

(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2009-518041  
(P2009-518041A)

(43) 公表日 平成21年5月7日(2009.5.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 F	4 B 0 2 9
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/00 A	4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 M	
<b>G O 1 N 37/00 (2006.01)</b>	G O 1 N 37/00 1 0 2	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁)

(21) 出願番号 特願2008-544530 (P2008-544530)  
 (86) (22) 出願日 平成18年12月9日 (2006. 12. 9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年7月22日 (2008. 7. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/046862  
 (87) 国際公開番号 W02007/070376  
 (87) 国際公開日 平成19年6月21日 (2007. 6. 21)  
 (31) 優先権主張番号 60/748, 884  
 (32) 優先日 平成17年12月9日 (2005. 12. 9)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 11/446, 825  
 (32) 優先日 平成18年6月5日 (2006. 6. 5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

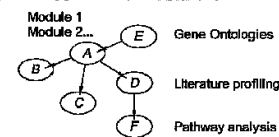
(71) 出願人 506291531  
 ベイラー・リサーチ・インスティテュート  
 アメリカ合衆国テキサス州75204ダラス・スイート125・ライブオークストリート3434  
 (74) 代理人 110000741  
 特許業務法人小田島特許事務所  
 (72) 発明者 シヨサベル, ダミアン  
 アメリカ合衆国テキサス州75082リチャードソン・サウスポイントドライブ4532  
 (72) 発明者 バンシユロ, ジャック・エフ  
 アメリカ合衆国テキサス州75230ダラス・ノースアブーン6730  
 Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA11 HA14  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血中白血球のマイクロアレイ分析を介する全身性エリテマトーデスの疾患進行の診断、予知およびモニタリング

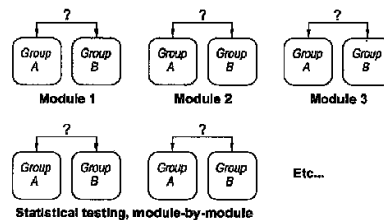
(57) 【要約】

本発明は、遺伝子発現データのモジュール分析を使用して、SLEを早期検出し、そして一貫した測定を行うための組成物、アレイおよび方法を含む。

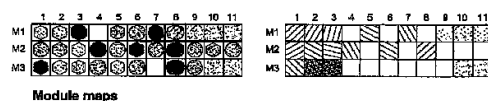
II. Functional annotation/analysis



III. Group comparison:



IV. Visualization / Interpretation:



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

個体が全身性エリテマトーデス ( S L E ) であるかどうかを決定する方法であって：

患者のトランスクリプトームを得；

1 もしくは複数の転写モジュールに基づきトランスクリプトームを採点 ( s c o r e ) し；そして

患者の疾患または状態を、 S L E の表示である 1 もしくは複数の転写モジュールのトランスクリプトーム内の遺伝子の発現の存在、不存在またはレベルに基づき決定する、工程を含んでなる上記方法。

## 【請求項 2】

転写モジュールが：

疾患または状態毎に合う各クラスターからそのモジュールについての遺伝子を選択し；

選択した遺伝子を分析から除き；そして

疾患または状態のサブフラクションにクラスターをなす遺伝子について、遺伝子発現値を選択する工程を繰り返す、

ことにより 1 もしくは複数の転写モジュールに関する遺伝子発現値を反復して選択し；そして

すべての遺伝子クラスターが使用し尽されるまで、各クラスターについてモジュールの作成を繰り返し反復する、

ことにより得られる請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

クラスターが発現値クラスター、キーワードクラスター、代謝クラスター、疾患クラスター、感染クラスター、移植クラスター、シグナル伝達クラスター、転写クラスター、複製クラスター、細胞サイクルクラスター、 s i R N A クラスター、 m i R N A クラスター、ミトコンドリアクラスター、T細胞クラスター、B細胞クラスター、サイトカインクラスター、リンホカインクラスター、熱ショッククラスターおよびその組み合わせから選択される請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

患者がヒト S L E 患者である請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

患者に、グルココルチコイド、非ステロイド系抗炎症剤および免疫抑制剤からなる群から選択される治療に有効な量の薬剤が提供される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

患者の自己免疫または慢性炎症疾患を診断またはモニタリングする方法であって、免疫グロブリン、好中球、インターフェロン、T細胞およびリボソームタンパク質から選択される遺伝子を含む 2 以上の遺伝子モジュールの発現レベルを検出することを含んでなる上記方法。

## 【請求項 7】

1 もしくは複数の遺伝子が：

M 1 . 7 M H C クラス I 分子： H L A - A , B , C , G , E ) + ベータ 2 - ミクログロブリン ( B 2 M )、リボソームタンパク質： R P L s , R P S s を含んでなる 1 もしくは複数の M H C / リボソーム遺伝子；

M 2 . 2 ラクトトランスフェリン： L T F、デフェンシン： D E A F 1、細菌透過性増加タンパク質 ( B P I )、カセリシジン抗微生物タンパク質 ( C A M P ) を含んでなる 1 もしくは複数の好中球遺伝子；

M 2 . 4 R P L s , R P S s、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー ( E E F s )、核小体タンパク質： N P M 1 , N O A L 2 , N A P 1 L 1 を含んでなる 1 もしくは複数のリボソームタンパク質遺伝子；

M 2 . 8 C D 5 , C D 6 , C D 7 , C D 2 6 , C D 2 8 , C D 9 6、リンホトキシン

10

20

30

40

50

ベータ、I L 2 - 誘導性 T 細胞キナーゼ, T C F 7, T 細胞分化タンパク質  
m a l, G A T A 3 および S T A T 5 B を含んでなる 1 もしくは複数の T 細胞  
表面マーカー遺伝子;

および

M 3 . 1 抗ウイルス分子 ( O A S 1 / 2 / 3 / L, G B P 1, G 1 P 2, E I F 2 A  
K 2 / P K R, M X 1, P M L )、ケモカイン ( C X C L 1 0 / I P - 1 0  
)、シグナル伝達分子 ( S T A T 1, S T A t 2, I R F 7, I S G F 3 G  
) を含んでなる 1 もしくは複数のインターフェロン - 誘導性遺伝子:

から選択される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

疾患が全身性エリテマトーデス ( S L E ) を含んでなる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

発現レベルが遺伝子により発現される R N A レベルを測定することにより検出される請  
求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

遺伝子により発現される R N A レベルの検出前に、患者から R N A を単離することをさ  
らに含んでなる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

R N A レベルが P C R により、ハイブリダイゼーションまたはオリゴヌクレオチドに対  
するハイブリダイゼーションにより検出される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

分析されるモジュールがさらに、M 1 . 1、M 1 . 7、M 2 . 1、M 2 . 2、M 2 . 3  
、M 2 . 4、M 2 . 5、M 2 . 6、M 2 . 7、M 2 . 8 および / または M 3 . 1 として列  
挙されるモジュールでここに列挙される遺伝子を含んでなる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 13】

分析されるモジュールが以下の:

第 1 モジュールは以下の遺伝子または遺伝子断片の 1 もしくは複数を含む: H s . 4 0  
6 6 8 3 ; H s . 5 1 4 5 8 1 ; H s . 5 4 6 3 5 6 ; H s . 3 7 4 5 5 3 ; H s . 4 4  
8 2 2 6 ; H s . 3 8 1 1 7 2 ; H s . 5 3 4 2 5 5 ; H s . 4 0 6 6 2 0 ; H s . 5 3  
4 2 5 5 ; H s . 4 1 0 8 1 7 ; H s . 1 3 6 9 0 5 ; H s . 5 4 6 3 9 4 ; H s . 4 1  
9 4 6 3 ; H s . 5 3 0 8 ; H s . 5 1 4 5 8 1 ; H s . 3 8 7 8 0 4 ; H s . 5 4 6 2  
8 6 ; H s . 3 0 0 1 4 1 ; H s . 3 5 6 3 6 6 ; H s . 4 3 3 4 2 7 ; H s . 5 3 3 6  
2 4 ; H s . 5 4 6 3 5 6 ; H s . 3 7 0 5 0 4 ; H s . 4 3 3 7 0 1 ; H s . 1 5 3 1  
7 7 ; H s . 1 5 0 5 8 0 ; H s . 5 1 4 5 8 1 ; H s . 3 5 6 7 9 4 ; H s . 4 1 9 4  
6 3 ; H s . 4 3 3 4 2 7 ; H s . 4 6 9 4 7 3 ; H s . 3 8 0 9 5 3 ; H s . 4 1 0 8  
1 7 ; H s . 4 2 1 2 5 7 ; H s . 4 0 8 0 5 4 ; H s . 4 3 3 5 2 9 ; H s . 4 5 8 4  
7 6 ; H s . 4 3 9 5 5 2 ; H s . 1 5 6 3 6 7 ; H s . 5 4 6 2 9 1 ; H s . 5 4 6 2  
9 0 ; H s . 5 1 4 5 8 1 ; H s . 1 4 4 8 3 5 ; H s . 4 3 9 5 5 2 ; H s . 3 5 6 5  
0 2 ; H s . 3 9 7 6 0 9 ; H s . 4 4 6 6 2 8 ; H s . 5 4 6 3 5 6 ; H s . 2 6 5 1  
7 4 ; H s . 4 2 5 1 2 5 ; H s . 3 7 4 5 9 6 ; H s . 3 8 1 1 2 6 ; H s . 3 8 1 0  
6 1 ; H s . 4 0 6 6 2 0 ; H s . 5 3 3 9 7 7 ; H s . 4 4 7 6 0 0 ; H s . 1 4 8 3  
4 0 ; H s . 4 2 1 9 0 7 ; H s . 4 4 8 2 2 6 ; H s . 4 1 0 8 1 7 ; H s . 1 1 9 5  
9 8 ; H s . 4 3 3 4 2 7 ; H s . 4 1 0 8 1 7 ; H s . 8 1 0 2 ; H s . 4 4 6 6 2 8  
; H s . 3 5 6 5 7 2 ; H s . 3 8 1 1 2 3 ; H s . 5 1 5 3 2 9 ; H s . 4 0 8 0 5 4  
; H s . 4 8 3 8 7 7 ; H s . 3 8 6 3 8 4 ; H s . 3 3 7 7 6 6 ; H s . 4 0 8 0 7 3  
; H s . 5 4 6 2 8 9 ; H s . 3 7 4 5 9 6 ; H s . 5 1 2 1 9 9 ; H s . 1 1 9 5 9 8  
; H s . 4 9 9 8 3 9 ; H s . 4 4 6 5 8 8 ; H s . 3 5 6 5 7 2 ; H s . 3 9 7 6 0 9  
; H s . 3 5 6 5 7 2 ; H s . 1 4 4 8 3 5 ; H s . 5 1 5 3 2 9 ; H s . 5 3 4 8 3 3  
; H s . 3 7 4 5 8 8 ; H s . 1 4 4 8 3 5 ; H s . 8 0 5 4 5 ; H s . 5 4 6 3 5 6 ;  
H s . 4 0 0 2 9 5 ; H s . 1 1 9 5 9 8 ; H s . 4 0 8 0 7 3 ; H s . 4 1 2 3 7 0 ;

10

20

30

40

50

Hs . 401929 ; Hs . 425125 ; Hs . 374588 ; Hs . 374588 ;  
Hs . 356366 ; Hs . 186350 ; および Hs . 186350 ; および

第2モジュールは以下の遺伝子または遺伝子断片の1もしくは複数を含む： Hs . 513711 ; Hs . 375108 ; Hs . 176626 ; Hs . 2962 ; Hs . 41 ; Hs . 99863 ; Hs . 530049 ; Hs . 51120 ; Hs . 480042 ; Hs . 36977 ; Hs . 294176 ; Hs . 529019 ; Hs . 2582 ; Hs . 550853 ; Hs . 529517 ; Hs . 204238 ; および ;

