固体支持体はマルチウェルプレートである。本発明において有用なマルチウェルプレートは、例えば、4ウェルプレート、6ウェルプレート、24ウェルプレート、96ウェルプレート、384ウェルプレート、および1536ウェルプレートのような、種々の標準的なフォーマットのいずれかであってよい。あるいは、本発明で使用されるマルチウェルプレートは、例えば、少なくとも500個、少なくとも1000個、少なくとも1500個または少なくとも2000個のウェルを有するプレートのような非標準フォーマットであってよい。

20

30

【0067】

本発明のアレイにおける使用に適した細胞には、真核細胞および原核細胞の全てのタイプが含まれる。好ましい実施形態では、細胞は真核細胞、特に哺乳動物細胞である。特定の実施形態では、本発明のアレイに使用される細胞は、少なくとも1つの異種核酸配列を用いて形質転換された細胞のような、遺伝子操作された細胞である。そのような核酸分子は、T細胞受容体または任意のヒト膜タンパク質をコードし得る。遺伝子操作された細胞は、複数の異種核酸配列を含むことができる。本明細書に記載の核酸配列または分子は、DNA、RNA、もしくはハイブリッドまたはDNAもしくはRNAのいずれかの誘導體であり得る。本発明のアレイにおいて使用するための核酸分子は、核酸分子（例えば、転写または翻訳制御領域）、完全長または部分コード領域、およびそれらの組合せの発現を制御する調節領域を含むことができる。核酸分子の任意の部分は：(1) その天然の環境から分子を単離すること；(2) 組換えDNA技術（例えば、PCR増幅、クローニング）を用いること；または(3) 化学合成法を用いることにより、生産することができる。遺伝子は、例えば、その遺伝子によってコードされる細胞表面受容体の産生を制御する制御領域（例えば、転写、翻訳または翻訳後制御領域のような、ただしこれに限定されない）ならびにコード領域自体のような天然の細胞表面受容体遺伝子に関連する全ての核酸配列を含む。

40

【0068】

核酸分子には、タンパク質をコードする天然核酸分子の機能的等価物またはタンパク質により結合させることができる天然核酸配列の機能的等価物を含むことができる。天然の

50

核酸分子の機能的等価物には、そのような配列にコードされる産物の機能に悪影響を及ぼすことなく、ヌクレオチドがそのような分子に挿入、欠失、置換および/または逆位された、天然の対立遺伝子変異体および修飾核酸分子を含むことができるが、それに限定されない。一部の実施形態では、核酸はヒト膜タンパク質をコードする。一部の実施形態では、核酸はレポーター遺伝子である。

【0069】

本発明のアレイにおける使用に適した細胞への異種の核酸分子（例えば、異種の細胞表面受容体をコードする核酸分子）の形質転換は、そのことにより遺伝子を細胞に挿入することができる任意の方法によって達成することができる。形質転換技術には、トランスフェクション、レトロウイルス感染、エレクトロポレーション、リポフェクション、細菌輸送およびスフェロプラスト融合が含まれるが、これらに限定されない。本発明のアレイの使用に適した細胞に形質転換された核酸分子は、染色体外ベクター（一過性トランスフェクション）上に残るか、または細胞ゲノムに組み込まれ得る（安定なトランスフェクション）。安定な細胞株を生成するために、目的の遺伝子および適切なウイルス転写プロモーターを、抗生物質、例えばネオマイシンのような増殖抑制化合物に対する耐性を付与する選択マーカーを含む、プラスミドまたはレトロウイルスのような適切なベクターに挿入する。DNA構築物は、細胞に導入され、宿主細胞株のゲノムに安定に組み込まれて、操作された細胞が耐性である適切な抗生物質の存在下で選択的に培養され得る安定な細胞株を提供する。あるいは、アデノウイルスベクターを用いて、宿主細胞の一過性形質導入を適切に行うことができる。ベクターDNA分子は宿主クロマチンへ組み込まれないが、細胞型に依存して典型的に24~96時間の寿命を有する染色体外分子として存在する。

10

20

【0070】

細胞内での本発明の核酸分子の発現は、当業者に公知の技術を用いて達成することができる。簡潔には、核酸分子は、遺伝子が宿主細胞に形質転換された時に、遺伝子の構成的発現または調節発現のいずれかが可能であるように、核酸分子が転写制御配列に作動可能に連結される様式で発現ベクターに挿入される。本明細書で使用される語句「組換え分子」は、発現ベクター上の少なくとも1つの転写制御配列に作動可能に連結された遺伝子を指す。本明細書で使用される語句「発現ベクター」は、宿主細胞を形質転換することができ、宿主細胞内で複製することができ、作動可能に連結された遺伝子の発現に影響を及ぼすことができるDNAまたはRNAベクターを指す。発現ベクターは、その固有の特性に依存して、高いかまたは低いコピー数のいずれかに複製することができる。産生されるタンパク質の量を制御することができる転写制御配列には、転写の開始、伸長および終結を制御する配列が含まれる。特に重要な転写制御配列は、プロモーターおよび上流活性化配列のような転写開始を制御するものである。

30

【0071】

発現システムは、当業者に公知の方法を用いて核酸配列に作動可能に連結された任意の公知の制御エレメントから構築することができる。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら、1989年、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Pressを参照されたい。

【0072】

好ましい実施形態では、複数のヒト膜遺伝子が、これらの遺伝子が発現され、細胞表面上に個別に提示され得るように、第1の細胞にトランスフェクトされる。このことを達成するために、実施例のセクションに記載の最適化された逆転写プロトコールを使用してもよい。あるいは、遺伝子の発現および個々の提示は、レトロウイルス形質導入、レンチウイルス形質導入、リポフェクションおよびCRISPRを含むが、これらに限定されない任意の公知の遺伝子導入技術によって達成され得る。

40

【0073】

本発明の固体支持構造体中の第1の細胞は、ヒト膜遺伝子、例えばヒト293T細胞のトランスフェクションおよび発現に適した当技術分野で公知の任意の標準的細胞であり得る。あるいは、第1の細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。第1

50

の細胞の他の例は、C O S - 7 細胞である。好ましい実施形態では、第 1 の細胞は、免疫関連アダプターを発現するヒト 2 9 3 T . 2 A 細胞である。免疫関連アダプターの例としては、D A P 1 0、D A P 1 2、F c R および C D 3 E が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の第 2 の細胞は、その活性が第 1 の細胞上に提示されるタンパク質との相互作用により調節される免疫細胞である。一部の実施形態では、本発明のアレイにおける第 2 の細胞は免疫細胞、例えば、T 細胞である。例示的な T 細胞には、J u r k a t 細胞、ナイーブ T 細胞、エフェクター T 細胞、消耗 T 細胞、アネルギー T 細胞および制御性 T 細胞が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、第 2 の細胞は、骨髄由来サブレッサー細胞であってもよい。

【 0 0 7 4 】

一部の実施形態では、本発明のアレイにおける第 2 の細胞は、細胞アッセイセンサーまたは、例えば、細胞アッセイの読み取り値を提供するために、蛍光タンパク質もしくは酵素を発現するレポーター遺伝子のような検出可能なレポーターを安定に発現するように操作される。一部の実施形態では、レポーター遺伝子は、レポーター遺伝子の発現を駆動する誘導性転写制御エレメントを含む構築物の中に含まれる。一部の実施形態では、レポーター構築物は細胞毒性関連レポーター構築物である。他の実施形態では、レポーター構築物は、アポトーシス関連レポーター構築物である。さらに別の実施形態では、レポーター構築物は、増殖関連レポーター構築物である。

【 0 0 7 5 】

レポーター遺伝子技術は、シグナル伝達および遺伝子発現に関する細胞事象をモニターするために広く使用される。本発明の文脈において、レポーター遺伝子という用語は、バックグラウンドに対して簡単に区別することができる容易に測定可能な表現型を用いて、例えば T 細胞のような細胞の活性に対するヒト膜遺伝子の効果の検出を可能にする遺伝子を指すために使用される。レポーター遺伝子構築物は、例えば、緑色蛍光タンパク質 (G F P) の発現のための T 細胞関連転写応答エレメントを使用して、レポーター遺伝子の発現を駆動する誘導性転写制御エレメントを含む。例示的な T 細胞関連転写応答エレメントには、N F - k B、N F - A T、A P - 1、E G R 2、M A P K および P I 3 K が含まれるが、これらに限定されない。本発明のアレイに使用するのに適したレポーター遺伝子には、酵素、蛍光タンパク質、光タンパク質、融合タンパク質およびエピトープタグが含まれるが、これらに限定されない。酵素レポーター遺伝子の例には、ベータ - ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ - ラクタマーゼ、ルシフェラーゼおよびニトロ還元酵素が含まれるが、これらに限定されない。蛍光タンパク質の例としては、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 緑色蛍光タンパク質 (G F P) およびその変異体 (例えば、シアン蛍光タンパク質および黄色蛍光タンパク質) が挙げられるが、これらに限定されない。好適な光タンパク質としては、エクオリンが挙げられるが、これに限定されない。あるいは、本発明のレポーター遺伝子は、サイトカイン遺伝子である。例示的なサイトカイン遺伝子には、I F N - ガンマ、T N F - アルファおよび I L - 1 0 が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 6 】

本発明に従って行い得るレポーター遺伝子アッセイの一例は、例えば E G F P、Y F P、または B F P のような G F P またはその任意の変異体から誘導され得る蛍光タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子の導入によって操作される細胞を使用しており (Shaner, N.C.ら、Nat.Methods、2 0 0 5 年、2 巻 (1 2 号)、9 0 5 ~ 9 頁)、核酸分子は、例えば、N F - k B、N F - A T、A P - 1、E G R 2、M A P K および P I 3 K を含むがこれらに限定されない T 細胞関連転写応答エレメントのような発現制御配列に作動可能に連結され、制御される。その後、T 細胞の活性を測定する手段として、G F P または機能的な G F P アナログの蛍光放出をモニターする。本方法は、第 1 の細胞にトランスフェクトされた膜遺伝子の、第 2 の細胞の全体の活性に対する効果を検出および比較するために使用され得る。

【 0 0 7 7 】

10

20

30

40

50

本発明のアレイは、複数のヒト膜遺伝子をコードする cDNA ライブラリーもまた含む。cDNA ライブラリーを生成する方法は、当技術分野で周知である。簡潔には、cDNA ライブラリーを構築するための古典的方法において、まず mRNA を特定の細胞から単離し、その後、このプロセスの連続工程において異なる酵素およびアルカリで処理する。平行して、ベクター（例えば、プラスミド pBR322）は、合成された cDNA の挿入が可能ないように処理される。cDNA および前処理されたベクターのアニーリングの後、適した宿主（例えば、E. coli K12 株）をベクター-cDNA 構築物で形質転換し、適した基質上にプレティングし、インキュベートする。このようにして得られた形質転換した細胞からの全てのコロニーが cDNA ライブラリーを構成する（Gublerら、Gene、25 巻（2～3 号）：263～269 頁、1983 年）。一部の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子には、約 1,000～7,000 の遺伝子、約 2,000～5,000 の遺伝子、約 4,000～7,000 の遺伝子または約 100～5,000 の遺伝子が含まれる。例えば、複数のヒト膜遺伝子には、少なくとも約 500、1000、2000、3000、4000、5000、6000 または 7000 個のヒト膜遺伝子が含まれる。一部の実施形態では、複数のヒト膜遺伝子には、全ヒト膜遺伝子の 90% より多くをカバーする 6,000 を超えるヒト膜遺伝子が含まれる。

