

(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2007-503841

(P2007-503841A)

(43) 公表日 平成19年3月1日(2007.3.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2006-526218 (P2006-526218)	(71) 出願人	506074314 バイオシーク インコーポレイティッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パー リンゲイム ミトゥン ロード 863- シー
(86) (22) 出願日	平成16年9月2日 (2004.9.2)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成18年5月2日 (2006.5.2)	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/028970	(72) 発明者	ベルグ エレン エル. アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロ アルト ブレア コート 978
(87) 国際公開番号	W02005/023987		
(87) 国際公開日	平成17年3月17日 (2005.3.17)		
(31) 優先権主張番号	60/500,180		
(32) 優先日	平成15年9月3日 (2003.9.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 薬剤作用を決定するための細胞ベースのアッセイ法

(57) 【要約】

複合的な一次ヒト細胞ベースの疾患モデルを測定可能なアッセイ形式で使用することによって、ヒト生物学に対する効果に従って生物学的活性剤を分類するための組成物および方法を提供する。本発明のシステムは、複数のシグナル伝達経路の同時活性化を使用して、生理学的に重要な細胞表面分子および分泌分子の発現パターンを作成および同定する。複数の細胞型の組み合わせを使用してもよい。複数の細胞型を包含するシステムは、それぞれの細胞型の細胞内シグナル伝達ネットワークの乱れのみでなく、細胞間の情報伝達経路の阻害に対しても反応する。読取情報は多システム解析に組み入れられてもよく、そこで多システムから得られたプロファイルは薬剤分類の分解能を増強するために組み合わせられる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物学的活性剤の活性を、その細胞内シグナル伝達経路に対する効果に従って決定する方法であって、以下の段階を含む方法：

被験生物学的活性剤を、複数のシグナル伝達経路で同時に活性化された一次ヒト細胞を含む細胞培養系と接触させる段階；

該薬剤の導入後、少なくとも二つの異なる細胞パラメーター読取値の変化を記録する段階；

該パラメーター読取値の変化から第一のバイオマップデータセットを導出する段階であって、該バイオマップが、該生物学的活性剤を欠いた対照条件下において複数のシグナル伝達経路で同時に活性化された、同じ該一次ヒト細胞についての対照データで標準化されたデータを含み、かつバイオマップデータセットが薬剤の作用様式または機能的効果を区別できるのに十分な情報を提供するように、出力パラメーターが最適化されている、段階；

該第一のバイオマップデータセットを参照バイオマップデータセットと比較して変動の存在を決定する段階であって、変動の存在が被験生物学的活性剤の細胞内シグナル伝達経路に対する効果の差を示す、段階。

【請求項 2】

細胞培養系が少なくとも二つの異なる因子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

細胞培養系が少なくとも三つの異なる因子を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

細胞培養系が複数のヒト細胞型を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

ヒト一次細胞が内皮細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

細胞培養系が複数のヒト細胞型を含む、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

細胞培養系が、内皮細胞と末梢血単核細胞またはそのサブセットとの組み合わせを含む、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

該細胞培養系が、内皮細胞と多形核血液細胞またはそのサブセットとの組み合わせを含む、請求項6記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも4つのパラメーターおよび10以下のパラメーターが測定される、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

以下の段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

被験生物学的活性剤を、複数のシグナル伝達経路で同時に活性化された一次ヒト細胞を含む第二の細胞培養系と接触させる段階；

該薬剤の導入後、少なくとも二つの異なる細胞パラメーター読取値の変化を記録する段階；

該パラメーター読取値の変化から第二のバイオマップデータセットを導出する段階であって、該バイオマップが、該生物学的活性剤を欠いた対照条件下において複数のシグナル伝達経路で同時に活性化された、同じ該一次ヒト細胞についての対照データで標準化されたデータを含み、かつバイオマップデータセットが薬剤の作用様式または機能的効果を区別できるような十分な情報を提供するように、出力パラメーターが最適化されている、段階；

第一および第二のバイオマップデータセットを参照バイオマップデータセットと比較して変動の存在を決定する段階であって、変動の存在が被験生物学的活性剤の細胞内シグナ

10

20

30

40

50

ル伝達経路に対する効果の差を示す、段階。

【請求項 1 1】

バイオマップデータセットが多次元尺度法により相関プロットに配列されている、請求項10記載の方法。

【請求項 1 2】

比較する段階が、薬剤活性間の全ての対応のある相関 (pairwise correlations) の有意性の客観的評価を含む、請求項10記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は一般的に、遺伝子および薬物機能の解析、生物学的経路の同定、およびより特定のには作用機序による薬物の同定および特性化、シグナル伝達経路の構造の明確化、シグナル伝達構成要素間の関係の発見、薬物標的およびそれらの標的に作用する薬物の同定のための方法に関する。したがって本発明は、生物学、分子生物学、化学、医化学、薬学、および医学の分野に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、同時係属中の、2002年9月5日に提出された米国特許出願第10/236,558号および第10/220,999号、ならびに2001年3月6日に提出された第09/800,605号に関連し、それらはいずれも参照として本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ヒトゲノム配列決定の完了は、化学的多様性への現代的手法とともに、新しい医学の空前の発展の機会を開いた。この可能性の実現には、ヒト生物学の背景における分子機能の理解のための迅速かつ実用的な手法が必要である。システム生物学分野は、構成分子の大規模な測定の解析に基づいて複合的なシステム反応をモデル化することによって、ヒト生物学に知見を提供する可能性を有している。酵母を用いたモデルシステムでいくつかの進歩が報告されているが、ヒト生物学および疾患における細胞および器官レベルの反応はより複雑であるので、これらの大規模測定手法のヒト疾患生物学に対する適用はあまり確かなものではない。

【0004】

生物学的活性を測定する有用なアッセイは、被験物質の存在下において測定可能なパラメーターの力強くかつ再現性のある変化を示す。創薬においては、そのようなアッセイはしばしば、例えばキナーゼまたは酵素アッセイといった生化学的アッセイ、もしくは特定の標的または経路の活性を測定するよう設計された細胞ベースのアッセイのいずれかである。細胞ベースのアッセイの例は、遺伝子レポーターアッセイ、NFκB転位アッセイなどを含む。創薬における典型的な細胞ベースのアッセイを区別する特徴には、単一の特定の標的または経路の活性を増強するアッセイ設計；単一の細胞型、典型的には細胞株の使用；および、単一の強い読取值、例えばカルシウムシグナルなどの測定が含まれる。

【0005】

しかし、そのようなアッセイは高感度で再現性を有しうるものの、それぞれの新しい標的または経路に対して個別のアッセイを立ち上げる必要があること、被験薬剤のアッセイ標的に対する特異性情報が提供されないこと、およびそのアッセイにおける活性薬剤の作用機序に関する情報が提供されないことを含む、いくつかの制限がある。改良されたアッセイ形式は強力さかつ再現性を有したままであるだけでなく、被験薬剤の標的または経路に対する機序や特異性についての情報を含む、各アッセイにおける複数の標的または経路の情報をも提供する。

【0006】

10

20

30

40

50

そのような改良された方法論は、2001年9月13日に刊行されたPCT特許国際公開公報第167103号、ならびに2002年9月5日に提出された米国特許出願第10/236,558号および第10/220,999号に記述されている。これらの方法は、様々な種類の遺伝子発現および/またはタンパク質発現のアレイデータからシグナル伝達ネットワークを再構築することを可能にする、パターン認識および数学的モデル化アルゴリズムを用いる。これらの方法は薬物標的や薬物作用機序の同定を可能にするが、特に抗炎症効果を有する薬物に関して、化合物が望ましくない副作用なしに望ましい生物学的効果を有するかどうか決定するためのアッセイのみならず、ヒト体内の複雑な生物学的環境をよりよく反映する改良された方法が依然として必要とされている。本発明はこれらおよび他の必要性を充たすものである。

【発明の開示】

10

【0007】

発明の概要

複合的な一次ヒト細胞ベースの疾患モデルを測定可能な (scalable) アッセイ形式で使用することによって、生物学的活性剤をそのヒト生物学への作用に従って分類するための組成物および方法が提供される。本発明のシステムは、複数のシグナル伝達経路の同時活性化を使用して、炎症をシミュレートした環境を含む一つまたは複数の複合環境における、一次細胞の生理学的に重要な細胞表面分子および分泌分子の発現パターン(または「プロファイル」)を作成および同定する。本アッセイシステムは、強固で再現性があり、生物学的因子、化合物、および遺伝子を含む多数の薬剤活性に対して反応性がありかつ識別的である。

20

【0008】

本発明の一つの態様において、生物学的活性剤は、複合的で生物学的関連性のある環境中の一次ヒト細胞を含むシステムにおいて特徴的な反応プロファイルを誘導することが示されており、それらのプロファイルは比較的少数の生理学的意義のあるタンパク質読取値を測定することによって捕捉される。そのような読取パラメーターは、それらの情報量および関心対象の生理学的プロセスとの関連性により選択される。

【0009】

本発明の別の態様においては、例えば異なった一次細胞型の組み合わせ、一次細胞型と細胞株との組み合わせなどの、複数の細胞型の組み合わせが用いられる。複数の細胞型を包含するシステムは、それぞれの細胞型の細胞内シグナル伝達ネットワークの乱れのみでなく、細胞間の情報伝達経路の阻害に対しても反応する。したがって、複数の細胞型からなるシステムにより、生物学的機能空間の適用範囲をさらに広げることができる。

30

【0010】

本発明の別の態様において、読取情報は多システム解析に組み入れられる。複数のシステムから得られたプロファイルは、薬剤分類の分解能 (resolution) を増強するために組み合わせられる。

【0011】

発明の詳細な説明

化合物の作用機序および関連する活性を迅速かつ再現可能に特性化できる、複合的なヒト一次細胞システムにおいて、機序に基づいた薬物開発のための方法が提供される。本明細書に記載のシステムは、創薬に複数の応用がある。生物学の広い適用範囲は、例えば候補薬剤の作用特異性を決定するといった、化合物の検証に有用なツールを提供する。測定可能な複合的細胞システムにおける多重活性プロファイリングは、新規分子の作用経路および機序を迅速に特性化する潜在性を有する。

40

【0012】

本方法の強さは、複合的な、組み合わせで決定されるシステム反応に由来し、複数のシグナル伝達経路を同時に活性化するシステムを並行して検査する (parallel interrogation) ことにより増強されうる。本方法は任意で少パラメーター解析 (pauciparameter analysis) を利用し、比較的少数のパラメーターを読み取る。複数の細胞型の組み合わせを使用してもよく、特に少なくとも一つの一次細胞型を含む。読取値情報は、分解能の増

50

強のため多システム解析に組み入れてもよい。

【0013】

本発明の方法の応用は、大規模な遺伝子機能スクリーニングおよび標的の検証、生物学および病態生理学の標的検証および薬物開発への統合、薬物開発プログラムの効率改善；ならびに環境依存性および細胞分化依存性の生物学的反応の大規模な特性化および解析を含んでよい。

【0014】

本明細書において使用されるように、本発明の「システム」は分類解析のために、一つまたは複数の細胞型、因子、および被験薬剤を含む。多くの場合、システムはさらに、被験薬剤のない細胞および因子の試料を含み、その試料は対照となる。システムは公知の薬剤の存在下にある細胞および因子の試料を含んでもよく、その試料も対照となる。システム内の試料は、異なる因子の組み合わせを含んでよい。それぞれの試料は、生物学的検証の管理のために、複製で存在してもよい。被験薬剤に暴露した後、パラメーターの評価によって、細胞の反応が測定される。薬剤の存在によって生じるパラメーターの変化は、対照および/または他の薬剤（特にそれらの薬剤が既知の生物学的活性を有するものを含む場合）から得られたデータセットと比較される。もし被験薬剤の存在下で効果があれば、同様にしてその効果の標的および作用機序を決定することができる。その化合物の非存在下における変化の度合いについての一群のパラメーターに対する効果を比較できることにより、その化合物の機能を比較することができ、作用する経路が同定でき、副作用が予測できる。