第3モジュールは以下の遺伝子または遺伝子断片の1もしくは複数を含む： Hs . 518827 ; Hs . 8102 ; Hs . 190968 ; Hs . 508266 ; Hs . 523913 ; Hs . 437594 ; Hs . 515598 ; Hs . 54780 ; Hs . 534384 ; Hs . 527105 ; Hs . 522885 ; Hs . 462341 ; Hs . 127610 ; Hs . 408018 ; Hs . 381219 ; Hs . 6917 ; Hs . 109798 ; Hs . 497581 ; Hs . 369728 ; Hs . 432485 ; Hs . 314359 ; Hs . 409140 ; Hs . 529798 ; Hs . 477028 ; Hs . 107003 ; Hs . 528668 ; Hs . 314359 ; Hs . 6917 ; Hs . 333120 ; Hs . 500822 ; Hs . 131255 ; Hs . 469925 ; Hs . 410817 ; Hs . 277517 ; Hs . 529631 ; Hs . 367900 ; Hs . 408054 ; Hs . 467284 ; Hs . 111099 ; Hs . 378103 ; Hs . 108332 ; Hs . 397609 ; Hs . 80545 ; Hs . 529631 ; Hs . 472558 ; Hs . 519452 ; Hs . 516023 ; Hs . 438429 ; Hs . 515472 ; Hs . 512675 ; Hs . 438429 ; Hs . 314359 ; Hs . 75056 ; Hs . 482526 ; Hs . 333388 ; Hs . 483305 ; Hs . 515329 ; Hs . 288856 ; Hs . 546288 ; Hs . 483305 ; Hs . 534346 ; Hs . 528435 ; Hs . 381219 ; Hs . 469925 ; Hs . 172791 ; Hs . 190968 ; Hs . 182825 ; Hs . 492599 ; Hs . 406620 ; Hs . 549130 ; Hs . 532359 ; Hs . 534346 ; Hs . 421257 ; Hs . 511831 ; Hs . 380920 ; Hs . 311640 ; Hs . 546356 ; Hs . 119598 ; Hs . 405590 ; Hs . 178551 ; Hs . 499839 ; Hs . 148340 ; Hs . 483305 ; Hs . 505735 ; Hs . 381219 ; Hs . 299002 ; Hs . 532359 ; Hs . 5662 ; Hs . 515329 ; Hs . 408073 ; Hs . 515070 ; Hs . 448226 ; Hs . 515329 ; Hs . 511582 ; Hs . 421608 ; Hs . 186350 ; Hs . 529798 ; および Hs . 294094 ; および ;

第4モジュールは以下の遺伝子または遺伝子断片の1もしくは複数を含む： Hs . 397891 ; Hs . 438801 ; Hs . 125036 ; Hs . 210891 ; Hs . 220629 ; Hs . 376208 ; Hs . 316931 ; Hs . 196981 ; Hs . 271272 ; Hs . 397891 ; Hs . 7946 ; Hs . 505326 ; Hs . 369581 ; Hs . 58685 ; Hs . 7236 ; Hs . 17109 ; Hs . 49143 ; Hs . 505806 ; Hs . 60339 ; Hs . 13262 ; Hs . 22380 ; Hs . 233044 ; Hs . 133397 ; Hs . 445489 ; Hs . 60339 ; Hs . 428214 ; Hs . 431498 ; Hs . 533994 ; Hs . 533994 ; Hs . 498317 ; Hs . 533994 ; Hs . 517717 ; Hs . 173135 ; Hs . 522679 ; Hs . 446149 ; Hs . 525700 ; Hs . 519580 ; Hs . 481704 ; Hs . 379414 ; Hs . 125036 ; Hs . 440776 ; Hs . 475602 ; Hs . 173135 ; Hs . 481704 ; Hs . 167087 ; Hs . 142023 ; Hs . 524134 ; Hs . 98309 ; Hs . 433700 ; Hs . 480837 ; Hs . 5019 ; Hs . 525700 ; Hs . 94229 ; Hs . 446149 ; Hs . 502710 ; および

第5モジュールは以下の遺伝子または遺伝子断片の1もしくは複数を含む： Hs . 276925 ; Hs . 98259 ; Hs . 478275 ; Hs . 273330 ; Hs . 17

