

(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2005-527221

(P2005-527221A)

(43) 公表日 平成17年9月15日(2005.9.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/50 P	
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2004-507843 (P2004-507843)  
 (86) (22) 出願日 平成15年5月29日 (2003. 5. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成17年1月25日 (2005. 1. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/005650  
 (87) 国際公開番号 W02003/100437  
 (87) 国際公開日 平成15年12月4日 (2003. 12. 4)  
 (31) 優先権主張番号 02011964.0  
 (32) 優先日 平成14年5月29日 (2002. 5. 29)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

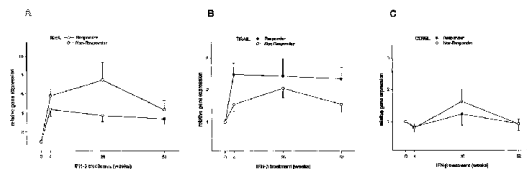
(71) 出願人 504436778  
 ヒヤリテーユニヴェルズィテーツメディジ  
 ン ベルリン  
 ドイツ連邦共和国, 10117 ベルリン  
 , シューマンストラッセ 20/21  
 (74) 代理人 100088904  
 弁理士 庄司 隆  
 (74) 代理人 100124453  
 弁理士 資延 由利子  
 (74) 代理人 100129160  
 弁理士 古館 久丹子  
 (72) 発明者 ヴァンディンガー, クラウス-ペーター  
 ドイツ連邦共和国, 13187 ベルリン  
 , フローラプロメナーデ 11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T R A I L 発現の決定による I 型インターフェロン応答性MS患者の同定方法

(57) 【要約】

本発明は、マーカーとしてT R A I L 遺伝子および/または蛋白質発現を決定することによって、I型インターフェロン ( I F N )、特にI F N - に感受性であるM S 患者を同定し、およびM S 患者でのI F N 療法をモニタリングする方法に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

TRAIL 発現および/または TRAIL 蛋白質の濃度を決定することを特徴とする、多発性硬化症の治療に利用される I 型インターフェロン (IFN) 療法に対し個体を陽性応答者または非応答者として同定する方法。

## 【請求項 2】

使用する療法が、IFN - 療法である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

TRAIL 発現の決定および/または TRAIL 蛋白質濃度の決定を IFN 療法の前に行う、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

TRAIL 発現の決定および/または TRAIL 蛋白質濃度の決定を哺乳動物起源の試料によって実施する、請求項 1 から 3 のいずれか 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記試料が、体液、その画分、組織抽出物、および、細胞抽出物を含む群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記体液が、全血、その画分、血清、血漿、脳脊髄液、滑液、腹水浸出液、炎症浸出液、および尿を含む群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

20

## 【請求項 8】

(a) TRAIL ポリペプチドまたはその部分をコードする TRAIL 核酸の量および/または濃度を検出しかつ/または測定することによって TRAIL 発現を決定し、かつ  
(b) TRAIL ポリペプチドまたはその部分の量および/または濃度を検出しかつ/または測定することによって TRAIL 蛋白質の濃度を決定する、前記請求項 1 から 7 のいずれか 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

液体試料に可溶性 TRAIL 蛋白質の量および/または濃度を測定することによって TRAIL 蛋白質濃度の決定を実施する、請求項 8 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

TRAIL ポリペプチドの量および/または濃度の測定が、抗 TRAIL 抗体を使用するイムノアッセイによって行われる、請求項 8 および 9 のいずれか 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

決定した TRAIL ポリペプチドの量および/または濃度を限界値と比較して陽性応答者と非応答者を判別する、請求項 8 から 10 のいずれか 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記限界値が、少なくとも  $350 \pm 20 \text{ pg/ml}$  であり、約  $584.1 \text{ pg/ml}$  が好ましい、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

請求項 4 から 6 のいずれか 1 による試料中の TRAIL mRNA の量および/または濃度を測定することによって TRAIL 核酸の量および/または濃度を決定する、請求項 8 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記試料が、血液細胞、末梢免疫細胞、ニューロン組織、および筋組織の抽出物を含む群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

TRAIL mRNA の量および/または濃度の測定を、1 つまたは複数の TRAIL 特異的プローブを使用しポリメラーゼ連鎖反応を援用して実施する、請求項 13 および 14 のいずれか 1 に記載の方法。

50

## 【請求項 16】

T R A I L m R N A の量および/または濃度を限界値と比較して陽性応答者と非応答者を判別する、請求項 13 から 15 のいずれか 1 に記載の方法。

## 【請求項 17】

T R A I L 核酸の量および/または濃度が、1 つまたは複数の生体活性マーカーの核酸の量および/または濃度と相関し、ならびに/あるいは T R A I L ポリペプチドの量および/または濃度が、1 つまたは複数の生体活性マーカーのポリペプチドの量および/または濃度に相関する、前記請求項 1 から 16 のいずれか 1 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記生体活性マーカーが、M x A 蛋白質または他の I F N 誘導性蛋白質を含む群から選

10

## 【請求項 19】

多発性硬化症の治療に利用される I F N 療法をモニタリングするための請求項 1 から 18 のいずれか 1 に記載の方法の使用。

## 【請求項 20】

前記 T R A I L 遺伝子またはその部分に特異的な核酸プローブおよび/または(1 つまたは複数の)プライマー、ならびに/あるいは前記 T R A I L ポリペプチドまたはその部分に特異的な抗体を含む、請求項 1 から 19 のいずれか 1 に記載の方法を実施するためのキット。

## 【請求項 21】

E L I S A 検定に適切で前記 T R A I L ポリペプチドに特異的な少なくとも 1 個の抗体を含む、請求項 20 に記載のキット。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、T R A I L 遺伝子および/または蛋白質の発現をマーカーとして決定することによる、I 型インターフェロン(I F N)、特に I F N - に感受性の M S 患者を同定する方法、および M S 患者での I F N 療法をモニタリングするための方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

多発性硬化症(M S)は、世界中で約 100 万人が患う最もありふれた中枢神経系(C N S)疾患であり、若年成人で長引く重篤な障害を引き起こす。その病因は、依然として不明であるが、その病因の根底には脳および脊髄の白質内の自己分子に対抗する、T 細胞が媒介する炎症過程があるという概念が有力な証拠をもって支持されている(Martin et al. 1992, Annu Rev Immunol 10: 153-187)。M S 患者および健康な個人にはミエリン反応性 T 細胞が存在するので(Pette et al. 1990, Neurology 40: 1770-1776; Hohlfeld et al. 1995, Neurology 45 (suppl 6): S33-S38)、M S の一次免疫異常には、T 細胞活性化状態を高め厳格な活性化要件を弱める調節機序の異常が関与する可能性が極めて高い(Zang et al. 1994, J Exp Med 179: 973-984; Markovic-Plese et al. 2001, J Clin Invest 108: 1185-1194)。

30

## 【0003】

I 型インターフェロン(I F N)であるインターフェロンベータ(I F N - )は、免疫調節特性を有する多面的サイトカインであり、M S の治療において世界標準になっている。この薬物の応答者で有効性が十分実証されているにも関わらず、かなりの数の患者が I F N - に応答しない。M S に関して、なぜ I F N - 療法が有効なのか、または有効でないのか、かつ I F N - により M S の臨床経過がどのように変化するのは依然として不明である(I F N B 多発性硬化症研究グループ、およびブリティッシュコロンビア大学 M S / M R I 分析グループ 1995, Neurology 45: 1277-1285; Jacobs et al. 1996, Ann Neurol 39: 285-294、P R I S M S 研究グループ 1998, Lancet 352: 1498-1504)。推定される作用機序には、T 細胞の増殖抑制、多数のサイトカインの調節、並びに細胞接着

40

50

、細胞遊走、およびマトリックスメタロプロテナーゼ活性への干渉による血液脳関門開放の阻止が含まれる (Rudick et al. 1996, Ann Neurol 40: 618-627; Wang et al. 2000, J Immunol 165: 548-557; Stone et al. 2000, Ann Neurol 37: 611-619)。しかし、MSにおいてIFN- $\gamma$ がどのように働くかを理解することはマーカーの開発に不可欠である。すなわちそのマーカーがあれば個体がIFN- $\gamma$ に陽性の応答をするチャンスがあるか否かが予測可能になる。その予測が可能であれば、それはIFN- $\gamma$ 療法のコストおよび患者に起こり得る副作用の面で価値があり、MS患者を治療する現在と将来の戦略の有効性が増大する。

#### 【0004】

したがって、MS患者でのIFN- $\gamma$ 療法の臨床結果と相関し、個々の患者の治療応答を予測する方法において使用可能なマーカーを同定する必要がある。 10