【0015】

バイオマップデータセットを提供するために、結果をデータ処理装置に入れることができる。バイオマップは、一つまたは複数のシステムからのパラメーター読取値を含むと考えられる。バイオマップは、システム内における様々な薬剤の存在下および非存在下での細胞のパラメーターまたはマーカーを測定することによって得られた値、ならびに関心対象の薬剤の存在と少なくとも一つの他の状態、通常は対照状態（薬剤なしまたは異なる薬剤を加えた状態を含みうる）を比較することによって得られた値から作成される。パラメーターは、細胞産物またはそれらのエピトープ、ならびに因子の存在で値が変動する機能的状態を含む。望ましくは、結果を標準値、通常は「対照値または状態」に対して標準化し、標準化データセットを提供する。試験値から対照値を引き、補正試験値を補正刺激対照値で割ることによって、試験条件から得られた値を標準化することができる。他の標準化方法を使用することもでき；測定値、または試験値と刺激対照もしくは他の対照値との比の対数、または他の派生値を用いてよい。データは、対照条件下の同じ細胞型の対照値に対して標準化されるが、バイオマップは一つ、二つまたは複数の細胞型およびアッセイ条件からの標準化データを含みうる。

【0016】

バイオマップは、システム内の試料由来の少なくとも二つの異なるパラメーターレベル値を含み、少なくとも約3、少なくとも約4、かつ約20を超えないパラメーターからの値を含みうる。本明細書に提供されている結果は、少数のパラメーター（少パラメーター解析）が非常に有益でありうることを実証しており、その場合のパラメーター数は約10未満、かつ約3より多く、通常は約5より多い。

【0017】

バイオマップの用途に応じて、バイオマップは複数のシステムのパラメーター値を含んでもよく、その場合第一のバイオマップ、第二のバイオマップ、第三のバイオマップなどが比較される。十分な数の代替システムに値を提供するバイオマップの編集物を開発して、値の比較を可能にする。これは、多様な生物学的活性の識別および分類を増大させるための、特に強力な方法であることがわかる。

【0018】

バイオマップを比較するため、ならびにそれらの間の類似点および相違点の定量的測定を提供するために、数学的システムを用いることができる。例えば、データベース内にあ

10

20

30

40

50

るバイオマップは、バイオマップの関連性を定量化するために、統計学的解析(相関係数など)を用いた、パターン認識アルゴリズムまたはクラスタリング法(例えば階層的、またはK平均クラスタリングなど)によって解析することができる。これらの方法は、バイオマップが異なる機能的影響を識別する能力を最適化するように、変更することができる(重みづけや、分類方法を用いることによって)。例えば平均化、標準化、対数標準化が行われたプロファイルデータは、多次元尺度法(multidimensional scaling)とピボット選択法(pivoting)を組み合わせ対角線上に相関の高いものを移動させることによって、相関プロットに配列してもよい。統計学的解析により、薬剤活性間の全ての対応のある相関の有意性を客観的に評価できる。薬剤間の関係を可視化するために、多次元尺度法が用いられることもある。

10

【0019】

複数のシグナル伝達経路は、細胞をそのような経路を活性化する因子と接触させることにより、活性化される。少なくとも一つの因子、通常は少なくとも二つ、より通常は少なくとも三つの因子がシステム内に存在しており、システムは少なくとも四つまたはそれ以上の因子を含みうる。因子に反応する細胞内の経路を誘導する、数多くの因子が知られている。多くの場合、因子は細胞表面の受容体に結合するが、核膜の受容体などの他の受容体も関与しうる。加えて、受動的または能動的輸送もしくはエンドサイトーシスによって因子が膜表面を貫通できる場合、因子は膜、細胞質ゾル、または例えば核などの細胞小器官の構成要素と結合しうる。

【0020】

20

好ましくは、組み合わせで選択された因子は、例えば催炎症反応；抗炎症反応；血管新生；関心対象の発生経路など、関心対象の生理学的状態に関連している。望ましいバイオマップに応じて、これらの因子はサイトカイン、ケモカイン、および例えば成長因子といった他の因子(そのような因子にはインターロイキン；GM-CSF、G-CSF、M-CSF、TGF、FGF、EGF、TNF- α 、GH、コルチコトロピン、メラノトロピン、ACTHなどが含まれる)、細胞外基質の構成要素、インテグリンおよびアドヘシンなどの膜表面タンパク質、ならびに標的細胞またはそれらの周囲のインビボ環境によって発現している他の構成要素を含むことができる。

【0021】

関心対象の組み合わせは、内皮細胞に関連する一連の因子、例えばEGF、FGF、VEGF、インスリンなど、IL-1、IL-3、IL-4、IL-8、およびIL-13を含むインターロイキンなどのサイトカイン；IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ を含むインターフェロン；ケモカイン；TNF- α 、TGF β 、血管形成促進因子および抗血管形成因子などを含む。

30

【0022】

慢性Th2アッセイの組み合わせは、反応性のある細胞をTNF- α および/またはIL-1およびIL-4と共に24時間培養することによって規定することができる。例えば喘息などの慢性Th2環境の炎症では、TNF- α 、IL-1およびIL-4が存在するが、IFN- γ が存在しないことによって特徴付けられる。

【0023】

T細胞の培養は、抗CD3+IL-2 +/- IL-4 +/- IFN- γ +/- IL-12 +/- 抗IL-4または抗IFN- γ の組み合わせを含みうる。乾癬の疾患環境は、IL-12、IFN- γ およびTNF- α を含む。クローン病の疾患環境は、IL-1、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18およびIFN- γ を含む。関節リウマチの疾患環境は、TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10、IL-15、MIP1、MCP-1およびTGF β を含む。喘息の疾患環境は、IL-1 α 、IL-4、IL-5、IL-6およびGM-CSFを含む。マクロファージはIL-4および他のIL因子、M-CSFおよびGM-CSFに反応性がある。免疫反応、新生物増殖、血管新生などを調べるために癌細胞をシステムに使用してもよく、この場合、関心対象因子にはケモカイン；血管形成因子；IL-10などのサイトカイン；エストロゲン、プロゲステロン、テストステロンなどのステロイド；抗Her-2/neu；上皮成長因子；FGF；IGF-1などが含まれる。造血環境は、flt-2；幹細胞因子；IL-6；IL-3；IL-7；LIFなどを含みうる。

40

50

【0024】

催炎症性および抗炎症性システムを調べるためのシステムは、T細胞受容体複合体の刺激として糖抗原を、またはToll受容体シグナル伝達の刺激としてリポ多糖体(LPS)(LPSシステム)を含んでもよい。関心対象の因子は、IL-1 α ；IL-1 β ；IL-2；IL-3；IL-4；IL-5；IL-6；IL-7；IL-8；IL-9；IL-10；IL-11；IL-12；IL-13；IL-18；M-CSF；G-CSF；GM-CSF；MCP-1；MIG；IFN- α ；IFN- β ；IFN- γ ；TGF β ；ヒスタミン；PHA、抗CD3；抗CD28、ConA；抗IL-1、抗IL-2、抗TNF- α 、抗IFN- γ 、抗IL-12；抗IL-4；抗TGF β などを含む。

【0025】

本発明の一つの態様において、アッセイシステムは一つまたは複数の一次細胞を含む。本明細書で使用されるように、「一次細胞」という用語は、組織から確立された初代の細胞培養物に存在する細胞を意味し、かつそれに続く継代培養に由来する細胞を意味するが、通常は約10継代未満、好ましくは約5継代未満である。一次培養物中の接着細胞は、通常培養皿表面を覆うまで、すなわちそれらが接着阻害を示すまで増殖する。一次細胞は通常、培養において無制限には増殖できない。培養において無制限に増殖する細胞株は、「不死の」または「不死化した」細胞株と呼ばれることがあり、本発明の目的のためには一次細胞と区別される。不死化した細胞株には腫瘍形成性のものもあり、「形質転換」細胞株と呼ばれることもある。そのような永久細胞株は多くの種類の実験に特に有用であるが、本発明の方法にはそれらはあまり好ましくない。

【0026】

本発明のシステムにおいては、多くの細胞型が使用される。炎症反応に関与する細胞であれば制限なく含まれる。そのような細胞は、例えば一次微小血管、HUVEC、大動脈内皮細胞などの内皮細胞；例えばT細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージなどの、血液単核細胞またはそれらに由来する細胞のサブセット；例えば好酸球、好塩基球、好中球、巨核球などの、血液多形核細胞またはそれに由来する細胞のサブセット；樹状細胞；胸腺上皮細胞；皮質樹状細胞などを含む。構成細胞はさらに細分化されることもあり、例えばT細胞はTh1/Th2極性化；CD4+；CD8+について選択され；B細胞系統の細胞は、形質細胞、B細胞、プレB細胞に分けられる。

【0027】

アッセイシステムは、一次細胞、細胞株、またはそれらの組み合わせであってよい二つまたはそれ以上の細胞型を含んでよい。複数の細胞型を包含するシステムは、それぞれの細胞型のシグナル伝達ネットワークの乱れだけでなく、細胞間の情報伝達経路の阻害にも反応する。したがって、複数の細胞型を含むシステムにより、生物学的機能空間のさらなる適用範囲を提供する。

【0028】

関心対象の組み合わせには、内皮細胞および白血球；白血球および抗原提示細胞；癌細胞および内皮細胞；癌細胞、抗原提示細胞および白血球；間葉幹細胞または造血幹細胞および間質細胞；胸腺細胞および胸腺上皮細胞および/または皮質樹状細胞；神経幹細胞および内皮細胞などが、制限なく含まれる。

【0029】

遺伝子薬剤のスクリーニングアッセイにおいては、細胞の遺伝子構成を変化させるために、パネル中の一つまたは複数の細胞にポリヌクレオチドが加えられる。特定の経路に影響する表現形が変化するかどうか決定するために、出力パラメーターがモニターされる。このようにして、関心対象の経路、特に異常な生理学的状態に関連する経路においてタンパク質の発現をコードするかまたはそれに影響する遺伝子配列が同定される。

【0030】

通常同じ細胞型または細胞の組み合わせを用いて、関心対象の生理学的細胞状態、特にインビボにおける生理学的細胞状態をシミュレートする、細胞培養物を通常用いるアッセイの組み合わせが提供される。これらの細胞培養物は、関心対象の状態の細胞生理をシミュレートする反応を惹起し、かつ環境の変化に対する培養細胞の状態が決定できるようにする、十分な数の異なる因子を加えることによって作成される。関心対象の状態は、通常

、その関心対象の状態に関連する表現形を同定する多数のパラメーターまたはマーカーを調節する多数の経路を含むと考えられる。

【0031】

表現形は、パラメーターの形成を上方または下方制御によってその表現形の産生に影響する経路を誘導する、多数の因子を検出可能な産物として含むことによって作ることができるか、または、例えば腫瘍性一次細胞、細胞株などの細胞の性質に基づいていてもよく、その場合因子は関心対象の反応をより綿密に近似するインビトロの細胞反応を増強する。それらの因子は、例えば、膜表面受容体を有しかつ改変された表現形を生じさせる細胞内シグナルを誘導する公知の化合物といった、天然に存在する化合物であるか、または天然に存在する因子を模倣する合成の化合物である。ある例においては、それらの因子は細胞膜表面を通過し、細胞質に入って細胞質ゾル、核または他の細胞小器官内の構成要素に結合することによって、細胞内で作用すると考えられる。因子または模倣物を使用することにより環境を提供する際には、天然に存在する因子またはそれらの模倣物を使用して、環境にその因子の活性を提供する。因子に言及する際、それは関心対象の因子の活性であって、必ずしも特定の天然に存在する因子そのものではないことが理解される。