10

20

30

40

50

5 1 2 0 ; H s . 1 9 0 6 2 2 ; H s . 1 7 5 1 2 0 ; H s . 4 1 5 5 3 4 ; H s . 6 2  
 6 6 1 ; H s . 3 4 4 8 1 2 ; H s . 1 4 5 1 5 0 ; H s . 5 1 4 8 ; H s . 3 0 2 1 2  
 3 ; H s . 6 5 6 4 1 ; H s . 6 2 6 6 1 ; H s . 8 6 7 2 4 ; H s . 1 2 0 3 2 3 ; H  
 s . 3 7 0 5 1 5 ; H s . 2 9 1 0 0 0 ; H s . 6 2 6 6 1 ; H s . 1 1 8 1 1 0 ; H s  
 . 1 3 1 4 3 1 ; H s . 4 6 4 4 1 9 ; H s . 6 5 6 4 1 ; H s . 1 4 5 1 5 0 ; H s .  
 4 1 5 5 3 4 ; H s . 5 4 4 8 3 ; H s . 5 2 0 1 0 2 ; H s . 4 1 4 5 7 9 ; H s . 1  
 9 0 6 2 2 ; H s . 3 7 4 9 5 0 ; H s . 4 7 8 2 7 5 ; H s . 3 6 9 0 3 9 ; H s . 2  
 2 9 9 8 8 ; H s . 4 5 8 4 1 4 ; H s . 4 2 5 7 7 7 ; H s . 5 3 1 3 1 4 ; H s . 3  
 5 2 0 1 8 ; H s . 5 2 6 4 6 4 ; H s . 4 7 0 9 4 3 ; H s . 5 1 4 5 3 5 ; H s . 4  
 8 7 9 3 3 ; H s . 4 8 1 1 4 3 ; H s . 2 1 7 4 8 4 ; H s . 5 2 4 1 1 7 ; H s . 1  
 3 7 0 0 7 ; H s . 4 5 8 4 1 4 ; H s . 3 7 4 6 5 0 ; H s . 4 7 0 9 4 3 ; H s . 5  
 0 8 4 2 ; H s . 1 1 8 6 3 3 ; H s . 1 3 0 7 5 9 ; H s . 3 8 4 5 9 8 ; H s . 5 2  
 4 7 6 0 ; H s . 4 4 1 9 7 5 ; H s . 5 3 0 5 9 5 ; H s . 5 4 6 4 6 7 ; H s . 5 2  
 9 3 1 7 ; H s . 1 7 5 6 8 7 ; H s . 1 1 2 4 2 0 ; H s . 1 7 0 6 ; H s . 5 2 3 8  
 4 7 ; H s . 3 8 8 7 3 3 ; H s . 1 6 3 1 7 3 ; H s . 4 7 0 9 4 3 ; H s . 4 8 1 1  
 4 1 ; H s . 1 7 1 4 2 6 ; H s . 1 7 4 1 9 5 ; H s . 5 1 8 2 0 1 ; H s . 1 1 8 6  
 3 3 ; H s . 4 8 9 1 1 8 ; H s . 4 8 9 1 1 8 ; H s . 1 9 3 8 4 2 ; H s . 5 5 1 5  
 1 6 ; H s . 5 1 8 2 0 3 ; H s . 3 7 1 7 9 4 ; H s . 5 2 9 3 1 7 ; H s . 1 9 5 6  
 4 2 ; H s . 1 2 3 4 1 ; H s . 4 1 4 3 3 2 ; H s . 5 2 4 7 6 0 ; H s . 4 7 9 2 6  
 4 ; H s . 5 0 1 7 7 8 ; H s . 4 1 4 3 3 2 ; H s . 1 2 6 4 6 ; H s . 5 1 8 2 0 0  
 ; H s . 4 4 1 9 7 5 ; H s . 4 4 1 9 7 5 ; H s . 4 3 7 6 0 9 ; H s . 1 3 0 7 5 9  
 ; H s . 8 2 3 1 6 ; H s . 5 1 8 2 0 0 ; H s . 4 5 8 4 8 5 ; H s . 3 1 8 6 9 ; H  
 s . 1 6 6 1 2 0 ; H s . 5 4 9 0 4 1 ; H s . 1 7 5 1 8 ; H s . 5 4 6 4 6 7 ; H s  
 . 5 1 7 3 0 7 ; H s . 5 4 9 0 4 1 ; H s . 5 2 8 6 3 4 ; H s . 3 8 9 7 2 4 ; H s  
 . 5 4 6 5 2 3 ; H s . 8 2 3 1 6 ; H s . 7 1 5 5 ; H s . 5 2 1 9 0 3 ; H s . 2 6  
 6 6 3 ; H s . 1 2 0 3 2 3 ; および H s . 9 2 6 の各々から選択される 1 もしくは複数  
 の遺伝子を含んでなる、請求項 6 に記載の方法。

10

20

【請求項 1 4】

ヌクレオチド配列が、DNA、RNA、cDNA、PNA、ゲノムDNAまたは合成オリゴヌクレオチドを含んでなる請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 1 5】

発現が遺伝子のタンパク質レベルを測定することにより検出される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 1 6】

MHCクラス I 分子：HLA - A , B , C , G , E ) + ベータ 2 - ミクログロブリン ( B 2 M )、リボソームタンパク質：RPLs , RPSs を含んでなる 1 もしくは複数の MHC / リボソーム遺伝子：

ラクトランスフェリン：LTF、デフェンシン：DEAF1、細菌透過性増加タンパク質 ( BPI )、カセリシジン抗微生物タンパク質 ( CAMP ) を含んでなる 1 もしくは複数の好中球遺伝子；

40

RPLs、RPSs、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー ( EEFs )、核小体タンパク質：NPM1 , NOAL2 , NAP1L1 を含んでなる 1 もしくは複数のリボソームタンパク質遺伝子：

CD5 , CD6 , CD7 , CD26 , CD28 , CD96、リンホトキシンベータ、IL2 - 誘導性 T 細胞キナーゼ , TCF7 , T 細胞分化タンパク質 ma1 , GATA3 および STAT5B を含んでなる 1 もしくは複数の T 細胞表面マーカー遺伝子；および

抗ウイルス分子 ( OAS1 / 2 / 3 / L , GBP1 , G1P2 , EIF2AK2 / PKR , MX1 , PML )、ケモカイン ( CXCL10 / IP - 10 )、シグナル伝達分子 ( STAT1 , STAT2 , IRF7 , ISGF3G ) を含んでなる 1 もしくは複数のインターフェロン - 誘導性遺伝子：

50

からなる群から選択される 1 もしくは複数の遺伝子プローブを含んでなり、自己免疫疾患、ウイルス感染バクテリア感染、癌および移植拒絶の間を識別するために十分な疾患分析ツール。

【請求項 17】

1 もしくは複数の転写モジュールの代表である遺伝子の組み合わせを含んでなるカスタマイズされた遺伝子アレイを含んでなり、カスタマイズされた遺伝子アレイと接触する患者のトランスクリプトームが S L E の予知となる予知遺伝子アレイ。

