

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7288431号
(P7288431)

(45)発行日 令和5年6月7日(2023.6.7)

(24)登録日 令和5年5月30日(2023.5.30)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/09 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/09	Z
A 6 1 K	31/573 (2006.01)		A 6 1 K	31/573	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)		A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/02 (2006.01)		A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)		A 6 1 P	37/02	

請求項の数 10 (全21頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-512530(P2020-512530)

(86)(22)出願日 平成30年8月28日(2018.8.28)

(65)公表番号 特表2020-532302(P2020-532302
A)

(43)公表日 令和2年11月12日(2020.11.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/048240

(87)国際公開番号 WO2019/046233

(87)国際公開日 平成31年3月7日(2019.3.7)

審査請求日 令和3年7月8日(2021.7.8)

(31)優先権主張番号 62/551,839

(32)優先日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(73)特許権者 391015708

ブリストル - マイヤーズ スクイブ カン
パニー

B R I S T O L - M Y E R S S Q U I

B B C O M P A N Y

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャー

ジー州 プリンストン、ルート 2 0 6 ア

ンド・プロビンス・ライン・ロード

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 グルココルチコイドのインビボ投与によって介在される薬力学的応答をモニタリングするための方法

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法であって、

a) グルココルチコイドの投与後のヒトから回収された血液サンプルから R N A を単離すること、

b) ステップ (a) において単離された R N A の遺伝子発現をプロファイリングすること、および

c) 投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、
を含み、F K B P 5 、 E C H D C 3 、 I L 1 R 2 、 Z B T B 1 6 、 I R S 2 、 I R A K 3 、 A C S
L 1 、 および D U S P 1 についての遺伝子特性スコアの増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、

方法。

【請求項 2】

グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法であって、

a) グルココルチコイドの投与後のヒトから回収された血液サンプルから R N A を単離すること、

b) ステップ (a) において単離された R N A の遺伝子発現をプロファイリングすること、および

c) 投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、

10

20

を含み、

F K B P 5、E C H D C 3、I L 1 R 2、Z B T B 1 6、I R S 2、I R A K 3、A C S L 1、D U S P 1、P H C 2、T L R 2、T S C 2 2 D 3、S L A、C R I S P L D 2、M A N 2 A 2、F A R 2、C E B P D、S P T L C 2、およびH S P A 6についての遺伝子特性スコアの増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、方法。

【請求項 3】

興味あるグルココルチコイドが、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、ベタメタゾンブデソニド、フルチカゾン、および合成グルココルチコイドからなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。 10

【請求項 4】

コントロール遺伝子特性が、グルココルチコイド投与前の同じヒトから、またはグルココルチコイドを投与されない正常健常コントロールから得られる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

コントロールと比較して遺伝子特性スコアの 1 . 5 倍の増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

コントロールと比較して遺伝子特性スコアの 2 倍の増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、請求項 1 または 2 に記載の方法。 20

【請求項 7】

血液サンプルが、グルココルチコイドの投与 4 時間後のヒトから回収されている、請求項 1 - 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

グルココルチコイドに対するヒトの応答を試験することにおいて使用するための、グルココルチコイドを含む医薬組成物であって、ヒトはリウマチ性関節炎（R A）と診断されており、

試験することが、

- a . 興味あるグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、
- b . ステップ (a) のヒトから血液を採取すること、
- c . ステップ (b) において回収された血液から R N A を単離すること、
- d . ステップ (c) において単離された R N A の遺伝子発現をプロファイリングすること、および
- e . 投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、F K B P 5、E C H D C 3、I L 1 R 2、Z B T B 1 6、I R S 2、I R A K 3、A C S L 1、およびD U S P 1についての遺伝子特性スコアの増加が、ヒトがグルココルチコイドに対して応答するであろうことを示すこと、

を含む、

医薬組成物。 40

【請求項 9】

グルココルチコイドに対するヒトの応答を試験することにおいて使用するための、グルココルチコイドを含む医薬組成物であって、ヒトは全身性エリテマトーデス（S L E）と診断されており、

試験することが、

- a . 興味あるグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、
- b . ステップ (a) のヒトから血液を採取すること、
- c . ステップ (b) において回収された血液から R N A を単離すること、
- d . ステップ (c) において単離された R N A の遺伝子発現をプロファイリングすること、および

50

20

40

50

e . 投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、 F K B P 5 、 E C H D C 3 、 I L 1 R 2 、 Z B T B 1 6 、 I R S 2 、 I R A K 3 、 A C S L 1 、および D U S P 1 についての遺伝子特性スコアの増加が、ヒトがグルココルチコイドに対して応答するであろうことを示すこと、
を含む、

医薬組成物。

【請求項 10】

ステップ(b)が、グルココルチコイドの投与 4 時間後に行われる、請求項 8 または請求項 9 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本願は、 35 U.S.C. § 119(e) の下に 2017 年 8 月 30 日に出願された米国仮出願番号 62 / 551839 の利益を主張する；その開示は、出典明示により本願明細書に包含させる。

【0002】

本願全体で、種々の文献が参照されている。これらの刊行物の開示は、本願発明が関係する最先端をより完全に説明するために、それら全体において、出典明示により本願に包含させる。

20

【0003】

技術分野

本願発明は、一般的に、グルココルチコイドのインビボ投与によって介在される薬力学的応答をモニターする方法に関する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

グルココルチコイド (G C) は、リウマチ性関節炎 (R A) 、炎症性腸疾患、乾癬、喘息、および全身性エリテマトーデス (S L E) を含む多数のヒト疾患を処置するために広範囲に使用される有効な抗炎症薬である (Buttgereit F. Bull NYU Hosp Jt Dis 2012; 70 Suppl 1:S26-9) 。しかしながら、これらの有用性は、糖尿病、骨粗鬆症、筋肉疲労、脂肪再分布、および視床下部 - 下垂体 - 副腎 (H P A) 軸の抑制を含むこれらの薬物の毒性によって限定される (Desmet SJ, et.al., J Clin Invest 2017;127:1136-45) 。有害な副作用の危険性は、より高い用量およびより長期の使用で増加する (Bijlsma JWJ, et.al. Rheumatology 2016;55 Suppl 2:ii3-5; Ruiz-Arruza I, et.al. Rheumatology 2014;53:1470-6) 。副作用の可能性にもかかわらず、グルココルチコイドは、依然として重要な標準療法のままである。

30

【0005】

グルココルチコイドは、核ホルモン受容体であるグルココルチコイド受容体アルファ (G R) との相互作用を介して生物学的效果を媒介する。グルココルチコイド受容体アルファは、グルココルチコイド応答配列にホモ二量体として結合することによって転写を誘導するリガンド活性化転写因子である (Weikum ER, et.al. Nat Rev Mol Cell Biol 2017;18:159-74) 。多数の G R 活性化遺伝子が抗炎症活性を有する (Colotta F, et.al. Science 1993;261:472-5; Abraham SM, et.al. J Exp Med 2006;203:1883-9; Beaulieu E, et.al. Nat Rev Rheum 2011;7:340-8) 。しかしながら、転写活性化遺伝子は副作用とも関連している (Cain DW, et.al. Nat Rev Immunol 2017;17:233-47) 。 G R はまた、転写抑制と称されるプロセスにおける DNA 結合とは独立して、 N F - B 、 A P - 1 、 I R 3 F 、 C R E B 、 N F A T 、 S T A T 、 T - B e t 、および G a t a - 3 を含むいくつかの炎症性転写因子の活性を阻害することも示されている (Greulich F, et.al. Steroids 2016;114:7-15) 。いくつかの合成グルココルチコイドは、治療の範囲を

40

50

広げる試みにおいて低下した転写活性化であるが無傷な転写抑制活性で開発されている (Strehl C, et.al., Exp Opin Invest Drugs 2017;26:187-95)。

【0006】

損傷効果を発生させる危険性に加えて、慢性的なグルココルチコイド使用はまた組織特異的耐性と関連する (Rodriguez JM, et.al., Steroids 2016;115:182-92)。GR発現の下方調節ならびに受容体のドミナントネガティブアイソフォームの上方調節を含むいくつかの耐性メカニズムが、記載されている (Dendoncker K, et.al. Cytokine Growth Factor Rev 2017;35:85-96)。アゴニストに対する感受性を調節するGRの多型もまた、記載されている (Straub RH, et.al. Rheumatology 2016;55 Suppl 2:ii6-14)。グルココルチコイドに対する臨床反応の不均一性を考慮すると、グルココルチコイドの生物学的活性のバイオマーカーの仲間(companion)を有することが非常に重要であろう。