10

【0032】

測定されるパラメーターの性質および数は、一般的に複数の経路への反応を反映する。本手法は、関心対象の生理学的状態に関連するより強い予測可能性を有する強固な結果を提供する。その結果は、基底状態および/または一つまたは複数の因子が存在する状態と比較され、特に薬剤の存在下または非存在下において使用された全ての因子と比較される。異なる環境の効果は、バイオマップに都合よく提供され、結果を数学的に比較することができる。

20

【0033】

遺伝子薬剤のスクリーニングアッセイについても、上記と同じ手法が使用されることが考えられる。望ましい環境、すなわち、例えば疾患状態のような異常な状態に関連する生理学的環境などの関心対象の環境を提供する一つまたは複数の因子が存在する培地中に置かれた細胞に、遺伝子薬剤を添加する。その生理学的状態に関連する経路に係するパラメーターがモニターされる。そのパラメーターが、経路の上方または下方制御を示すパターンを示す場合には、その遺伝子薬剤はその経路の要素の発現をコードするかまたはそれに影響すると推測される。このようにして、関心対象の生理学的状態における遺伝子の役割を決定することができ、治療的応用のための標的を定義することができる。

30

【0034】

いったん関心対象の経路および/または環境のためのバイオマップが作成されると、因子を用いても用いなくてもアッセイを実施することができる。個々の因子および異なる因子の組み合わせによるパラメーターの変動が分かると、異なるアッセイの組み合わせにおいて以前に測定したパラメーターを測定することによって、その薬剤の細胞培養への効果を比較することができる。異なるパラメーターレベルに対する薬剤の観測された効果は、その後バイオマップデータセット内の因子または因子の組み合わせの観測された効果と相関させることができる。

【0035】

生理学的状態へのシミュレーションに言及する際、シミュレーションには通常、正常または疾患状態のインビボの対応細胞と共有される少なくとも三つの異なる調節特性(パラメーター)が含まれると考えられる。または、シミュレーションには、関心対象の条件下で、インビボで機能する少なくとも三つの異なるシグナル伝達経路または細胞機能における改変を識別できる細胞培養系が含まれてもよい。

40

【0036】

バイオマップデータセットを提供するために、結果をデータ処理装置に入れることができる。異なる条件下で得られたバイオマップの比較および解析のためのアルゴリズムが用いられる。バイオマップ内の複数のパラメーターの変化を決定することによって、因子や薬剤の効果が読み取られる。バイオマップには、薬剤のアッセイの組み合わせからの結果

50

が含まれ、かつ一つまたは複数の対照状態、シミュレートされた状態、および他の薬剤を使用するかまたは他の条件下で行ったアッセイの組み合わせを含んでもよい。迅速かつ簡単な比較のために、結果をバイオマップのグラフとして視覚的に提示してもよく、数字、グラフ、色表示などを含んでもよい。

【0037】

パラメーターは、定量可能な細胞の構成要素であり、特に、望ましくは高処理システム内で、正確に測定されうる要素である。パラメーターは、細胞表面決定因子、受容体、タンパク質またはそれらの構造的もしくは翻訳後改変物、脂質、炭水化物、有機または無機分子、例えばmRNA、DNAなどの核酸、もしくはそのような細胞構成要素に由来する部分またはそれらの組み合わせを含む、任意の細胞構成要素または細胞産物であってよい。

10

【0038】

好ましいパラメーターは情報を与えるものであり、すなわちそれらはシステムの一つまたは複数の個々の因子または薬剤に反応して強固な変調を有し；さらに、例えば炎症、癌生物学などのシステムに潜在的または既知の関連性を有しうる。先に論じたように、選択された一連のパラメーターは、薬剤間の識別を可能にするよう十分に大きい、算出要件を満たすよう十分に選択的である。

【0039】

パラメーターは、特定のモノクローナル抗体またはリガンドまたは受容体結合決定因子によって定義されうる。パラメーターは、例えばCD抗原(CD1からCD247)、 $\alpha_4\beta_7$ および他のインテグリンを含む細胞接着分子、CLAおよびシアリルルイスXなどのセレクトインリガンド、ならびに細胞外基質の構成要素といった、細胞表面分子の存在を含みうる。パラメーターは、IL-2、IL-4、IL-6、成長因子を含むリンフォカインなどの、分泌産物の存在も含みうる。

20

【0040】

T細胞については、これらのパラメーターはIL-1R、IL-2R、IL-4R、IL-12R β 、CD45R0、CD49E、組織選択的接着分子、ホーミング受容体、ケモカイン受容体、CD26、CD27、CD30および他の活性化抗原を含みうる。活性化中に調節される追加のパラメーターは、MHCクラスII；クラスター化および/または構造的変化によるインテグリンの機能的活性化；T細胞増殖およびケモカインの産生を含むサイトカインの産生を含む。特に重要なものは、サイトカイン産生パターンの調節であり、最も特徴的な例は、Th2細胞によるIL-4の産生、およびTh1 T細胞によるインターフェロン γ の産生である。内皮細胞については、パラメーターはICAM-1、E-セレクトイン、IL-8、HLA-DR、VCAM1、GRO- α 、ENA-78などを含む。

30

【0041】

関心対象の他のパラメーターは、MIG(CLCX9)；IP-10；エオタキシン-1；エオタキシン-3；MCP-1；RANTES；Tarc；CD31； $\alpha_v\beta_3$ ；P-セレクトイン(CD62P)；CD34；CD14；CD40；CD38；CD55；CD69；CXCR2；CD95；フィブロネクチン；HLA-ABC；GRO α ；MCP-4；TAPA-1；インテグリン $\alpha_v\beta_5$ ；E-カドヘリン；CD44；フォンウィルブランド因子；CD3；CD25；CD141；CD142；CD143；CD151；MCP-1；皮膚リンパ球抗原(CLA)；CXCR3；CCR3；TNF- α ；IFN- γ ；IL-2；IL-4；IL-1 α ；M-CSF；インテグリン $\alpha_4\beta_7$ ；インテグリン $\alpha_E\beta_7$ ；L-セレクトイン；EGF-R；HLA-DR(CD74)；CD44；癌胎児性抗原(CEA，CD66e)；インテグリン $\alpha_5\beta_1$ ；HLA-I；ポリIg受容体；CA-19-9；CD95；インテグリン $\alpha_2\beta_1$ ；インテグリン $\alpha_3\beta_1$ ；インテグリン $\alpha_6\beta_1$ ；インテグリン $\alpha_6\beta_4$ ；インテグリン α_v ；ラミニン5；ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)；TNFR-I；乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)；ミトコンドリアチトクロームc；AP02.7エピトープ；活性型カスパーゼ-3；Ki-67；およびPCNAを、制限なく含む。

40

【0042】

関心対象の薬剤は、特徴的なシグネチャープロファイル(signature profiles)を誘導する薬物および遺伝子を含む。当業者は、本発明は炎症およびその制御に関連する多くの重要な遺伝子および薬物を例示しているが、本発明は任意の遺伝子または薬物に適用可能であることを理解すると考えられる。ヒトゲノム配列の完了でヒト遺伝子の全てが利用可

50

能となり、化学的多様性への現代的アプローチと組み合わせて、生物学と医学に空前の発展の機会を開いた。

【0043】

関心対象の候補薬剤は、数多くの化学的分類を網羅する生物学的活性剤、主に有機分子であり、有機金属分子、無機分子、遺伝子配列などを含みうる。本発明の重要な局面は、好ましい生物学的反応機能を用いて、候補薬物を評価し、治療用抗体およびタンパク質に基づいた治療法を選択することである。候補薬剤は、タンパク質との構造的相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含み、典型的には少なくとも一つのアミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボキシル基を含み、少なくとも二つの官能化学基を含むことが多い。候補薬剤はしばしば、上記の一つまたは複数の官能基で置換された、環状炭素または複素環構造および/または芳香族または多環芳香族構造を含む。候補薬剤は、ペプチド、ポリヌクレオチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、派生物、構造的類似体またはそれらの組み合わせを含む、生体分子にも見出される。

【0044】

薬理学的に活性のある薬物、遺伝的に活性のある分子なども含まれる。関心対象の化合物は、化学療法剤、抗炎症剤、ホルモンまたはホルモンアンタゴニスト、イオンチャネル修飾薬、および神経活性剤を含む。本発明に適した例示的な薬剤は、"Pharmacological Basis of Therapeutics," Goodman and Gilman, McGraw-Hill, New York, New York, (1996), 第9版の以下の項に記述されている：シナプスおよび神経作用接合部に作用する薬剤(Synaptic and Neuroeffector Junctional Sites)；中枢神経系に作用する薬物(Drugs Acting on the Central Nervous System)；オートコイド(Autacoids)：炎症の薬物療法(Drug Therapy of Inflammation)；水、塩およびイオン(Water, Salts and Ions)；腎機能および電解質代謝に作用する薬物(Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism)；心血管系薬物(Cardiovascular Drugs)；消化管機能に作用する薬物(Drugs Affecting Gastrointestinal Function)；子宮運動に作用する薬物(Drugs Affecting Uterine Motility)；寄生虫感染の化学療法(Chemotherapy of Parasitic Infections)；微生物疾患の化学療法(Chemotherapy of Microbial Diseases)；腫瘍性疾患の化学療法(Chemotherapy of Neoplastic Diseases)；免疫抑制に使用される薬物(Drugs Used for Immunosuppression)；造血器官に作用する薬物(Drugs Acting on Blood-Forming organs)；ホルモンおよびホルモンアンタゴニスト(Hormones and Hormone Antagonists)；ビタミン(Vitamins)；皮膚科学(Dermatology)；および毒性学(Toxicology)（全て参照により本明細書に組み入れられる）。毒素、ならびに生物学的および化学的兵器薬剤も含まれ、例えばSomani, S. M. (Ed.), "Chemical Warfare Agents", Academic Press, New York, 1992を参照されたい。

【0045】

薬剤は、合成または天然の化合物のライブラリーを含む、広範な種類の源から得られる。例えば、ランダムオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む、生体分子を含む広範な種類の有機化合物の無作為合成および指定合成のための数多くの方法が利用可能である。または、細菌、真菌、植物および動物の抽出物の形態での天然化合物のライブラリーも利用可能であるかもしれない。加えて、天然または合成的に作製したライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的および生化学的手段によって容易に改変され、コンビナトリアルライブラリーを作製するのに用いることができる。既知の薬剤を、構造的類似体を作製するために、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの指定または無作為の化学的改変に供してもよい。

【0046】

本明細書で使用されているように、「遺伝子薬剤」という用語は、ポリヌクレオチドおよびそれらの類似体を指し、この薬剤は、本発明のスクリーニングアッセイにおいて、細胞に遺伝子薬剤を加えることによって検査される。遺伝子薬剤の導入は、細胞の全遺伝子構成に変化を生じさせる。DNAなどの遺伝子薬剤は、一般に染色体内への配列の組み込みによって、細胞のゲノム内に実験的に導入された変化を生じさせることができる。遺伝子

変化は、外因性配列が組み込まれないがエピソーム因子として維持される、一時的なものであってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドなどの遺伝子薬剤は、mRNAの転写または翻訳を阻害することによって、細胞の遺伝子型を変化させることなくタンパク質の発現に影響を与えることもできる。遺伝子薬剤の効果は、細胞内の一つまたは複数の遺伝子産物の発現を、増加または減少させるものである。