【請求項 18】

S L E に関する治療に対する患者の応答がモニタリングされる、請求項 17 に記載のアレイ。

【請求項 19】

アレイが自己免疫疾患、ウイルス感染バクテリア感染、癌および移植拒絶の間を識別できる請求項 17 に記載のアレイ。

【請求項 20】

アレイが 2 以上の転写モジュールに組織化されている請求項 17 に記載のアレイ。

【請求項 21】

アレイが：

【表 1】

サブモジュール	プローブの組数	キーワードの選択	評価
M 1.1	69	Ig、免疫グロブリン、骨、骨髄、PreB, IgM, Mu	形質細胞:免疫グロブリン鎖(IGHM, IGJ, IGLL1, IGKC, IGHD)および形質細胞マーカーCD38 をコードする遺伝子;
M 1.2	96	血小板、接着、凝集、内皮、血管	血小板:血小板糖タンパク質(ITGA2B, ITGB3, GP6, GP1A/B)、およびPPPB(プロ血小板塩基性タンパク質)およびPF4(血小板因子4)のような血小板由来免疫メディエーターをコードする遺伝子;
M 1.3	47	イムノレセプター、BCR、B細胞、IgG	B細胞:B細胞表面マーカー(CD72, CD79A/B, CD19, CD22)および他のB細胞関連分子:初期B細胞因子(EBF)、B細胞リンカー(BLNK)およびBリンパ系チロシンキナーゼ(BLK)をコードする遺伝子;
M 1.4	87	複製、抑制、修復、CREB、リンパ系、TNF-アルファ	cAMP シグナル伝達経路のレギュレーターおよび標的(JUND, ATF4, CREM, PDE4, NR4A2, VIL2)、TNF-アルファ媒介型 NF-KB 活性化のリプレッサー(CYLD, ASK, TNFAIP3)をコードする遺伝子;
M 1.5	130	単球、樹状突起の、MHC、同時刺激、TLR4、MYD88	ミエロイド系:ミエロイド系細胞により発現される分子(CD86, CD163, FCGR2A)、病原体の認識(CD14, TLR2, MYD88)、およびTNFファミリーメンバー(TNFR2, BAFF)をコードする遺伝子;
M 1.6	28	亜鉛、フィンガー、P53、RAS	シグナル伝達分子、活性化STAT(PIAS1 およびPIAS2)の亜鉛フィンガー含有インヒビター、または活性化T細胞の核因子NFATC3をコードする遺伝子;
M 1.7	127	リボゾーム、翻訳、40S、60S、HLA	MHC/リボゾームタンパク質:MHCクラスI分子(HLA-A,B,C,G,E)+ベータ2-ミクログロブリン(B2M)またはリボゾームタンパク質(RPLs, RPSs)をコードする遺伝子;
M 1.8	86	代謝、生合成、複製、ヘリカーゼ	代謝酵素(GLS, NSF1, NAT1)およびDNA複製に関与する因子(PURA, TERF2, EIF2S1)をコードする遺伝子;
M 2.1	72	NK、キラー、細胞溶解、CD8、細胞媒介型、T細胞、CTL、IFN-g	細胞傷害性細胞:細胞傷害性T細胞およびNK細胞表面マーカー(CD8A, CD2, CD160, NKG7, KLRs)、細胞溶解分子(グランザイム、パーホリン、グラニュリシン)、ケモカイン(CCL5, XCL1)およびCTL/NK-細胞関連分子(CTSW)をコードする遺伝子;

10

20

30

40

【表 2】

サブモジュール	プローブの組数	キーワードの選択	評価
M 2.2	44	顆粒球、好中球、 防御、ミエロイド、 骨髄	好中球: 好中球顆粒に見いだされる内在性分子 (ラクトトランスフェリン: LTF、デフェンシン: DEAF1, 細菌透過性増加タンパク質: BPI、カセリシジン抗微生物タンパク質: CAMP…)をコードする遺伝子;
M 2.3	94	赤血球、赤、 貧血、グロビン、 ヘモグロビン	赤血球: ヘモグロビン遺伝子(HGBs)他の赤血球関連遺伝子(赤血球のアルキリン: ANK1、グリコホリン C: GYPC、ヒドロキシメチルビラン シンターゼ: HMBS、赤血球関連因子: ERAF)をコードする遺伝子;
M 2.4	118	リボヌクレオタン パク質、60S、 核小体、アッセン ブリー、延長	リボソームタンパク質: リボソームタンパク質 (RPLs, RPSs)、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー (EEFs)および核小体タンパク質(NPM1, NOAL2, NAP1L1)をコードする遺伝子;
M 2.5	242	腺癌、間質の、 間葉、樹状突起、 運動	免疫関連(CD40, CD80, CXCL12, IFNA5, IL4R)ならびに細胞骨格関連分子(ミオシン、サイトキネシスのデディケーター、シンデカン 2、プレキシシン C1, ジストロブレピン)をコードする遺伝子;
M 2.6	110	顆粒球、単球、 ミエロイド、ERK、 壊死	単球および好中球のようなミエロイド系細胞 (IGTB2/CD18,リンホトキシンベータ受容体, ミエロイド関連タンパク質 8/14 ホルミルペプチド受容体 1)の分子をコードする遺伝子;
M 2.7	43	キーワードは抽出 されない	ケモカイン様因子スーパーファミリー(CKLFSF8)の1もしくは複数のメンバーをコードする遺伝子;
M 2.8	104	リンパ腫、T細胞、 CD4, CD8, TCR、 胸腺、リンパ系、 IL2	T細胞: T細胞表面マーカー(CD5, CD6, CD7, CD26, CD28, CD96)およびリンパ系細胞により発現される分子(リンホトキシンベータ IL2-誘導性T細胞キナーゼ, TCF7, T細胞分化タンパク質 mal, GATA3, STAT5B)をコードする遺伝子;
M 2.9	122	ERK、トランス活性 化、細胞骨格、 MAPK, JNK	細胞骨格に関連する分子 (アクチン関連タンパク質 2/3, MAPK1, MAP3K1, RAB5A)をコードする遺伝子。また存在するのは、T細胞が発現する遺伝子(FAS, ITGA4/CD49D, ZNF1A1);
M 2.10	44	ミエロイド、 マクロファージ、 樹状突起、炎症、 インターロイキン	免疫関連細胞表面分子(CD36, CD86, LILRB)、サイトカイン(IL15)およびシグナル伝達分子(FYB, TICAM2-Toll-様受容体経路)をコードする遺伝子;
M 2.11	77	複製、抑制、 RAS、自己リン酸 化作用、 発癌遺伝子	キナーゼ (UHMK1, CSNK1G1, CDK6, WNK1, TAOK1, CALM2, PRKCI, ITPKB, SRPK 2, STK17B, DYRK2, PIK3R1, STK4, CLK4, PKN2) および RASファミリーメンバー(G3BP, RAB14, RAS A2, RAP2A, KRAS)をコードする遺伝子;