10

【発明の概要】

【0007】

発明の概要

本願発明者らは、正常健常ボランティア (N H V) ドナー由来の末梢血単核細胞 (PBM C) のプレドニゾロンでの処置によって調節される遺伝子に基づく遺伝子特性を開発した。この特性の感度は、プレドニゾロンまたは部分的なGRアゴニストのいずれかの投与後の健常参加者において全血遺伝子発現を分析することによって確認された。特性の発現は、化合物の転写活性化の可能性と一致して、部分的なアゴニストを受けた対象よりもプレドニゾロンを投与された健常対象において高かった。全身性エリテマトーデス (SLE) およびリウマチ性関節炎 (RA) を有する患者からの全血における特性の発現は、より高いレベルの末梢血好中球およびより低いレベルの末梢血リンパ球を含む、公知のグルココルチコイド媒介薬力学的效果と相關している。特性の発現はまた、これらのコホートにおいてプレドニゾロンの報告された使用および投与と一致した。

20

【0008】

本願発明は、グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法であって、興味あるグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、を含み、FKBP5、ECHDC3、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3、ACSL1、DUSP1についての遺伝子特性スコアの増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、方法を含む。

30

【0009】

本願発明は、グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法であって、興味あるグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、を含み、FKBP5、ECHDC3、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3、ACSL1、DUSP1、PHC2、TLR2、TSC22D3、SLA、CRISP LD2、MAN2A2、FAR2、CEBPD、SPTLC2、HSPA6についての遺伝子特性スコアの増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、方法を含む。

40

【0010】

本願発明は、グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法であって、興味あるグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、を含み、FKBP5、ECHDC3、IL1R2についての遺伝子特性スコアの増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、方法を含む。

50

【 0 0 1 1 】

本願発明は、グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法であって、興味あるグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、を含み、FKBP5、ECHDC3、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3についての遺伝子特性スコアの増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、方法を含む。

【 0 0 1 2 】

本願発明の態様において、興味あるグルココルチコイドは、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、ベタメタゾン ブデソニド、フルチカゾン、および／または合成グルココルチコイドである。 10

【 0 0 1 3 】

本願発明の態様において、コントロール遺伝子特性スコアは、グルココルチコイド投与前の同じヒトから回収された血液および／またはグルココルチコイドを投与されない正常健常コントロールから回収された血液から得られる。

【 0 0 1 4 】

本願発明の態様において、血液サンプルは、投与4時間後の興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから回収される。 20

【 0 0 1 5 】

本願発明の態様において、興味あるグルココルチコイドに対して応答するヒトは、コントロールよりも少なくとも1.5倍以上の遺伝子特性スコアを有する。

【 0 0 1 6 】

本願発明の態様において、興味あるグルココルチコイドに対して応答するヒトは、コントロールよりも少なくとも2倍以上の遺伝子特性スコアを有する。

【 0 0 1 7 】

本願発明は、SLEまたはRAと診断されたヒトを処置する方法であって、1)興味あるグルココルチコイドをヒトに投与すること、興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすることによってグルココルチコイドに対するヒトの応答を決定すること、および2)投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、FKBP5、ECHDC3、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3、ACSL1、DUSP1についての遺伝子特性スコアの増加が、ヒトが興味あるグルココルチコイドに対して応答するであろうことを示す、および3)グルココルチコイドをヒトに投与すること、を含む方法を含む。 30

【 0 0 1 8 】

本願発明は、SLEまたはRAと診断されたヒトを処置する方法であって、1)興味あるグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすることによってグルココルチコイドに対するヒトの応答を決定すること、および2)投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、FKBP5、ECHDC3、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3、ACSL1、DUSP1、PHC2、TLR2、TSC22D3、SLA、CRISP1D2、MAN2A2、FAR2、CEBPD、SPTLC2、HSPA6についての遺伝子特性スコアの増加が、ヒトが興味あるグルココルチコイドに対して応答するであろうことを示す、および3)グルココルチコイドをヒトに投与すること、を含む方法を含む。 40

【 0 0 1 9 】

本願発明は、SLEまたはRAと診断されたヒトを処置する方法であって、1)興味あ

10

20

30

40

50

るグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすることによってグルココルチコイドに対するヒトの応答を決定すること、および2)投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、FKBP5、ECHDC3、IL1R2についての遺伝子特性スコアの増加が、ヒトが興味あるグルココルチコイドに対して応答するであろうことを示す、および3)グルココルチコイドをヒトに投与すること、を含む方法を含む。

【0020】

本願発明は、SLEまたはRAと診断されたヒトを処置する方法であって、1)興味あるグルココルチコイドを該ヒトに投与すること、興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすることによってグルココルチコイドに対するヒトの応答を決定すること、および2)投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、FKBP5、ECHDC3、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3についての遺伝子特性スコアの増加が、ヒトが興味あるグルココルチコイドに対して応答するであろうことを示す、および3)グルココルチコイドをヒトに投与すること、を含む方法を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1A - 1Dは、グルココルチコイド(GC)調節遺伝子を示す。正常健常ボランティア(NHV)からの末梢血単核細胞(PBMC)を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ プレドニゾロンまたはDMSOビヒクル単独のいずれかで6時間インビトロで培養した。RNAを、AffyMetrixプロファイリングを使用して遺伝子発現について分析した。ビヒクルと比較してプレドニゾロンによって調節される遺伝子の分析を示す。軸は、FDR調節log 10 p値対倍数変化を示す。 ≤ 0.05 のFDR調節p値を有するプレドニゾロン対ビヒクルによる >2 倍の上方調節された(1A)および下方調節された(1B)遺伝子が示される。インビトロでプレドニゾロンの増加する濃度で刺激された全血サンプルに対する上方調節された(1C)および下方調節された(1D)遺伝子についてのSSGSSEAスコア。 $** P = 0.005$ 、 $*** P < 0.001$ 。

20

【0022】

【図2】図2A - 2Eは、部分的なGRアゴニストを使用するグルココルチコイド遺伝子特性の検証を示す。プレドニゾロン、GRモジュレーターBMS-791826、およびBMS-776532によるPGC1(2A)およびTIF2(2B)補充の哺乳動物2-ハイブリッド分析。データは、 200 nM デキサメタゾンによって誘導される活性に正規化されたトリプリケートの平均値を示す。2の典型的な実験の1つが示される。クロマチン免疫沈降、次にqPCRにより分析されるときの、 $1\text{ }\mu\text{M}$ プレドニゾロン、 $1\text{ }\mu\text{M}$ GRモジュレーターBMS-791826、および $2\text{ }\mu\text{M}$ BMS-776532によるANGPTL4、ALOX5AP、およびLEPREL1のプロモーターへのGR(2C)およびTIF2(2D)補充の分析。値は、トリプリケート反応の平均および標準偏差を示す。結合値は入力値に正規化される。ChIP = クロマチン免疫沈降。p値はT検定により計算された。 $* P < 0.01$ vs プレドニゾロン、 $** P < 0.01$ vs プレドニゾロン、 $*** P < 0.001$ vs プレドニゾロン、ns = 有意でない。(2E) DMSOビヒクル、 $5\text{ }\mu\text{M}$ プレドニゾロン、 $5\text{ }\mu\text{M}$ GRモジュレーターBMS-791826、または $10\text{ }\mu\text{M}$ BMS-776532のいずれかでインビトロで培養された全血サンプルに対するGC遺伝子特性スコア。 $*** P < 0.001$

30

【0023】

【図3】図3A - 3Bは、GC遺伝子特性のインビオ検証を示す。(3A) NHVに、経口用量の150または 300 mg GRモジュレーターBMS-791826、 10 mg プレドニゾロン、またはプラセボを投与した。血液を、投与前および投与4時間後に回収した。全血発現プロフィールを、GC遺伝子特性について分析した。 $* P = 0.027$

40

50

; *** P < 0 . 0 0 1。 (3 B) N H V に、 5 、 1 0 または 3 0 m g プレドニゾロン または プラセボ (すなわち 0 m g) を投与した。 血液を、 投与前および投与後の異なる 時間で (2 、 4 、 8 、 4 8 、 1 4 4 、 および 2 1 6 時間) 採取した。 全血発現プロフィール を、 G C 遺伝子特性について分析した。

【 0 0 2 4 】

【 図 4 】 図 4 A - 4 B は、 S L E および R A コホートにおける G C 使用に対する G C 遺伝子特性の関係を示す。 (4 A) 全血を、 N H V および R A および S L E を有する患者から回収した。 R N A を単離し、 プローブ A f f y m e t r i x H G - 2 1 9 アレイに使用した。 G C 遺伝子特性スコアを、 G C を現在使用している患者 (真) 対 他の標準療法における患者 (偽) によって分けた。 処置情報なしの患者は、 ' N A ' (利用できない) の下に列挙される。 ** P = 0 . 0 0 3 、 *** P < 0 . 0 0 1 。 (4 B) アバタセプト S L E フェーズ I I 試験からのベースラインサンプルに対する G C 遺伝子特性スコア。 患者は G C 用量 (低、 中、 または 高) によって分類された。 n s = 有意でない ; ** P = 0 . 0 0 1 。