【0047】

ポリペプチドをコードしている発現ベクターの導入を用いて、その配列を持たない細胞内でコード産物を発現させたり、またはその産物を過剰発現させることができる。構成的または外部調節をうける様々なプロモーターを使用することができ、後者の状況においては、遺伝子の転写をオンまたはオフに変えることができる。これらのコード配列は、全長cDNAまたはゲノムのクローン、それらに由来する断片、または天然配列と他のコード配列の機能的または構造的ドメインとを組み合わせたキメラを含みうる。または、導入配列は、アンチセンス配列をコードするか；アンチセンスオリゴヌクレオチドであるか；ドミナントネガティブ変異体、または天然配列の優性または構成的活性化変異体；変化した調節配列などをコードしてもよい。

10

【0048】

宿主細胞種由来の配列に加えて、他の関心対象の配列として、例えば病原体の遺伝子配列、例えばウイルス、細菌、原虫の遺伝子、特にヒトまたは他の宿主細胞機能に影響する遺伝子のコード領域が挙げられる。他種に由来する配列を導入してもよく、この場合対応する相同配列はあってもなくてもよい。

20

【0049】

例えばヒト、他の哺乳類、およびヒト病原体の配列に関する多数の公共の資源が、遺伝子配列源として利用可能である。ヒトゲノムのかなりの部分が解読され、GenBankなどの公共のデータベースを通じて利用できる。ゲノム配列のみならず、uni-geneセットも資源に含まれる。例えば、Dunhamら、(1999) *Nature* 402, 489-495;またはDeloukasら、(1998) *Science* 282, 744-746を参照されたい。

【0050】

多くのヒト遺伝子配列に対応するcDNAクローンが、IMAGEコンソーシアムから利用可能である。国際IMAGEコンソーシアム研究所(The international IMAGE Consortium laboratories)は、世界中で使用するためのcDNAクローンを開発しアレイ化(array)している。それらのクローンは、例えばGenome Systems, Inc., St. Louis, MOから市販されている。DNA配列情報に基づくPCRにより配列をクローニングする方法についても、当技術分野において公知である。

30

【0051】

以下の実施例は、当業者に本発明の作製法および使用法の完全な開示および説明を提供するために記載され、発明者らが考える発明の範囲を制限することを意図するものではなく、下記の実験が行った実験の全てもしくは唯一の実験であることを示すことを意図するものでもない。使用される数字(例えば量、温度など)に関する正確性を確実にするための努力がなされてきたが、いくつかの実験誤差および偏差が説明されるべきである。指示されていない限り、部分は重量部分(parts by weight)であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、気圧は大気圧または大気圧付近である。

40

【0052】

本明細書に引用されている全ての刊行物および特許出願は、個々の刊行物または特許出願が具体的かつ個別に参照として組み入れられることが示されているかのように、参照により本明細書に組み入れられる。

【0053】

本発明は、本発明の実施のための好ましい様式を含む、本発明者によって見出されまたは提案された特定の態様に関して記載されている。本開示に照らすと、本発明の意図する範囲から逸脱することなく、例示された特定の態様に数多くの改変や変更が可能であることが、当業者に理解されるであろう。例えば、コドンの冗長性によって、タンパク質配列

50

に影響を与えることなく基礎となるDNA配列に変更を加えることができる。さらに、生物学的機能同義性の考慮により、生物学的機能の種類または量に影響を与えることなく、タンパク質の構造を変化させることができる。すべてのそのような改変は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【0054】

実施例 1

材料と方法

本実施例は、本発明およびそれにより提供される利点を説明する残りの実施例を通じて使用される材料と方法に関する情報を提供する。本明細書に例示されているものとは異なる種々の材料も本発明の実施に使用可能であり、本明細書の教示を考慮すれば、説明されている種々の方法の変形物が日常の技術の範囲内にあることを当業者は理解すると考えられる。

10

【0055】

方法

サイトカイン、抗体、および試薬

組換えヒトIFN- γ 、TNF- α 、およびIL-1 β はR&D Systems (Minneapolis, Minnesota)から入手した。マウスIgGはSigma (St. Louis, Missouri)から入手した。マウス抗ヒト組織因子(mIgG₁)はCALBIOCHEM (San Diego, CA)から入手した。マウス抗ヒトICAM-1(mIgG₁)はBeckman Coulter (Fullerton, California)から、およびマウス抗ヒトE-セレクトリン(mIgG₁)はHyCult Biotechnology (Uden, The Netherlands)から入手した。ヒトVCAM-1に対する非結合マウス抗体(mIgG₁)、CD31(mIgG₁)、HLA-DR(mIgG_{2a})、CD3(mIgG₁)、CD40(mIgG₁)、CD69(mIgG₁)、MIG(mIgG₁)、MCP-1(mIgG₁)、CD14(mIgG₁)、IL-1 α (mIgG₁)およびCD38(mIgG₁)はBD Biosciences (San Jose, California)から入手した。IL-8に対する非結合マウス抗体(mIgG₁)およびM-CSF(mIgG₁)はR&D Systemsから入手した。TNF- α 、IFN- γ およびIL-1 β に対するヤギポリクローナル抗体、および対照ヤギIgGはR&D Systemsから入手した。

20

【0056】

アピゲニン、U0126、ブデソニド、デキサメタゾン、ゲニステイン、ゼアラレノン、 β -ゼアラレノール、アザチオプリン、プレドニゾロン、レフルノミド、ナブメトン、AA861、およびシクロスポリンAはSigmaから入手した。PD098059、PD169316、SKF-86002、SB220025、メバスタチン、ノルジヒドログアヤレット酸 (nordihydroguaiaritic acid) (NGDA)、FK506、およびラバマイシンはCalbiochem (San Diego, California)から入手した。アトルバスタチンおよびシンバスタチンはLKT Laboratories (St. Paul, Minnesota)から入手した。組換えヒトIL-1ra、およびIL-10はR&D Systemsから入手した。Ro-20-1274、R(-)ロリプラム、DRB、PP2、およびPP1はBIOMOL (Plymouth Meeting, Pennsylvania)から。ミコフェノール酸、WHI-P131、ZM39923、ワートマニン、SC-560、NS-398、LM1685、AG490、AG126、SC68376、およびSB239063はCalbiochemから入手した。ZM336372、ラディシコール、17-AAG、SP600125、ロバスタチン、LY294002、FR122047、DUP697およびゲルダナマイシンはTocris (Ellisville, MO)から入手した。

30

【0057】

化合物は一連の濃度にわたって評価され(例えば、図6を参照)、示したデータは細胞毒性を生じない濃度におけるものである。黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 由来のブドウ球菌エンテロトキシンB、毒性ショック症候群毒素-1 (ブドウ球菌エンテロトキシンF)、およびサルモネラ腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*) 由来のリポ多糖はSigmaから入手した。

40

【0058】

細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)はCascade Biologics (Portland, OR)から入手し、製造者により提供された補足剤および2%の熱非働化ウシ胎仔血清(Hyclone, Logan, Utah)を含むEGM-2培地中で培養し、0.05%トリプシン-0.53mM EDTA (Mediatech, Herndon, Virginia)を製造者の記載通りに使用して継代培養した。末梢血単核球(PBMC)は軟膜(Stanford Blood Bank, Stanford, California)から、Hisopaque-1077(Sigma)上で遠心分離することに

50

よって調製した。サイトカイン(IL-1 β 、1ng/ml; TNF- α 、5ng/ml;およびIFN- γ 、100ng/ml)、活性化剤(SAg、20ng/mlまたはLPS、0.2ng/ml)、および/またはPBMC (7.5x10⁴)の存在下で、HUVECをマイクロタイタープレート(Falcon; BD Biosciences)で表示された時間培養することにより、実験を行った。薬物は刺激の1時間前に加えられ、24時間の全刺激時間にわたって存在していた。

【0059】

細胞ベースのELISA

細胞ベースのELISAは、本質的にはMelroseら (1998) *J. Immunol* 161: 2457-64に記載されているように行われた。簡潔に述べると、処理および刺激されたHUVEC(またはHUVEC/PBMC)を含むマイクロタイタープレートをブロッキングし、その後一次抗体またはアイソタイプ対照抗体(0.01-0.5 μ g/ml)とともに一時間インキュベートした。洗浄後、プレートをペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG(Promega)二次抗体、またはビオチン結合抗マウスIgG抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)とともに一時間インキュベートし、続いてストレプトアビジンHRPとともに30分インキュベートした。プレートを洗浄し、TMB基質(Clinical Science Products, Mansfield, Massachusetts)で発色させ、Molecular Device SpectraMAX 190プレートリーダー(Molecular Device, Sunnyvale, California)で、450nmにおける吸光度(OD)を読んだ(650 nmにおける背景吸光度を差し引く)。

【0060】

siRNAトランスフェクション

早期の継代培養の(5未満)、指数関数的に増殖しているHUVEC細胞を収穫し、PBSで一回洗浄し、2x10⁶の細胞を100 μ lのヌクレオフェクション溶液(Human Umbilical Vein Endothelial Cell Nucleofector Kit, AMAXA, Koeln, Germany)に再懸濁した。TNFR1 siRNA(配列番号: 1 AAGTGCCACAAAGGAACCTAC; 20 μ Mの溶液中15 μ l; Dharmacon, Lafayette, Colorado)を細胞懸濁液に加え、エレクトロポレーション用キュベットに移し、U-1設定を使用してエレクトロポレーションを行った。細胞懸濁液を、その後3mlのEGM-2培地(Clonetics)を含む別のチューブに移し、37 $^{\circ}$ Cで10分インキュベートし、上記のようなサイトカイン活性化解析およびELISA解析のために、マイクロタイタープレート(25,000細胞/ウェル)にプレートした。

【0061】

データ解析

実験あたり3つの複製試料から、それぞれのパラメーターに対する平均OD値を計算した。その後平均値を用いて、それぞれの実験内における、処理(例えば薬物またはsiRNA)および対応する対照(例えば培地またはDMSO)のパラメーター値の比を作成した。これらの標準化されたパラメーター比を、その後log₁₀に変換した。ログ発現比を、全てのピアソン相関計算(Partek Pro, Version5.1; Partek, St. Charles, Missouri)に使用した。ピアソン相関の66%信頼区間は、ブートストラップ再サンプリング法によって決定した(Efron & Tibshirani, An Introduction to the Bootstrap, (Chapman and Hall, New York, 1993)。個々の実験プロファイル(図2)または平均プロファイル(薬物あたりの実験数n=3; 図3および4)は、階層的クラスタリング(平均距離を用いたピアソン相関メトリック(metric))によって配列した。

【0062】

図5の平均プロファイルデータは、多次元尺度法とピボット選択法を組み合わせ対角線方向に相関の高いものを移動させることによって、相関プロットに配列した。有意な相関は、1)経験的プロファイルの順序を変えて作られた無作為データを用いてピアソン相関分布を作成すること、2)ピアソン相関を、FDR(Tusherら、(2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116-21) (図5の2%)を最小化するか、または無作為データにおけるこの選択したピアソン相関よりも大きい相関数の、経験的なデータにおけるこの選択したピアソン相関よりも大きい相関数に対する比を最小化するように選択すること(図5の0.67)、および3)このカットオフピアソン相関値を実験プロファイル間の相関に適用することによって決定した。

10

20

30

40

50

【0063】

言い換えると、2%のFDRの場合、実験プロファイルに由来する相関の98%が真の生物学的効果の結果であり、無作為的な偶然ではない。AT&T GraphVizソフトウェアを用いて、相関関係を多次元尺度によって二次元的に可視化した。化合物間の距離はそれらの類似性を表しており、偶然によらないレベルで(上記で定義されているように)プロファイルが類似している化合物間に線が引かれている。