10

20

30

40

【表 3】

サブモジュール	プローブの組数	キーワードの選択	評価
M 3.1	80	ISRE、インフルエンザ、抗ウイルス、IFN-ガンマ、IFN-アルファ、インターフェロン	インターフェロン誘導性: インターフェロン誘導性遺伝子: 抗ウイルス分子(OAS1/2/3/L, GBP1, G1P2, EIF2AK2/PKR, MX1, PML)、ケモカイン (CXCL10/IP-10)、シグナル伝達分子(STAT1, STAT2, IRF7, ISGF3G)をコードする遺伝子;
M 3.2	230	TGF-ベータ、TNF、炎症、アポトーシスの、リポ多糖	炎症I: 炎症プロセスに関与する分子(例えば IL8, ICAM1, C5R1, CD44, PLAUR, IL1A, CXCL16)、およびアポトーシスのレギュレーター(MCL1, FOXO3A, RARA, BCL3/6/2A1, GADD45B)をコードする遺伝子;
M 3.3	230	顆粒球、炎症防御、酸化する、リソソームの	炎症II: 顆粒球-マクロファージCSFを誘導する、またはそれにより誘導性の(SPI1, IL18, ALOX5, ANPEP)、ならびにリソソーム酵素を誘導する、またはそれにより誘導性(PPT1, CTSS/S, CE S1, NEU1, ASAH1, LAMP2, CAST)の分子をコードする遺伝子;
M 3.4	323	キーワードは抽出されない	タンパク質ホスフェート(PPP1R12A, PTPRC, PPP1CB, PPM1B)およびホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)ファミリーメンバー(PIK3CA, PIK32A, PIP5K3)をコードする遺伝子;
M 3.5	19	キーワードは抽出されない	ヘモグロビン遺伝子(HBA1, HBA2, HBB)をコードする遺伝子;
M 3.6	233	補体、宿主酸化的、細胞骨格、T細胞	T細胞表面マーカー(CD101, CD102, CD103)、ならびに血中白血球の回りで偏在的に発現される分子(CXCR1: フラクタルキン受容体, CD47, P-セレクトインリガンド)をコードする遺伝子;
M 3.7	80	スプライソソーム、メチル化、ユビキチン、ベーターカテニン	プロテアソームサブユニット(PSMA2/5, PSMB5/8); ユビキチンタンパク質リガーゼ HIP2, STUB1、ならびにユビキチンリガーゼ複合体(SUGT1)の成分をコードする遺伝子を含む;
M 3.8	182	CDC、TCR、CREB、グリコシラーゼ	幾つかの酵素: アミノメチルトランスフェラーゼ、アルギニルトランスフェラーゼ、アスパラギンシントターゼ、ジアシルグリセロールキナーゼ、イノシトールホスファターゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヘリカーゼをコードする遺伝子; および
M 3.9	261	クロマチン、チェックポイント、複製、トランス活性化	プロテインキナーゼ (PRKPIR, PRKDC, PRKCI)およびホスファターゼ (PTPLB, PPP1R8/2CB)をコードする遺伝子。また RAS 癌遺伝子ファミリーメンバーおよび NK 細胞受容体 2B4 (CD244)も含む;

10

20

30

40

から選択される1もしくは複数のサブモジュールを含んでなる3以上の転写モジュールに組織化され、ここで1もしくは複数の遺伝子に特異的に結合するプローブが、3以上のモジュール内から選択され、そして全身性エリテマトーデスの表示である請求項17に記載

50

のアレイ。

【請求項 2 2】

臨床試験の患者を選択するための方法であって：

予想される患者のトランスクリプトームを得；

トランスクリプトームを、臨床試験で処置される疾患または状態の表示となる 1 もしくは複数の転写モジュールに対して比較し；そして

患者が臨床試験の良い候補となる見込を、臨床試験での成功と相関する 1 もしくは複数の転写モジュール内の患者のトランスクリプトームで発現される 1 もしくは複数の遺伝子の存在、不存在またはレベルに基づき決定する、  
工程を含んでなる上記方法。

10

【請求項 2 3】

各モジュールがサンプル中の転写産物の比率の和と相関するベクターを含んでなる、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

各モジュールがベクターを含んでなり、そして 1 もしくは複数の疾患または状態がこの 1 もしくは複数のベクターと関連する、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

各モジュールが、各モジュール内の 1 もしくは複数の遺伝子の発現レベルと相関するベクターを含んでなる、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 6】

各モジュールがベクターを含んでなり、そして選択されるモジュールが：

転写モジュール

MHC クラス I 分子：HLA - A , B , C , G , E ) + ベータ 2 - ミクログロブリン ( B 2 M )、リボゾームタンパク質：RPLs , RPSs を含んでなる 1 もしくは複数の MHC / リボゾーム遺伝子：

ラクトランスフェリン：LTF、デフェンシン：DEAF1、細菌透過性増加タンパク質 ( BPI )、カセリシジン抗微生物タンパク質 ( CAMP ) を含んでなる 1 もしくは複数の好中球遺伝子；

RPLs , RPSs、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー ( EEFs )、核小体タンパク質：NPM1 , NOAL2 , NAP1L1 を含んでなる 1 もしくは複数のリボゾームタンパク質遺伝子：

CD5 , CD6 , CD7 , CD26 , CD28 , CD96、リンホトキシンベータ、IL2 - 誘導性 T 細胞キナーゼ , TCF7 , T 細胞分化タンパク質 ma1 , GATA3 および STAT5B を含んでなる 1 もしくは複数の T 細胞表面マーカー遺伝子；

抗ウイルス分子 ( OAS1 / 2 / 3 / L , GBP1 , G1P2 , EIF2AK2 / PKR , MX1 , PML )、ケモカイン ( CXCL10 / IP - 10 )、シグナル伝達分子 ( STAT1 , STAT2 , IRF7 , ISGF3G ) を含んでなる 1 もしくは複数のインターフェロン - 誘導性遺伝子；

およびその組み合わせであり、転写モジュールが SLE 患者を他の患者と区別するために使用される、請求項 2 2 に記載の方法。

40

【請求項 2 7】

固体支持体上に固定化された核酸プローブのアレイであり、1 もしくは複数の疾患の間を識別するために差次的に発現する遺伝子を十分な比率で提供する 1 もしくは複数のモジュールから十分なプローブを含んでなり、プローブが表 4 から選択される上記アレイ。