10

【 0 0 2 5 】

【 図 5 】 図 5 A - 5 C は、 G C 遺伝子特性の相関関係を示す。 S L E (5 A) および R A (5 B) を有する患者からの末梢血 C D 4 + T 細胞、 C D 8 + T 細胞、 および C D 1 9 + B 細胞のパーセンテージを、 各患者について G C 遺伝子特性スコアに対してプロットする。 W B C = 白血球。 (5 C) アバタセプト S L E 試験ベースラインサンプルからの末梢血好中球数を、 各患者について G C 遺伝子特性スコアに対してプロットする。 相関関係を、 Spearman ランク付け試験により分析した。

20

【 0 0 2 6 】

【 図 6 】 図 6 A - 6 B は、 8 遺伝子 G C 特性の検証を示す。 (6 A) プラセボ、 1 5 0 または 3 0 0 m g G R モジュレーター B M S - 7 9 1 8 2 6 、 または 1 0 m g プレドニゾロンを投与された健常男性コホート 2 におけるプレドニゾロンからの参加者についての 8 遺伝子の短縮リストを使用する G C 遺伝子特性スコア。 * P = 0 . 0 1 5 ; *** P < 0 . 0 0 1 。 (6 B) アバタセプト S L E 試験からのベースラインでの参加者についての、 8 遺伝子リストを使用する G C 遺伝子特性スコア 対 末梢血好中球数。 相関関係を、 Spearman ランク付け試験を使用して計算した。

30

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 7 】

発明の詳細な説明

グルココルチコイドは、 各薬物についての処方情報に記載されているように投与される。 一般的に、 初期用量は、 処置される特定の疾患の存在の重症度によって決定される。 低い重症度の状況において、 低用量が一般的に十分であるが、 選択される患者においてより高い初期用量が必要とされ得る。 満足のいく応答が認められるまで、 初期量は典型的に維持または調整される。 合理的な期間後、 満足のいく臨床反応が不足しているとき、 グルココルチコイドは中止され、 患者は他の適当な治療に置かれる。 良好的な応答がなし遂げられた後、 適切な維持量は、 十分な臨床反応を維持する最低量に達するまで、 適当な時間間隔で少しの減少において初期薬物量を減少させることによって決定される。 明らかに、 どのように患者がグルココルチコイドに応答するかを決定することができることは、 患者の維持量を最適化するために必要とされる時間を減少させるであろう。

40

【 0 0 2 8 】

本願発明は、 興味あるグルココルチコイドをヒトに投与すること、 興味あるグルココルチコイドを投与されたヒトから血液を採取すること、 回収された血液から R N A を単離すること、 単離された R N A の遺伝子発現をプロファイリングすること、 および投与後の遺伝子特性をコントロール遺伝子特性と比較すること、 ここで、 選択される遺伝子の上方調節がグルココルチコイドに対する応答を示す、 によって、 グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法を含む。

【 0 0 2 9 】

50

本願発明者らは、グルココルチコイド遺伝子特性の発現が、グルココルチコイドの経口投与後に正常健常ボランティア（N H V）の末梢血白血球において有意に上昇されることを見いだした。特性の発現は、用量依存的に増加し、投与4時間後でピークであり、および投与48時間後までにベースラインに戻った。より低い発現が部分的なグルココルチコイド受容体アゴニストを投与されたN H Vにおいて検出され、この化合物の低下した転写活性化の可能性と一致する。全身性エリテマトーデス（S L E）およびリウマチ性関節炎（R A）を有する患者のコホートにおいて、グルココルチコイド特性の発現は、末梢血リンパ球のパーセンテージと負に相関しており、末梢血好中球数と正に相関しており、グルココルチコイド受容体の公知の生物学と一致する。

【0030】

10

グルココルチコイド調節遺伝子の同定

末梢血においてグルココルチコイド依存性応答をモニタリングするために、ヒトPBM Cにおいてプレドニゾロンによって調節される遺伝子を同定した。10人の個々の正常健常ボランティアドナーからのPBM Cを、6時間、DMSOコントロールまたは $1\text{ }\mu\text{M}$ プレドニゾロンのいずれかで処理した。 >2 倍変化および <0.05 のFDR補正p値を有する遺伝子を、上方調節されるまたは下方調節される遺伝子として同定した。

【0031】

上方調節される遺伝子は、ECHDC3、ACSL1、P2RX5、TPST1、TBC1D8、APBA2、SESN1、RNASE1、ABLIM3、RNASE6、BL M、KIF13B、DNMBP、SAP30、SFMBT1、TMEM2、HSPH1、METTL7A、HSPA1B、SLC25A37、VIPR1、FAR2、HSPA6、PHC2、PELI1、POLR1E、SPON2、GFOD1、SPRY1、NDFIP1、MAN2A2、ISG20、RAB31；FKBP5、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3、DUSP1、SLCO4A1、TSC33D3、CD163、SLC1A3、ALOX15B、CCND3、RHOB、VSIG4、FLT3、CRISPLD2、ADORA3、RG S1、AMPH、CPM、ANG、CD93、SPTLC2、SERPINE1、ESTS2、TLR2、PER1、DNAJB1、PTK2B、CEBPD、SLAを含む（図1A）。

20

【0032】

下方調節される遺伝子は、KMO、CCR5、CXCL8、FPR3、PLA2G7、PEA15、TRAF1、CSF2RB、TRDC、OLR1、KIAA0226L、FCGR2B、ATF5、CX3CR1、MYOF、SLAMF7、CD9、IL1RNを含む（図1B）。

30

【0033】

これらの遺伝子中の多くは、公知のグルココルチコイド調節遺伝子であった（Chinenov Y, et.al., BMC Genomics 2014;15:656）。しかしながら、上方調節される遺伝子ECHDC3、ACSL1、P2RX5、TPST1、TBC1D8、APBA2、SESN1、RNASE1、ABLIM3、RNASE6、BL M、KIF13B、DNMBP、SAP30、SFMBT1、TMEM2、HSPH1、METTL7A、HSPA1B、SLC25A37、VIPR1、FAR2、HSPA6、PHC2、PELI1、POLR1E、SPON2、GFOD1、SPRY1、NDFIP1、MAN2A2、ISG20、RAB31は、グルココルチコイド制御に以前に関連していなかった。DUSP1（Abraham SM, et.al., J Exp Med 2006;203:1883-9）、TSC22D3（Beaulieu E, et.al. Nat Rev Rheum 2011;7:340-8）、IRAK3（Miyata M, et.al., Nat Commun 2015;6:606）、およびCD163（Schaer DJ, et.al., Immunogenetics 2001;53:170-7）を含む上方調節される遺伝子のいくつかは、抗炎症性活性に以前に関連していたが、下方調節される遺伝子のいくつかは、ケモカイン、ケモカイン受容体、および他の炎症性メディエーターをコードした。調節遺伝子のネットワーク分析は、免疫応答経路に関する濃縮を示した。単一サンプル遺伝子セット濃縮分析（ssGSEA）アルゴリズムを使用して、個々のサンプルのトランскriプトームにおけるこれらの遺伝子の濃縮に

40

50

について複合(composite)スコア(または遺伝子特性)を生成した(Barbie DA, et.al. *Nature* 2009;462:108-12)。全血をインビトロで5時間プレドニゾロンの異なる濃度で刺激し、上方および下方調節される遺伝子の発現レベルを計算した。上方調節される遺伝子についてのssGSEAスコアは、用量依存的に増加した(図1C)。同様に、下方調節される遺伝子の発現は、用量依存的に減少した(図1D)。上方調節される遺伝子モジュールは、より広い動的な範囲を有し、したがって、この遺伝子モジュールは全ての他の分析のために利用された。