#### 【0005】

最近、固有で特異的な免疫応答に關与し、MSでIFN- $\gamma$ の潜在的なエフェクター標的である多数の遺伝子が同定された (Wandinger et al. 2001, Ann Neurol 50: 349-357)。TNF/神経成長因子スーパーファミリの新規な構成員であって、腫瘍壊死因子 (TNF) 関連アポトーシスを誘導するリガンド (TRAIL、APO2Lとも称される) (Wiley et al. 1995, Immunity 3: 673-682) が、*in vitro*でIFN- $\gamma$ によって一貫して上方調節される遺伝子の1つであった。興味深いことに、TRAILは内在性IFN- $\gamma$ の誘導を媒介し、それによってこの療法の効果を増幅することも分かってきた (Kumar-Sinha et al. 2002, J Biol Chem 277: 575-585)。 20

#### 【0006】

最近、そのアポトーシス誘導効果 (Wiley et al. 1995, Immunity 3: 673-682) とは別に、TRAILがT細胞レベルで強力な抗炎症特性を発揮することが分かった (Song et al. 2000, J Exp Med 191: 1095-1104; Hilliard et al. 2001, J Immunol 166: 1314-1319; Lunemann et al. 2002, J Immunol 168: 4881-4888)。TRAIL受容体2による全身的な中和を行うとコラーゲン誘導関節炎および実験的な自己免疫脳脊髄炎が悪化することが自己免疫疾患動物モデルの研究によって実証され、T細胞増殖およびエフェクター機能にTRAILが作用することが示唆されている (Song et al. 2000, J Exp Med 191: 1095-1104; Hilliard et al. 2001, J Immunol 166: 1314-1319)。つい最近、ヒト免疫系において、Lunemann et al. (2002, J Immunol 168: 4881-4888) が、TRAILはアポトーシスの誘導に失敗しても、自己反応性かつ外来抗原特異的T細胞の活性化を阻害することを示している。特に、リンパ球の活性化に極めて重要な、ストア作動性カルシウム放出によって活性化されるカルシウムチャンネルを介して、TRAILはカルシウム流入を負に調節し、さらにT細胞抗原特異性あるいはTヘルパー表現型とは無関係に、後続の細胞周期の進行およびサイトカインの産生を阻害する (Lunemann et al. 2002, J Immunol 168: 4881-4888)。TRAILがヒトT細胞エフェクター機能にこのような影響を与えることから、TRAIL系がMSの病因に役割を果たしていることが示唆され、その役割の中で活性化したミエリン特異的T細胞が炎症性脳損傷を媒介すると思われる。病気の自然な進行中、TRAILはMS患者の末梢免疫細胞中で増加することが判明したこと、および再発寛解型MS患者において臨床的寛解時にTRAIL濃度が最高であったことによ 30 40

#### 【0007】

ヒトT細胞に対するその免疫制御特性の他に、TRAILは、形質転換していないヒト肝細胞および脳細胞でアポトーシス型細胞死を誘導することが分かった (Jo et al. 2000, Nat Med 6: 564-657; Nitsch et al. 2000, Lancet 356: 827-828)。後者の知見は、抗炎症特性および破壊的特性の促進による、神経炎症でのTRAILの両刃の役割を示唆している。しかし、血液脳関門の統合性に与えるIFN- $\gamma$ の即時効果を考慮すると、MS治療の際にIFN- $\gamma$ により誘導されたTRAILの上方調節には、CNSに対する直接効果よりも周辺での免疫制御機序が含まれる可能性がより高い (Stone et al. 1995, Ann Neurol 37: 611-619)。

## 【0008】

現在まで、IFN-治療に対する患者の感受性を高い信頼度で予測することはできない。IFN-治療が極めて高価であり、医療システムに莫大な経済的負担を課していることを考慮すれば、患者のIFN-療法の結果について予測ができれば望ましい。さらに、個々の患者にとって、一方で恩恵の可能性と他方で予想されるはずの副作用を比較考慮するために、そのような予測を立てることは極めて望ましい。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

したがって、本発明の目的は、個々のMS患者においてIFN-療法が成功するチャンスを実証可能にすることである。 10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

TRAIL発現および/またはTRAIL蛋白質の濃度を決定することを特徴とする、MSの治療に利用されるI型IFN療法に対して陽性応答者または陰性応答者、すなわち、非応答者として個人を同定する方法によってこの目的を解決する。

## 【0011】

MSの治療に利用されるI型IFN療法をモニタリングするために本発明による方法を使用することによってもこの目的は解決される。

## 【0012】

高用量のIFN-に対するMS患者の応答をモニタリングするために本発明による方法を使用することによってもこの目的は解決される。 20

## 【0013】

IFN-治療経過中に中和抗体(NAB)の発生および/または出現をモニタリングするために本発明による方法を使用することによってもこの目的は解決される。

## 【0014】

TRAIL遺伝子またはその部分に特異的な核酸プローブおよび/または1つまたは複数のプライマー、ならびに/あるいはTRAILポリペプチドまたはその部分に特異的な抗体を含む、本発明による方法を実施するためのキットによってこの目的はさらに解決される。別の好ましい実施形態では、本発明による方法を実施するためのキット(または医薬組成物)は、標準化TRAIL蛋白質プローブ(すなわち、血清または血漿など)、ならびに1つまたは複数の抗TRAIL抗体を含み、場合によっては、別の成分と混合して、とりわけ、ELISA検定、好ましくは大規模自動操作で適切に使用することができる。 30

## 【0015】

本発明の方法は、IFN-療法で使用されることが好ましい。

## 【0016】

本発明の方法は、IFN療法の前にTRAIL発現および/またはTRAIL蛋白質の濃度を決定するために使用することが好ましい。

## 【0017】

前記方法では、試料は、哺乳動物から得ることが好ましく、ヒトから得ることがより好ましい。 40

## 【0018】

好ましい実施形態では、試料は、体液、その画分、組織抽出物、および細胞抽出物を含む群から選択する。

## 【0019】

より好ましい実施形態では、体液は、全血、血清、血漿、脳脊髄液、滑液、腹水浸出液、炎症の浸出液、および尿を含む群から選択する。

## 【0020】

本発明による方法の特定の好ましい実施形態では、 50

(a) T R A I Lポリペプチドまたはその部分をコードするT R A I L核酸の量および/  
または濃度を検出しかつ/または測定することによってT R A I L発現を決定し、かつ  
(b) T R A I Lポリペプチドまたはその部分の量および/または濃度を検出しかつ/ま  
たは測定することによってT R A I L蛋白質の濃度を決定する。

## 【0021】

本発明による方法の一実施形態では、液体試料中の可溶性T R A I L ( s T R A I L )  
蛋白質の量および/または濃度を測定することによってT R A I L蛋白質濃度の決定を実  
施する。

## 【0022】

T R A I Lポリペプチドの量および/または濃度の測定は、抗T R A I L抗体を使用す 10  
るイムノアッセイによって行われることが好ましい。

## 【0023】

イムノアッセイは、酵素結合免疫吸着剤検定 ( E L I S A ) が好ましいが、たとえば、  
ラジオイムノアッセイ ( R I A )、またはウェスタンブロットなどのプロットング技術  
でもよい。

## 【0024】

決定したT R A I Lポリペプチドの量および/または濃度を限界値と比較して陽性応答  
者と非応答者を判別するのが好ましく、その限界値は約  $350 \pm 20 \text{ pg/ml}$  である。  
とはいえ、より高い濃度の s T R A I L である約  $584.1 \text{ pg/ml}$  も療法前に 90 .  
5 % の応答者および 71 . 4 % の非応答者の臨床結果を正確に予測した。 20

## 【0025】

あるいは、膜に結合したT R A I L蛋白質の濃度を決定することができ、この決定は抗  
T R A I L抗体の使用によって、たとえば、F A C S c a n分析、E L I s p o t検定、  
または免疫組織化学技術で行われることが好ましい。

## 【0026】

本発明の別の実施形態では、T R A I L核酸の量および/または濃度は、組織または細  
胞抽出物試料中のT R A I L m R N Aの量および/または濃度の測定によって決定するこ  
とが好ましい。

## 【0027】

好ましい実施形態では、前記試料には、血液細胞、末梢免疫細胞、ニューロン組織、お 30  
よび筋組織の抽出物を含む群から選択した抽出物が含まれ、その中でも末梢血単核細胞 ( P B M C )  
抽出物が特に好ましい。

## 【0028】

T R A I L m R N Aの量および/または濃度の測定は、1つまたは複数のT R A I L特  
異的プローブを使用するポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) を用いて行うことが好ましい。

## 【0029】

あるいは、ノーザンブロットなどの他の核酸定量技術を使用することができる。さらに  
、T R A I L m R N Aの量および/または濃度は、固体組織または細胞試料で、たとえば  
、T R A I L特異的プローブを使用する i n s i t uハイブリッド形成法によって決定  
することができる。 40