10

【0078】

本発明のアレイにおいて使用するための膜遺伝子は、ヒト膜ゲノムの全スペクトルを表す。一部の実施形態では、膜遺伝子は受容体遺伝子である。他の実施形態では、膜遺伝子はシグナル伝達遺伝子である。さらに別の実施形態では、膜遺伝子は免疫グロブリン遺伝子である。一部の実施形態では、膜遺伝子はトランスポーター遺伝子である。

20

【0079】

本発明のアレイは、T 細胞上の T 細胞受容体が抗原提示細胞上で抗原/MHC 複合体と相互作用するか、または MHC（例えば、抗 CD3 抗体）の背景において抗原を模倣するシグナルが起きる、細胞増殖、抑制、消耗、細胞毒性、アポトーシス、およびサイトカイン放出を含むがこれらに限定されない種々の T 細胞活性のスクリーニングを可能にする。本明細書中で使用される場合、T 細胞の「活性化」とは、T 細胞増殖、T 細胞分化、および/または細胞産物（例えば、サイトカイン）の産生をもたらす、T 細胞におけるシグナル伝達経路の誘導を指す。

【0080】

本発明によれば、本明細書に記載の T 細胞受容体 (TCR) は、具体的には T 細胞の抗原受容体を指す。CD3、CD4、CD8、CD28、CTLA-4、CD45、CD43 および Thy-1 を含むがこれらに限定されない、T 細胞応答において重要であり、T 細胞によって発現される種々の他の受容体があることが当技術分野において認識されている。T 細胞受容体は、T 細胞受容体をコードする天然に存在する遺伝子および/または細胞に形質転換された異種の核酸分子の発現によって産生することができる。同様に、本明細書に記載の膜タンパク質は、天然に存在する遺伝子の発現によって、および/または細胞に形質転換された異種の核酸分子の発現によって、細胞中で産生され得る。

30

【0081】

本発明のアレイにおいて、第 1 の細胞（例えば、抗原提示細胞として働くヒト 293T・2A 細胞）を、第 2 の細胞と（例えば、T 細胞）、細胞が生存細胞として維持される条件（例えば、培養培地、温度、酸素、CO₂、インキュベーション時間）で培養し、他の細胞と相互作用させてシグナル伝達経路を活性化させる。このように、細胞は、炭素、窒素および微量栄養素のような細胞増殖に必要な成分を含む任意の適した培地内で培養することができる。そのような細胞のために適した培養培地および増殖条件の決定は、十分に当業者の技術範囲内である。

40

III. ゲノムスケールの T 細胞活性アレイ (GS-TCAA) を作製する方法

【0082】

本発明はまた、ゲノムスケールの T 細胞活性アレイ (GS-TCAA) を作製する方法を提供する。本方法は、複数のウェルを含む固体支持構造体を提供することを含み、複数

50

のウェルのそれぞれは、第1の細胞および第2の細胞を含む。第1の細胞は、膜結合抗CD3抗体またはその抗原結合性断片を安定に発現するようにトランスフェクトされる。第2の細胞は、第1の細胞上に提示された抗CD3抗体またはその抗原結合性断片と相互作用する細胞表面上の受容体を発現し、第2の細胞の活性を刺激する一次シグナルを提供する。本発明の方法はまた、膜結合抗CD3抗体またはその抗原結合性断片を発現する第1の細胞を、複数のウェルのそれぞれに培養するステップ；複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされるタンパク質の第1の細胞上への提示が可能になるように、複数のヒト膜遺伝子をコードするcDNAライブラリーで第1の細胞をトランスフェクトするステップ；および細胞表面上の受容体およびレポーター遺伝子を発現する第2の細胞を用いて複数のウェルのそれぞれに共培養するステップを含む。第2の細胞はレポーター遺伝子を発現し、レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、第1の細胞にトランスフェクトされた複数のヒト膜遺伝子の1つによってコードされる提示されたタンパク質が、刺激性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞の活性を刺激することを示し、レポーター遺伝子の発現レベルの低下が、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされる提示されたタンパク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞の活性を阻害することを示す。

10

20

30

40

50

【0083】

本発明の方法において使用される固体支持構造体は、上に記載のように、培養細胞を保持し、増殖することを可能にさせるのに適した任意の支持体であり得る。一実施形態では、固体支持体はマルチウェルプレートである。本発明において有用なマルチウェルプレートは、例えば、4ウェルプレート、6ウェルプレート、24ウェルプレート、96ウェルプレート、384ウェルプレート、および1536ウェルプレートのような種々の標準的なフォーマットのいずれかであり得る。あるいは、本発明で使用されるマルチウェルプレートは、例えば、少なくとも500個、少なくとも1000個、少なくとも1500個または少なくとも2000個のウェルを有するプレートのような、非標準フォーマットであり得る。

【0084】

本発明の方法における使用に適した細胞には、上に記載のような全てのタイプの真核細胞および原核細胞が含まれる。好ましい実施形態では、細胞は真核細胞、特に、哺乳動物細胞である。特定の実施形態では、本発明の方法で使用される細胞は、少なくとも1つの異種の核酸配列で形質転換された細胞のような遺伝子操作された細胞である。そのような核酸分子は、T細胞受容体、ヒト膜タンパク質、またはレポーターをコードすることができる。そのような核酸分子は、当技術分野で公知の任意の分子生物学技術、またはセクションIIにおいて上に記載した任意の方法によって産生され得る。

【0085】

本発明の方法における使用に適した細胞へのこのような異種の核酸分子（例えば、異種の膜タンパク質をコードする核酸分子）の形質転換は、上に記載のように、遺伝子を細胞に挿入することができる任意の方法によって達成できる。好ましい実施形態では、複数のヒト膜遺伝子が、これらの遺伝子が発現され、細胞表面上に個別に提示されるように、第1の細胞にトランスフェクトされる。このことを達成するために、実施例のセクションに記載の最適化された逆転写プロトコルを使用してもよい。あるいは、遺伝子の発現および個々の提示は、レトロウイルス形質導入、レンチウイルス形質導入、リポフェクションおよびCRISPRを含むが、これに限定されない任意の公知の遺伝子導入技術によって達成し得る。

【0086】

本発明の固体支持構造体中の第1の細胞は、例えばヒト293T細胞のようなヒト膜遺伝子のトランスフェクションおよび発現に適した当技術分野で公知の任意の標準的細胞であり得る。あるいは、第1の細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞である。第1の細胞の別の例は、COS-7細胞である。好ましい実施形態では、第1の細胞は、免疫関連アダプターを発現するヒト293T.2A細胞である。免疫関連アダプターの

例としては、DAP10、DAP12、FcR およびCD3Eが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の第2の細胞は、その活性が第1の細胞上に提示されるタンパク質との相互作用により調節される免疫細胞である。一部の実施形態では、本発明の方法における第2のものは免疫細胞、例えばT細胞である。例示的なT細胞には、Jurkat細胞、ナイーブT細胞、エフェクターT細胞、消耗T細胞、アネルギーT細胞および制御性T細胞が含まれるが、これらに限定されない。あるいは、第2の細胞は、骨髄由来サブレッサー細胞であってもよい。

【0087】

一部の実施形態では、本発明の方法における第2の細胞は、細胞アッセイセンサーまたは検出可能なレポーター、例えば、蛍光タンパク質または酵素を発現するレポーター遺伝子を安定に発現するように操作され、細胞アッセイの読み取り値を提供する。一部の実施形態では、レポーター遺伝子は、レポーター遺伝子の発現を駆動する誘導性転写制御エレメントを含む構築物に含まれる。一部の実施形態では、レポーター構築物は、細胞毒性関連レポーター構築物である。他の実施形態では、レポーター構築物は、アポトーシス関連レポーター構築物である。さらに別の実施形態では、レポーター構築物は、増殖関連レポーター構築物である。

【0088】

T細胞の活性に対するヒト膜遺伝子の効果を検出するために使用されるレポーター遺伝子は、当技術分野で公知の任意の標準的方法によって生成することができる。上に記載のように、レポーター遺伝子構築物は、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)の発現のためのT細胞関連転写応答エレメントを使用して、レポーター遺伝子の発現を駆動する誘導性転写制御エレメントを含む。例示的なT細胞関連転写応答エレメントには、NF-κB、NF-AT、AP-1、EGR2、MAPKおよびPI3Kが含まれるが、これらに限定されない。本発明に適したレポーターには、酵素、蛍光タンパク質、光タンパク質、融合タンパク質およびエピトープタグが含まれるが、これらに限定されない。酵素レポーターの例には、ベータ-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ラクタマーゼ、ルシフェラーゼおよびニトロ還元酵素が含まれるが、これらに限定されない。蛍光タンパク質の例には、オワンクラゲ緑色蛍光タンパク質(GFP)およびその変異体(例えば、シアン蛍光タンパク質および黄色蛍光タンパク質)が含まれるが、これらに限定されない。適した光タンパク質には、エクオリンが含まれるが、これに限定されない。あるいは、本発明のレポーター遺伝子は、サイトカイン遺伝子である。例示的なサイトカインには、IFN-ガンマ、TNF-アルファおよびIL-10が含まれるが、これらに限定されない。

【0089】

本発明の方法において、第1の細胞(例えば、抗原提示細胞として働くヒト293T、2A細胞)は、第2の細胞(例えば、T細胞)と共に培養される。用語「培養する」は、様々な種類の培地上または培地中の細胞または生物体の*in vitro*増殖を指す。培養中で増殖させた細胞の子孫は、親細胞と完全に同一ではない(例えば、形態学的に、遺伝的に、または表現型的に)ことがあり得ることは、理解される。細胞は、そのような細胞が生存細胞として維持することができ、他の細胞と相互作用してシグナル伝達経路を活性化することができる条件(例えば、培養培地、温度、酸素、CO₂、インキュベーション時間)下で培養する。したがって、細胞は、炭素、窒素および微量栄養素のような細胞成長に必要な成分を含む任意の適した培養培地で培養することができる。そのような細胞に適した培養培地および増殖条件の決定は、十分に当業者の範囲内である。

【0090】

本発明の方法において使用される細胞は、種々の培地中で培養されてもよい。Ham's F10(商標)(Sigma)、Minimal Essential Medium(商標)(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(商標)(DMEM)、(Sigma)のような市販の培地が、細胞培養に適している。さらに、Hamら、Meth.En

10

20

30

40

50

z. 58巻：44頁（1979年）、Barnesら、Anal.Biochem. 102巻：255頁（1980年）、米国特許第4,767,704号；第4,657,866号；第4,927,762号；第4,560,655号；もしくは第5,122,469号；国際公開第90/03430号；国際公開第87/00195号；または米国特許第Re.30,985号は、細胞の培養培地として使用してもよく、その教示の全体が参照により本明細書に組み込まれる。これらの培地のいずれかには、必要に応じて、（インスリン、トランスフェリンまたは上皮増殖因子のような）ホルモンおよび/または他の成長因子、（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸のような）塩、（HEPESのような）緩衝液、（アデノシンおよびチミジンのような）ヌクレオチド、（ゲンタマイシン薬物のような）抗生物質、（マイクロモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される）微量元素、ならびにグルコースまたは同等のエネルギー源を補充してもよい。他の必要な栄養補助剤もまた、当業者に公知の適切な濃度で含まれていてもよい。温度、pHなどのような培養条件は、発現のために選択された宿主細胞で以前に使用されたものであり、当業者には明らかであろう。