【0034】

この遺伝子モジュールがGR活性を正確に反映するというさらなる機械的証拠を提供するために、部分的なグルココルチコイド受容体(GR)アゴニストの活性を分析した。2つの選択的なGRモジュレーター、BMS-776532およびBMS-791826のインビトロおよびインビボ活性は、以前に記載されている(Weinstein DS, et.al. *J Med Chem* 2011;54:7318-33)。両方の化合物は、GRに結合し、AP-1および核因子-B-依存性レポーターを抑制したが、プレドニゾロンと比較してGR-依存性レポーターの有意に弱い誘導を証明した。BMS-791826は、BMS-776532と比較して転写抑制および転写活性化アッセイにおいてより強力であった。GRは、TIF2(Khan SH, et.al., *Biol. Chem.* 2012; 287:44546-44560)およびPGC1(Knutti D, et.al., *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20:2411-2422)を含む共調節因子の補充を介して転写を調節する。哺乳動物2-ハイブリッドシステムならびにクロマチン免疫沈降を使用して、これらの化合物の転写活性化の可能性を特徴付けた。プレドニゾロンと比較して、BMS-791826およびBMS-776532は、GRに対して有意に低いPGC1およびTIF2を補充し、プレドニゾロンによって補充されるレベルの30-75%でピークに達した(図2A、2B)。BMS-791826は、BMS-776532と比較してより多くのTIF2であるが(50% vs 30%)、同様の量のPGC1を補充した。クロマチン免疫沈降アッセイにおいて、両方の化合物は、プレドニゾロンと比較して、3つの標的遺伝子のプロモーターに対して有意に低い量のGR(図2C)ならびにTIF2(図2D)を補充し、これらの化合物の低下した転写活性化の可能性を確認した。2人の独立した正常健常ボランティアドナーからの全血を、インビトロでこれらの化合物およびプレドニゾロンで5時間刺激し、次に、RNA単離およびAffymetrixプロファイリングを行った。これらのサンプルについてのグルココルチコイド遺伝子特性スコアは、化合物の転写活性化の可能性とよく一致した:プレドニゾロン>BMS-791826>BMS-776532(図2E)。

【0035】

本願発明は、グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法であって、それを必要とするヒトから回収された全血を興味あるグルココルチコイドで刺激すること、刺激された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および刺激後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、遺伝子特性が、遺伝子ECHDC3、ACSL1、P2RX5、TPST1、TBC1D8、APBA2、SESN1、RNASE1、ABLIM3、RNASE6、BLM、KIF13B、DNMBP、SAP30、SFMBT1、TMEM2、HSPPH1、METTL7A、HSPA1B、SLC25A37、VIPR1、FAR2、HSPA6、PHC2、PELI1、POLR1E、SPON2、GFOD1、SPRY1、NDFIP1、MAN2A2、ISG20、RAB31を含み、遺伝子特性スコアの増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、を含む方法を含む。

【0036】

本願発明は、グルココルチコイドに対するヒトの応答を決定する方法であって、それを必要とするヒトから回収された全血をコルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、ベタメタゾン、ブデソニド、フルチカゾン、および合成グルココルチコイドからなる群から選択される1つ以上のグルココルチコイドで刺激すること、刺激された血液からRNAを単離する

10

20

30

40

50

こと、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および刺激後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、遺伝子特性が、遺伝子ECHDC3、ACSL1、P2RX5、TPST1、TBC1D8、APBA2、SESN1、RNASE1、ABLIM3、RNASE6、BLM、KIF13B、DNMBP、SAP30、SFMBT1、TMEM2、HSPH1、METTL7A、HSPA1B、SLC25A37、VIPR1、FAR2、HSPA6、PHC2、PELI1、POLR1E、SPON2、GFOD1、SPRY1、NDFIP1、MAN2A2、ISG20、RAB31を含み、遺伝子特性スコアの増加が、グルココルチコイドに対する応答を示す、を含む方法を含む。

【0037】

10

グルココルチコイド遺伝子特性のインビオ評価

グルココルチコイド(GC)特性がインビトロでグルココルチコイド受容体(GR)アゴニスト活性を正確に捕捉したため、インビオでのGC遺伝子特性の挙動を試験した。正常健常ボランティア(NHV)に、プラセボ、10mg プレドニゾロン、または150もしくは300mg GRモジュレーターBMS-791826を投与した。血液を投与前および投与4時間後に採取し、RNAをAffymetrix遺伝子発現プロファイリングにより分析した。プレドニゾロンを投与された参加者についてのGC特性スコアは、投与前およびプラセボと比較して4時間の時点で有意に上昇された(図3A)。BMS-791826を投与された参加者についての特性スコアは、投与前レベルおよびプラセボを与えられた参加者よりも高かったが、プレドニゾロングループにおける参加者よりも低かった。GC遺伝子特性応答の動力学に対処するために、異なる用量のプレドニゾロンを投与されたNHVからの全血RNAプロフィールを分析した。GC遺伝子特性スコアは、用量依存的に増加し、投与4時間後でピークであった(図3B)。最も高い用量のプレドニゾロンを除く全てについて、GC遺伝子特性スコアは、投与8時間後までにベースラインレベルに戻った。特性スコアは、投与48時間後までに全てのグループにおいてベースラインレベルであった。

20

【0038】

複合グルココルチコイド遺伝子特性スコアは、グルココルチコイド投与に対するインビオ応答の高感度の尺度である。

【0039】

30

本願発明は、プレドニゾロンに対するヒトの応答を決定する方法であって、プレドニゾロンを該ヒトに投与すること、投与4時間後のプレドニゾロンを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性スコアをコントロール遺伝子特性スコアと比較すること、ここで、遺伝子特性が、遺伝子ECHDC3、ACSL1、P2RX5、TPST1、TBC1D8、APBA2、SESN1、RNASE1、ABLIM3、RNASE6、BLM、KIF13B、DNMBP、SAP30、SFMBT1、TMEM2、HSPH1、METTL7A、HSPA1B、SLC25A37、VIPR1、FAR2、HSPA6、PHC2、PELI1、POLR1E、SPON2、GFOD1、SPRY1、NDFIP1、MAN2A2、ISG20、RAB31を含み、遺伝子特性スコアの増加が、プレドニゾロンに対する応答を示す、を含む方法を含む。

40

【0040】

グルココルチコイド遺伝子特性と報告されたグルココルチコイド使用との関係

グルココルチコイド特性が処置状態に基づいて患者間で区別できるか否かを決定するために、SLEまたはRAを有する患者の断面コホートにおける特性の発現を分析した。正常健常コントロールまたは他の標準治療薬で処置された患者のいずれかと比較して、グルココルチコイドを処方されたSLEまたはRAを有する患者は、上昇した特性スコアを有した(図4A)。グルココルチコイド特性が上昇されたとき、特性スコアにおいて有意な患者間変動性があった。SLEにおけるアバタセプトのフェーズII試験からのベースラインサンプルを、グルココルチコイド遺伝子特性の発現について分析した(Fleishaker

50

DL, et.al., BMC Musculoskelet Disord 2016;17:29) (図4B)。グルココルチコイド遺伝子特性スコアは、高用量 (> 30 mg)、中用量 (10 - 30 mg) および低用量 (< 10 mg) に分類されるとき、報告されたプレドニゾン用量と概ねよく一致した。しかしながら、全てのグループにてグルココルチコイド遺伝子特性スコアにおいて有意な患者間変動性が再びあった。これは、いくつかの患者においてステロイド耐性またはいくつかの患者でコンプライアンス問題を反映している可能性がある。

【0041】

グルココルチコイド遺伝子特性と他の薬力学的終点との相関関係

グルココルチコイドは、骨髓から好中球のデマージネイション(demargination)またはリンパ器官におけるリンパ球集団の隔離を介する白血球サブセットの再分布を引き起こすことが知られている (Merayo-Chalico J, et.al., Hum Immunol 2016;77:921-6; Spies CM, et.al., Arthritis Res Ther 2014;16 Suppl 2:S3)。グルココルチコイド特性がこれらの薬力学的終点と相関しているか否かを決定するために、SLE および RA 患者の末梢血を、CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、および CD19+ B 細胞について試験した。グルココルチコイド特性の発現は、SLE 患者 (図5A) および RA 患者 (図5B) の末梢血におけるこれらのサブセットのパーセンテージと負に相関していた。アバタセプト SLE 試験において、グルココルチコイド特性スコアは、好中球数と正に相関していた (図5C)。

【0042】

したがって、グルココルチコイド遺伝子特性の発現は、SLE および RA 患者の両方に 20 おいてグルココルチコイドの知られている生物学と相関する。

【0043】

グルココルチコイド遺伝子特性の精密化

64 メンバーの遺伝子特性のさらなる精密化は、クリニックにおける実施を容易にするであろう。64 の上方調節される遺伝子のリストが、健常男性コホート 2 試験においてプレドニゾロン 対 プレドニゾロンにおけるプラセボで投与された患者を比較して、< 0.05 の FDR 調節 p 値で 1.5 倍以上まで誘導された上方調節される遺伝子に精密化された。リストは、アバタセプト SLE 試験において検出可能な発現についてさらに検索条件を追加された。最初の 64 遺伝子のうち、18 (FKBP5, ECHDC3, IL1R2, ZBTB16, IRS2, IRAK3, ACSL1, DUSP1, PHC2, TLR2, TSC22D3, SLA, CRISP1, MAN2A2, FAR2, CEBD, SPTLC2, HSPA6) はこれらの基準を満たす。リストからの上位 3 つの遺伝子 (FKBP5, ECHDC3 および IL1R2)、上位 6 つの遺伝子 (FKBP5, ECHDC3, IL1R2, ZBTB16, IRS2, IRAK3) および上位 8 つの遺伝子 (FKBP5, ECHDC3, IL1R2, ZBTB16, IRS2, IRAK3, ACSL1, DUSP1) を、次に、ssGSEA スコアを計算するために使用した。