## 【0030】

T R A I L m R N Aの量および/または濃度は、限界値と比較して陽性応答者と非応答  
者を判別することが好ましい。前記限界値は、基準値と比較して少なくとも2倍である。

## 【0031】

T R A I L核酸および/またはポリペプチドの量および/または濃度は、それぞれ、M  
x A蛋白質や他のI F N誘導性蛋白質など、I F N - 療法の1つまたは複数の生体応答  
マーカー核酸および/またはポリペプチドの量および/または濃度に相関することが好ま  
しい。

## 【0032】

本明細書では、顕性M Sを患う個人は、一般的に受け入れられている判定基準に従って 50

診断する (Poser et al. 1983, Ann Neurol 13: 227-231; McDonald et al. 2001, Ann Neurol 50: 121-127)。(拡大障害状態尺度 E D S S によって定義した、; Kurtzke 1983, Neurology 22: 1444-1452) 障害状態は、臨床パラメータによって評価した。

【0033】

本明細書では、「陽性応答者」を、I F N - の治療中にさらに再発することなく、E D S S も低下しなかった患者として定義する一方で、引き続き1度または複数回再発している患者を「非応答者」として定義する。別の態様では、I F N - 治療の陽性応答者および非応答者を臨床補助的活性マーカー、たとえば、磁気共鳴画像法 (M R I) によって定義する。

【0034】

T R A I L 発現および/または T R A I L 蛋白質の濃度の決定を体外で実施する方法として本発明の方法は理解されるものとする。

【0035】

本明細書で使用される用語「決定」は、定性的検出および定量を意味してよい。

【0036】

本明細書では、「抗 T R A I L 抗体」は、T R A I L ポリペプチドまたはその部分を目的とする抗体であり、ポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、二重抗体 (diabodies)、およびキメラを含めてよい。

【0037】

本明細書では、「T R A I L」は、腫瘍壊死因子 (T N F) 関連アポトーシス誘導リガンドのことをさし、すなわち、略して「T R A I L」は特異的形態特徴を伴うある種の型の細胞死であるアポトーシスを誘導することが初めに注目された分子である。T N F および T R A I L は、類似の能力を持つ同じ分子ファミリーに属する。その最初の発見以来、T R A I L 分子の他の機能が同定されてきた。本明細書で示したデータにとって重要な機能は T 細胞作用の阻止であり、この機能は炎症を全体的に防止するので抗炎症性であると考えられることができる。T R A I L は、T 細胞数の増加 (増殖、次項参照のこと) を担う細胞周期の一定の経路を阻害することによってこの効果を生み出している。

【0038】

本明細書で使用される「T細胞増殖/細胞周期」は、T細胞数の増加をさしT細胞増殖と称される。この過程のために予め必要な条件は、カルシウムが主要な役割を担う活性化段階に始まり、続いて単細胞を分割して2個の細胞に導く一連の事象である。後者が生じるためには、細胞はいくつかのステップ [たとえば、G (=間) 期および S (=合成) 期] からなり、いくつかの分子によって調節される、いわゆる、「細胞周期」を経なければならない。

【0039】

「遺伝子発現プロファイリング」により、たとえば、c D N A マイクロアレイ、すなわち、遺伝子発現の同時測定用に数百および数千の異なるプローブを含むマイクロアレイによって、特定の時間に特定の組織で発現される遺伝子のスナップ写真が得られる。

【0040】

本明細書では、「実時間定量的 r t P C R」は、二重標識蛍光プローブの分解を P C R 増幅に伴ってリアルタイムにモニタする方法をさす。入力標的 R N A 濃度は、レポーター蛍光放出が閾値濃度を超過して増加する (P C R サイクルで測定した) 時間に相関する。

【0041】

本明細書で使用される「R O C 分析」は、一定の診断パラメータに基づき一連の判別を行って異なる2つの状態 (病人、および非病人) に分ける必要があるとき、いかに正確に診断試験を実施するか統計的定量方法をさす。その判別パラメータのあらゆる値をカットオフとして使用し対応する感受性および特異性を計算する。

【0042】

要するに、T R A I L が M S の I F N - 療法における生体応答マーカーであるとの同定は本明細書の開示が最初である。初期のかつ持続した T R A I L 遺伝子の誘導が、I F

10

20

30

40

50

N - 療法応答のマーカーであることは、その遺伝子および蛋白質の発現プロファイルと長期間治療したMS患者の臨床疾患マーカーとを結びつけることによって実証されている。TRAIL遺伝子の*in vivo*プロファイルおよび蛋白質の発現によって、IFN - 療法の非応答者と応答個体とをより詳細に判別することができる。さらに、患者血清中のsTRAIL蛋白質の濃度が高い場合には療法を開始する前ですら治療応答のあることを予測することができた。sTRAILの血清濃度を決定するためにELISAを使用して、2つの限界値、その1つの値は約 $350 \pm 20 \text{ pg/ml}$ 、高い方の値はすなわち $584.1 \text{ pg/ml}$ が観察された。したがって、これらの限界値より高い濃度では、IFN - 療法に対して陽性の応答が予測されることが示唆されるが、低い濃度では応答しないことが指摘される。

10

## 【0043】

次に、本発明を添付図に関する以下の実施例によってさらに説明する。本発明の範囲にどんな制限を加える意図もなく実施例は全て、例示のためにのみ提供される。引用した参照文献は全て、その全体が参照により本明細書に編入される。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0044】

実施例を説明する前に図について述べる。

## 【0045】

図1は、IFN - 1a療法中のMS患者62人のMxA、TRAIL、およびCD95Lの自発的遺伝子発現を示す。末梢血単核細胞(PBMC)試料をIFN - 1a療法開始前、ならびに療法下4週間目、26週間目、および52週間目に得た。全RNAを抽出し、実時間(rt)PCRによって相対的mRNA濃度を決定した。遺伝子発現濃度をヒポキサンチンホスホリル転移酵素(Hprt)の発現に対して標準化した。MxA蛋白質遺伝子発現の誘導をIFN - 療法の生体応答マーカーとして*in vivo*で測定した。変化を治療前の遺伝子発現濃度と比べて示す。データを平均値 $\pm$ SEMとして示す。時間の影響を1群MANOVA、各 $p < 0.05$ によって証明した。治療4週間後、26週間後、および52週間後の変化をPost-hoc Wilcoxon検定した結果を多重調節した基準と比較した(\* $p < 0.001$ )。

20

## 【0046】

図2は、IFN - 「初年度応答者」( $n = 20$ )および「初年度非応答者」( $n = 19$ )のTRAIL遺伝子発現の示差的な誘導を示す。非応答者とは対照的に、IFN - 1a療法によって、臨床治療に応答するMS患者ではTRAIL遺伝子発現が初期におよび持続して上方調節される。MxA遺伝子発現が上方調節されることから、両患者群においてIFN - 1aの*in vivo*生体有効性が実証される。CD95Lは、どんな患者の部分集団においてもIFN - 療法によって顕著に調節されなかった。\* $p < 0.05$ 。

30

## 【0047】

図3は、IFN - 治療中のTRAIL遺伝子発現の上方調節が、中和抗体(NAB)の存在下で阻害されることを示している。治療1年後に、IFN - 1aに対してNABが生じた患者の第3部分集団( $n = 23$ )でMxAおよびTRAILの自発的遺伝子発現を測定した。NABの存在は18ヵ月後に確認された。MxAおよびTRAIL遺伝子発現の初期上方調節は、中和抗体の存在下で阻害された。時間作用：1群MANOVA、各 $p < 0.0001$ 、多重調節したPost-hoc Wilcoxon検定(\* $p < 0.001$ )。

40

## 【0048】

図4は、患者部分集団の基準TRAIL遺伝子発現濃度を示す。遺伝子発現濃度をHprtの発現に対して標準化した。箱ひげ図は、各群の濃度中央値(箱内水平線)、25および75パーセントイル(箱の上端および下端)、および10および90パーセントイル(箱の上方および下方に伸びた線)を表す。患者下位群間には有意差は認められなかった(Mann-Whitney-U検定)。

50

## 【0049】

図5は、健康な個体と比較した(A)、およびIFN- $\gamma$ 療法中の(B)MS患者の可溶性TRAIL蛋白質の濃度を示す。実験の詳細は実施例4参照のこと。