IV. ゲノムスケールのT細胞活性アレイ（GS-TCAA）を用いたスクリーニングアッセイ

【0091】

本発明は、自己免疫疾患および/またはがんの治療における潜在的な治療の用途を有し得る免疫モジュレーターを同定する方法もまた提供する。本方法は、セクションIIに記載されるゲノムスケールのT細胞活性アレイ（GS-TCAA）を提供するステップ、第1の細胞中の複数のヒト膜遺伝子のうちの1つを発現させるステップ；第1の細胞と第2の細胞とを共培養するステップ；第2の細胞におけるレポーター遺伝子の発現レベルを検出するステップ；レポーター遺伝子の発現レベルと対照の第2の細胞中のレポーター遺伝子の発現レベルとを比較するステップであって、対照の第2の細胞が複数のヒト膜遺伝子の1つでトランスフェクトされていない対照の第1の細胞と共培養されているステップを含む。レポーター遺伝子の発現レベルの上昇が、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされる提示されたタンパク質が刺激性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を刺激することを示し、レポーター遺伝子の発現レベルの低下が、複数のヒト膜遺伝子のうちの1つによってコードされた提示されたタンパク質が阻害性共シグナル伝達分子として作用し、第2の細胞株の活性を阻害することを示す。

【0092】

最適なT細胞活性化には、TCR/CD3複合体を介する抗原特異的の一次シグナルおよび二次シグナル伝達に関わる共シグナル伝達の両方が必要である。一実施形態では、本発明の方法によって同定される免疫モジュレーターは、免疫系、特にT細胞活性を調節する。例えば、免疫モジュレーターは、T細胞活性を調節する共シグナル伝達分子であり得る。一部の実施形態では、免疫モジュレーターはT細胞活性を活性化する。他の実施形態では、免疫モジュレーターはT細胞活性を阻害する。さらに他の実施形態では、免疫モジュレーターは、自己免疫疾患および/またはがんを治療するために使用してもよい。

【0093】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、FOLH1、FAS、IL3RA、CD248、THBD、B7.1、GJB1、OX40L、4-1BBLおよびB7.2からなる群から選択され、免疫モジュレーターはT細胞活性を上昇または増強させる。あるいは、免疫モジュレーターは、FLT1、CXCR6、SEMA6a、RHCE、FCRLA、TNFRSF19、SEC22b、B3GNT1、NFAM1、LY6およびGP1BAからなる群から選択され、ここで免疫モジュレーターはT細胞活性の阻害効果を示す。一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、FLT1、SEMA6a、SEC22bおよびGP1BAからなる群から選択される。

【0094】

本発明は、多くの薬物同定および発見スキーム、好ましくはハイスループットスクリーニングフォーマットにおける使用に適した、広い細胞ベースのスクリーニングアプローチ

を提供する。自動ハイスループットスクリーニングは、例えば、Burbaumら、1997年、*Current Opinion in Chemical Biology*、1巻：72～78頁；およびSchullekら、1997年、*Analyt. Biochem.* 246巻：20～29頁に記載されている。一部の実施形態では、本発明の方法は、ロボット工学、例えばロボット液体ハンドリングシステムを使用して実施される。非限定的な例として、本発明に記載のハイスループットスクリーニングにおいては、液体ハンドリング操作を、ロボット Tecan Freedom EVO 200 液体ハンドリングプラットフォームによって行うことができる。スクリーニングに必要な他の装置（例えば、インキュベーター、プレート洗浄機、プレートハンドリングシステム、プレートリーダー）は、必要に応じて自動機能に適合させることができるか、または自動モジュールとして商業的に購入することができる。例えば、自動プレート

10

【0095】

本明細書中で使用される場合、「ハイスループットスクリーニング」は、同時にスクリーニングされる複数の候補薬剤、試料または試験化合物を提供するアッセイを指す。そのようなアッセイの例としては、少量の試薬および試料を用いて多数のアッセイを同時に実行できるため、特に便利なマイクロタイタープレートの使用を含み得る。本発明の方法は、96ウェル、384ウェルおよび1536ウェルのフォーマットを含むがこれらに限定されないマルチウェルフォーマットにおいて容易に実行され、自動化される。

【0096】

一部の実施形態では、本発明のアッセイは、スペクトル（例えば、蛍光）特性の変化を検出するために細胞上で顕微鏡画像を用いて実行される。他の実施形態では、アッセイはマルチウェルフォーマットで実行され、スペクトル特性はマイクロプレートリーダーを使用して決定される。本発明の方法における使用に適した装置は、例えば、Molecular Devices (FLEXstation (商標) マイクロプレートリーダーおよび流体輸送システムまたは FLIPR (商標) システム)、Hamamatsu (FDS S6000)、PerkinElmer Life and Analytical Sciences (CellLux (商標))、「VIPR」電圧イオンプローブリーダー (Aurora、Bioscience Corp.、カリフォルニア州、米国) および InCell Imager (GE Healthcare Life Sciences) などから市販されている。一部の実施形態では、本発明の方法において使用するための GFP 検出装置は、InCell Imager である。他の実施形態では、本発明の方法の画像分析は、Cellprolifer ソフトウェアを使用して実行される。

20

30

【0097】

統合した液体ハンドリングを有するいくつかの市販の蛍光イメージングシステムが市販されている。これらには、Perkin Elmer CellLux - Cellular Fluorescence Workstation および Hamamatsu FDS S6000 System が含まれるが、これらに限定されない。励起/発光特性は、蛍光体ごとに異なり、したがって、それぞれのアッセイについて選択されたフルオロフォアを検出するように機器が構成される。適切なフルオロフォアの選択およびそれぞれの実験について選択されたフルオロフォアを検出するための機器の構成は、当業者の技術範囲内である。

40

【0098】

本発明の方法における使用に適した細胞イメージングのための構成は、コンピュータシステムを備えた顕微鏡の使用を含み得る。コンピュータは、パラメータフィールドのセットへのユーザー入力の形態であるか、または例えば様々な異なる特定の操作のために予めプログラムされているような、予めプログラムされた命令の形態の、ユーザーの指示を受け取るための適切なソフトウェアを含むことができる。ソフトウェアは、場合によって、これらの命令を（例えば、流体ハンドリングエレメント、ロボットエレメントおよび/またはレーザを制御するための）システムの構成要素の操作を制御するための適切な言語に

50

変換する。また、コンピュータは、例えば、検出器からのような他のシステムの構成要素からデータを受け取ることができ、データを解釈することができ、人間が読める形式でユーザーに提供したり、そのデータを使用して、ユーザーによる任意のプログラミングに従って、さらなる操作を開始することができる。そのような構成の一例である、Carl ZeissからのATTOのAttofluor(商標)RatioVision(商標)リアルタイムデジタル蛍光分析器は、生存細胞および調製標本における蛍光プローブの分析のための完全に統合された作業ステーションである(ATTO、ロックヴィル、メリーランド州)。

【0099】

潜在的な治療用免疫モジュレーターが本発明の方法およびアレイに基づいて同定された後、検証のために*in vitro*機能アッセイおよび*in vivo*マウスモデル分析を探求することができる。一部の実施形態では、本発明の方法は、*in vitro*機能アッセイ、*in vivo*アッセイ、受容体アレイアッセイ、バイオインフォマティクスアッセイ、またはそれらの組合せからなる群から選択されるアッセイとともに、ゲノムスケールのT細胞活性アレイを実行することを含む。

10

【0100】

本発明の方法における使用に適した*in vitro*機能アッセイとしては、増殖アッセイ、アポトーシスアッセイまたはサイトカイン(例えば、IFN- γ 、IL-2またはIL-10)放出アッセイが含まれるが、それに限定されない、当技術分野で公知の任意の標準的T細胞アッセイが含まれる。一部の実施形態では、*in vitro*機能アッセイには、複数のヒト膜遺伝子の1つを発現する第2の細胞および膜結合抗CD3抗体またはその抗原結合性断片を初代T細胞とともに培養し、T細胞アッセイを実行することが含まれる。本発明の方法における使用に適した初代T細胞は、任意のタイプの初代細胞を含む。例示的な初代細胞には、ヒト初代CD8細胞またはヒト初代CD4細胞が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0101】

本発明の方法は、受容体アレイ技術と組み合わせて実行してもよい。受容体アレイ技術は、標的タンパク質のカウンター受容体をスクリーニングするための十分に確立された技術である(Zhu Yら、Nat Commun、4巻:2043頁、2013年;Yao Sら、Immunity、34巻(5号):729~740頁、2011年)。簡潔には、受容体アレイは、複数のウェルを含む固体支持構造体を含み、複数のウェルのそれぞれが、受容体タンパク質をコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞を含む。標的遺伝子(分泌タンパク質をコードする)または標的遺伝子の細胞外ドメイン(膜貫通タンパク質、例えば免疫モジュレーターをコードする)は、タグ遺伝子(マウスIgG2a Fc、ヒトIgG1 Fc、FLAG、または6xHIS)に遺伝的に融合させ、以前に記載されたように(Chapoval, Al.ら、Mol Biotechnol 21巻(3号):259~264頁、2002年)融合遺伝子を調製する。個々の融合遺伝子の293T細胞へのトランスフェクションに際して、精製組換え融合タンパク質を用いて受容体アレイに対してスクリーニングする。タグに対する蛍光標識二次抗体を適用して、標的タンパク質、例えば、本発明の方法に基づいて同定された免疫モジュレーターの、トランスフェクトされた293T細胞への結合を検出し、Applied Biosystems 8200細胞検出システムでスクリーニングし、CDS 8200ソフトウェアで分析する。前述の参考文献の内容の全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【0102】

本発明の方法によって同定された免疫モジュレーターの治療可能性は、例えば、免疫疾患またはがんの動物モデルにおいて、*in vivo*でさらに試験することができる。一部の実施形態では、*in vivo*アッセイは、自己免疫疾患またはがんの動物モデルに免疫モジュレーターを投与することを含む。本発明の方法における使用に適した自己免疫疾患またはがんのための動物モデルには、例えば、ヒトメラノーマ細胞および腫瘍反応性T細胞を用いて注射されたNOD-scid IL2Rガンマ^{0/0}マウスモデルのよ

50

うな、当技術分野で公知の自己免疫疾患またはがんのための任意のタイプの動物モデルが含まれる。他の実施形態では、動物モデルはマウスモデルである。あるいは、動物モデルは、ラットモデル、ウサギモデル、またはサルモデルである。別の実施形態では、動物モデルはヒト化マウスモデル、例えば免疫患者由来異種移植（免疫PDX）モデルである。