10

20

30

40

50

【表1】

遺伝子名	logFC	adj.P.Val	平均発現	OrderIn18
FKBP5	2.85	6.93E-05	5.08	1
ECHDC3	2.34	6.52E-05	4.18	2
IL1R2	2.07	7.12E-04	7.80	3
ZBTB16	2.04	5.92E-05	5.79	4
IRS2	1.75	1.36E-03	7.51	5
IRAK3	1.45	9.77E-03	4.25	6
ACSL1	1.43	4.41E-03	8.46	7
DUSP1	1.37	2.30E-04	5.13	8
PHC2	1.15	5.92E-05	10.13	9
TLR2	1.11	1.54E-03	9.35	10
TSC22D3	1.08	7.76E-03	9.23	11
SLA	0.98	2.42E-04	9.20	12
CRISPLD2	0.94	5.54E-03	7.60	13
MAN2A2	0.91	3.73E-04	5.43	14
FAR2	0.88	1.37E-02	5.39	15
CEBPD	0.86	8.78E-05	9.50	16
SPTLC2	0.75	1.05E-03	5.21	17
HSPA6	0.67	7.76E-03	7.21	18

10

20

30

【0044】

この短縮された特性にて部分的なG Rアゴニストの健常男性コホート2試験におけるプレドニゾロンの分析を、64の遺伝子特性の挙動を完全に捕捉した(図6A)。64の上方調節される遺伝子で生成された特性と同様に、8の遺伝子特性は、これらの化合物のインビオ投与後の部分的なアゴニストおよびプレドニゾロンの転写活性化可能性を正確に反映した。8の遺伝子特性はまた、アバタセプトS L E試験から末梢血好中球数と正に相関しており、64の遺伝子リストで生成された相関関係と同様のp値であった(図6B)。我々は、これらの8の遺伝子についての定量的ポリメラーゼ連鎖反応(q P C R)アッセイが、簡単な全血回収で実施することができるグルココルチコイド薬力学的活性の高感度なバイオマーカーであろうと結論付ける。

【0045】

本願発明は、プレドニゾロンに対するヒトの応答を決定する方法であって、プレドニゾロンを該ヒトに投与すること、投与4時間後のプレドニゾロンを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性をコントロール遺伝子特性と比較すること、ここで、遺伝子特性が、遺伝子FKBP5、ECHDC3、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3、ACSL1、DUSP1を含み、遺伝子特性スコアの増加が、プレドニゾロンに対する応答を示す、を含む方法を含む。

40

【0046】

本願発明は、プレドニゾロンに対するヒトの応答を決定する方法であって、プレドニゾロンを該ヒトに投与すること、投与4時間後のプレドニゾロンを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液からRNAを単離すること、単離されたRNAの遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性をコントロール遺伝子特性と比較すること、ここで、遺伝子特性が、遺伝子FKBP5、ECHDC3、IL1R2、ZBTB16、IRS2、IRAK3、ACSL1、DUSP1、PHC2、TLR2、TSC22D3、SLA、CRISPLD2、MAN2A2、FAR2、CEBPD、

50

S P T L C 2、H S P A 6 を含み、遺伝子特性スコアの増加が、プレドニゾロンに対する応答を示す、を含む方法を含む。

【 0 0 4 7 】

本願発明は、プレドニゾロンに対するヒトの応答を決定する方法であって、プレドニゾロンを該ヒトに投与すること、投与 4 時間後のプレドニゾロンを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液から R N A を単離すること、単離された R N A の遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性をコントロール遺伝子特性と比較すること、ここで、遺伝子特性が、遺伝子 F K B P 5、E C H D C 3、I L 1 R 2 を含み、遺伝子特性の増加が、プレドニゾロンに対する応答を示す、を含む方法を含む。

【 0 0 4 8 】

本願発明は、プレドニゾロンに対するヒトの応答を決定する方法であって、プレドニゾロンを該ヒトに投与すること、投与 4 時間後のプレドニゾロンを投与されたヒトから血液を採取すること、回収された血液から R N A を単離すること、単離された R N A の遺伝子発現をプロファイリングすること、および投与後の遺伝子特性をコントロール遺伝子特性と比較すること、ここで、遺伝子特性が、遺伝子 F K B P 5、E C H D C 3、I L 1 R 2 、Z B T B 1 6、I R S 2、I R A K 3 を含み、遺伝子特性スコアの増加が、プレドニゾロンに対する応答を示す、を含む方法を含む。

10

【 0 0 4 9 】

結論

グルココルチコイドは、強力な抗炎症活性によって多くの自己免疫性および炎症性疾患に対する処置の主力のままである。しかしながら、慢性的な使用は、毒性効果のリスクの増加と関連している。グルココルチコイドに対する臨床反応におけるこのリスクおよび有意な患者間変動性を考慮すると、適切な用量選択を容易にする高感度な客観的な薬力学が必要である。

20

【 0 0 5 0 】

本願発明のグルココルチコイド遺伝子特性は、N H V に由来する P B M C を使用してインビトロでの発現プロファイリング実験に基づいて開発された。下方調節される遺伝子よりもむしろ、グルココルチコイド処置により誘導される遺伝子が、ドナーにわたって大きな動的な範囲のために焦点が当てられた。S S G S E A アルゴリズムを使用して、個々のサンプルまたは患者に適用することができる複合スコアを生成した。このアルゴリズムは、いくつかの観察に基づいて、グルココルチコイド依存性転写応答を高感度に検出するようになれた。グルココルチコイド特性スコアは、完全なおよび部分的な G R アゴニストの経口投与後に得られたサンプルを使用して、インビトロでの全血プロファイリング試験およびインビオ試験の両方からの総合的な部分的な G R アゴニストの転写活性化の可能性を正確に反映した。特性スコアはまた、インビトロおよびインビオの両方でグルココルチコイドに対する用量応答を捕捉した。

30

【 0 0 5 1 】

本願発明の方法が、S L E および R A を有する患者の断面コホートからのサンプルに適用されたとき、グルココルチコイド特性スコアは、他の非グルココルチコイド標準治療薬物と比較して、グルココルチコイドを使用する患者においてより高かった。アバタセプト S L E 試験からのベースラインサンプルにおいて、ステロイド用量が増加されるとき、グルココルチコイド特性スコアは、漸進的に増加した。

40

【 0 0 5 2 】

本願発明のグルココルチコイド遺伝子特性は、臨床診療の一環としてのみだけでなく、臨床試験におけるステロイドの潜在的な交絡効果を決定するための手助けとしてもまた有用性を有する。アバタセプト S L E 試験からのベースラインサンプルにおいて、グルココルチコイド遺伝子特性スコアは、報告されたステロイド用量と一般的に相關している。しかしながら、各投与グループ内の有意な患者間変動性が観察された。本願発明の方法は、患者がグルココルチコイドに対して耐性であるか、または試験プロトコールに準拠していないか否かを決定するために使用することができる。

50

【0053】

グルココルチコイドの強力な抗炎症効果を考慮すると、試験は、しばしば、グルココルチコイドを漸減するか、または中止さえする必要性を含む。本願発明のグルココルチコイド遺伝子特性は、プロトコールへのコンプライアンスを評価するための客観的な方法を提供する。8の遺伝子特性スコアの計算は、全血回収物を使用するqPCRまたは他のプラットフォームで容易に実施することができる。要約すれば、本願発明の遺伝子特性は、処方される多くの適応において、グルココルチコイドに対する応答をモニターするための幅広い有用性を有する。

【実施例】

【0054】

実施例1

グルココルチコイド調節遺伝子の同定

Ficoll勾配遠心分離を使用して、10人の独立したドナーの血液からリンパ球を単離した。96ウェル平底ブロックプレート(Qiagen, Hilden, Germany)の500万リンパ球/ウェルで500μlアッセイ培地(以下を有するRPMI-1640、Glutamax、10%木炭処理ウシ胎児血清; Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)中で、細胞を培養した。ジメチルスルホキシド(DMSO)ビヒクルまたは1μMプレドニゾロンのいずれかで6時間、細胞を培養した。6時間後、細胞をペレット化し、1ml核酸精製溶解溶液(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)をカルシウムおよびマグネシウムを含まないリン酸緩衝食塩水(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で1:2希釈された溶液に再懸濁した。細胞を溶解バッファー中で室温で10分インキュベートし、次に-80°で保存した。製造業者の指示にしたがってQiagen RNeasy单離キットを使用して、RNAを単離した。