【0064】

実施例2内皮細胞機能の調節因子

本実施例は、内皮細胞の関与する免疫および/または炎症状態を変化させる化合物のスクリーニングへの本発明の応用について説明する。内皮細胞は実施例1に記載されているように培養した。

10

【0065】

複合的なサイトカインで刺激した内皮細胞炎症システムは、複数のシグナル伝達経路の阻害剤を識別する

内皮細胞は、接着受容体およびケモカインの発現を介して白血球の移動を調節することによって、炎症反応を調節する。慢性的炎症組織において、内皮細胞は、IL-1 β 、TNF- α およびIFN- γ を含む複数の催炎症性サイトカインに曝露されている。したがって、一次ヒト内皮細胞(EC)を、この三つの催炎症性サイトカインの組み合わせ(3Cシステム)で刺激し、慢性炎症過程に関連した重要な経路および経路の相互作用を同時に活性化した。一つまたは複数の個々のサイトカインまたはサイトカインの組み合わせ、または特定の薬物効果(下記を参照)に反応したそれらの強固な調節、および炎症生物学とのそれらの潜在的または既知の関連性によって、読取値を選択した。

20

【0066】

調べた多数の潜在性の読取値から、次の読取りパラメーターを選択した：VCAM-1、ICAM-1およびE-セ렉チン(白血球の血管接着分子)、MHC-クラスII(抗原提示)、MIG/CXCL9、MCP-1/CCL2、およびIL-8/CXCL8(血液からの選択的白血球動員を媒介するケモカイン)、ならびにCD31(白血球の移動)。タンパク質または生物活性分子を(発現遺伝子のかわりに)測定したが、その理由は、1)遺伝子とは異なり、生物学的活性タンパク質は生理学および病態生理学的過程の近接媒介物質であり、かつ2)これらの種は測定可能な高処理アッセイ形式で容易に測定されるためである。薬物は24時間のサイトカイン活性化期間を通して含まれ、読取りパラメーターはELISAで測定した。それぞれのシステムにおける薬物処理に反応した読取りパラメーター発現レベルの相対的变化を提示する。

30

【0067】

図1に説明されているように(10の独立した実験)、3Cシステムは、TNF- α の抗体阻害剤、およびアピゲニン(NF- κ B機能を遮断するカゼインキナーゼII阻害剤)、PD169316(p38 MAPK阻害剤)、およびPD098059(MEK阻害剤)という薬物を含む、複数の異なる経路および機序の阻害剤に反応する。これら薬剤の各々は、特徴的な反応プロファイルを誘導し、3Cシステムが独特かつ再現性のある様式でこれらのシグナル伝達要素の乱れに反応することを示している。追加の用量反応データは、図6に提供されている。

40

【0068】

実施例3システム反応と薬物の作用機序および経路阻害との相関

薬物に対するシステム反応が、作用機序または経路活性と相関するかどうか決定するために、本発明者らは、通常の細胞経路に作用する化学的に多様な阻害剤を用いて3Cシステムの反応を評価した。図2aに、薬物につき3つの独立した実験から得られた薬剤活性プロファイルが、ヒートマップ形式で示されている(緑は、示した読出パラメーターのレベルが薬物なしの対照に対して増加していることを示し、黒は変化なしを示し、赤は減少を示す)。図2bは、薬物活性プロファイルの対応のある比較の結果を示す(ピアソン相関関数、r)。高い正の相関関数(もっとも強いものの値は >0.9)をもつプロファイルの対は水色で

50

ある。図2aおよび2bの化合物の順序は、教師なし階層的クラスタリング(クラスタリングメトリックとしてピアソン相関を使用した図2b右側の樹形図を参照)によって決定した。

【0069】

共通の標的を持つ薬物は相同的なプロファイルを誘導する。炎症の間、サイトカインシグナル伝達により、p38分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)のリン酸化および核内への移行が生じ、核内でそれは細胞表面受容体およびサイトカインの転写調節に関与する。p38 MAPKの化学的に異なる阻害剤に対するシステム反応を直接比較することにより、強い機能相同性が明らかとなる(例えば、図2bにおいて、PD169316 対 SB220025 の平均対数パラメーター発現率の対応のあるピアソン相関は $r=0.96$; 66%信頼区間は $[0.90, 0.99]$)。個別の実験プロファイルの類似性(図2a)によって、および複数の個別実験にわたるPD 169316および他のp38 MAPK阻害剤(SB220025およびSB202190)のシステム反応の様に高い相関性(図2bの、個々のPD169316、SB202190、およびSB202190の実験間の高い対応のあるピアソン相関を参照)によって示されるように、この機能的相関には再現性があり、他のp 38 MAPK阻害剤にも及ぶ。対照的に、個別の実験について図2bの相関マップで説明されているように、p38阻害対MEK阻害(PD098059による)またはNF- κ B阻害(アピゲニン、NGDAまたはTNF- α アンタゴニストによる)のシステム反応にはほとんどまたは全く類似性が見られない($r<0.4$)。 10

【0070】

複合的細胞システムにおける機能の相同性は、化合物活性の機序的オーバーラップを明らかにすることができる。分子シャペロンhsp-90の二つの阻害剤、17-AAGおよびラディシ 20
シコールは、再現性のある機能的相関を示し(図2aおよび2b)、興味深いことに、p38阻害剤とも機能類似性を示す(17-AAG対PD169316の、平均対数発現率は $r=0.84$, $[0.78, 0.92]$)。NF- κ B活性化の直接的阻害に加えて、ラディシコールを用いたhsp-90の遮断はp38経路を介するシグナル伝達も阻害することができ、したがってここで同定された機能相同性はこれらの阻害剤間の機序的オーバーラップと合致している。アピゲニンとノルジヒドログアヤレト酸(NDGA)もまた、3Cシステムにおいて機能相同性を示す(図2aおよび2b、 $r=0.79$, $[0.69, 0.92]$)。これらの薬物は別個の作用機序を有するが(フラボノイドであるアピゲニンはカゼインキナーゼII阻害剤として特徴づけられており、一方NDGAは5-リポキシゲナーゼ阻害剤である)、両者は炎症の重要な経路であるNF- κ B経路が媒介する反応を阻害する。 30

【0071】

相同的な機能的反応は、標的外活性を明らかにすることもできる。ZM336372について得られたプロファイルは、当初はc-Rafの阻害剤として選択され、ゆえにRas/Raf/MEK/ERK経路を阻害すると期待されていたが、p38阻害剤と有意な機能的類似性を示した(図2、p38阻害剤クラスターの青の囲み; PD169316に対して $r=0.75$, $[0.43, 0.97]$)。これらの結果に一致して、ZM336372は現在、c-Rafに加えてp38MAPK阻害剤として知られている。したがって、この3Cシステムにおける再現性のある反応は、既知の作用機序と相関し、標的外活性も明らかにすることができる。

【0072】

複合的細胞システムは、タンパク質および遺伝子操作にも反応性がある。TNF- α を、抗 40
TNF- α 抗体(または可溶性TNF受容体1)を用いて阻害すると、siRNAを用いたTNF受容体1のノックダウンにより得られた結果と高い相関のある反応を生じる(図2)($r=0.92$, $[0.88, 0.98]$)。したがって、そのような複合的細胞システムにおける遺伝子ノックダウンは、遺伝子機能を詳細に分析し、遺伝子標的に対する薬物の効果を予測するのに有用でありうる。

【0073】

これらのデータは、シグネチャー薬物反応プロファイルが、この複合的EC炎症システムにおける機能相同性に基づいて薬物作用を検出するのみでなく、識別および分類ができることを示している。しかし、この一つのシステムは、炎症における複数の標的および経路に対して感受性があるが、免疫調節因子のすべてのクラスを検出するわけではない。例え 50

ば、システムに加えられていない免疫サイトカインの阻害剤、または白血球シグナル伝達経路(例えばT細胞受容体シグナル伝達)に特異的な免疫調節因子は、多重刺激された内皮細胞システムに対して(毒性を生じないレベルでは)、ほとんどまたは全く効果がなかった。

【0074】

実施例4

生物学および薬理学的活性空間の適用範囲を広げるための多細胞複合システム

追加の細胞型を組み入れることによって、複合的システムでアッセイ可能なシグナル伝達経路および炎症機構の幅を広げることができる。したがって、末梢血単核球(PBMC; CD4⁺およびCD8⁺T細胞、単球、NK細胞、および他の単核白血球の混合物)、およびECを含む多細胞システムを、T細胞受容体複合体の刺激としてスーパー抗原(SAg)を(SAgシステム)、またはトール受容体シグナル伝達の刺激としてリポ多糖を(LPSシステム)を用いて評価した。選択されたパラメーターには、CD3(T細胞マーカー)、CD14(単球マーカー)、CD38およびCD69(早期活性化マーカー)、CD40(リンパ球共刺激に重要なTNFRファミリーメンバー)、E-セレクトインおよびVCAM-1(内皮接着分子)、組織因子(TF、CD142; 凝固開始因子)、IL-1 α およびM-CSF(サイトカイン)、およびIL-8、MCP-1およびMIG(白血球動員を制御するケモカイン)が含まれる。これらの多細胞システムにおいて、細胞は直接的に開始刺激に反応および/または相互に反応し、その結果複合的な事象のカスケードが生じる。

【0075】

複合的SAgシステムは、内皮炎症システムにおいて不活性もしくはおいて弱い活性のみを持つ数多くの化合物に、強固にかつ再現可能に反応する(図3)。例えば、FK506およびシクロスポリンAは、カルシニューリン媒介T細胞受容体シグナル伝達の阻害剤であるが、SAgシステム反応の強力な阻害剤でもある(図3a; 複数の白血球および内皮パラメーターの減少(赤)に注目)。さらに、これらの薬物は強い機能相同性を示す(図3b)。SAgシステムにおいて活性を持つ(しかし3Cシステムでは持たない)他の化合物は、IL-10、ホスホジエステラーゼ4阻害剤であるRo-20-1274およびロリプラム、免疫抑制剤であるラパマイシン、JAK阻害剤であるWHI-P131およびZM39923、HMG-CoA還元酵素阻害剤、コルチコステロイド、srcファミリーキナーゼ阻害剤であるPP1およびPP2を含む(図3aおよび3b)。内皮炎症システムで活性なほとんどの化合物(図2)は、より複合的な多細胞システムにおいても活性を有する(例えば、p38阻害剤のPD169316およびSB220025、および抗TNF- α : 図4も参照)。再度、図3の化合物の順序は、平均プロファイルデータの教師なし階層的クラスタリングにより決定した(n=3の独立した実験: 図3b右側の樹形図を参照)。このシステムで有用な他のマーカーは、VCAM-1とエオタキシン-3を含む。

【0076】

複数の細胞型を包含するシステムは、それぞれの細胞型の細胞内シグナル伝達ネットワークの乱れに反応するのみでなく、細胞間の情報伝達経路の阻害に対しても反応する。実際、SAgシステムは、複合型細胞システムにおいて、SAgに刺激された白血球によって内因性に産生されたTNF- α の阻害(抗TNF- α)、IL-1 β の阻害(抗IL-1 β およびIL-1受容体アンタゴニスト)、およびIFN- γ の阻害(抗IFN- γ)を検出する(図3)。したがって、複数の細胞型を含むシステムは、生物学的機能空間のさらなる適用範囲を提供することができる。

【0077】

実施例5

多システム解析は検出の増加と化合物機序の識別の両方を提供する

広範囲の生物学を反応プロファイルに含むためのさらなる手法は、平行してアッセイした複数の複合的システムからのデータを組み合わせることである。これは、多様な生物学的活性の識別や分類を特に増加する強力な方法であることがわかる(図4)。本発明者らは約20の機能的分類から、48の化合物を選び(図4a)、三つの複合的システムにおいてそれらを実験した: 3Cシステム(図1および図2を参照)、SAgシステム(図3を参照)、およびLPSシステム(図5a参照)。図4における化合物の提示順序は、プロファイル(図4b)またはプロファイルの組み合わせ(図4c)の階層的クラスタリングにより決定され、用いるシステムの組