## 【0050】

図6は、IFN- $\gamma$ によるTRAILの遺伝子転写および蛋白質発現の調節を示す。PBMC(ウェル当たり $10^6$ 個)を48穴プレートにて最終容量1mlで指定した時間培養した。PHA( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )およびインターロイキン-2(IL-2)( $10\text{IU}/\text{ml}$ )のIFN- $\gamma$ (10および $100\text{IU}/\text{ml}$ )で細胞を培養した。TRAIL mRNAをrtPCRによって決定した。遺伝子発現濃度を18SrRNAに対して標準化した(A)。細胞表面発現をフローサイトメトリーによって検出した。抗TRAILモノクローナル抗体と、それに続くフィコエリトリン(PE)標識ヤギ抗マウスモノクローナル抗体によって細胞を染色した(B)。培養上清のsTRAIL蛋白質濃度をELISAによって決定した(C)。2名の健康な個人で得られた結果を示す(平均値 $\pm$ SEM)。

10

## 【0051】

図7は、TRAIL遺伝子発現がIFN- $\gamma$ 治療を受けた、療法応答性患者で特異的に誘導されることを示している。治療を受けた患者、未治療患者、および健康な対象の第2の独立コホートで9ヵ月間にわたって自発的遺伝子発現を測定した。患者の人口統計的特性に関しては表2を参照のこと。TRAIL遺伝子発現に関する顕著な影響はIFN- $\gamma$ 治療応答者で排他的に見受けられた。(MANOVA  $p = 0.026$ )(A)。M $\times$ A遺伝子発現の上方調節は、治療応答者(MANOVA  $p = 0.0064$ )および非応答者(MANOVA  $p = 0.0006$ )でのIFN- $\gamma$ の*in vivo*生体有効性を実証している(B)。

20

## 【0052】

図8は、「初年度応答者」対「初年度非応答者」におけるsTRAIL濃度の予測される判別値を示す。治療前に応答者29人および非応答者20人(NABを有する患者を含む)から得た血清を調査した(A)。IFN- $\gamma$ 療法前の患者の血清中のsTRAIL濃度により予測される治療応答についての感受性および特異性を示すROC特性(材料および方法を参照のこと)。ROC曲線領域 = 0.879、95%信頼区間、0.785 ~ 0.974。(B)NABを有しない下位グループの患者のROC分析(応答者16人および非応答者17人)。ROC曲線領域 = 0.919、95%信頼区間、0.812 ~ 1.026。

30

## 【0053】

週1回IFN-β-1a、44μgで治療した患者の臨床特性

患者群	N (%)	平均年齢 (範囲)	性別, F/M	MSと確定 された期間 (ヵ月)	EDSS 基準 中央値 (範囲)	52/78週目 のEDSS 中央値 (範囲)	研究2年 前の再発 平均値 (範囲)	研究期間 中の再発 平均値 (範囲)	52週間目の NAB力価 (INU/ml)	78週間の NAB力価 (INU/ml)
合計	62 (100)	33.8 (22-44)	45/17	68.9 (1-307)	2.3 (0.0-5.5)	2.3 (0.0-6.5)	2.9 (2-10)	0.8 (0-4)	286.8 (0-2001)	376.6 (0-2001)
R	20 (32)	35.0 (25-64)	12/8	51.52 (7-150)	2.2 (1.0-3.5)	1.8 (1.0-3.5)	2.6 (2-6)	0	0	0
NR	19 (31)	34.8 (27-39)	15/4	61.2 (1-216)	2.6 (1.0-5.5)	3.0 (1.0-6.5)	2.9 (2-5)	1.9 (1-3)	0	0
NAB	23 (37)	33.0 (22-44)	18/5	90.4 (4-307)	2.3 (0.0-4.0)	2.1 (1.0-5.0)	3.0 (2-10)	0.6 (0-4)	773.1 (100- 2001)	1111.1 (230- 2001)

R: 「初年度応答者」、 NR: 「初年度非応答者」、 INU: インターフェロン中和化単位、 NAB: 中和抗体。NABの存在を18ヵ月後に確認した。

【表 2】

未治療患者、および週3回INF-β-1a、22μgで治療した患者の臨床特性およびMRI特性

患者群	n (%)	平均年齢 (才)	性別 F/M	MSと確定された期間 (ヵ月)	EDSS 基準		研究終了時 EDSS (中央値 (範囲))	研究2年前の再発	研究期間中の再発	基準/研究終了時のT2病変負荷		基準/研究終了時のT1病変負荷		研究期間中の新規Gd+病変	
					中央値 (範囲)	平均値 (範囲)				平均値 (範囲)	平均値 (範囲)	平均値 (範囲)	平均値 (範囲)	平均値 (範囲)	
合計	20 (100)	33.3 (18-47)	17/3	34.5 (1-196)	1.5 (0.0-4.0)	1.4 (0-4)	1.45 (1-3)	0.45 (0-2)	19.7/20.9 (2-83)/(5-63)	6.7/8.4 (0-24)/(1-23)	1.8 (0-9)				
R	5 (25)	34.2 (27-40)	2/3	43 (3-123)	1.6 (1.0-2.0)	1.2 (1.0-2.0)	1.4 (1-3)	0.2 (0-1)	30.6/25.0 (5-83)/(5-63)	8.6/8.0 (2-20)/(2-18)	0 (0-0)				
NR	6 (30)	32.7 (18-47)	6/0	62 (9-196)	2.0 (0.0-4.0)	2.0 (1.0-4.0)	1.83 (1-3)	0.83 (0-2)	23.7/28.0 (4-45)/(17-45)	9.7/12.5 (4-21)/(7-23)	4.0 (1-7)				
未処置	9 (45)	33.2 (21-46)	9/0	11 (1-34)	1.1 (0.0-3.0)	1.1 (0.0-2.0)	1.22 (1-3)	0.33 (0-2)	10/13 (2-28)/(5-34)	4.8/5.5 (0-24)/(1-21)	0.5 (0-2)				

R: 初年度成答者 NR: 初年度非成答者

10

20

30

40

【0055】

以下の実施例は、本発明を例示し立証することを目的とする。IFN-療法でのTRAILの関与を研究するためにMSと確定された患者を集めた。研究は、地方倫理委員会によって承認され、各人からはインフォームドコンセントを得た。

【0056】

MS患者は全て、再発寛解型と臨床上確定されたMSであった。健康な志願者は、神経免疫学研究室の職員から選択した。研究したMS患者(n=62)は、IFN-1aの臨床試験であるMASTER(Rebif(登録商標))によるMS抗体状態および療法

50

評価) 研究に継時的に参加した。その研究に適格な対象は、18歳から55歳の患者であって、2年を超えて再発寛解型MSを患っており、過去2年間に少なくとも2回再発し、研究前6ヵ月間にどんな免疫調節治療も受けていない、治療開始前4週間に悪化していない、かつ拡大障害状態尺度(EDSS)(Lunemann et al. 2001, Neurology 57: 1132-1134)によって定義される障害スコアが0~5.5である患者である。患者は全て、週1回の皮下注射によってIFN- $\beta$  1a (Rebif(登録商標)、Serono社、ドイツ国Unterschleisheim)、44 $\mu$ gの治療を受けた。この用量は、T2活性およびMRIによって測定した疾患の負担を著しく低減することが示されており、最初の神経系統機能障害の出現後、患者が確定したMSへ転換(conversion)するのを遅らせることが実証されているIFN- $\beta$  1a濃度の2倍を表している(The Once Weekly Interferon for MS Study Group「MSに向けて週1回インターフェロン研究グループ」1999, Neurology 53: 679-686; Comi et al. 2001, Lancet 357: 1576-1582)。さらに、治療開始後にPBMCCのMxA遺伝子発現が明らかに著しく増強されることによって示されたように、この用量は生体に有効であることが判明した(参照: 図1)。IFN- $\beta$  1aの適用後3日目の採血時毎に(EDSSによって定義した)障害の状態および再発の臨床データを得た(Kurtzke 1983, Neurology 33: 1444-1452)。臨床再発とは、既存の症状の著しい悪化、または発熱はないが24時間を超えて持続する新規な神経系欠陥の様子として定義した。この研究の目的のために、完全な継時的データのある患者しか含めなかった(n=62)。IFN- $\beta$  1aで治療中、さらに再発せずEDSSも低下しなかった患者を陽性応答者(n=20)として定義する一方で、引き続き1度または複数回再発した患者を非応答者(n=19)として定義した。これらの患者の数人で、臨床再発を静脈内メチルプレドニゾン用量1g/日の3日間コースで治療した。しかし、全ての血液試料を治療前に得た。この研究の目的のために、陽性応答者(n=20)および非応答者(n=19)は無作為に選択した(表1を参照)。さらに、MxA誘導検定によって決定した、Rebif(登録商標)に対して中和抗体(NAB)を生じた患者(n=23)を含めた。Rebif(登録商標)によって誘導されたMxA濃度は記載の通りに決定した(Kracke et al. 2000, Neurology 54: 193-199)。結果をインターフェロン中和化単位(IU)、すなわちRebif(登録商標)10U/mlの活性を検量線によって決定した判別可能な1U/mlの活性に中和する血清の力価として示す。この群内では、17人の患者が治療応答に関する臨床判定基準を満たした。IFN- $\beta$  1a治療前(基準=0週)ならびに療法下4週間目、26週間目、および52週間目に静脈血液試料を採取した(毎回IFN- $\beta$  1a適用後3日目)。治療経過中NABを生じた患者は78週間目まで追跡した。