【0055】

全血のプロファイリングのために、4人の正常健常ボランティアからの抗凝固剤クエン酸デキストロース溶液Aを含む全血を、DMSOビヒクル、200nMプレドニゾロン、1μMプレドニゾロン、5μMプレドニゾロン、5μMGRモジュレーターBMS-791826、または10μMBMS-776532のいずれかで5時間培養し、次にPAXgeneチューブに移した。全RNAを単離し、次に、DNase Iで処理し、Qiagen RNeasy MinElute Cleanup Kitを使用して浄化した。RNA濃度をNanoDrop(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使用して決定し、Experion電気泳動システム(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を使用してRNA品質を評価した。全ての標的標識化試薬は、Affymetrix(West Sacramento, CA, USA)から購入した。

【0056】

T7 RNAポリメラーゼプロモーターを含むオリゴ-dTプライマーでの逆転写およびcDNA Synthesis System(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を使用する二本鎖変換を介して、1μgの全RNAから二本鎖cDNAを合成した。ビオチン標識化cRNAは、cDNAから生成され、96ウェルプレートにおいて96シングルHG-U133AアレイからなるHuman Genome HT_HG-U133Aプレート(Affymetrix, Sunnyvale, CA, USA)を調べるために使用した。全てのcDNAおよびcRNA標的調製ステップは、AffymetrixからのCaliper GeneChip Array Stationで処理した。アレイハイブリダイゼーション、洗浄、およびスキャンは、製造業者の推奨にしたがって行った。

【0057】

遺伝子特性開発およびスコア化

Affymetrix Array StationからのCELファイルを、Rの「Affy」パッケージ(version 3.2.1; 16)を使用するRobust Multi-Array Average(RMA)アルゴリズム(Gautier L, et.al., Bioinformatics 2004;20:307-15)およびBrainArray(version 18.0.0; Dai M, et.al., Nucleic Acids Res 2005;33:e175)からのカスタムCDFファイルを備えたBiocconductor(Gentleman R

C, et.al. *Genome Biol.* 2004, 5 (10):R80) を使用して処理および正規化した。Array Studio (OmicSoft, Cary, NC, USA)においてモデレート t - 検定 (Ritchie ME, et.al., *Nucleic Acids Res* 2015;43:e47) を使用して、差次的遺伝子発現分析を実行し、プレドニゾロン処置 対 コントロールサンプルにおける遺伝子発現レベルを比較した。p 値を、誤検出率とも呼ばれる複数のテスト補正方法を使用して調整した (FDR, Benjamini Y, et.al., *J. Royal Statistical Soc., Series B* 1995; 57:289)。実験にわたって < 0.05 の調整された p 値で少なくとも 2 倍上方調節または下方調節された遺伝子を、GC 遺伝子特性として報告した。

【0058】

GC 遺伝子特性の濃縮レベルにより個々のサンプルをスコア化するために、我々は、単一サンプルの遺伝子セット濃縮分析 (ssGSEA) アルゴリズム (Barbie DA, et.al., *Nature* 2009;462:108-12) を適応して複合スコアを生成した。これは、R の Gene Set Variation Analysis パッケージ (version 3.4.0, Hanzelmann S, et.al., *BMC Bioinformatics* 2013;14:7) を使用して実行された。濃縮スコアがトランスクリプトーム内の GC 遺伝子の可能なランキングの最低から最高までを表す -1 および 1 間になるようにアルゴリズムを修正した。

【0059】

哺乳動物 2 - ハイブリッド分析

全長ヒトペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 コアクチベーター - 1 アルファ (PGC1) または全長ヒト転写メディエーター / 中間因子 2 (TIF2) のいずれかをコードする配列を、ベクター pM (Clontech, Mountain View, CA, USA) における GAL4 DNA - 結合ドメインと共にフレームにおいてクローニングした。全長ヒト GR を、ベクター pVP16 (Clontech) における VP16 活性化ドメインと共にフレームにおいてクローニングした。ヒト SK-N-MC 神経芽腫細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) を、これらのプラスミドおよび GAL4 依存性 ルシフェラーゼレポーター (pGF-luc; Promega, Madison, WI, USA) と共にトランسفエクトした。形質転換体を、200 nM デキサメタゾン、または異なる濃度のプレドニゾロン、GR モジュレーター BMS-791826 または BMS-776532 のいずれかで刺激した。ルシフェラーゼ活性を、トランسفエクションの 48 時間後に測定した。

【0060】

クロマチン免疫沈降

クロマチン免疫沈降のために、A549 細胞を、10% 木炭処理ウシ胎児血清を有する RPMI において、DMSO、1 μM プレドニゾロン、1 μM GR モジュレーター BMS-791826、または 2 μM BMS-776532 のいずれかで 1 時間培養した。細胞をホルムアルデヒドで固定し、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を使用して特定のプロモーター配列に対する GR および TIF2 補充の分析について Active Motif (Carlsbad, CA, USA) に送った。

【0061】

患者コホート

全身性エリテマトーデス (SLE) およびリウマチ性関節炎 (RA) 断面コホート

2014 年および 2015 年において Northwell Health (Great Neck, NY, USA) で定期訪問中の SLE を有する 86 人の患者から末梢血を得た。患者は、ヒドロキシクロロキン、ミコフェノール酸モフェチル、グルココルチコイド、および / またはベリムマブを含む一般的な SLE または狼瘡腎炎のための標準療法を受けた。患者特性は、次のとおりであった：年齢、45 ± 14 歳 (平均 ± SD)；女性、85%；SLE 疾患活動性指数 20.00 スコア (SLEDAI-2K)、3.7 ± 3.2 (平均 ± SD)；狼瘡腎炎の病歴、43%；疾患の期間、15 ± 13 年 (平均 ± SD)。

【0062】

RA コホートについて、2014 年および 2015 年において Brigham และ Women's Hospital, Boston, MA または Northwell Health

10

20

30

40

50

1 th、Great Neck、New York のいずれかで定期訪問中の 84人の患者から血液を得た。患者は、メトトレキサート、ヒドロキシクロロキン、トファシチニブ、アバタセプト、抗腫瘍死因子生物製剤、トリリズマブ、グルココルチコイド、および/または非ステロイド系抗炎症剤を含む RA のための標準療法を受けた。患者特性は、次のとおりであった：年齢、 57 ± 14 歳（平均 \pm SD）；女性、77%；リウマチ性関節炎スコアに関して 2010 年米国リウマチ学会の基準、 7.8 ± 1.6 （平均 \pm SD）；疾患の期間、 17 ± 10 年（平均 \pm SD）。血液の PAX gene チューブを、各訪問時に、ヘパリン処理した血液を回収した。血液を一晩輸送し、蛍光活性化細胞選別分析のために到着時に処理した。血液の PAX gene チューブをまた、年齢および性別がマッチした正常健常ボランティア（Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ, USA）から回収した。RNA を血液の PAX gene チューブから単離し、上記プロトコールを使用して Affymetrix HG-U219 遺伝子アッセイを調べるために使用した。

【0063】

アバタセプト SLE 臨床コホート (NCT00119678)

ベースライン PAX gene 回収物および全血球数を、A または B のイギリス諸島狼瘡評価グループ（British Isles Lupus Assessment Group）（BILAG）スコアの基準を満たす SLE を有する 144 人の成人から得た。ベースラインでの集団は、多発性関節炎を有する患者の 53%、円板状狼瘡を有する 35%、および漿膜炎を有する 12% からなった。全体として、患者の 87% はプレドニゾンであり、50% はヒドロキシクロロキンであり、41% は免疫抑制性（メトトレキサート、アザチオプリン、またはミコフェノール酸モフェチル）であった。

【0064】

健常男性コホート 1 (NCT03196557) におけるプレドニゾロン

5、10 または 30 mg プレドニゾロンの 1 日用量を 7 日間受けるように、男性の正常健常ボランティアをランダムに割り当てた（6 参加者 / グループ）。2 人の参加者はプラセボを受けた。PAX gene チューブを、投与前および投与 2、4、8、48、144、および 216 時間後に回収した。

【0065】

健常男性コホート 2 (NCT03198013) におけるプレドニゾロン

ポリエチレングリコール（PEG）-400 溶液のプラセボ（4 参加者）；PEG-400 溶液としての GR モジュレーター BMS-791826 の単回 1 日経口用量（150 または 300 mg）（6 参加者 / 用量）；または 10 mg プレドニゾロン（4 参加者）の単回 1 日用量のいずれかを連続 3 日間で受けるように、男性の正常健常ボランティアをランダムに割り当てた。PAX gene チューブを、投与前および 1 日目の投与 4 時間後に回収した。