10

20

30

40

50

み合わせによって異なる。

【0078】

3Cシステム単独における化合物の評価は、20のうち13の化合物分類からの、48のうち25の化合物(図4b左パネル; 薄いグレーの化合物は非活性であった)を検出するのに十分であり(一つのパラメーターにおいて少なくとも20%の変化と客観的に定義される; 対数比は ± 0.1)、p38阻害剤、hsp-90阻害剤、およびPI3K阻害剤を含む活性化合物の小サブセットの分類を可能にする(化合物リストの左に階層的樹形図により示されている)。SAgシステム(図4b、中央パネル)またはLPSシステム(図4b、右パネル)における化合物の解析は、検出された化合物数を、それぞれ43および45に増加させ、これらの多細胞システムのいずれかで全ての被験化合物分類のうちの少なくとも一つのメンバーを検出することができる。しかし、SAgもLPSシステムも、いずれも単独ではあまり効率的に活性化合物を識別および分類しない(図4bの化合物リスト右の樹形図を参照)。例えば、hsp-90阻害剤であるラディシコールおよびゲルダナマイシンは、SAgシステムにおいて、カルシニューリン阻害剤(FK-506およびシクロスポリン)およびsrcファミリー阻害剤(PP1およびPP2)とは区別されない。

10

【0079】

個々のシステムからのプロファイルを「多システムプロファイル」(図4c)に組み合わせると、機能相同性による化合物分類の質が劇的に向上する。3CおよびSAgシステムの組み合わせにおいては、HMG-CoA阻害剤、カルシニューリン阻害剤、srcファミリー阻害剤、ステロイド、ホスホジエステラーゼ4阻害剤、およびCox阻害剤は全て別個のクラスターを形成し、一方(3Cシステムからの)p38、hsp-90およびPI3K阻害剤クラスターは保持されている。3CおよびSAgシステムと直列にLPSシステムプロファイルを加えると(図4C、右パネル)、48の被験化合物の最適な検出が可能になり、さらに機能的分類の識別が向上する。

20

【0080】

図4のような階層的クラスタリング法は、化合物を機能相同性によって分類する、多システムプロファイリングの威力を説明しているが、この方法は樹形図の異なる枝にある化合物間の有意な類似性を曖昧にすることがある。したがって、本発明者らは、これらの三つのシステム全てにおける化合物プロファイルに追加の統計学的解析(方法を参照)を適用し、化合物活性間の全ての対応のある相関の有意性を客観的に評価できるようにした(図5)。これらの三つのシステム全てから得られたプロファイルデータを、まず25のパラメータープロファイルに連結し(図5a)、互いに対応のあるピアソン相関により比較した(図5b; 青色の強度は正の相関度を示す)。化合物間の関係を可視化するために、多次元尺度を使用し(図5c); このグラフにおいて、それらの類似度を反映するよう化合物間の距離を調整し、直線を用いて多システムプロファイルが統計学的に有意な類似性を示す薬物を結んだ。

30

【0081】

結果として生じる機能相同性マップ(図5c)の検討により、共通の機序(図4のように色分けされている)を共有することが知られている大部分の化合物分類は、互いに有意に関連があることが示される。興味深いことに、例えば一般的なチロシンキナーゼ阻害剤であるAG126およびゲニステイン、またはJAK阻害剤であるZM39923、WHI-P131、およびAG490などの標的特異性が少ない化合物は、互いに有意な機能類似性を示さず、そのかわり多様な種類の化合物に類似性を示し、複数の分子標的の阻害という独特な生物学的結果を反映している。二つの指定された5-リボキシゲナーゼ阻害剤であるAA861とNGDAもまた、際立った生物学的反応を生じ、NGDAの潜在的な標的外活性を反映している。実際、AA861は、5-リボキシゲナーゼ活性を増強しかつ副作用が少ない¹⁵ように合理的に設計された阻害剤であった。興味深いことに、両方の化合物ともNF- κ B依存性シグナル伝達の阻害能力があるため(図2)、NGDAは3CシステムにおいてCKII阻害剤であるアピゲニンと機能相同性を示すが、多システム解析はそれらを識別できる。もう一つのCKII阻害剤であるDRBは、アピゲニンに対して有意な機能相同性を示すが、これらの二つの化合物は3Cシステム単独ではともにクラスターを形成しなかった(図2参照)。

40

50

【0082】

多システム解析により機序的に別個の薬物により誘導された機能的反応の類似性が明らかとなる場合もある。mTORアンタゴニストであるラパマイシンが一般的なPI3K阻害剤であるLY294002およびワートマニンと高い機能相同性を示すという所見は、既知のp70S6K(mTORの標的)のPI3Kによる調節と一致している。ホスホジエステラーゼ4阻害剤(Ro-20-1724およびロリプラム)は、コルチコステロイド(デキサメタゾン、ブデソニド、およびプレドニゾロン)とクラスターを形成し、SAgおよびLPSシステムにおけるそれらの白血球シグナル伝達に対する効果の類似性と一致している。興味深いことに、非ステロイド性真菌エストロゲン受容体アゴニストであるゼアラレノンおよび β -ゼアラレノールは、ともにp38 MAPK阻害剤の大グループとクラスターを形成し、効果がp38シグナル伝達を調節するエストロゲンの報告されている能力に潜在的に関連した。

【0083】

同時に、関連する機能を有する化合物の注意深い検討により、それらが特定のシステムにおいて区別可能であることが示される。例えば、ホスホジエステラーゼ阻害剤は、LPSシステムにおいてM-CSF発現を減少させ(コルチコステロイドとは対照的に)、ラパマイシンは、SAgシステムにおいて、CD69およびE-セレクトインを上方制御する(図5a)ことによってPI3K阻害剤と区別している。したがって、複数のシステム内における化合物プロファイルの検討により、機序的なオーバーラップの識別および同定の両方が可能になる。これらの関連する生物学的反応の阻害剤の間のさらなる識別力は、さらに複合システムを加えることによって得られる可能性がある。

【0084】

加えて、特定の細胞経路(例えば、NFAT、カルシニューリン、NF- κ B、MAPキナーゼなど)を選択的に標的化または調節する遺伝子構築物を有する細胞、または、例えば、Lck、CD45などを欠いたJurkat細胞株(Yamasaki, 1997, J. Biol. Chem. 272; 14787を参照)などの既知の遺伝子変異を含む細胞を含むアッセイパネルから作られた参照バイオマップをデータベースに含めてもよい。

【0085】

催炎症性サイトカインに対する細胞の反応を阻害する能力は、多くの抗炎症性化合物に共通した特性であり、創薬において抗炎症的な細胞ベースのスクリーニングの基礎となる。例えば、コルチコステロイド、免疫抑制剤、プロテオソーム阻害剤、様々なキナーゼ阻害剤、その他を含む多くの抗炎症性化合物は、IL-1 β またはTNF- α によって誘導される内皮細胞反応を阻害することが示されている。そのようなアッセイは、作用機序の異なる化合物を検出するが、効果的に識別または分類しない。本発明の方法は、炎症性疾患生物学に関連したより高レベルの複合性を組み入れた一連のヒト細胞ベースのモデルシステムを介して、作用機序が異なる化合物同士をさらに識別する。そのようなシステムは、効果的な新しい治療法の迅速な同定に有用である。既知の薬剤を用いたこれらのシステムの性能の試験において、これらの複合的システムで測定された反応は、驚くほど強固かつ再現性のあるものであり、機能的活性に従って化合物を効率的に分類するために用いることができることが発見された。

【0086】

現在の研究の一つの局面は、比較的小さいパラメーターセットが、細胞および組織レベルの炎症に関して、生物学的空間の幅広い適用範囲を提供できるということである。この広範囲の感受性は、測定されるそれぞれの受容体またはサイトカインパラメーターのレベルが、何百ものシグナル伝達要素により媒介される経路相互作用の間接的な反映である、複合的細胞システムの生来の特質である。機能的識別は、最大情報量を提供するシステムおよびパラメーターの経験的な選択に依存している。さらに、生物学的機能は状況依存性であるので、平行するいくつかの複合的システムの解析は、検出および識別されうる機能的反応の範囲を劇的に増強する。議論した薬物に加えて、これらのモデルシステムは、NF- κ B、PI3K/Akt、Ras/ERK、IFN- γ 経路の既知および新規の遺伝子要素を検出し、効率的かつ自動的な遺伝子機能ネットワークの予測を可能にする。

10

20

30

40

50

【0087】

実施例6

T細胞分化および極性化の調節因子

本実施例は、TH1/TH2極性化過程の調節因子などの、T細胞媒介性炎症および免疫の調節因子を同定または特徴付けるために、本発明をどのように使用することができるかを説明する。成人T細胞の分化および極性化反応の局面を再現する、一連のアッセイの組み合わせが提供される。

【0088】

本発明のこの例示的態様においては、成人ヒト末梢血CD4⁺T細胞を用いる。成人末梢血CD8⁺T細胞、CD4⁺またはCD8⁺T細胞の単離群、CD4⁺またはCD8⁺記憶細胞またはナイーブT細胞を含む、他の細胞も使用することができる。末梢血単核球を、記載されているように(Ponath, 1996, JEM 183;2437を参照)、血液からFicoll-hypaque密度勾配遠心法によって単離する。その後、記載されているように(Kim, 2001, JCI 108;1331を参照)、MACSビーズを用いたネガティブ選択によってCD4⁺T細胞を単離する。細胞はその後、1-5 μ g/mlの抗CD-3 (Pharmingen)で12時間あらかじめコーティングした培養皿で、完全RPMI(RPMI-1640+50 μ g/50 Uのペニシリン/ストレプトマイシン+10%のFCS+50 μ Mの β -メルカプトエタノール+1mMのピルビン酸ナトリウム+2mMのL-グルタミン)中で、4~6日間 0.5×10^6 細胞/mlで培養する。これらの培養T細胞に、共刺激のために1 μ g/mlの抗CD28抗体(Pharmingen)を、増殖のために5ng/mlのIL-2を加えた。共刺激のために置換できる他の試薬は、有効濃度の抗CD49d、抗CD2、またはCD40-Igを含むが、それらに限定されない。加えて、T細胞の分化に重要なサイトカインが、特に分化や極性化を誘導する他のサイトカインに対する抗体と組み合わせて加えられる。有用な組み合わせは、TH1の分化を模倣する4ng/mlのIL-12、10ng/mlのIFN- γ 、および3 μ g/mlの抗IL-4；およびTH2の極性化条件を模倣する10ng/mlのIL-4、3 μ g/mlの抗IL-12、3 μ g/mlの抗IFN- γ を含む。他の態様においては、10ng/mlのIL-13、IL-6またはIL-9がTH2条件に加えられることもあり、10ng/mlのIL-23またはIL-27がTH1条件に加えられることもある。他の極性化条件は、Tr1極性化(10ng/mlのIL-10および4ng/mlのIFN- α_2b)または中性極性化(neutral polarization)(5 ng/mlのIL-2のみ)を含む。6日後、同じT細胞群を、同じ方法で、さらに6日間さらなる極性化のために再刺激してもよい。