【0103】

本発明の方法はまた、バイオインフォマティクス分析と組み合わせて実行してもよい。自己免疫疾患およびがんに関する遺伝子を絞り込むために、バイオインフォマティクスアプローチを利用することができる。疾患の進行中に有意に変化し、疾患の病因の潜在的なシグネチャー遺伝子である遺伝子を同定するために複数の厳格な基準が選択される。一実施形態では、ランキングシステムは、特定の自己免疫疾患またはがんにおいてのみ調節される特定の遺伝子を同定するように設定される。あるいは、異なる自己免疫疾患またはがんの間で共通の遺伝子を選択し得る。このことを達成するために、実施例セクションに記載された特定の選択基準を使用してもよい。

10

V. 治療の方法

【0104】

1つの態様では、本発明は、自己免疫疾患またはがんを、それを必要とする対象において治療する方法を提供する。本方法は、上に記載のような本発明のスクリーニング方法により同定された有効量の免疫モジュレーターを、それを必要とする対象に投与し、それにより対象における自己免疫疾患またはがんを治療することを含む。他の実施形態では、本発明のスクリーニング方法によって同定された免疫モジュレーターの調節物質の有効量は、それを必要とする対象に投与され、それにより対象における自己免疫疾患またはがんを治療する。

20

【0105】

一部の実施形態では、免疫モジュレーターは、FOLH1、FAS、IL3RA、CD248、THBD、B7.1、GJB1、OX40L、4-1BBLおよびB7.2からなる群から選択される。他の実施形態では、免疫モジュレーターは、FLT1、CXCR6、SEMA6a、RHCE、FCRLA、TNFRSF19、SEC22b、B3GNT1、NFAM1.LY6およびGP1BAからなる群から選択される。

【0106】

本発明の方法における使用に適した免疫モジュレーターの調節物質は、上に記載のような免疫モジュレーターの発現および/または活性レベルを調節することができる任意の薬剤を含む。一部の実施形態では、免疫モジュレーターの調節物質は、免疫調節物質の発現レベルおよび/または活性レベルを上昇させる。一部の実施形態では、免疫モジュレーターの調節物質は、免疫調節物質の発現レベルおよび/または活性レベルを低下させる。一実施形態では、免疫モジュレーターの調節物質は、免疫モジュレーターに結合し、その機能を活性化または阻害する。免疫モジュレーターの例示的な調節物質には、免疫モジュレーターに特異的な抗体、もしくはその抗原結合性断片、免疫モジュレーターに特異的な小分子、および/または免疫モジュレーターに特異的に結合するアダプターが含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、免疫モジュレーターの調節物質は、自己免疫疾患および/またはがんを治療するために使用してもよい。

30

40

【0107】

本発明の方法に基づいて同定される免疫モジュレーターおよび/または免疫モジュレーターの調節物質は、非経口投与（例えば、注射、注入）を含む任意の適した手段によって投与することができ、皮下、腹腔内、肺内、および鼻腔内、ならびに必要に応じて局所治療のために、病変内投与によって投与されてもよい。非経口注入には、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮内または皮下投与が含まれる。さらに、本発明の方法に基づいて同定された免疫モジュレーターおよび/または免疫モジュレーターの調節物質は、パルス注入によって、特に用量を減少させて適切に投与される。投薬は、静脈内注射または皮下注射のような注射によって行うことができる。投与の経路は、投与が短時間であるかまたは慢性であるかのような様々な要因に応じて選択することができる。局所投与、特に経皮投与

50

、経粘膜投与、直腸投与、経口投与または局所投与、例えば、所望の部位の近くに配置されたカテーテルを介した投与を含む他の投与方法が企図される。注射、特に静脈注射には関心がある。

【0108】

一部の実施形態では、本方法は、治療有効量の本明細書に記載の免疫モジュレーターを対象に投与することを含む。一部の実施形態では、本方法は、治療有効量の免疫モジュレーターの調節物質を対象に投与することを含む。免疫モジュレーターまたは免疫モジュレーターの調節物質の治療有効量は、対象の疾患を治療するために十分な量である。本明細書に記載の免疫モジュレーターおよび/または免疫モジュレーターの調節物質の治療有効用量は、対象と対象の間でいくらか異なり、対象の年齢、体重および状態ならびに送達経路のような因子に依存するであろう。そのような用量は、当業者に公知の手順に従って決定することができる。

10

【0109】

本発明の方法で治療することができる疾患には、自己免疫疾患またはがんが含まれるが、それらに限定されない。「治療する」とは、患者、例えば疾患に罹患しているか、または疾患を発症するリスクのある患者に利益を与える任意のタイプの治療のことを指す。治療には、患者の状態（例えば、1つまたは複数の症状の緩和）の改善、疾患の発症または進行の遅延の目的のためにとられた行為と回避された行為とが含まれる。

【0110】

本明細書に記載されているように、「自己免疫疾患」は、体内に通常存在する物質および組織に対する身体の異常な免疫応答から生じる疾患であり、慢性関節リウマチ（RA）、若年性慢性関節炎（JCA）、甲状腺炎、移植片対宿主病（GVHD）、強皮症、真性糖尿病、グレーブス病、アレルギー、これらに限定されないが、例えば腎臓移植、心臓移植、骨髄移植、肝臓移植、膵臓移植、小腸移植、肺移植および皮膚移植のような同種移植に伴う急性または慢性免疫疾患が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0111】

本明細書に記載されているように、用語「がん」は、隣接する組織または身体の他の部分に広がる可能性がある、制御されていない異常な細胞増殖によって引き起こされる疾患群の1つのことを指す。がん細胞は、がん細胞が密集した固形腫瘍を形成するか、または、白血病の場合のように分散細胞として存在することができる。本発明の方法によって治療されるために適したがんのタイプには、副腎がん、肛門がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、脳/CNS腫瘍、乳がん、キャスルマン病、子宮頸がん、結腸/直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、眼がん、胆嚢がん、胃腸がん、腎臓がん、喉頭がんおよび下咽頭がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、皮膚リンパ腫、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽頭がん、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、口腔および口腔咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、陰茎がん、下垂体腫瘍、前立腺がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、皮膚がん、小腸がん、胃がん、精巣がん、胸腺がん、甲状腺がん、子宮肉腫、膣がん、外陰がん、ウォルデントロンマクログロブリン血症、ならびにウィルムス腫瘍が含まれるが、それらに限定されない。

30

医薬製剤

40

【0112】

本発明の方法に基づいて同定された免疫モジュレーターおよび/または本発明の免疫モジュレーターの調節物質を含む医薬製剤は、所望の純度を有するタンパク質または核酸を、保存のために、随意の生理的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合させ（Remington's Pharmaceutical Sciences第16版、Osol, A.編（1980年））、水溶液、凍結乾燥または他の乾燥製剤の形態で調製されてもよい。許容される担体、賦形剤または安定剤は、使用される用量および濃度でレシピエントに無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジンおよび他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルモしく

50

はベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンのようなアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - ペンタノール；およびm - クレゾール）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシンのようなアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAのようなキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールのような糖類；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn - タンパク質複合体）；ならびにノまたはTween（商標）、Pluronic（商標）もしくはポリエチレングリコール（PEG）のような非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0113】

本明細書の製剤はまた、治療される特定の適応症に必要な2つ以上の活性化化合物を含んでもよい。例えば、自己免疫疾患が治療される場合、免疫モジュレーターまたは免疫調節物質の調節物質を含む本発明の製剤は、例えばメチルプレドニゾロン（methylprednisolone）、ケナログ（kenalog）、メドロール（medrol）、プレドニゾロン（prednisolone）、コルテフ（cortef）、ヒドロコルチゾン（hydrocortisone）、コルチゾン（cortisone）、トリアムシノロン・アセトニド（triamcinolone acetonide）、セレストン・ソルスパン（celestone soluspan）、メチルプレドニゾロン・アセテート（methylprednisolone acetate）、オラブレドODT（orapred ODT）、バリブレド20（veripred 20）、ソル - メドロール（Solu-Medrol）またはメチルプレドニゾロンナトリウム（methylprednisolone sodium）のような自己免疫疾患を治療することが公知の薬物と組み合わせられてもよい。がんを治療する場合、免疫モジュレーターまたは免疫調節物質の調節物質を含む本発明の製剤は、アビラテロンアセテート（Abiraterone Acetate）、ABIREXATE（メトトレキセート；Methotrexate）、ABRAXANE（パクリタキセル（Paclitaxel）アルブミン - 安定化ナノ粒子製剤）、ADCETRIS（ブレンツキシマブベドチン；Brentuximab Vedotin）、アド - トラスツズマブ・エムタンシン（Ado-Trastuzumab Emtansine）、ADRIAMYCIN（ドキシソルビシン（Doxorubicin）塩酸塩）、ADRUCIL（フルオロウラシル；Fluorouracil）、アフアチニブニマレイン酸塩（Afatinib Dimaleate）、AFINITOR（エベロリムス；Everolimus）、ALDARA（イミキモド；Imiquimod）、アルデスロイキン（Aldesleukin）、アレムツズマブ（Alemtuzumab）、ALIMTA（ペメトレキセドニナトリウム；Pemetrexed Disodium）、ALOXI（パロノセトロン塩酸塩；Palonosetron Hydrochloride）、AMBORCHLORIN（クロラムブシル；Chlorambucil）、AMBORCLORIN（クロラムブシル；Chlorambucil）、アミノレブリン酸（Aminolevulinic Acid）、アナストロゾール（Anastrozole）、アプレピタント（Aprepitant）、AREDIA（パミドロネートニナトリウム；Pamidronate Disodium）、ARIMIDEX（アナストロゾール；Anastrozole）、AROMASIN（エキセメスタン；Exemestane）、ARRANON（ネララビン；Nelarabine）、三酸化ヒ素、ARZERRA（オフアツムマブ；Ofatumumab）、アスパラギナーゼ・エルウィニア・クリサンテミ（Asparaginase Erwinia chrysanthemi）、AVASTIN（ベバシズマブ；Bevacizumab）、アキシチニブ（Axitinib）、アザシチジン（Azacitidine）、ベンダムスチン塩酸塩（Bendamustine Hydrochloride）、ベバシズマブ（Bevacizumab）、ベキサロテン（Bexarotene）、BEXXAR（トシツモマブ（Tositumomab）およびI131ヨウ素トシツモマブ）、ブレオマイシン（Bleomycin）、ボルテゾミブ（Bortezomib）、BOSULIF（ボスチニブ（Bosutinib））、カバジタキセル（Cabazitaxel）、カボザンチニブ - S - りんご酸塩（Cabozantinib-S-Malate）、CAMPATH（アレムツズマブ；Alemtuzumab）、CAMPOTOSAR（塩酸イリノテカン；Irinotecan Hydrochloride）、カペシタピン（Capecitabine）、カルボプラチン（Carboplatin）、カルフィルゾミブ（Carfilzomib）、CEENU（ロムスチン；Lomustine）、CERUBIDINE（塩酸ダウノルビシン；Daunorubicin Hydrochloride）、セツキシマブ