#### 【0057】

特異性を調査し本発明者らのデータを確認するために、第2の独立コホートは、当方外来診療部門で月1回追跡したn=20の再発寛解型MS患者(表2)、および同じ間隔で血液を提供した4人の健康なドナーからなった。これらの人々のうち、11人の患者には週3回標準用量の22 $\mu$ gのRebif(登録商標)の投与を開始した。療法開始時に現れるインフルエンザ様症状などの副作用を緩和するために、用量は徐々に増加し4週間後に総量に達した。MRI走査(1, 5Tスキャナ、Siemens Vision、Siemens社、ドイツ国Erlangen)は、臨床データおよび免疫学的データを伏せた熟達した研究者によって分析した。本発明者らは、治療開始前および開始後9ヵ月目に、スピネコーT1強調走査(TR840ms、TE14ms、マトリックス寸法192x256、視野256mm、5mm厚の28枚の連続軸位断)を造影剤(Magnevist(登録商標)20ml、ガドペンテト酸ジメグルミン[Gd]、Schering社、ドイツ国ベルリン)の有無によって測定し、かつターボスピネコーT2強調走査(TR400ms、TE100ms、マトリックス寸法96x128mm、視野240mm)を測定した。IFN- $\beta$  1a治療中、さらに再発せず、EDSSも低下せず、T1およびT2の病変負荷も進行せず、Gd強化病変もない患者を「初年度応答者」として定義する一方で、引き続き1度または複数回再発した患者、またはMRIが活性な患者を「初年度非応答者」として定義した。

#### 【0058】

10

20

30

40

50

フィコール密度勾配遠心法 (Bio-Whittaker社、米国メリーランド州Walkersville) によってP B M Cを新鮮血から単離し液体窒素で冷凍保存した。検定を実施するまで血清を $-20^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。臨床データ、MRIデータ、およびそれらのそれぞれの結果も伏せた独立した研究者らによって全RNAおよび蛋白質測定を実施した。研究の全部分は、地方倫理委員会によって承認され、各個人からは書面によるインフォームドコンセントを得た。

#### 【0059】

人口統計的データは、平均値、中央値、および範囲によって記載されている。比較の根拠に図の結果は平均値 $\pm$ SEMとして表す。時間に関する興味深い臨床結果の変化は、2因子設計での反復測定(因子として治療および反復)用非パラメータ多変量分散分析(MANOVA)を使用して分析した(Brunner, E., Domhof, S., Langer, F. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments「因子実験での継時的データ非パラメータ分析」J. Wiley, New York 2002)。したがって、本発明者らは、対応する応答曲線上の全点を同時に比較した。全般的試験後、本発明者らは、Post-hoc解析(Wilcoxon検定)を実施して治療の一定の時間相互間での特異的な差、および治療と基準の間での特異的な(臨床的に重大な)差を検出した。同じ理由で、本発明者らは、Mann-Whitney-U検定の使用によって一定の時間点に関して2つの投与群間の差も分析した。Kruskal-Wallis検定を使用して2群を超える群間の差を検出した(非パラメータ1元配置ANOVA)。多重比較のための調整は、Bonferroni-Holmによる逐次拒絶検定の手順を使用して実施した。予測される判別値をROC分析によって算出した。感受性および特異性を考慮して最適カットオフ値を提案する。Windows用SPSS(リリース11.0.1、著作権(登録商標)SPSS Inc.11998-2001)およびStatistical Analysis System(SAS)バージョン8.2(SAS Institute Inc. 米国ノースカロライナ州Cary)を使用し統計分析を実施した。 $p < 0.05$ レベル、両側で有意性を評価した(正確)。

#### 【実施例1】

#### 【0060】

全身的IFN- $\gamma$  治療直後のTRAIL遺伝子発現の誘導

#### 【0061】

最初に、MS患者の全身的IFN- $\gamma$  治療によってin vivoでTRAIL遺伝子発現が誘導されるかどうかを検査した。この目的のために、MS患者( $n=62$ )から得たP B M CをIFN- $\gamma$  -1a療法前および療法中に調査した。

#### 【0062】

IFN- $\gamma$  -1a療法の開始前、ならびに療法下4週間目、26週間目、および52週間目に末梢血試料を得た。フィコール密度勾配遠心法(Bio-Whittaker、米国メリーランド州Walkersville)によって新鮮血からP B M Cを単離し分析まで液体窒素に冷凍保存した。

#### 【0063】

全RNAを抽出し相対的mRNA濃度を実時間(rt)PCRによって定量した。さらに、密接に関連したTNFファミリー構成員CD95L(FasLとも言う)も定量した。並行して、IFN- $\gamma$  -1a療法に対するin vivo応答マーカーとしてMxA蛋白質遺伝子発現も測定した(Wandinger et al. 2001, Ann Neurol 50: 349-357)。

#### 【0064】

RNeasyキット(Qiagen社、米国カリフォルニア州Santa Clarita)を使用し細胞から全RNAの単離を実施し、メーカー(Perkin Elmer社、米国カリフォルニア州Foster City)使用説明書に従ってTaqMan(登録商標)逆転写試薬を使用し無作為の六量体を用いてcDNAへ逆転写した。rtPCRの定量は、ABI Prism(登録商標)7700 Sequence Detection System(Perkin Elmer社)(Wandinger et al. 2001, Ann Neurol 50: 349-357)で実施した。刺激状態用にヒポキサンチンホスホリル転移酵素(HPR T)および18S rRNAを増幅し試料の標準化に利用した。増幅プロトコルは、TaqMa

10

20

30

40

50

n (登録商標) Gold RT-PCRキットの推奨に従った。TRAIL、CD95L、MxA、およびHPRT転写物を検出するために、オリゴヌクレオチドを、前進および逆進プライマーには最終濃度200nMで、また以下の蛍光発生プローブには100nMで使用した。

TRAIL前進: 5' CAGAGGAAGAAGCAACACATTTCTCT3'、

逆進: 5' TGATGATTCCCAGGAGTTTATTTTG3'、

プローブ: 5' FAM-ACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCC-TAMRA3' ;

CD95L前進: 5' ATGCACACAGCATCATCTTTGG3'、

逆進: 5' ATGGGCCACTTTTCCTCAGCT3'、

プローブ: 5' FAM-AAGCAAATAGGCCACCCAGTCCACC-TAMRA3' ;

MxA前進: 5' CAGCACCTGATGGCCTATCAC3'、

逆進: 5' GAGCATGAAGAAGACTGGATGATCAA3'、

プローブ: 5' FAM-AGCAAAGCGCATCTCCAGCCACATC-TAMRA3' ;

HPRT前進: 5' AGTCTGGCTTATATCCAACAACCTTCG3'、

逆進: 5' GACTTTGCTTTTCCTTGGTCAGG3'、

プローブ: 5' FAM-TTTCACCAGCAAAGCTTGCGACCTTGA-TAMRA3'。

#### 【0065】

そのプロトコルの $C_T$ 法によってHPRTまたは18SrRNAに相対的な遺伝子発現の定量を算出した。TaqMan (登録商標) リボゾームRNA制御試薬 (Perkin Elmer社) を使用し18SrRNAを増幅した。2倍以上の遺伝子発現の変化は、次の統計分析に有効であるとみなした。

#### 【0066】

SPSSソフトウェア (SPSS Software GmbH社、ドイツ国ミュンヘン) を使用し統計分析を実施した。Mann-Whitney-U検定を使用して患者群間のデータを比較した。群内の従属変数を分析するために、Wilcoxonの符号順位検定を実施した。以下に概説する実験から得られたデータを同じ統計手法を使用し評価した。人口統計的データを平均値、中央値、および範囲によって記載する。比較の根拠用に図の結果は平均値 $\pm$ SEMとして示す。

#### 【0067】

図1では、基準と比較して、MxAおよびTRAILの自発的遺伝子発現は、治療3週間後のMS患者のPBMCで著しく上方調節され、1年間高いままであったことがわかる [時間作用は各 ( $p < 0.05$ ) である1群MANOVAによって証明された。Post-hoc Wilcoxon検定ではBonferroni-Holmにより全 (正確)  $p$  値  $< 0.001 - / 3 = 0.0167$ ] (図1)。それに反して、CD95Lでは、IFN- $\gamma$  療法中、試験した各時間点でどんな著しい調節も示されなかった。