【0089】

必要な時間の後に、培養物中のT細胞をフローサイトメトリーによって、表面マーカーおよび細胞内サイトカインに関して解析する。抗CD-3および抗CD-4抗体を用いて、CD4⁺T細胞を同定する。指定の分化条件によって変化したパラメーターに基づいて、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-13、LT- α 、CCR4、CCR5、CXCR3、IL-4R α 、CD11c、CD134、CD150、CD137、CD69、B7-H1、B7-H2、およびCD200のパラメーターについてのバイオマップを作成する。他の関心対象のパラメーターは、 $\alpha 4\beta 7$ インテグリン、L-セレクチン(CD62L)、CCR7、CXCR5、CCR9、CCR2、皮膚リンパ球抗原(CLA)、CTLA-4(CD152)およびCD154を含む。TH1およびTH2リンパ球間の違いは、6および12日後の両方で区別されうる。例えば、図8を参照。

【0090】

バイオマップのデータベースは、二つの極性化条件(例えばTH1およびTH2)および抗炎症性薬物化合物を含む、一連のアッセイの組み合わせから作成される。これらの化合物は、カルシニューリン阻害剤であるFK-506およびシクロスポリンA、および増殖阻害剤であるラパマイシン、ミコフェノール酸およびメトトレキサートなどの、T細胞活性化および/またはT細胞増殖の阻害剤を含むことができる。他の免疫調節薬(例えばデキサメタゾン)、または抗体(例えば抗IL-12)もスクリーニングすることができ、異なる薬剤でのマーカーの変化を示すバイオマップが作成される。そのような化合物は、治療薬学の基礎(The Pharmacologic Basis of Therapeutics)に記載されているものを含む。

【0091】

図7に示されているように、バイオマップパラメーターは、一回または二回の極性化後

10

20

30

40

50

、TH1またはTH2細胞を特徴付けるのに有用である。TH1またはTH2の一連の分化マーカー(横軸)は得られたT細胞群を特徴付け、かつそれぞれの極性化後のTH1およびTH2細胞間の差を同定するための最良のパラメーターを決定するために使用された。

【0092】

図8は、TH1およびTH2極性化に対する薬物の効果を示している。ネガティブ選択によって単離されたCD4+末梢血T細胞を、TH1またはTH2条件下で2回極性化した。2回目の極性化の間、薬物または溶媒対照を1日おきに培養液に加えた(1、3および5日目)。一連のマーカー(それぞれのプロットの横軸)を用いて、2回目の極性化後のCD4+群のTH1またはTH2状態を特性化した。細胞のTH1状態に極性化する能力を抗IL-12が大きく損なうことが注目されるが、それはTH2極性化用の培養液にはすでに存在しているため、TH2状態への極性化にはほとんど影響はない。 10

【0093】

既知の薬剤でのバイオマップを、候補被験薬剤についてのものと比較する。これにより、既知の経路に作用する既知の薬物の特異的マーカーレベルの変化と候補薬剤で観察された変化とを比較することによって、候補薬剤が作用する経路を認識できる。データベースはまた、選択的に特異的細胞経路(例えばJAK/STAT、NF-AT、カルシニューリン、NF- κ B、MAPキナーゼなど)を標的化または調節する、遺伝子過剰発現またはノックダウン構築物(例えば構成的に活性なSTAT5a^{*}；図8)を加えた細胞を含むアッセイパネルから作成された、参照バイオマップを含むことができる。

【0094】

20

実施例7

単球機能調節因子

本実施例は、単球/マクロファージ機能を調節する化合物のスクリーニングのために、本発明の方法をどのように適用することができるかを説明する。

【0095】

ヒト末梢血単球を使用する。ヒト末梢血単球にかわって使用することができる他の細胞は、骨髄由来単球、エルトリエーションまたは陰性磁気ビーズ単離法によって単離された単球、および単球細胞株であるTHP-1またはU937を含む。1mlあたりおよそ 10×10^6 個の末梢血単核球を、10%ウシ胎仔血清を含むRPMIで1時間培養する。非接着リンパ球を穏やかに洗浄することで除去する。 30

【0096】

その後、以下のものが5時間または24時間加えられる：IL-1 (1ng/ml)、TNF- α (100 ng/ml)またはLPS (200 ng/ml) (Dietz, 1998, Basic Res. Cardiology 93 Suppl2:101; Lommi, 1997, Eur. Heart. J. 18:1620; およびJafri, 1997, Semin. Thromb. Hemost. 23:543を参照)。続くパネルにおいて、IFN- γ (10 ng/ml)、GM-CSF (10 ng/ml)、IL-4 (20 ng/ml)、IL-13 (30 ng/ml)、IL-10 (10 ng/ml)、オステオポンチン (10 ng/ml)、トロニン (10U/ml)、CD40L、酸化LDL (100 μ g/ml)、または最小改変LDLのうち一つまたは複数、最初の三つの因子に加えるか、またはその三つの因子の一つと置換してもよい (Brown, 2000, J. Clin. Endocrinol. Metab. 85:336; Ashkar, 2000, Science 287:860; de Boer, 1999, J. Pathol. 188:174; およびBerliner, 1990, J. Clin. Invest. 85:1260を参照)。文献に 40
記載されているように標準濃度の薬剤が用いられる (Kaplanski, 1999, J. Immunol. 158:5435, 1997; Hofman, Blood 92:3064; Li, 2000, Circulation 102:1970; Essler, 1999, JBC 274:30361; およびBrown, 2000, J. Clin. Endocrinol. Metab. 85:336)。

【0097】

指定の因子によって変化を受けたパラメーターに基づいて、バイオマップを作成する。例示的なパラメーターには、アネキシンV、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、MIP-1 α 、Mac-1 (CD11b/CD18)、IL-12、およびMCP-1が含まれる (Devaux, 1997, Eur. Heart J. 18:470; Kessler, 1998, Diabetes Metab. 24:327; Becker, 2000, Z. Kardiol. 89:160; Kaplanski, 1997, J. Immunol. 158:5435; およびLi, 2000, 上記、を参照)。バイオマップに含むことができる他の関心対象のマーカーは、CD14、PAI-1、ウロキナーゼ型プラスミノー 50

ゲン活性化因子受容体(uPAR、CD87)、IL-10、IL-18、組織因子、フィブリノーゲン結合活性、MIG、TARC、MDC、RANTES、CD80、CD86、CD40およびCD36である(Paramo, 1985, Br. Med. J. 291:573; Fukuhara, 2000, Hypertension 35:353; Noda-Heiny, 1995, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 15:37; de Prost, 1995, J. Cardiovasc. Pharmacol., 25 Suppl2:S114; van de Stolpe, 1996, Thromb. Haemost. 75:182; Mach, 1999, J. Clin. Invest. 104:1041; およびNicholson, 2000, Ann. N.Y. Acad. Sci. 902:128を参照)。

【0098】

バイオマップのデータベースを、スタチンを含むがこれに限定されない既知の抗アテローム生成薬剤を含む一連のアッセイの組み合わせから作成し、被験化合物をスクリーニングし、異なる被験化合物でのマーカーの変化を示すバイオマップを作られる。既知の薬剤のバイオマップ用いて、候補被験薬剤と比較する。これにより、既知の経路に作用する既知の薬剤に特異的なマーカーのレベルの変化と候補被験化合物で観察された変化とを比較することによって決定されるように、候補薬物が作用する経路を認識できる。データベース参照バイオマップは、特定の細胞経路(例えば、NF- κ B、MAPキナーゼなど)を選択的に標的化または調節する遺伝子構築物を有する細胞、または既知の遺伝子変異を含む細胞(例えば、CD36欠損、Yanai, 2000, Am. J. Med. Genet. 93:299など)を含むアッセイパネルから作成されたものを含むことができる。

10

【0099】

図9に示されているように、バイオマップ解析を使用して、LPSで刺激された単球のサイトカイン分泌への薬物の効果を特性化することができる。CD14+単球を24ウェルプラスチック培養皿に1時間接着させることによって集積し、非接着細胞を除去した。単球を、2 μ Mのモネンシン(分泌阻害剤)の存在下で、1 μ g/mlのLPSで5時間刺激した。指定濃度の薬物あるいは溶媒対照(DMSO)は、LPS刺激の15分前に加え、5時間全体にわたって存在していた。アネキシンV染色はアポトーシス細胞を示す。細胞を培養皿からかき取った後、細胞を固定および透過化処理して細胞内サイトカインを検出した。

20

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1】複合的な催炎症性環境中の内皮細胞を包含するシステムは、複数のシグナル伝達経路の阻害剤に再現可能に反応する。内皮細胞を、抗TNF- α (4 μ g/ml)、アピゲニン(6 μ M)、PD098059(10 μ M)、またはPD169316(10 μ M)の存在下で、IL-1 β 、TNF- α およびIFN- γ とともに24時間培養した。読取パラメーターを、材料と方法に記載されているように、ELISAにより測定した。データは、溶媒または培地対照に対する対数発現率($\log_{10}$ [薬物のパラメーター値/対照のパラメーター値])で表されている。それぞれのパラメーターについて平均(黒線)および個々のデータ点(赤点)を示す(n=10から12の独立した実験)。個々のデータ点は、異なる日および/または異なる内皮細胞ドナーを用いて行ったアッセイを表す。

30

【図2】共通の経路および機序を標的とする薬物は、類似のシステム反応を誘導する：「機能の相同性」による薬物比較。内皮細胞を、指定の薬物存在下で、IL-1 β 、TNF- α およびIFN- γ とともに24時間培養した。(a)個々の実験からの対数パラメーター発現率のヒートマップ、個々のパラメーター値の増加(緑)、減少(赤)、または変化なし(黒)を示す。色の飽和度はその薬物効果の強度を反映する(下のスケールを参照)。(b)個々の実験プロファイルの対比較のピアソン相関：正の相関は青(最も強いものは $r>0.9$)；黒は相関無し($r\sim 0$)；黄色は負の相関を示している。ピアソン相関係数をクラスタリングメトリック(metric)として用いた、それぞれの化合物および実験の対数発現率プロファイルの教師無し階層的クラスタリングの結果を示す樹形図を、右に示す。クラスタリングの結果を偏りのない様式で使用し、化合物(a)と(b)の提示順序を決定した。生の相関値は表1にある。

40

【図3】複合的なPBMCおよび内皮細胞の共培養システムは、炎症に関する生物学的活性の適用範囲を広げる。PBMCを内皮細胞とともにインキュベートし、T細胞受容体依存性反応を活性化させるためにSAgで処理した。(a)三つの独立した実験からの平均対数パラメーター発現率のヒートマップ(一実験あたりn=3の複製)、個々のパラメーターレベルの増加(

50

緑)、減少(赤)、または変化なし(黒)を示す。色の飽和度はその薬物効果の強度を反映する(下のスケールを参照)。(b) 図2bと同様の、個々の実験間の対応のあるピアソン相関。右の樹形図は、平均プロファイルデータ(複製実験の平均対数発現率)の階層的クラスタリングの結果を示す。この樹形図を使用して、化合物(a)と(b)の提示順序を決定した。生の相関値は表2にある。

【図4】多システム解析により化合物の検出や識別が増加する。20の機能的分類を代表する48の化合物を、3C、SAG、およびLPSシステムで試験した。(a)報告されている作用機序によって色分けされた、それぞれの分類に属する薬物のリスト。(b) 3C、SAG、およびLPSの個々のシステムにおける、活性化合物プロファイルの階層的クラスタリング。(c)組み合わせシステム(3C+SAGおよび3C+SAG+LPSシステム)からの活性化合物プロファイルの階層的クラスタリング。グレーの化合物は、所与のシステムまたはシステムの組み合わせにおいて活性のなかったものを示す。(b) および(c)内の化合物は、平均プロファイルの教師無し階層的クラスタリングにより配列されている(一薬物あたり $n=3$ の独立した実験)。