20

30

40

50

(Cetuximab)、クロラムブシル (Chlorambucil)、シスプラチン (Cisplatin)、C L A F E N (シクロホスファミド)、クロファラビン (Clofarabine)、C O M E T R I Q (カボザンチニブ - S - リンゴ酸塩)、C O S M E G E N (ダクチノマイシン; Dactinomycin)、クリゾチニブ (Crizotinib)、シクロホスファミド、C Y F O S (イホスファミド; Ifosfamide)、シタラビン (Cytarabine)、ダブラフェニブ (Dabrafenib)、ダカルバジン (Dacarbazine)、D A C O G E N (デシタピン; Decitabine)、ダクチノマイシン (Dactinomycin)、ダサチニブ (Dasatinib)、ダウノルビシン (Daunorubicin) 塩酸塩、デシタピン (Decitabine)、デガレリクス (Degarelix)、デニロイキン・ジフチトキス (Denileukin Diftitox)、デノスマブ (Denosumab)、デクスラゾキサネ (Dexrazoxane) 塩酸塩、ドセタキセル (Docetaxel)、ドキシソルビシン (Doxorubicin) 塩酸塩、E F U D E X (フルオロウラシル)、E L I T E K (ラスブリカーゼ; Rasburicase)、E L L E N C E (塩酸エピルビシン (Epirubicin))、E L O X A T I N (オキサリプラチン; Oxaliplatin)、エルトロンボパグ・オラミン (Eltrombopag Olamine)、E M E N D (アプレピタント; Aprepitant)、エンザルタミド (Enzalutamide)、エピルビシン (Epirubicin) 塩酸塩、E R B I T U X (セツキシマブ)、メシル酸エリブリン (Eribulin)、E R I V E D G E (ビスモデジブ; Vismodegib)、エルロチニブ (Erlotinib) 塩酸塩、E R W I N A Z E (アスパラギナーゼ・エルウィニア・クリサンテミ)、エトポシド (Etoposide)、エベロリムス (Everolimus)、E V I S T A (塩酸ラロキシフェン (Raloxifene))、エキセメスタン (Exemestane)、F A R E S T O N (トレミフェン; Toremifene)、F A S L O D E X (フルベストラント; Fulvestrant)、F E M A R A (レトロゾール; Letrozole)、フィルグラスチム (Filgrastim)、F L U D A R A (フルダラビン (Fludarabine) リン酸)、フルダラビンホスフェート、F L U O R O P L E X (フルオロウラシル)、フルオロウラシル、フォリン酸 (Folinic acid)、F O L O T Y N (プラトレキサート; Pralatrexate)、フルベストラント (Fulvestrant)、ゲフィチニブ (Gefitinib)、ゲムシタピン (Gemcitabine) 塩酸塩、ゲムツズマブ・オゾガミシン (Gemtuzumab Ozogamicin)、G E M Z A R (塩酸ゲムシタピン)、G I L O T R I F (ニマレイン酸アファチニブ (Afatinib))、G L E E V E C (メシル酸イマチニブ (Imatinib))、H A L A V E N (メシル酸エリブリン (Eribulin))、H E R C E P T I N (トラスツズマブ; Trastuzumab)、H Y C A M T I N (塩酸トポテカン (Topotecan))、イブリツモマブ・チウキセタン (Ibritumomab Tiuxetan)、I C L U S I G (塩酸ポナチニブ (Ponatinib))、イホスファミド (Ifosfamide)、メシル酸イマチニブ、イミキモド (Imiquimod)、I N L Y T A (アキチニブ; Axitinib)、イントロンA (組換えインターフェロンアルファ - 2 b)、ヨード131トシツモマブ (Tositumomab) およびトシツモマブ、イピリムマブ (Ipilimumab)、イレッサ (ゲフィチニブ; Gefitinib)、イリノテカン (Irinotecan) 塩酸塩、I S T O D A X (ロミデプシン; Romidepsin)、イクサベピロン (Ixabepilone)、J A K A F I (ルキソリチニブ (Ruxolitinib) リン酸塩)、J E V T A N A (カバジタキセル; Cabazitaxel)、K a d c y l a (アド - トラスツズマブ・エムタンシン; Ado-Trastuzumab Emtansine)、K E O X I F E N E (塩酸ラロキシフェン (Raloxifene))、K E P I V A N C E (パリフェルミン; Palifermin)、K Y P R O L I S (カルフィルゾミブ; Carfilzomib)、ラパチニブ (Lapatinib) ・ジトシレート、レナリドミド (Lenalidomide)、レトロゾール (Letrozole)、ロイコボリン (Leucovorin) カルシウム、ロイプロリド (Leuprolide) アセテート、ロムスチン (Lomustine)、L U P R O N (ロイプロリド (Leuprolide) アセテート、M A R Q I B O (ビンクリスチン (Vincristine) 硫酸塩リポソーム)、M A T U L A N E (プロカルバジン塩酸塩)、メクロレタミン (Methotrexate) 塩酸塩、M E G A C E (酢酸メゲストロール (Megestrol))、酢酸メゲストロール、M E K I N I S T (トラメチニブ; Trametinib)、メルカプトプリン、メスナ (Mesna)、M E T H A Z O L A S T O N E (テモゾロマイド; Temozolomide)、メトトレキサート、マイトマイシン (Mitomycin)、M O Z O B I L (ブレリキサフォール)、M U S T A R G E N (メクロレタミン塩酸塩)、M U T A M Y C I N (マイトマイシンC)、M Y L O S A R (アザシチジン; Azacitidine)、M Y L O T

ド；Etoposide）、V I A D U R（酢酸ロイプロリド（Leuprolide））、V I D A Z A（アザシチジン）、ビンブラスチン（Vinblastine）硫酸塩、ビンクリスチン（Vincristine）硫酸塩、ビノレルビン（Vinorelbine）酒石酸塩、ビスモデジブ（Vismodegib）、V O R A X A Z E（グルカピダーゼ；Glucarpidase）、ポリノスタット（Vorinostat）、V O T R I E N T（塩酸パゾパニブ（Pazopanib））、W E L L C O V O R I N（ロイコボリン（Leucovorin）カルシウム）、X A L K O R I（クリゾチニブ（Crizotinib））、X E L L O D A（カペシタビン；Capecitabine）、X G E V A（デノスマブ；Denosumab）、X O F I G O（ラジウム223二塩化物）、X T A N D I（エンザルタミド；Enzalutamide）、Y E R V O Y（イピリムマブ；Ipilimumab）、Z A L T R A P（Ziv-アフリベルセプト；Ziv-Aflibercept）、Z E L B O R A F（ベムラフェニブ；Vemurafenib）、ゼバリン（イブリツモマブ・チウキセタン；Ibritumomab Tiuxetan）、Z I N E C A R D（塩酸デクスラゾキサソ（Dexrazoxane））、Z i v - アフリベルセプト、ゾレドロン酸（Zoledronic Acid）、Z O L I N Z A（ポリノスタット；Vorinostat）、Z O M E T A（ゾレドロン酸）、Z Y T I G A（酢酸アピラテロン（Abiraterone））のようながんを治療することが公知の薬剤と組み合わせてもよい。

10

【0114】

活性成分はまた、例えばコアセルベーション技術によって、または例えば、ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン-マイクロカプセル、およびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルなどの界面重合によって、それぞれ、（例えば、リボソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセルのような）コロイド状薬物送達システム中かまたはマクロエマルジョン中に、調製されたマイクロカプセルに包装されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版、Osol, A.編（1980年）に開示されている。

20

【0115】

in vivo 投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通じた濾過によって容易に達成される。

【0116】

一般に、組成物の成分は、例えば活性剤の量を示すアンプルまたはサシェのような密封された容器中に、乾燥した凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、単位剤形で別途にまたは一緒に混合して供給される。投与様式が注入である場合、組成物は、無菌の医薬グレードの水または生理食塩水を含む注入ボトルで分配することができる。投与様式が注射である場合、投与の前に成分を混合することができるように、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができる。別の実施形態では、本発明の医薬組成物の1つまたは複数は、密閉した容器内に液体形態で供給され、薬剤の量および濃度を示す。

30

【0117】

活性薬剤は、典型的には注射可能な溶液として調製される、非経口投与に適した医薬組成物に組み込むことができる。注射用溶液は、フリントまたはアンバーバイアル、アンプルまたは事前に満たしたシリンジ中に、液体または凍結乾燥剤形のいずれかで構成することができる。液体または凍結乾燥された投与量は、緩衝液（例えば、L-ヒスチジン、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウム、塩化ナトリウム）、凍結防止剤（例えば、ショ糖トレハロースまたはラクトース）、増量剤（例えば、マンニトール）、安定化剤（例えば、L-メチオニン、グリシン、アルギニン）、アジュバント（ヒアルロニダーゼ）をさらに含んでもよい。

40

【0118】

本発明の組成物は、様々な形態であり得る。これらには、例えば、液体溶液（例えば、注射可能および注入可能な溶液）、マイクロエマルジョン、分散液、リボソームまたは懸濁液、錠剤、丸剤、散剤、リボソームおよび坐剤のような液体、半固体および固体剤形が含まれる。好ましい形態は、意図される投与様式および治療用途に依存する。典型的な投与様式には、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）注射または経口投与が含

50

まれる。

【0119】

本明細書に記載の免疫モジュレーターまたは免疫モジュレーターの調節物質を含む医薬組成物は、特定の組織への投与のために製剤化されてもよい。例えば、特定の実施形態では、様々な器官における結合組織および/または腫瘍部位に、免疫モジュレーターまたは免疫モジュレーターの調節物質を投与することが望ましい場合がある。

【0120】

一実施形態では、本明細書に記載の治療方法は、ヒトに対して行われる。さらなる実施形態では、本明細書に記載の方法は、マウスまたは他の非ヒト動物では行われない。

【0121】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明されるが、これは決して限定することを意図してはいない。本出願を通して引用された全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容の全体ならびに図は、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0122】

(実施例1)

ゲノムスケールのT細胞活性アレイ(GS-TCAA)の構築

将来の免疫療法の標的のヒトゲノム全域検索を行うために、ゲノムスケールのT細胞活性アレイを開発した。ヒト膜ゲノムの90%をカバーする6402ヒト膜cDNAを、Qiagen mini prepキットを使用して調製し、GS-TCAA構築のために定

【0123】

最適なT細胞活性化には、TCR/CD3複合体を介する抗原特異的の一次シグナルと二次シグナル伝達に關与する共シグナル伝達の両方が必要である。機能性T細胞アッセイを用意するために、基底のT細胞活性化を刺激する人工的な抗原提示細胞株に基づく293T細胞を設計し、蛍光レポーターをT細胞活性の指標として使用した(図1A)。具体的には、293T.2A細胞を活性アレイに使用した。これらの293T.2A細胞は、免疫関連膜遺伝子の最適な発現のための主要な免疫関連アダプター(DAP10/DAP12/FcR/CD3E)を発現する293T細胞を操作したものであった。また、CD14 GPIアンカーに連結されたOKT-3モノクローナル抗体の膜型scfvである、膜結合抗CD3抗体ScFvを発現するように、さらに293T.2A細胞を操作した(図1B)。これらの293T.2A/m抗CD3細胞は、抗原提示細胞および個々の膜遺伝子を発現する細胞の両方として働く。