#### 【実施例2】

#### 【0068】

IFN- $\gamma$  応答者および非応答者でのTRAIL遺伝子発現

#### 【0069】

IFN- $\gamma$  の作用機序のためのTRAIL誘導の機能的な妥当性を検証するために、患者を彼らの臨床応答状態に関して特徴付けた。IFN- $\gamma$  治療中、さらに再発せずEDSSも低下しなかったNAB陰性患者を陽性薬物応答者として定義する一方で、引き続き1度または複数回再発した患者を非応答者として定義した。

#### 【0070】

図2に例示したように、IFN- $\gamma$  療法によって、臨床応答するMS患者でTRAIL遺伝子発現の初期にかつ持続して上方調節がもたらされた (Wilcoxon検定:  $p =$

10

20

30

40

50

0.001、 $p = 0.021$ 、 $p = 0.002$  正確-Bonferroni-Holm)。これに反して、非薬物応答者では、TRAIL 遺伝子発現は治療6ヵ月後に一時的にしか誘導されなかった。生体応答マーカーMxAは、両群で著しく上方調節され(図2A)両患者群でIFN- $\gamma$ のin vivo生体有効性が示された。図2Aで概説したように、非応答者では、調査した各時点で全身的IFN- $\gamma$ 治療に呼応してさらに高いMxA遺伝子発現濃度が示された(非パラメータMANOVA  $p < 0.0001$ )。群全体に関しては、CD95Lは、患者部分集団ではIFN- $\gamma$ 療法によって顕著に調節されなかった。応答者と非応答者の間では、調査した遺伝子の基準発現濃度の差は認められなかった(データを図示せず)。

#### 【実施例3】

10

##### 【0071】

中和抗体を生じた患者でのTRAIL 遺伝子発現

##### 【0072】

in vivoでのIFN- $\gamma$ によるMxAおよびTRAIL発現の平行した上方調節を考慮して、IFN- $\gamma$ の治療進行中のNABの出現が、MxAに関して報告されているようにTRAIL 遺伝子の発現に作用するかどうかを調査した(Deisenhammer et al. 1999, Neurology 52: 1239-1243)。したがって、1年後にNABを生じた患者の第3部分集団( $n = 23$ )で自発的遺伝子発現を分析した。NABの存在は18ヵ月後に確認された(参照:表1、2)。

##### 【0073】

20

図3は、これらの対象で、MxA遺伝子の誘導によって測定されたIFN- $\gamma$ の生体利用能がNABの存在下で完全に阻害されたことを実証する(系統だった時間作用は1群用非パラメータMANOVAで分析( $p < 0.0001$ )、Wilcoxon検定での最初の2個の $p$ 値 $< 0.0001$ 、 $p_3 = 0.563$ 、 $p_4 = 0.741$  正確)。並行して、IFN- $\gamma$ によるTRAIL 遺伝子発現の初期上方調節も阻害され、IFN- $\gamma$ によるTRAIL転写の直接調節が示唆された(図3)(1群用非パラメータMANOVA( $p < 0.0001$ )、Wilcoxon検定では最初の2個の $p$ 値 $< 0.0001$ 、 $p_3 = 0.855$ 、 $p_4 = 0.543$  正確)。CD95Lの発現は、NABの存在下で著しい変動を示さなかった(データを図示せず)。TRAILの基準遺伝子発現濃度では3群の患者下位群相互間に有意差は認められなかった(図4)(Kruskal-Wallis検定、 $p = 0.502$  正確)。

30

##### 【0074】

興味深いことに、これらの患者の大部分は、研究時中依然として臨床応答状態のままであった。しかし、この臨床観察は、IFN- $\gamma$ -1bの中心的試行およびIFN- $\gamma$ -1aのPRISMS研究の拡大の結果と一致し、その研究では最後に、NABの発生は、それぞれ、18~24ヵ月間および24ヵ月以降の観察期間中効力喪失の遅延が伴った(IFN $\beta$ 多発性硬化症グループおよびブリティッシュコロンビア大学MS/MRI分析グループ、1996, Neurology 47: 889-894; PRISMS研究グループおよびブリティッシュコロンビア大学MS/MRI分析グループ、PRISMS-4, 2001, Neurology 56: 1628-1636)。

40

#### 【実施例4】

##### 【0075】

IFN- $\gamma$  応答者および非応答者でのTRAIL蛋白質の発現

##### 【0076】

TRAIL蛋白質の発現に関してもIFN- $\gamma$  非応答者は応答者と異なるかという質問に対処するために、IFN- $\gamma$ -1a療法前および療法中のsTRAIL蛋白質血清濃度を異なる2種の実験設定で測定した。

##### 【0077】

実験用に、NAB陰性薬物応答者( $n = 12$ )および非応答者( $n = 11$ )から血清を入手して調査用とし、この血清を検定実施まで $-20^{\circ}\text{C}$ で貯蔵した。メーカー(Trinov

50

a Biochem、ドイツ国Giesen)のプロトコルに従って検出限界65 pg/mlであるサンドウィッチELISAを使用して可溶性TRAIL蛋白質を定量した。

【0078】

IFN- $\gamma$  1a療法前および療法中に、本発明者らは、膜結合および可溶性TRAIL (sTRAIL)蛋白質濃度を、調査のために血清を得ることができたNAB陰性薬物応答者(n=12)および非応答者(n=11)のPBMC上および血清で測定した。療法前には、MS患者(n=23)は、性別および年齢が似通った健康な個人(n=24)と比較してsTRAIL濃度が低下したことが明らかになった(Mann-Whitney-U検定、 $p=0.017$ 正確)(図5A)。患者群内では、IFN- $\gamma$  治療進行中 10  
 応答者と非応答者との間では、血清中sTRAIL蛋白質の蓄積で有意差があった(MANOVA、 $p=0.00109$ )(図5B)。

【0079】

IFN- $\gamma$  1a療法開始前、ならびに療法下4週間目、26週間目、および52週間目に、IFN- $\gamma$  応答者(n=12)および非応答者(n=11)の血清中の可溶性TRAIL蛋白質の濃度を測定した。箱ひげ図は、各群中央値濃度(箱内水平線)、25および75パーセントイル(箱の上端および下端)、ならびに10および90パーセントイル(箱の上方および下方に伸びた線)を示す。患者群間の統計的有意差をMann-Whitney-U検定によって検定した。 $*p < 0.05$ 。

【0080】

図5Bで実証したように、治療開始前、応答者は非応答者と比較して既に顕著に高いsTRAIL基準濃度を示し(Mann-Whitney検定、 $p=0.004$ 正確)、TRAIL発現の転写後調節の差が根底にあることを示唆した。350 pg/mlを超える、特に約584.1 pg/mlのTRAIL濃度は、IFN- $\gamma$  療法への応答に明確に関連付けられた。すなわち、療法前に350 pg/mlより上回る、またはわずかに下回るsTRAIL濃度によって、それぞれ、92%の陽性応答者および73%の非応答者の臨床結果が予想された。患者群全体では、これは正解予測率83.6%を意味した。基準濃度と比較して、血清中のsTRAIL蛋白質の蓄積は、応答者でIFN- $\gamma$  治療4週間後、および非応答者で著しく増大した。長期治療患者では、6ヶ月後および12ヵ月後、sTRAIL蛋白質の濃度は、非応答者と比較して陽性応答者では依然として著しく上方調節された(Mann-Whitney検定、 $p(6\text{ヵ月})=0.011$ 、 $p(12\text{ヵ月})=0.015$ 正確-Bonferroni-Holm)。 20  
 30

【0081】

血清中のsTRAILの他に、PBMC上に発現した膜結合TRAIL蛋白質をフローサイトメトリーで測定した。IFN- $\gamma$  1a療法前および療法中にNAB陰性応答者および非応答者からPBMCを調製し、1試料につきPBMC $2 \times 10^5$ 個を抗TRAILモノクローナル抗体(カタログ番号804-322-C100、Alexis Corporation社、米国カリフォルニア州サンディエゴ)または対照マウスIgG1(カタログ番号X0931、DAKO社、デンマーク国Glostrup)と共に濃度1:100で4°Cで30分間培養した。洗浄した細胞をフィコエリトリン(PE)標識2次ヤギ抗マウス抗体(カタログ番号R0480、DAKO社)と共に濃度1:20で30分間培養した。リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄後、細胞をFACScanフローサイトメーターで分析し、データをCellQuestソフトウェア(Becton-Dickinson社、米国Mountain View)を使用し処理した。値を特異的蛍光強度として表し、ヒストグラム統計によって計算し、TRAIL抗体による蛍光強度から適切な対照抗体による蛍光強度を除いて百分比によって定義した。 40