【0066】

末梢血の表現型

ヘパリン化全血を抗体のあらかじめ混合されたカクテルで染色し、次に溶解および固定した。SLE パネルのために使用される抗体は、CD3-eF450（clone OKT3；eBioscience, San Diego, CA, USA）、CD4-PE-Cy7（クローンOKT4；BioLegend, San Diego, CA, USA）、CD8-APC-H7（クローンSK1；BD Biosciences, San Jose, CA, USA）、および CD19-BV421（クローンHIB19；BioLegend）を含んだ。

【0067】

RA パネルのために使用される抗体は、CD19-BV421、CD3-Ax700（クローンOKT3；BioLegend）、CD4-Percp-Cy5.5（クローンRPA-T4；eBioscience）、および CD8-Bv785（クローンRPA-T8；BioLegend）を含んだ。

10

20

30

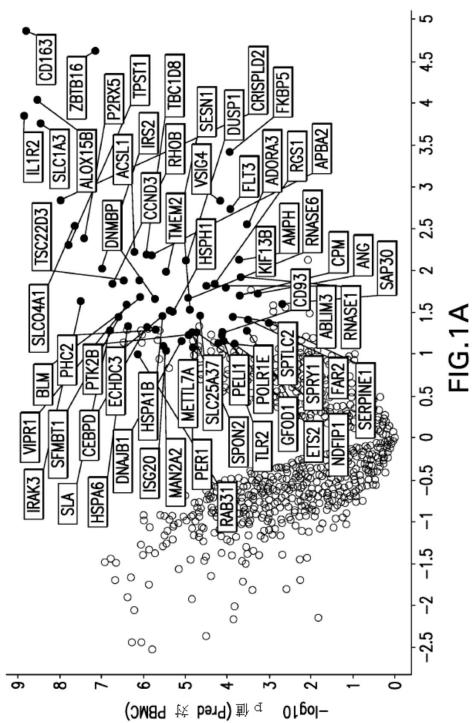
40

50

【図面】

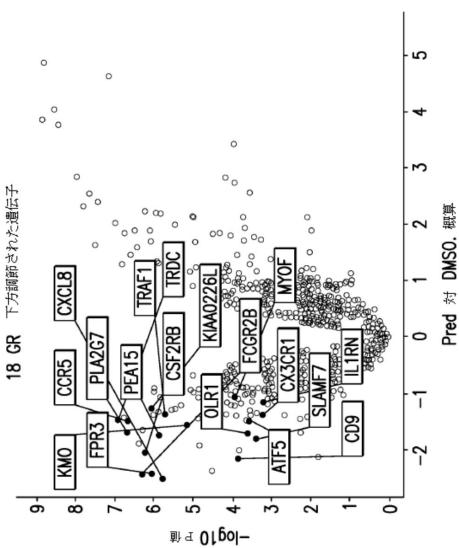
【図 1 - 1】

1/13



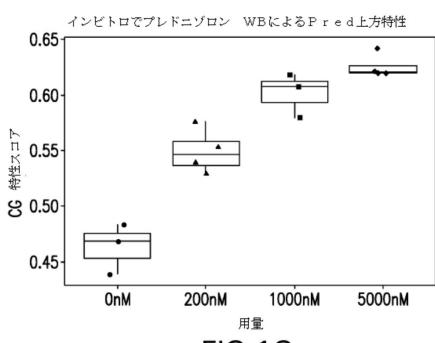
【図 1 - 2】

2/13



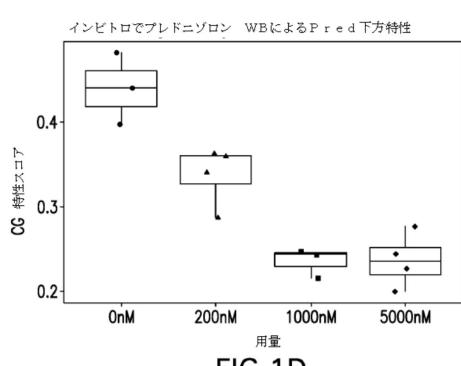
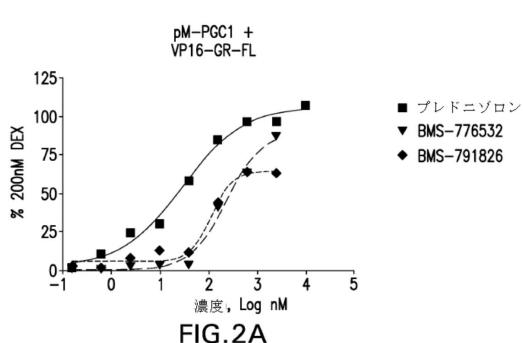
【図 1 - 3】

3/13



【図 2 - 1】

4/13



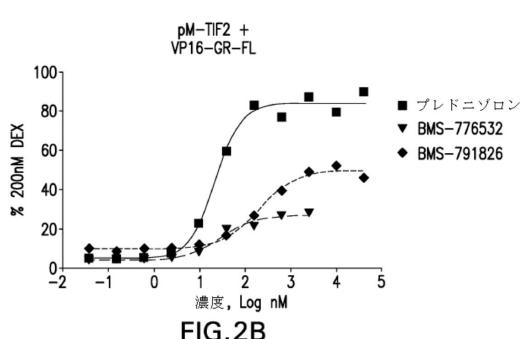
10

20

30

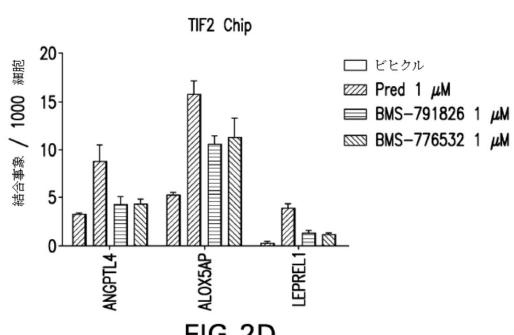
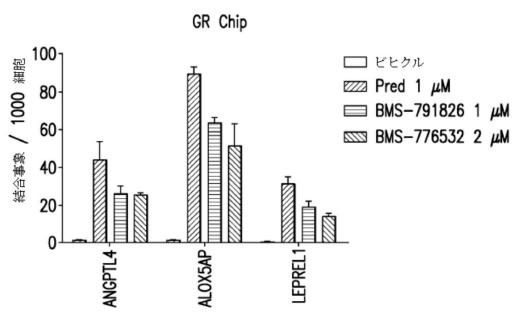
40

50



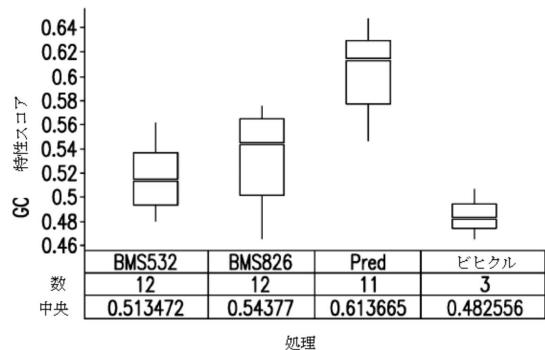
【図 2 - 2】

5/13



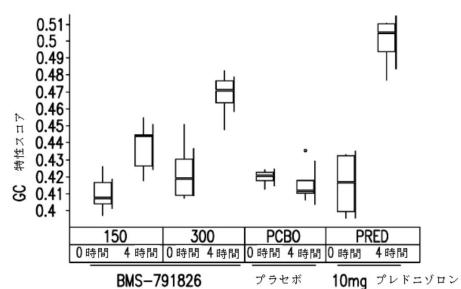
【図 2 - 3】

6/13

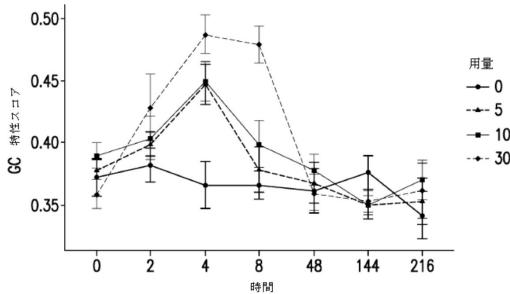


【図 3】

7/13

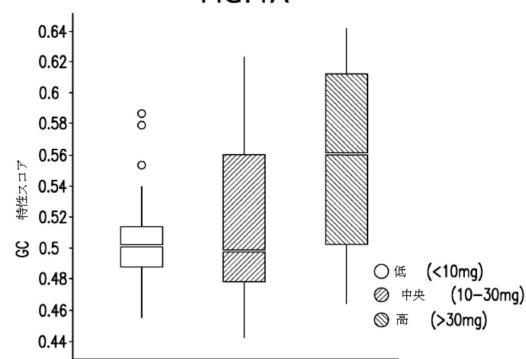
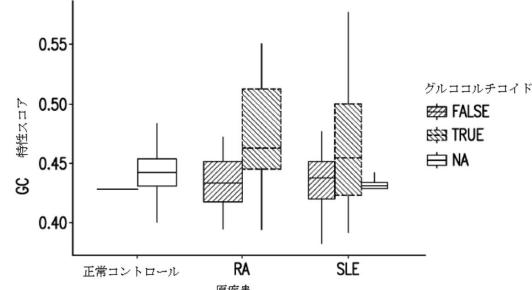