【0124】

GFPレポーターの制御下にある(NF-kb、NF-AT、AP-1またはEGR2のような)T細胞関連転写因子応答エレメント(TFRE)を含むいくつかの構築物を、このアッセイのために設計し、T細胞活性の指標として使用した(図1C)。例えば、NF-KB-GFPを安定に発現するJurkat細胞株が得られた。これらの細胞は、293T.2A細胞と共培養した場合、可視的なGFPシグナルを生成しなかった。しかしながら、膜抗CD3抗体および免疫関連膜遺伝子を発現する293T.2A細胞とオーバーナイトで共培養した後は、有意なGFPシグナルが観察された(図2Aおよび2B)。Jurkat細胞株に加えて、ナイーブT細胞またはエフェクターT細胞、消耗、アネルギーT細胞またはTregを含む初代免疫細胞もまた含まれていた。

【0125】

活性アレイについての読み取りには、サイトカイン(IFN-ガンマ、TNF-アルファまたはIL-10)を含む、増殖関連レポーター、およびT細胞の細胞毒性またはアポトーシスの蛍光ベースのシグナル検出が含まれた。増殖アッセイについては、T細胞共培養の直前に293T.2A.m抗CD3細胞を照射した(10,000rad)。約72時間後、1μlのCCK-8試薬(Dojindo)をプレートのウェルのそれぞれに入れ、Envisionプレートリーダー(Perkin Elmer)による450nm

10

20

30

40

50

での吸光度読み取りの前に2時間インキュベートした。細胞毒性アッセイについては、RFPを安定して発現する293T、2A、m抗CD3を使用した。簡潔には、GS-TCAAプレート中の遺伝子プラスミドを、RFPを有する293T、2A、m抗CD3細胞中に逆にトランスフェクトした。24時間後、IncuCyte(商標)キネティック・カスパーゼ-3/7アポトーシスアッセイ試薬(Essen Bioscience)およびOKT3前活性化またはアロPBMC活性化(allo-PBMC activated)ヒトPBMCをプレートに添加した。共培養後、別々の時点で、両方のRFPおよびGFPシグナルが、inCell分析計(GE)によって検出された。T細胞アポトーシスアッセイについては、OKT3前活性化またはアロPBMC活性化ヒトPBMCを、cellTraceバイオレット色素(Thermo Fisher)で標識し、IncuCyte(商標)キネティック・カスパーゼ-3/7アポトーシスアッセイ試薬(Essen Bioscience)と混合させ、プレートの中に入れた。RFPおよびGFPの両方およびCellTraceバイオレットシグナルは、共培養後の異なる時点で、inCell分析計(GE)によって検出された。T細胞の細胞毒性を(%RFP+GFP+細胞/RFP+細胞)により計算し、T細胞のアポトーシスを(%CellTraceバイオレット+GFP+細胞/CellTraceバイオレット+細胞)により計算した。

(実施例2)

ゲノムスケールのT細胞活性アレイの検出およびスクリーニング

【0126】

T細胞活性アレイのためのスクリーニングシステムを最適化するために、1536ウェルプレートにおける293T/m抗CD3細胞のトランスフェクション効率を試験し、これら2つの細胞共培養システムにおけるT細胞活性に必要な最適条件が決定された。さらに、InCellイメージングシステムを使用したGFP検出もまた、活性アレイに対して最適化された。

【0127】

自動プレートハンドリングシステム(Matrix Plate Mate Plus、Thermo Scientific)のために最適化されたプロトコルを使用して、遺伝子クローンをGreiner 1536ウェルイメージングプレートに移した。それぞれのGS-TCAAセットは、4つの1536ウェルイメージングプレートを含む。アレイスクリーニングのために、これらの遺伝子が293T、2A/m抗CD3細胞の細胞表面上に個別に提示されるように、最適化された逆トランスフェクションプロトコルを利用した。cDNAライブラリープラスミドを個別にミニプレップし、OptiMEM(4µg/ml)に希釈し、それぞれのウェル内に200µlのプラスミド溶液を384ディープウェルプレート(VWR)に移した。様々な遺伝子を含む4つの384プレートからの2µlのプラスミド溶液を、ロボット液体ハンドリングシステム(Plate Mate、Thermo Scientific)によって低塩基1536ウェルプレート(Greiner)の各ウェルに移して、受容体アレイプレートを生成した。全ヒト膜受容体アレイは、4つの1536ウェルプレートを含む。指定されない限り、これらの1536ウェルプレートは、将来の実験のためにさらにホイルし、-80度で保存された。

【0128】

ゲノムスケールのT細胞活性アレイの準備のために、4つの1536ウェルプレートを含むヒト受容体アレイのセットを-80度から取り出し、溶液が完全に解凍するまでインキュベーターに入れた。アレイプレートをスピンドウン(600g、2分)し、続いて逆トランスフェクションした。簡潔には、1536ウェルアレイプレートを、1ウェル当たり、ロボットディスペンサー(Multidrop Combi、Thermo Scientific)を用いて、リポフェカミン3000(lipofecamine 3000; 7µl/lipo/ml)を含む2µlのoptiMEMで分注し、超高速オービタルシェーカーにより1分間急速に振盪した。全てのプレートを室温で20分間保存し、続いてT細胞刺激のためにMultidropにより293T、2A、m抗CD3細胞を添加した(1ウェル当たり4µl内に2000細胞)。その後、37度でインキュベートする前に、プレー

10

20

30

40

50

トをさらにスピンドウンして(1000g、4分)、それぞれのウェルの内の気泡を除去した。異なるGFレポーターを用いて遺伝子操作したJurkat細胞株のようなT細胞レポーター細胞または初代T細胞(4000細胞)をトランスフェクションの24時間後にアレイプレートに入れた。プレートイメージングは、T細胞と293TベースのT細胞刺激物質との共培養の12時間後に、InCell画像分析装置(GE)によって行った。Cellprofilerソフトウェアを用いた最適化画像解析の後、潜在的な調節機能を有する遺伝子候補が同定された。例えば、分子がT細胞活性を調節することについて有効でない場合、GFシグナルは類似したままである。分子がT細胞活性の刺激シグナルとして作用する場合、相対的に強いGFシグナルが検出される。あるいは、分子が阻害性である場合、はるかに弱いGFシグナルが観察されるだろう。図3に示されるように、293T・2A/m抗CD3細胞は単独でT細胞の活性化を刺激し、基底シグナルとして働く検出可能なGFシグナルを生成した。B7.1、B7.2、OX40Lまたは4-1BBLの発現により、蛍光シグナルが上昇したが、それは、それらのそれぞれがT細胞活性の刺激シグナルとして役立ったことを示す。対照的に、293T・2A/m抗CD3細胞のB7-H1またはB7-H4を用いたトランスフェクションは、蛍光シグナルの低下をもたらし、これらの分子がT細胞活性を阻害することを示唆した。

10

【0129】

あるいは、特定のサイトカインの放出をレポーターとして使用して、T細胞活性の指標として役立つことができる。サイトカイン検出のために、共培養の24時間または48時間後に上清を回収し、ELISA(eBioscience)によって定量した。図4に示すように、GJB1およびFOLH1の発現は、T細胞からのIFN-放出を刺激したが、FLT1、SEMA6a、SEC22bおよびGP1BAの発現は、IFN-放出を減少させた。

20

【0130】

アレイスクリーニングについては、それぞれのT細胞レポーター細胞を三連プレートにおいてスクリーニングし、それぞれの遺伝子の平均値を計算し、アレイ中のGF陽性対象の密度に基づいてランク付けした。Jurkat T細胞活性に刺激機能を有する膜遺伝子でトランスフェクトされた細胞は、対照よりも高いGFの読み取り値を有し、T細胞活性に対して阻害機能を有する膜遺伝子でトランスフェクトされた細胞は、より低いGF読み取り値をもたらした。全てのGFシグナルを、CellProfilerソフトウェア(Broad Institute)により、それぞれのウェルのGF陽性対象および全GF密度の両方で正規化および定量化した。図5に示されるように、T細胞活性に対する刺激および阻害機能を有するいくつかの遺伝子が同定された。これらのGS-TCAAスクリーニングからの阻害機能を有する最上位の候補、例えばFLT1、SEMA6a、SEC22bおよびGP1Baを、さらなる検証のためにまとめて蓄えた。

30

(実施例3)

がん/自己免疫疾患を治療する可能性を有する新規な免疫調節遺伝子の検証

【0131】

GS-TCAA研究から得られた遺伝子候補の機能をさらに検証するために、初代ヒトT細胞を用いた*in vitro*機能アッセイが実行される。さらに、自己免疫疾患および/またはがんに関与する遺伝子を絞り込むために、バイオインフォマティクスアプローチが利用される。いくつかの最上位の遺伝子候補は、受容体アレイシステムにおける潜在的なカウンター受容体同定についてもスクリーニングされ、および*in vivo*研究のために選択され、ヒト化マウスPDモデルを含むヒト化マウス疾患モデルにおけるがん/自己免疫疾患の治療可能性を試験する。

40

in vitro T細胞機能アッセイ

【0132】

GS-TCAA分析から同定された最上位の遺伝子候補は、初代T細胞を用いた*in vitro*機能アッセイによって検証される。遺伝子候補を用いて293T・2A/m抗CD3細胞をトランスフェクトし、ヒト初代CD8またはCD4細胞と共培養する。T細胞

50

胞増殖、アポトーシス、およびサイトカイン（例えば、IFN-g、IL-2またはIL-10）の放出についてのアッセイは、上に記載のように実行される。

受容体アレイ技術（RAT）

【0133】

未知のカウンター受容体をスクリーニングするために、以前に記載されたように受容体アレイ技術が実行される（Zhu Yら、Nat Commun、4巻：2043頁、2013年；Yao Sら、Immunity、34巻（5号）：729～740頁、2011年）。簡潔には、標的遺伝子（分泌タンパク質をコードする）または標的遺伝子の細胞外ドメイン（膜貫通タンパク質をコードする）をタグ遺伝子（マウス IgG2a Fc、ヒト IgG1 Fc、FLAG、または6xHIS）と遺伝的に融合させて、以前に記載されたような融合遺伝子を調製する（Chapoval, Al.ら、Mol Biotechnol 21巻（3号）：259～264頁、2002年）。個々の融合遺伝子の293T細胞へのトランスフェクションの際に、精製組換え融合タンパク質を使用して受容体アレイに対してスクリーニングする。タグに対する蛍光標識二次抗体を適用して、標的タンパク質のトランスフェクトされた293T細胞への結合を検出し、Applied Biosystems 8200細胞検出システムを使用してスクリーニングし、CDS 8200ソフトウェアで分析する。

【0134】

細胞ベースのアッセイは、全てのヒト膜cDNAのおよそ90%をスクリーニングし、このことにより、受容体アレイ技術を使用した大規模スクリーニングおよびT細胞関連表面-分子相互作用のスクリーニングが可能となる。細胞ベースのハイスループットスクリーニングのための堅牢で安定したシステムが確立され、超ハイスループット受容体-リガンドスクリーニングについてのこの革新的なシステムの開発は、ロボット工学を使用することにより拡張され、受容体アレイを元の384ウェルプレートフォーマットから1,536ウェルプレートフォーマットまでに性能向上させた。