【図5】複数の複合システムにわたる機能の相同性による薬物分類。48の化合物を、3つのシステム(3C、SAGおよびLPS)からの連結プロファイルを用いて、機能相同性分類に供した。(a) 三つの実験からの平均対数パラメーター発現率のヒートマップ(各実験において $n=3$ の複製)、各システムにおける個々のパラメーターの増加(緑)、減少(赤)、変化なし(黒)を示す。(b)平均プロファイルデータの対比較のピアソン相関：正の相関は青(最も強いものは $r>0.9$)；黒は相関なし($r\sim 0$)；黄色は負の相関を示す。(a) と(b)の化合物は、尺度法およびピボット選択法によって自動的に配列し、相関の高いものを対角線上に移動した。(c)有意な相関(方法を参照)を直線で示す多次元尺度を用いて、二次元的に可視化された化合物の関係を表す機能相同性マップ。直線の長さは化合物プロファイルの類似性と反比例する。図4のように、報告されている分類によって化合物は色分けされている。

【図6】代表的な化合物(p38 MAPK阻害剤のPD169316、CKII/NF κ B阻害剤のアピゲニン、HMG-CoA阻害剤のアトルバスタチン、ステロイドのデキサメタゾン、NF-AT阻害剤のシクロスポリン、ホスホジエステラーゼ4阻害剤のR(-)ロリプラム、MEK阻害剤のU0126、ならびにc-Rafおよびp38阻害剤のZM336372)に関する、複数の用量(0.03、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0 μ M)で調べた三つの全てのシステム(3C、SAG、LPS)におけるプロファイルを描いた一連のグラフである。全ての図において、最も高い活性であるが毒性のない用量を使用した。調べたそれぞれの薬剤について、同様の用量反応性および毒性試験を行った。

【図7】一回または二回の極性化(polarization)後、TH1またはTH2を特性化するバイオマップパラメーター。ネガティブ選択により単離されたCD4+末梢血T細胞を、TH1またはTH2条件下で二回極性化した。TH1またはTH2分化のマーカーのパネル(横軸)を使用して、得られたT細胞集団を特性化し、それぞれの極性化後のTH1細胞とTH2細胞間の差を同定するための最もよいパラメーターを決定した。データは、TH1またはTH2条件下でそれぞれのマーカーを発現するCD4+T細胞の割合の差(TH1-TH2 %陽性)として表されている。示されているデータは、異なるドナーCD4+細胞を用いた三つの別々の極性化の、平均 $\pm$ SDである。0から有意に異なる差を、スチューデントのt検定を用いて決定し、白四角で示した。

【図8】TH1およびTH2極性化に対する薬物の効果。ネガティブ選択により単離されたCD4+末梢血T細胞を、TH1またはTH2条件下で二回極性化された。二回目の極性化中、薬物または溶媒対照を一日おきに培養液中に加えた(1、3、5日目)。マーカーのパネル(それぞれのプロットの横軸)を用いて、二回目の極性化後のCD4+集団のTH1またはTH2状態を特性化した。データは、培地のみの条件下で所定のマーカーを発現する細胞(短い破線)の割合で標準化されている。丸印のデータ点は、溶媒対照のデータ(長い破線)に対して、95%信頼区間外にある標準化比を表す。TH1極性化条件の場合、1未満のTH1マーカーの変化または1を超えるTH2マーカーの変化は、細胞群のTH2状態への移行を意味する。逆に、TH2極性化条件の場合、1を超えるTH1マーカーまたは1未満のTH2マーカーは、細胞群のTH1状態への移行を意味する。抗IL-12は細胞がTH1状態へ極性化する能力を大きく阻害するが、TH2極性化用の培養物中にすでに存在しているため、TH2状態への極性化にはほとんど影響はないことに注意されたい。データは、2回の実験の代表値である。

10

20

30

40

50

【图 1】

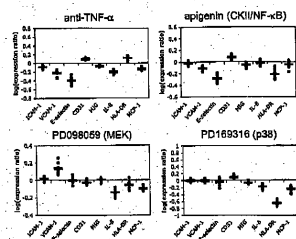
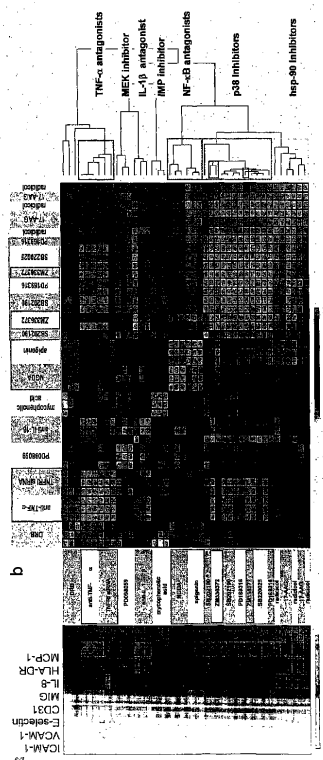


Figure 1

【图 2】



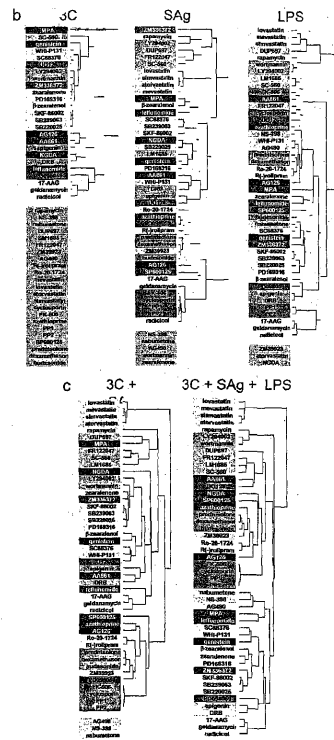
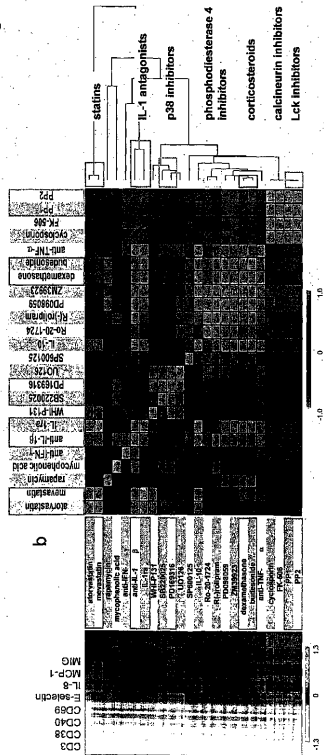


Figure 4

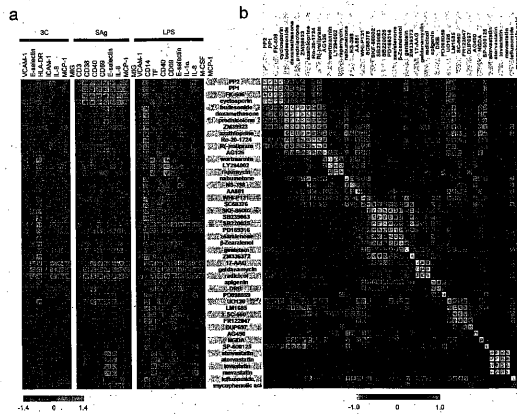
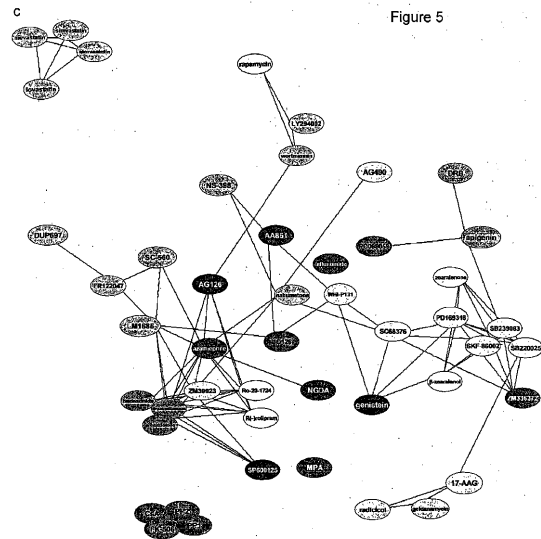
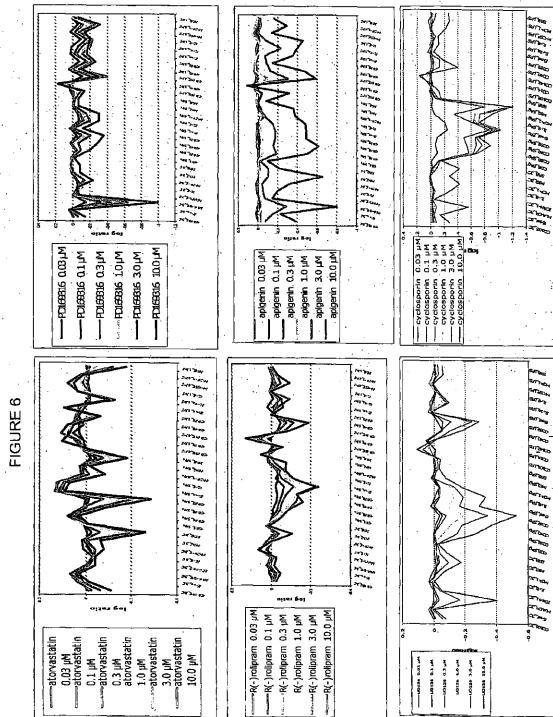


Figure 5



【図 6】



【図 7】

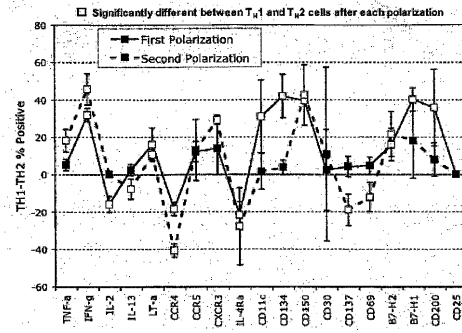


FIGURE 7

【図 8】

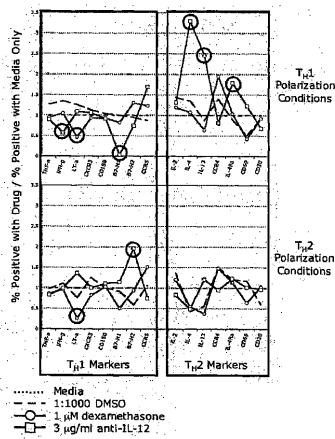


FIGURE 8

【図 9】

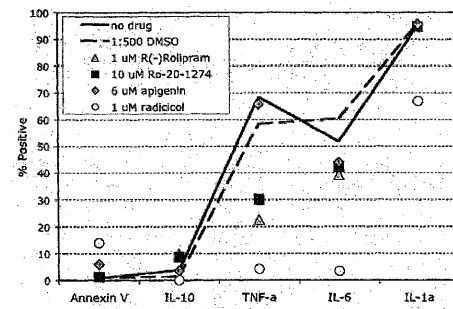


FIGURE 9

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/28970

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : G01N 33/53, 33/567

US CL : 435/7.21, 7.24

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)

U.S. : 435/7.21, 7.24

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)
EAST search terms: biomap, Pearson correlations, multidimensional scaling, primary human cells, signaling pathways

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HELLER, R.A. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA	1-6, 9-10
---	microarrays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. March 1997, Vol. 94, pages 2150-2155, see	
Y	entire document.	7-8 and 11-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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 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

14 February 2005 (14.02.2005)

Date of mailing of the international search report

19 OCT 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Marianne P. Allen

Telephone No. 703-308-0196

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, PL, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 メルローズ ジェニファー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ホンダ リクリエイション ドライブ 103

(72)発明者 クンケル エリック ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン マテオ ランド ストリート 740

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA11 GA11 HA20

4B063 QA05 QQ91 QR77 QS24 QX01