【請求項 2 8】

SLE の予知となるプローブの組み合わせを含んでなり、そしてプローブが：

転写モジュール

MHC クラス I 分子：HLA - A , B , C , G , E ) + ベータ 2 - ミクログロブリン ( B 2 M )、リボゾームタンパク質：RPLs , RPSs を含んでなる 1 もしくは複数の MHC / リボゾーム遺伝子：

50

ラクトトランスフェリン：L T F、デフェンシン：D E A F 1、細菌透過性増加タンパク質（B P I）、カセリシジン抗微生物タンパク質（C A M P）を含んでなる1もしくは複数の好中球遺伝子；

R P L s、R P S s、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー（E E F s）、核小体タンパク質：N P M 1、N O A L 2、N A P 1 L 1を含んでなる1もしくは複数のリボソームタンパク質遺伝子；

C D 5、C D 6、C D 7、C D 2 6、C D 2 8、C D 9 6、リンホトキシンベータ、I L 2 - 誘導性T細胞キナーゼ、T C F 7、T細胞分化タンパク質m a 1、G A T A 3およびS T A T 5 Bを含んでなる1もしくは複数のT細胞表面マーカー遺伝子；

抗ウイルス分子（O A S 1 / 2 / 3 / L、G B P 1、G 1 P 2、E I F 2 A K 2 / P K R、M X 1、P M L）、ケモカイン（C X C L 1 0 / I P - 1 0）、シグナル伝達分子（S T A T 1、S T A t 2、I R F 7、I S G F 3 G）を含んでなる1もしくは複数のインターフェロン - 誘導性遺伝子；

から選択されるカスタマイズされた遺伝子アレイを含んでなる予知遺伝子アレイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

#### 本発明の技術分野

本発明は一般的には全身性エリテマトーデスに関する診断の分野、そしてより詳細には処置前、最中および後の全身性エリテマトーデス疾患の進行を診断、予知およびモニタリングするためのシステム、方法および装置に関する。

【0002】

#### 長い表

本発明には以下の表を含み、その全内容は引用により本明細書に編入する。このファイルエリアを含む2枚のCDのコピーを添付する。

【発明の背景】

【0003】

本発明の範囲を限定するわけではないが、発明の背景は疾患の進行の診断、予知およびモニタリングと関連して記載される。

【0004】

全身性エリテマトーデス（S L E）は、先天的および適応免疫の調節不全を特徴とする自己免疫疾患である（非特許文献1～6）。この疾患過程は、予知できない再発性の発病および患者の状態の悪化を特徴とする。現在の処置は非特異的な免疫抑制に基づき、これは治療的介入のための新規標的を同定する必要性を強調する。マウスおよびヒトを対象とした実験により、有力な抗ウイルス性サイトカインであるインターフェロン - アルファがS L E免疫系の異常性に寄与し、そして1つのそのような新規標的を表しているかもしれないという強い証拠が提供された（非特許文献7～9）。

【0005】

しかし新規治療薬を試験する臨床試験は、S L Eの臨床的発現の異質性、および疾患活性の信頼できるマーカーの欠如、および末端臓器の傷害により阻まれている。S L Eの全般的疾患活性の少なくとも6つの複合的尺度を利用できる（非特許文献10～15）。これらの手段（i n s t r u m e n t）は疾患活性を記録し、そして定量するための測定基準を提供し、そして臨床試験に利用されてきた。しかし含まれる尺度の中には得ることが容易でないものもある。逆に臨床的な疾患の異質性を考えると、すべてのS L Eの発現がこれらの手段でコンピューター処理されるわけではなく、患者の状態の全体的評価を難しくしている。したがって、全体的な疾患活性を評価するために、例えば疾患の進行をモニタリングするためにより良いシステムを開発する重要な必要性がある。

【0006】

S L E疾患 - 活性、および個体のS L E状態を特徴付ける構成的症状の変動を決定および追跡する現在の方法には、例えばS L E疾患活性指数（S L E D A I）、全身性狼瘡活

10

20

30

40

50

性測定 (S L A M)、患者の視覚的アナログスケール (患者 V A S) および K r u p p の疲労強度スコア (K F S S) がある。初期評価後の S L E D A I、K F S S、V A S および S L A M に関する値、および治療を始める前の S L E D A I、K F S S、V A S および S L A M に関するベースライン値の間の差異が測定される。

【 0 0 0 7 】

S L E はまず子供を持つ年齢の女性に影響を及ぼし、20%までの患者が18歳未満と診断されている。提示、臨床的症候および免疫学的所見は、小児および成人 S L E 患者で類似する。しかし小児は成人にくらべて、より重篤な発症時の疾患、臓器が関与する高い発生数、および活発な臨床的過程を有する傾向がある (非特許文献 16 ~ 18)。小児における S L E の診断は、成人で使用するものと同じ基準に基づく (非特許文献 19、20)。

10

【 0 0 0 8 】

血清中の抗核抗体 (A N A) の存在は、S L E における全般的所見である。しかし正常集団の 5 ~ 10% までが低い力価で陽性の A N A 検査を提示する (非特許文献 21)。慢性的な筋骨格痛に罹患している患者が陽性の A N A 力価を有する場合 (非特許文献 22)、それらは S L E と誤診断され、そして不必要な検査および長い処置を受ける恐れがある。1つのそのような症状は成人および小児の両方に影響を及ぼす状態の線維筋痛症である (非特許文献 23)。

【 参 考 文 献 】

【 0 0 0 9 】

【非特許文献 1】Carroll, M. C. 2004. 全身性エリテマトーデスにおける先天免疫の保護的役割 (A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus). Nat Rev Immunol 4: 825 - 831.

20

【非特許文献 2】Manderson, A. P., Botto, M., and Walport, M. J. 2004. 全身性エリテマトーデスの発症における補体の役割 (The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus). Annu Rev Immunol 22: 431 - 456.