【0135】

自動化のためのTecan Freedom EVO 200液体ハンドリングプラットフォームを利用することにより、1,536ウェルプレートフォーマットをスクリーニングする際に、試薬の使用において4～5倍の減少と、感度の向上が達成された。トランスフェクション手順を最適化し、1,536ウェルプレートフォーマットにおいて、5ngの個々のプラスミドおよびリポフェクタミンの混合物でトランスフェクトすることにより、所望のタンパク質の高発現レベルが達成されたことを実証した。典型的には、トランスフェクションの12時間後、それぞれのウェルにおいて293T細胞の50～70%がトランスフェクトされたプラスミドを発現した。新しいプラスミドがシステムに組み込まれた場合に、特異的モノクローナル抗体を用いて無作為に選択されたウェルにおける発現を調べることによって、品質管理実験を実行した。この最適化と性能向上により、ハンドリング時間が短縮され、タイミング、コスト、労力について4倍効率的なスクリーニングによりスクリーニング全体が改善された。

【0136】

したがって、受容体アレイ技術を使用することにより、T細胞活性アレイから選択された遺伝子候補について相互作用するタンパク質が同定される。相互作用するタンパク質の同定は、同定された遺伝子候補の免疫機能についてのさらなる洞察を提供し、マウス腫瘍モデルにおける治療可能性を試験するためのin vivo研究の候補の選択を促進する。

ヒトがんのin vivoマウスモデル

【0137】

がんモデルにおける治療可能性を試験するために、最上位の有効な標的に特異的な抗体または最上位候補についての組換えタンパク質が生成される。624ヒトメラノーマ（GP100+HLA-A2+）細胞および腫瘍反応性T細胞を、NOD-scid IL2Rガンマ^{0/11}マウスに注射する。これらのマウスは、遺伝子候補および/または遺伝子候補の抗体で数ラウンドの処置を受け、腫瘍増殖および腫瘍部位における免疫細胞のラ

ンドスケープまたはエフェクター機能を注意深くモニターする。

患者由来異種移植 (P D X)

【 0 1 3 8 】

がん患者から採取したプレトリートメントおよびオントリートメント腫瘍標本における免疫組織化学 (I H C)、多重免疫蛍光 (m u l t i p l e x - I F) および質量分析 (C y T O F) 分析を組み合わせて、腫瘍微小環境 (T M E) の異種性を試験する。これらの技術の組合せは、ヒト T M E における機械的相互作用を同定するためのツールとして使用され得る。具体的には、T M E の免疫学的成分の差異を調べ、ベースラインおよび獲得した耐性の時点での試料を比較する。免疫患者由来の異種移植 (免疫 P D X) モデルとして公知の、ヒト化マウスモデルが開発され、これらの解析と並行してヒト T M E を研究するために使用することができる。これらの研究は、疾患微小環境における応答、耐性および獲得抵抗のメカニズムを明らかにするために不可欠であり、最終的にバイオマーカー開発の基礎を提供し、微小環境の比抵抗メカニズムに基づいたさらなる治療法を提供する。バイオインフォマティクスのアプローチ

10

【 0 1 3 9 】

バイオインフォマティクスのアプローチは、自己免疫疾患およびがんに関する遺伝子を絞り込むために利用される。疾患の進行の間に有意に変化し、疾患の病因の潜在的なシグネチャー遺伝子である遺伝子を同定するために複数の厳格な基準が選択される。

【 0 1 4 0 】

G S - T C A A および潜在的遺伝子候補のさらなる機能検証の後、特定の自己免疫疾患またはがんにおいてのみ調節される特定の遺伝子を同定するために、ランキングシステムが設定される。あるいは、異なる自己免疫疾患またはがんの間で共通の遺伝子が選択され得る。

20

【 0 1 4 1 】

例えば、膜貫通タンパク質および分泌タンパク質のみをコードする遺伝子が、主に、これらの分子の将来の操作が治療抗体または組換えタンパク質で容易になるように、選択される。さらに、この選択により、G S - T C A A および受容体アレイ技術の組合せを使用して、カウンター受容体および機能の同定が可能となる。第 2 の基準は、複数の疾患と共有される遺伝子を選択することである。上方制御された遺伝子が、目的の標的疾患のそれぞれに存在する場合 1 ポイントとしてスコアリングされる、ランキングシステムが使用される。より高い数字は、異なる疾患の間で遺伝子が共有されることを示す。このことにより、異なる自己免疫疾患またはがん型の根底にある共通メカニズムが明らかになる。

30

【 0 1 4 2 】

1 つの特定の疾患に特異的に関与するが他の自己免疫疾患またはがんのタイプには関与しない遺伝子を同定するための選択基準に基づいて、単一の疾患にユニークに関与する遺伝子が選択される。続いて、特定の疾患において、カットオフとして少なくとも 2 倍の変化で上方制御または下方制御される遺伝子が選択される。これは主に統計的考察によるものである。特定の免疫機能に関与し得る特定のタンパク質ドメインを有する遺伝子のリスト、例えば I g スーパーファミリー分子が同定される。最初にこれらの基準で特定の遺伝子を同定した後、これらの標的に対するカウンター受容体スクリーニングを、受容体アレイ技術を使用して実行し、これらの分子およびそれらのカウンター受容体が免疫モジュレーションの潜在的標的であるか否かを、免疫関連機能研究により判定する。

40

【 0 1 4 3 】

自己免疫疾患およびがん微小環境において上方制御される遺伝子およびタンパク質が同定される。N C B I、O n c o m i n e、T C G A がんデータベース、Y a l e 内部がんデータベースおよびヒトタンパク質 A t l a s のような主要データベースを使用して、様々な疾患の間で共有される差次的に発現される遺伝子もまた同定される。続いて、遺伝子セットエンリッチメント分析 (G e n e S e t E n r i c h m e n t A n a l y s i s ; G S E A) を使用して、免疫系、サイトカイン/ケモカインシグナル伝達、またはインターフェロンシグナル伝達に関連する遺伝子、および自己免疫疾患およびがんの発生および進行に重要な役割を

50

果たす抗原提示経路が同定される。最後に、上方制御され、共有された疾患遺伝子は、それらの細胞内位置によって分類され、膜タンパク質は、より容易に治療薬に接近可能であるために、焦点が当てられる。特定の遺伝子については、自己免疫疾患およびがんに影響を及ぼすことが公知である、FcR様遺伝子、HLA関連遺伝子、および共刺激分子(CD86、B7-H1、別名CD274、およびCTLA4)を含む、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーのメンバーであるか否かを決定するために分析が行われる。

【0144】

自己免疫疾患およびがん微小環境において下方制御される遺伝子およびタンパク質を同定するために、同様のアプローチが、公共およびアクセス可能なデータベースのバイオインフォマティクス分析を使用して施され、様々な疾患の間で共有される遺伝子を同定する。

10

【0145】

GS-TCAAスクリーニング、例えばFLT1、SEMA6a、SEC22bおよびGP1Baから同定されたT細胞活性に対する阻害機能を有する候補を、様々なタイプのがんにおけるそれらの発現レベルについてさらに分析した。図6~9において実証されるように、FLT1、SEMA6a、SEC22b、およびGP1Baの発現レベルは、異なるタイプのがんにおいて異なって調節されることが示された。例えば、SEC22bの発現は、腎臓がん、前立腺がん、肝臓がん、乳がん、頭頸部がん、胃がん、結腸直腸がんおよび副腎がんのような多くのがんにおいて上方制御されたが、SEC22bは肺がんにおいて特異的に下方制御された(図8)。このバイオインフォマティクス分析は、GS-TCAAが免疫モジュレーターの同定において重要であることをさらに確証し、がんおよび/または自己免疫疾患の治療のための潜在的治療標的として、これらの免疫モジュレーターが役立ち得ることを示唆する。

20

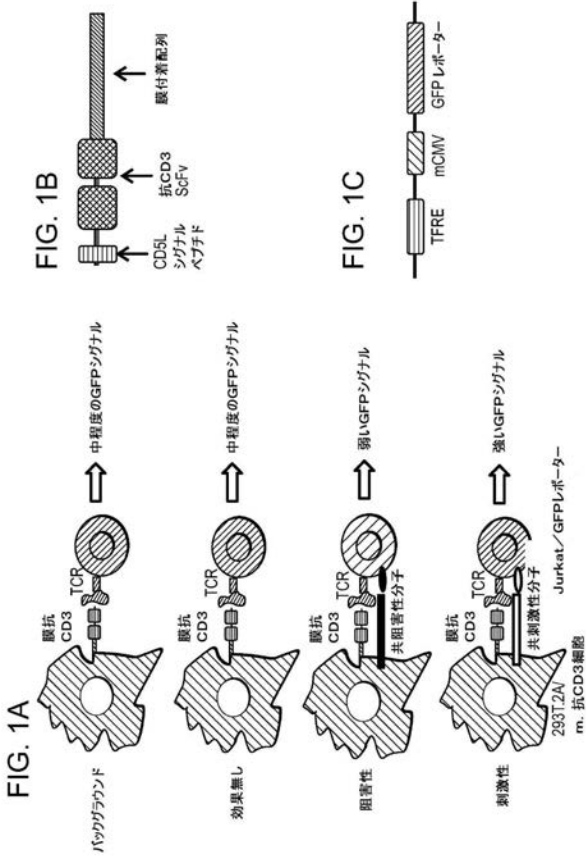
均等物

【0146】

当業者は、本明細書に記載された本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識するか、またはルーチン的な実験のみを用いて確認することができるであろう。そのような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。本出願を通じて引用される全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 図 1 】