【0082】

IFN- $\gamma$  治療中、PBMC上のTRAIL表面発現の著しい変化は患者部分集団のどれにも認められなかった(データを図示せず)。研究全体にわたって血液試料はIFN- $\gamma$  投与(皮下注射)後3日目に患者から回収したので、陰性の知見は膜結合TRAIL発現の時間経過によって説明できる。

【実施例5】

## 【0083】

P B M C 細胞培養での T R A I L 遺伝子および蛋白質の発現

## 【0084】

P B M C を I F N -  $\gamma$  の存在下 *in vitro* で培養し、T R A I L 遺伝子転写の調節、細胞表面発現、および培養上清中の可溶性蛋白質の蓄積を比較調査した(参照図6)。

## 【0085】

L - グルタミン 2 m M、ゲンタマイシン 5 0 m g / m l、およびペニシリン / ストレプトマイシン 1 0 0 U / m l (Whittaker Bioproducts社、米国メリーランド州 Gaithersburg)、ならびに 5 % ヒト血漿を補充したイスコフ改変ダルベッコ培地(ギブコ社、米国ニューヨーク州 Grand Island) に解凍したばかりの P B M C を再懸濁した。P B M C (ウェル当たり  $10^6$  細胞) を 3 7 ° C、5 % C O <sub>2</sub> の加湿雰囲気中で培養した。明示した場合は、フィトヘマグルチニン(P H A) またはサイトカインを以下のように培養に加えた: P H A 1  $\mu$  g / m l (Sigma-Aldrich社、ドイツ国 Steinheim)、組換えヒト I F N -  $\gamma$ 、1 0 I U / m l および 1 0 0 I U / m l (Rebif(登録商標)、Serono社、ドイツ国 Unterschleissheim)、組換えヒト I L - 2、1 0 I U / m l (Proleukin社、ドイツ国 FrankfurtEurocetus)。

## 【0086】

図6Aで実証したように、I F N -  $\gamma$  による P B M C を培養すると 2 4 時間後に T R A I L m R N A 濃度の迅速で用量依存的上方調節と、7 2 時間後にそれに続く第2ピークがもたらされた。T R A I L 発現も同様に I F N -  $\gamma$  によって 2 4 時間後に P B M C 表面上に急速に誘導された(図6B)。しかし、膜結合 T R A I L 発現は、7 2 時間後の基準濃度と比較してほんのわずかにしか増大しなかった。濃度 1 0 I U / m l の I F N -  $\gamma$  で刺激したとき、培養上清の可溶性 T R A I L 濃度は 2 4 時間にわたって増加し 9 6 時間高いままであった(図6C)。濃度 1 0 0 I U / m l の I F N -  $\gamma$  で培養すると、9 6 時間にわたって s T R A I L がさらに増加した。I F N -  $\gamma$  とは対照的に、P H A および I L - 2 で細胞を刺激すると、T R A I L 遺伝子および蛋白質の発現は遅延された(図6A-C)。既に報告されている知見と一致して、これらのデータは I F N -  $\gamma$  が T R A I L 発現の転写制御を直接調節することを示している(Kayagaki et al. 1999, J Exp Med 189:1451-1460)。

## 【実施例6】

## 【0087】

より高い用量の I F N -  $\gamma$  で治療した患者での示差的な T R A I L 調節の確認

## 【0088】

T R A I L が I F N -  $\gamma$  の潜在的応答マーカーであるという仮説を試験するために、週3回 2 2  $\mu$  g の I F N -  $\gamma$  療法を開始した第2の独立した患者群で T R A I L 発現をさらに研究した。これらの患者では、治療応答は、無症状性疾患の活性の測定として M R I 分析によって確認した。療法中、臨床判定基準の他に、応答者には T 1 および T 2 病変カウントで進行はなく、新規な G d 増大病変もないことが明らかになった。知見の確認として、治療中、T R A I L 遺伝子誘導の顕著な差によって応答者を非応答者と明瞭に判別することができた(系統だった時間作用は非パラメータ M A N O V A によって分析した。p = 0 . 0 2 6)(図7A)。

## 【0089】

標準用量で投与された I F N -  $\gamma$  による T R A I L 遺伝子誘導の影響は、これらの患者でほぼ5倍も高く、*in vivo* で遺伝子転写が用量依存性調節であることも実証した。生体応答マーカー M x A は、応答者および非応答者で著しく上方調節された(系統だった時間作用は非パラメータ 1 群 M A N O V A で分析した。それぞれ、各 p = 0 . 0 0 6 4 および p = 0 . 0 0 0 6、正確)(図7B)。

## 【0090】

I F N -  $\gamma$  で治療した患者を、1群の9人の未治療患者および4人の健康な個人と比較

10

20

30

40

50

することによって、IFN-療法に应答する患者でTRAILの上方調節の特異性が強調される(図7A)。未治療患者群だけでなく健康な個人においてもMxAは増加した(図7B)。

【実施例7】

【0091】

IFN-療法应答に関するsTRAILの予測値

【0092】

IFN-で治療した患者の第2群も、治療前に应答者で高いsTRAIL濃度を示したので、療法应答に関するsTRAILの予測される判別値を決定するために最後に全般的ROC分析を実施した。血清を得ることができた合計49人の治療前患者(NAB+患者を含む)を調査した。その後29人は应答者および20人は非应答者であった。療法前のsTRAIL濃度が584.1pg/mlより高いかまたは低いかによって90.5%の应答者および71.4%の非应答者の臨床結果が正確に予測された。ROC分析特性(曲線下領域、0.879、95%信頼区間、0.785~0.974)を図8Aに示す。中和抗体(NAB)を有する患者にsTRAILの治療应答を予測する能力が備わるかどうか調査するために、NAB患者を除いた第2予測分析の形で感受性分析を実施した(図8B)。この下位グループの結果(曲線下領域、0.919、95%信頼区間、0.812~1.026)は全患者での分析に一致したので、これらの患者は予測マーカーとしてのsTRAILの能力について適切な影響を持たないと推定することができる。

10

【0093】

以上の説明、特許請求の範囲、および/または添付の図面で開示された特徴は、別々におよびそれらのどんな組合せでも、その多様な形で本発明を提供するための材料であり得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】図1は、IFN-1a療法中のMS患者62人のMxA、TRAIL、およびCD95Lの自発的遺伝子発現を示す。

【図2】図2は、IFN-「初年度应答者」(n=20)および「初年度非应答者」(n=19)のTRAIL遺伝子発現の示差的な誘導を示す。

【図3】図3は、IFN-治療中のTRAIL遺伝子発現の上方調節が、中和抗体(NAB)の存在下で阻害されることを示している。

30

【図4】図4は、患者部分集団の基準TRAIL遺伝子発現濃度を示す。

【図5】図5は、健康な個体と比較した(A)、およびIFN-1a療法中の(B)MS患者の可溶性TRAIL蛋白質の濃度を示す。

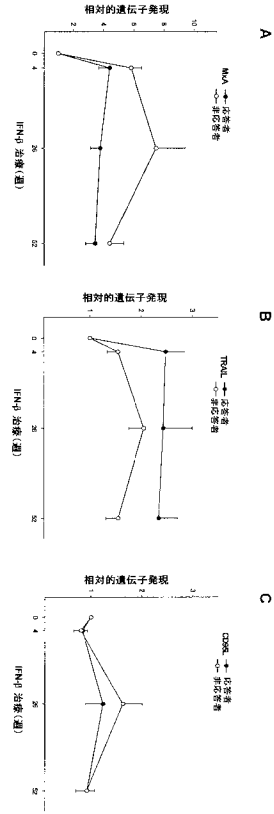
【図6】図6は、IFN-によるTRAILの遺伝子転写および蛋白質発現の調節を示す。

【図7】図7は、TRAIL遺伝子発現がIFN-治療を受けた、療法应答性患者で特異的に誘導されることを示している。

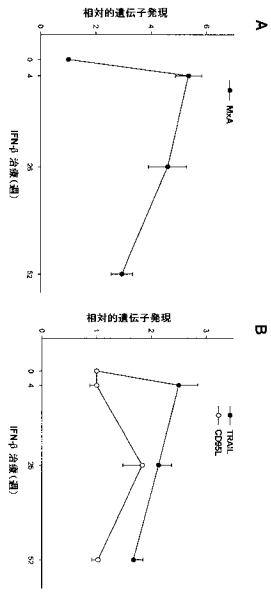
【図8】図8は、「初年度应答者」対「初年度非应答者」におけるsTRAIL濃度の予測される判別値を示す。