時間にわたる平均応答: Pred_Up_2FC_hPBMC_64



【図 4】

8/13



10

20

30

40

50

【図 5 - 1】

9/13

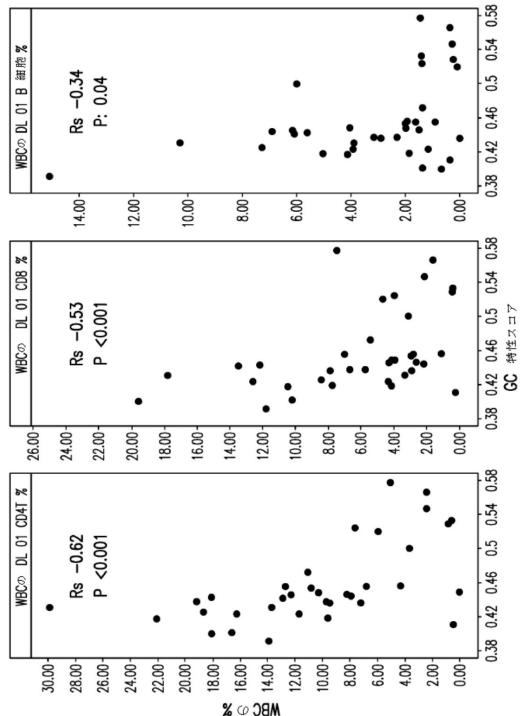


FIG.5A

10

【図 5 - 2】

10/13

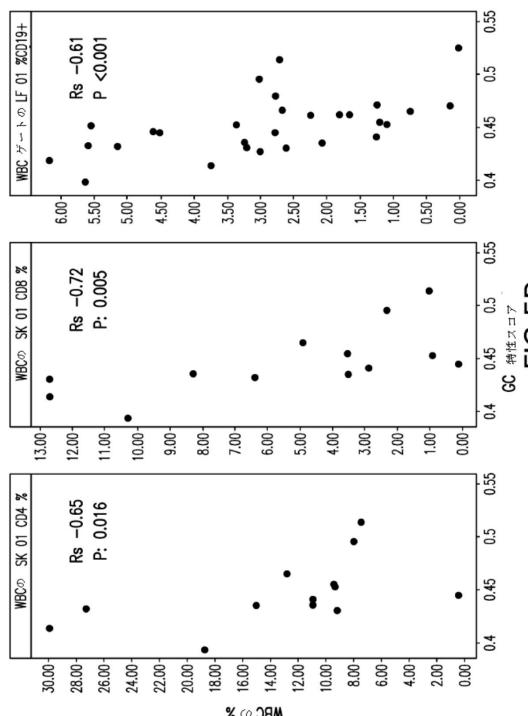


FIG.5B

20

【図 5 - 3】

11/13

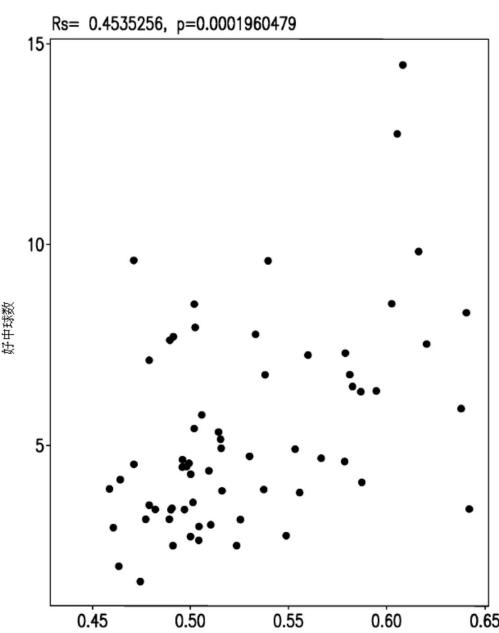


FIG.5C

30

【図 6 - 1】

12/13

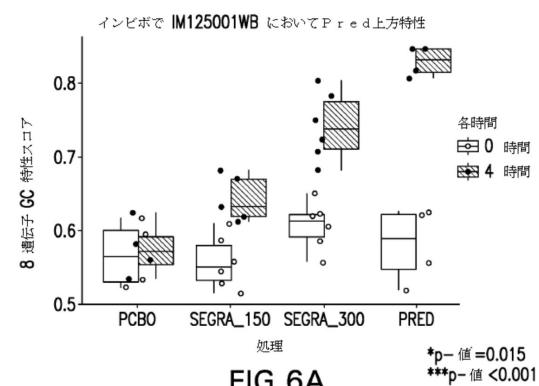


FIG.6A

40

50

【図 6 - 2】

13/13

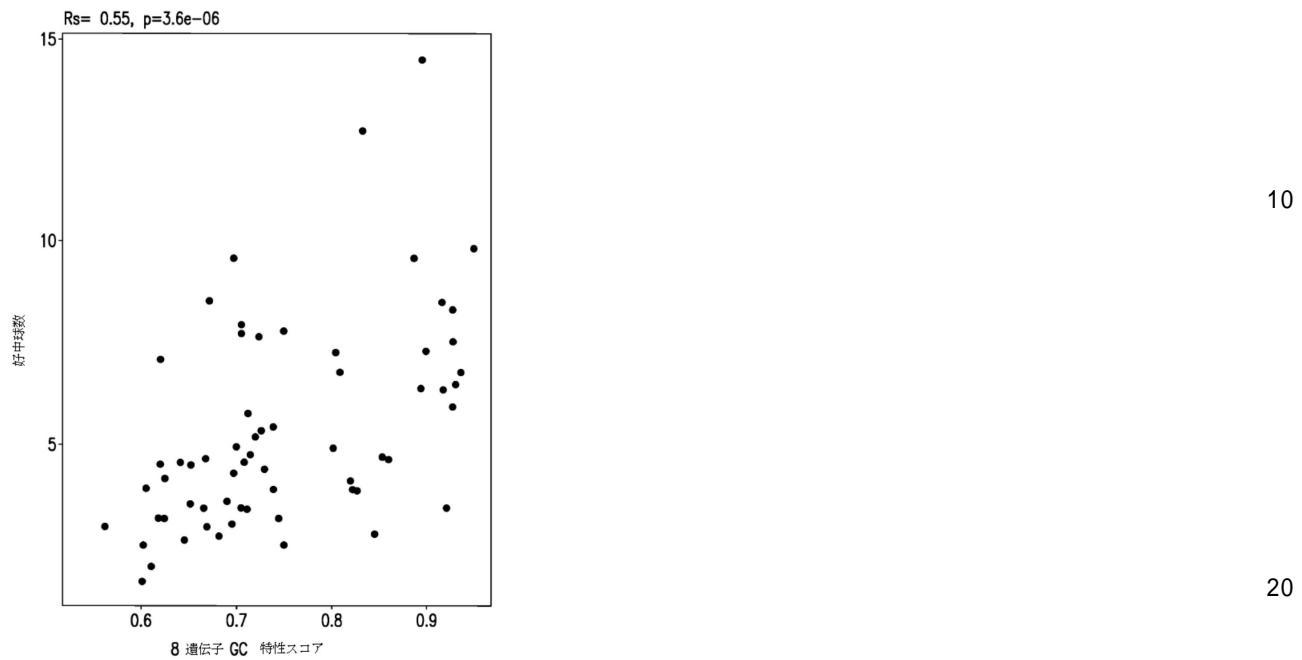


FIG.6B

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 Q 1/6809(2018.01)

F I

C 1 2 Q

1/6809

Z

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者

ジュリー・カーマン

アメリカ合衆国 0 8 6 4 8 ニュージャージー州ローレンス、ビレッジ・コート 1 4 番

(72)発明者

ホウ・ヤンホア

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、プリストル -マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献

特表 2 0 1 4 - 5 0 4 2 7 2 (J P , A)

特表 2 0 0 5 - 5 0 3 7 9 0 (J P , A)

Neuropsychopharmacology , 2012年 , vol.37 , p.1455-1464

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)