【 図 3 】

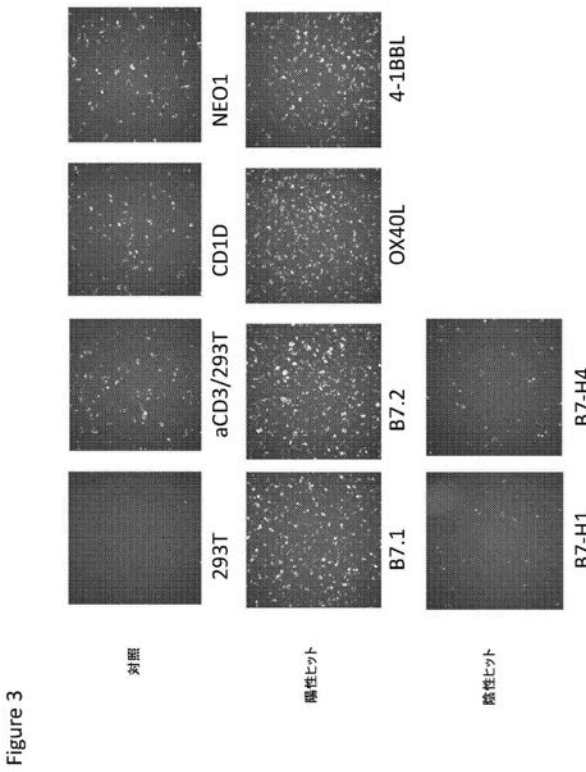


Figure 3

【 図 2 】

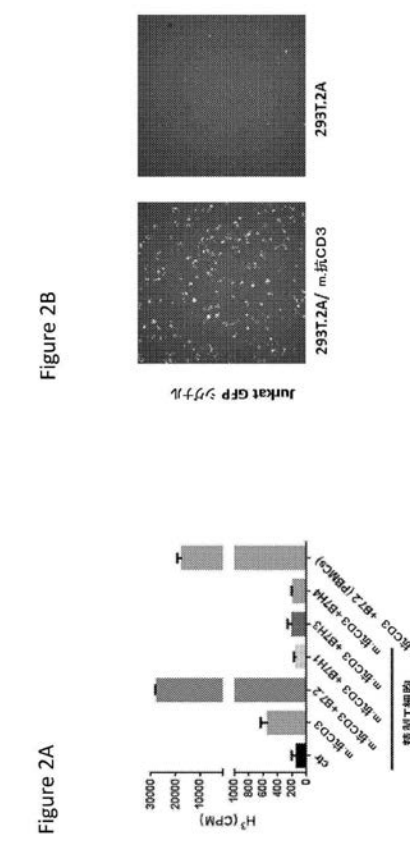


Figure 2A

【 図 4 】

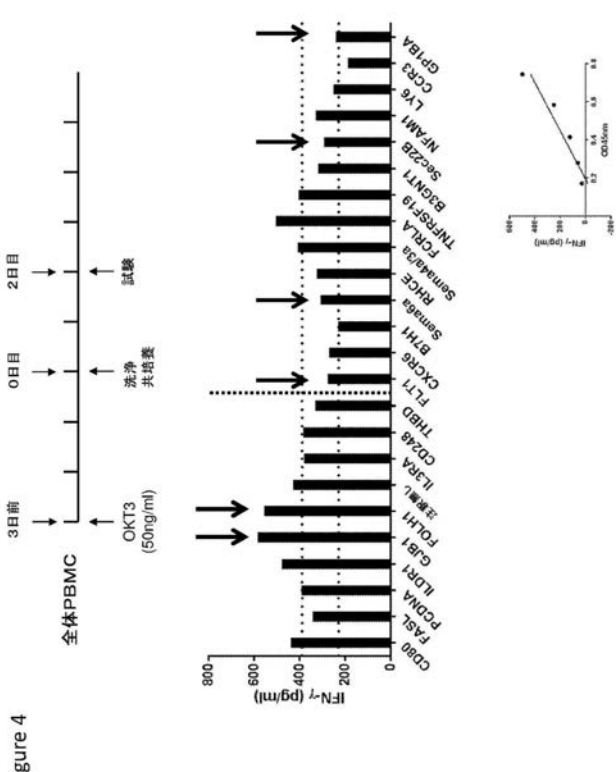


Figure 4

【 図 5 】

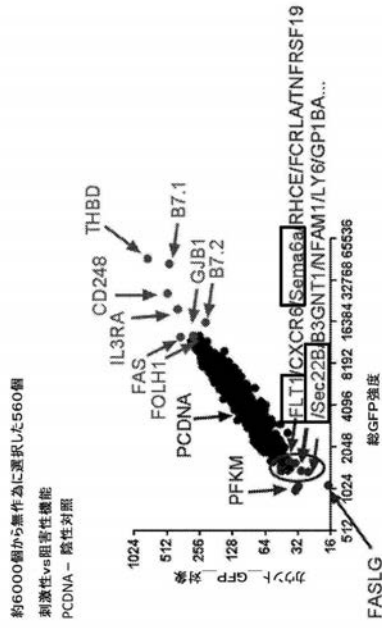


Figure 5

【 図 6 】

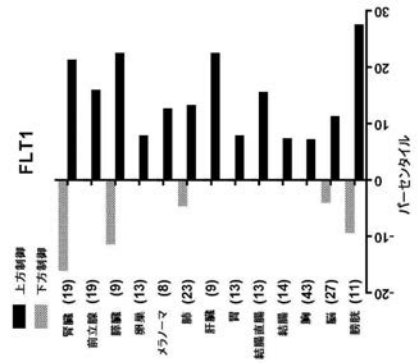


Figure 6

【 図 7 】

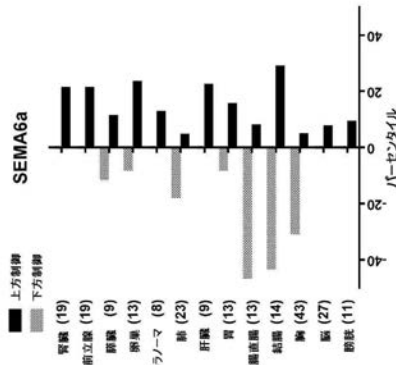


Figure 7

【 図 8 】

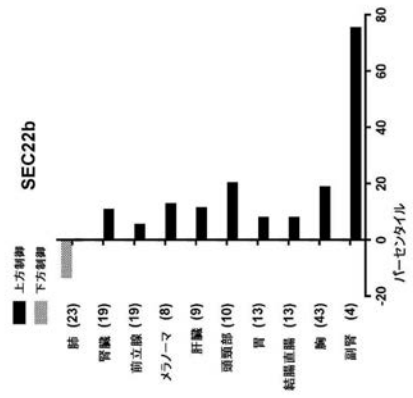
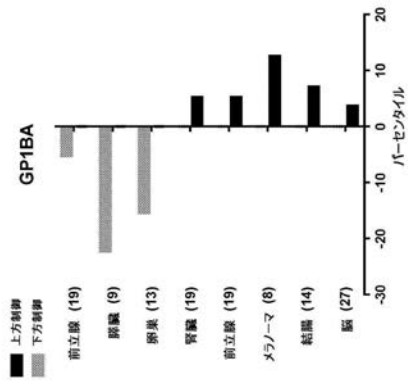


Figure 8

【 図 9 】

Figure 9



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/056395

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RAVI A. MADAN ET AL: "Clinical Evaluation of TRICOM Vector Therapeutic Cancer Vaccines", SEMINARS IN ONCOLOGY, vol. 39, no. 3, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 296-304, XP055331677, US ISSN: 0093-7754, DOI: 10.1053/j.seminoncol.2012.02.010 the whole document page 2, paragraph 2 ----- -/--	1-59
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 2 January 2017		Date of mailing of the international search report 14/03/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jenkins, Gareth

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/056395

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SHENG YAO ET AL: "The B7-CD28 paradigm revisited--- a systemic receptor array approach (178.19)", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 188 (supplement 178.19), no. 1, 1 May 2012 (2012-05-01), XP055331687, the whole document</p> <p>-----</p>	1-59
A	<p>SU-YI TSENG ET AL: "B7-Dc, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 193, no. 7, 2 April 2001 (2001-04-02), pages 837-845, XP055331693, US ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1007/s003359900508 the whole document</p> <p>-----</p>	1-59
A	<p>SWALLOW M M ET AL: "B7H, A NOVEL COSTIMULATORY HOMOLOG OF B7.1 AND B7.2 IS INDUCED BY TNFALPHA", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 11, 1 October 1999 (1999-10-01), pages 423-432, XP000971265, ISSN: 0019-9567 the whole document</p> <p>-----</p>	1-59
A	<p>US 2003/054354 A1 (BENNETT C FRANK [US] ET AL) 20 March 2003 (2003-03-20) the whole document claim 23</p> <p>-----</p>	1-59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/056395**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

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

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

see additional 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 an 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.:

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.:

1-59

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

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/056395

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003054354 A1	20-03-2003	EP 1425293 A1	09-06-2004
		US 2003054354 A1	20-03-2003
		US 2006099613 A1	11-05-2006
		US 2009023599 A1	22-01-2009
		US 2010222231 A1	02-09-2010
		WO 03018601 A1	06-03-2003

International Application No. PCT/US2016/056395

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-59

Genome-scale T cell activity array.

2-22. claims: 60-65

Methods of treating an autoimmune disease or cancer using FOLH1 (invention 2), FAS (invention 3) ... LY6 (invention 21), GB1BA (invention 22) or modulators thereof.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 38/43	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
C 4 0 B 50/06 (2006.01)	C 4 0 B 50/06	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 11/08 (2006.01)	C 1 2 N 11/08	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
C 1 2 N 15/23 (2006.01)	C 1 2 N 15/23	
C 1 2 N 15/24 (2006.01)	C 1 2 N 15/24	
C 1 2 Q 1/6897 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6897	Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/28 (2006.01)	C 1 2 N 15/28	

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

(72)発明者 ワン, ジュン

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 5 1 1, ニュー ハイブン, プロスペクト ストリート
4 7 0, アpartment 3 4

Fターム(参考) 2G045 AA24 CA18 DA13 DA14 DA36
4B029 AA07 AA23 BB11 BB15 BB17 CC02 CC08 EA18 FA02 GA03
4B033 NA16 NB33 ND05 NF06 NG05
4B063 QA01 QA07 QA13 QA14 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ13 QQ42
QQ52 QQ79 QR32 QR35 QS33 QS36 QX02
4B065 AA93Y AA94X AB01 AC14 BA05 BC41 CA24 CA44 CA46
4C084 AA13 AA17 BA44 DA45 DB63 DC01 MA17 MA21 MA22 MA23
MA24 MA31 MA35 MA43 MA44 MA52 MA66 NA14 ZA96 ZB08
ZB21

专利名称(译)	基因组规模的T细胞活性阵列及其使用方法		
公开(公告)号	JP2018538240A	公开(公告)日	2018-12-27
申请号	JP2018518954	申请日	2016-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
[标]发明人	チェンリエピン ワンジュン		
发明人	チェン, リエピン ワン, ジュン		
IPC分类号	C40B40/02 C12Q1/06 C12Q1/68 A61K45/00 A61K48/00 A61K38/43 A61K38/16 A61P43/00 A61P37/06 A61P35/00 G01N33/50 G01N33/53 C40B50/06 C12N15/13 C12N15/12 C12N5/10 C12N11/08 C12N15/113 C12N15/23 C12N15/24 C12Q1/6897 C12M1/00 C12N15/28		
CPC分类号	A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 G01N33/5023 G01N33/505 G01N2333/70532 B01L3/5085 B01L2300/0829		
FI分类号	C40B40/02 C12Q1/06 C12Q1/68 A61K45/00 A61K48/00 A61K38/43 A61K38/16 A61P43/00.105 A61P37/06 A61P35/00 G01N33/50.Z G01N33/53.Y C40B50/06 C12N15/13 C12N15/12 C12N5/10 C12N11/08 C12N15/113.Z C12N15/23 C12N15/24 C12Q1/6897.Z C12M1/00.A C12N15/28		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CA18 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/EA18 4B029/FA02 4B029/GA03 4B033/NA16 4B033/NB33 4B033/ND05 4B033/NF06 4B033/NG05 4B063/QA01 4B063/QA07 4B063/QA13 4B063/QA14 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA93Y 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA05 4B065/BC41 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DA45 4C084/DB63 4C084/DC01 4C084/MA17 4C084/MA21 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA43 4C084/MA44 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA96 4C084/ZB08 4C084/ZB21		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	62/241466 2015-10-14 US		
其他公开文献	JP2018538240A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了基因组规模的T细胞活性阵列 (GS-TCAA) 和制备这些阵列的方法以及使用它们鉴定免疫调节剂的方法。本发明至少部分基于新型基因组规模T细胞活性阵列 (GS-TCAA) 的开发, 该阵列允许鉴定参与T细胞生物网络调节的人膜蛋白。GS-TCAA 允许使用新的基于细胞的荧光报告系统研究超过90%的总人膜基因的不同T细胞活性, 例如增殖, 抑制和消耗。