40

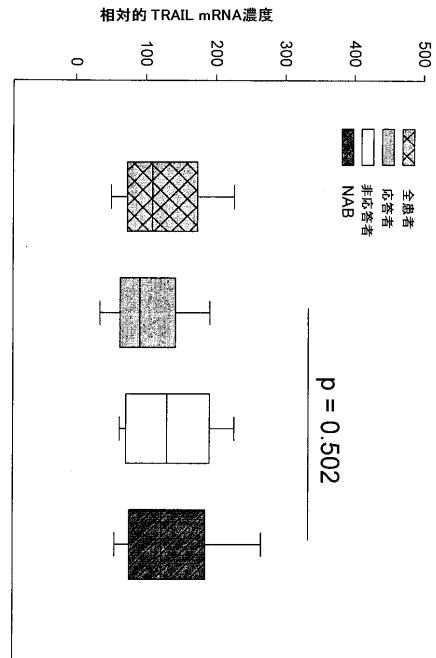
【 図 2 】



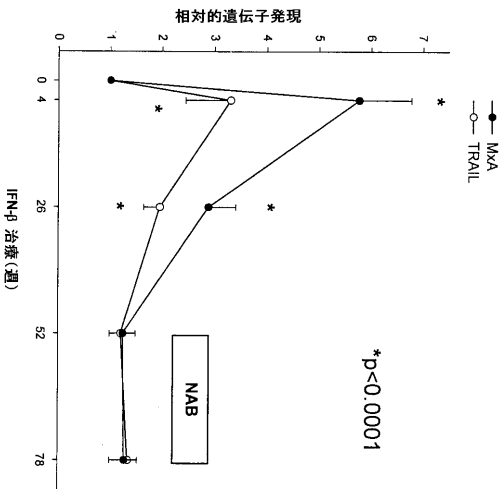
【 図 1 】



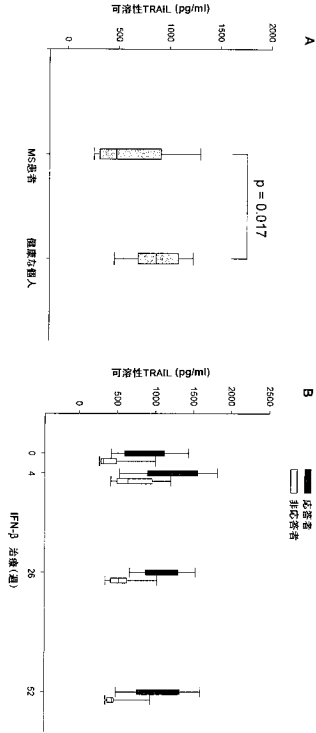
【 図 4 】



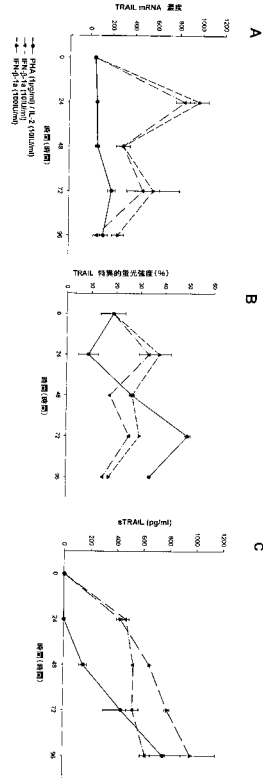
【 図 3 】



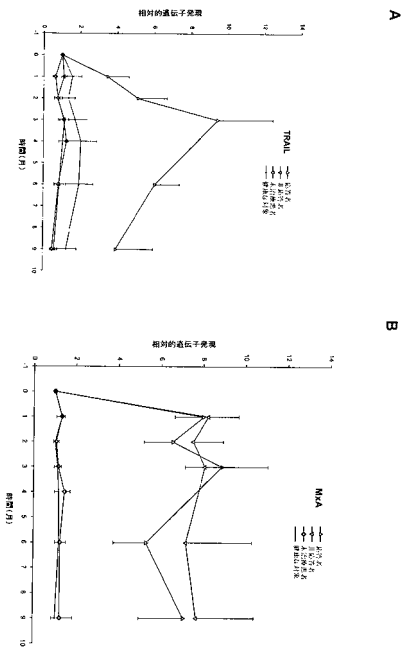
【 5】



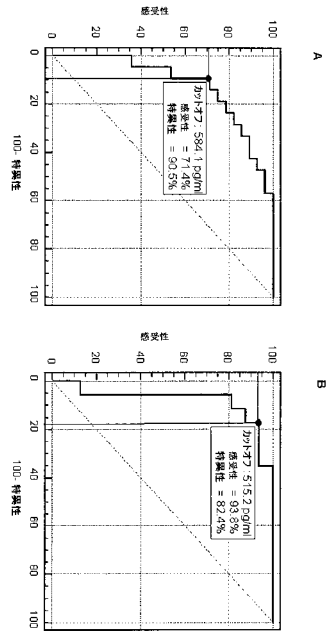
【 6】



【 7】



【 8】



【 9】

【 10】

【配列表】

2005527221000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/EP 03/05650
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 C07K14/705		
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) IPC 7 G01N C07K G01B		
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 practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, EMBL, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
<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	WANDINGER KLAUS-PETER ET AL: "Complex immunomodulatory effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes." ANNALS OF NEUROLOGY, vol. 50, no. 3, September 2001 (2001-09), pages 349-357, XP008010479 ISSN: 0364-5134 cited in the application abstract; table 1 page 355	20,21
A	--- -/-	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  8 September 2003		Date of mailing of the international search report  18/09/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Vadot-Van Geldre, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 03/05650

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 33899 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;RUBEN STEVEN M (US)) 18 September 1997 (1997-09-18)	20, 21
A	abstract; claim 21; example 4 page 41 -page 42 page 44, paragraph 2 ---	1-19
A	FR 2 766 713 A (BIO MERIEUX) 5 February 1999 (1999-02-05) claims; examples ---	1-21
A	WOSIK KAROLINA ET AL: "Interferon b (IFN $\beta$ ) modulates death receptor DR4 and DR5 expression on oligodendrocytes and their ligand TRAIL on T cells." NEUROLOGY, vol. 56, no. 8 Supplement 3, 24 April 2001 (2001-04-24), page A152 XP008010460 53rd Annual Meeting of the American Academy of Neurology; Philadelphia, PA, USA; May 05-11, 2001 ISSN: 0028-3878 abstract ---	1-19
A	WANDINGER KLAUS-PETER ET AL: "Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis." JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 149, no. 1, 1997, pages 87-93, XP002220790 ISSN: 0022-510X abstract ---	1-19
A	JEFFERY DOUGLAS R: "Relationship between disease activity and dose-response relationships with beta interferon therapies in the treatment of multiple sclerosis." JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 178, no. 1, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 2-9, XP002220791 ISSN: 0022-510X page 2 -page 3, column 1 -----	1-19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 03/05650

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:  
Although claim 1-19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/05650

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733899	A	18-09-1997	WO 9733899 A1	18-09-1997
			AU 5711196 A	01-10-1997
FR 2766713	A	05-02-1999	FR 2766713 A1	05-02-1999
			WO 9907408 A1	18-02-1999

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/68	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 リューネマン, ヤン

ドイツ連邦共和国, 1 0 1 1 5 ベルリン, アッカーストラッセ . 1 9

(72) 発明者 ツィプ, フ라우ケ

ドイツ連邦共和国, 1 3 5 0 1 ベルリン, リュードニーツェア ツァイレ 4 5

F ターム(参考) 2G045 CB01 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 GC15

4B024 AA11 BA80 CA09 CA12 CA20 HA11 HA13 HA14

4B063 QA05 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ53 QQ79 QQ91 QR08 QR32

QR35 QR40 QR42 QR48 QR56 QR62 QS16 QS25 QS33 QS34

QS36 QX01 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005527221A5</a>	公开(公告)日	2006-05-25
申请号	JP2004507843	申请日	2003-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	HYA字面海胆威赛罗卡哲媒体杜松子酒柏林		
申请(专利权)人(译)	Hyarite - 海胆维西利亚罗卡哲媒体杜松子酒柏林		
[标]发明人	ヴァンディングークラウスペーター リュウネマンヤン ツイプフラウケ		
发明人	ヴァンディングー, クラウス-ペーター リュウネマン, ヤン ツイプ, フラウケ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6863 G01N2333/70575		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.P G01N33/53.D G01N33/68 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2002011964 2002-05-29 EP		
其他公开文献	JP2005527221A		

#### 摘要(译)

本发明通过将TRAIL基因和/或蛋白质表达确定为标志物并监测MS患者的IFN治疗来鉴定对I型干扰素 ( IFN ) ， 特别是IFN-β敏感的MS患者。一种方法。