【非特許文献 3】Manzi, S., Ahearn, J. M., and Salmon, J. 2004. 補体に対する新たな洞察; 全身性エリテマトーデスにおける疾患活性の損傷メディエーターおよびマーカー (New insights into complement: a mediator of injury and marker of disease activity in systemic lupus erythematosus). Lupus 13: 298 - 303.

30

【非特許文献 4】Nambiar, M. P., Juang, Y. T., Krishnan, S., and Tsokos, G. C. 2004. ヒト全身性エリテマトーデスにおける TCR ゼータ鎖のダウンレギュレーションおよび T 細胞シグナル伝達異常の分子力学の詳細な分析 (Dissecting the molecular mechanism of TCR zeta chain downregulation and T cell signaling abnormalities in human systemic lupus erythematosus). Int Rev Immunol 23: 245 - 263.

40

【非特許文献 5】Kong, P. L., Odegard, J. M., Bouzazah, F., Choi, J. Y., Eardley, L. D., Zielinski, C. E., and Craft, J. E. 2003. 全身性自己免疫における内因性 T 細胞の欠損 (Intrinsic T cell defects in systemic autoimmunity). Ann N Y Acad Sci 987: 60 - 67.

【非特許文献 6】Grammer, A. C., and Lipsky, P. E. 2003. 全身性エリテマトーデスにおける B 細胞異常 (B cell abnormaliti

50

es in systemic lupus erythematosus). Arthritis Res Ther 5 Suppl 4: S22 - 27.

【非特許文献7】Jorgensen, T. N., Gubbels, M. R., and Kotzin, B. L. 2003. マウス狼瘡におけるI型インターフェロンと疾患の遺伝的基礎との間の関連 (Links between type I interferons and the genetic basis of disease in mouse lupus). Autoimmunity 36: 491 - 502.

【非特許文献8】Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. 2001. 全身性エリテマトーデスにおけるIFN-アルファによる樹状細胞分化の誘導 (Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus). Science 294: 1540 - 1543.

【非特許文献9】Santiago-Raber, M. L., Baccala, R., Haraldsson, K. M., Choubey, D., Stewart, T. A., Kono, D. H., and Theofilopoulos, A. N. 2003. I型インターフェロン受容体の欠損は、NZBマウスにおける狼瘡様の疾患を減らす (Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice). J Exp Med 197: 777 - 788.

【非特許文献10】Bencivelli, W., Vitali, C., Isenberg, D. A., Smolen, J. S., Snaitth, M. L., Sciuto, M., and Bombardieri, S. 1992. 全身性エリテマトーデスにおける疾患活性: リューマチ学調査に関するヨーロッパのワークショップのコンセンサススタディグループの報告。III. コンピューター処理した臨床チャートの開発および異なる疾患活性の指数の比較へのその応用 (Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of disease activity). The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. Clin Exp Rheumatol 10: 549 - 554.

【非特許文献11】Hay, E. M., Bacon, P. A., Gordon, C., Isenberg, D. A., Maddison, P., Snaitth, M. L., Symmons, D. P., Viner, N., and Zoma, A. 1993. BILAG指数: 全身性エリテマトーデスにおける臨床的疾患活性を測定するための信頼性のある、そして有効な手段 (The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus). Q J Med 86: 447 - 458.

【非特許文献12】Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Caron, D., and Chang, C. H. 1992. SLEDAIの誘導化。狼瘡患者に関する疾患活性指数。SLEにおける予知実験委員会 (Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE). Arthritis Rheum 35: 630 - 640.

10

20

30

40

50

- 【非特許文献13】Liang, M. H., Socher, S. A., Larson, M. G., and Schur, P. H. 1989. 全身性エリテマトーデスにおける疾患活性の臨床的評価のための6つのシステムの信頼性および有効性 (Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus). *Arthritis Rheum* 32:1107-1118.
- 【非特許文献14】Bae, S. C., Koh, H. K., Chang, D. K., Kim, M. H., Park, J. K., and Kim, S. Y. 2001. 全身性エリテマトーデスにおける臨床的疾患活性を測定するために改定された全身性狼瘡活性尺度 (SLAM-R) の信頼性および有効性 (Reliability and validity of systemic lupus activity measure-revised (SLAM-R) for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus). *Lupus* 10:405-409. 10
- 【非特許文献15】Petri, M., Buyon, J., and Kim, M. 1999. SLE臨床試験における主発赤の分類および定義 (Classification and definition of major flares in SLE clinical trials). *Lupus* 8:685-691.
- 【非特許文献16】Jimenez, S., Cervera, R., Font, J., and Ingelmo, M. 2003. 全身性エリテマトーデスの疫学 (The epidemiology of systemic lupus erythematosus). *Clin Rev Allergy Immunol* 25:3-12. 20
- 【非特許文献17】Rood, M. J., ten Cate, R., van Suijlekom-Smit, L. W., den Ouden, E. J., Ouwkerk, F. E., Breedveld, F. C., and Huizinga, T. W. 1999. 小児発生の全身性エリテマトーデス: 31名の患者の臨床的提示および予後 (Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus: clinical presentation and prognosis in 31 patients). *Scand J Rheumatol* 28:222-226. 30
- 【非特許文献18】Brunner, H. I., Silverman, E. D., To, T., Bombardier, C., and Feldman, B. M. 2002. 小児発生の全身性エリテマトーデスにおける傷害に関するリスクファクター: 累積的疾患活性および薬物使用は、疾患の傷害を予想する (Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: cumulative disease activity and medication use predict disease damage). *Arthritis Rheum* 46:436-444.
- 【非特許文献19】Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N., and Winchester, R. J. 1982. 全身性エリテマトーデスの分類に関する1982の改定された基準 (The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus). *Arthritis Rheum* 25:1271-1277. 40
- 【非特許文献20】Hochberg, M. C. 1997. 全身性エリテマトーデスの分類に関して、アメリカリウマチ学大学が改定した基準の更新 (Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of sys 50

temic lupus erythematosus). Arthritis Rheum 40:1725.

【非特許文献21】Tan, E. M., Feltkamp, T. E., Smolen, J. S., Butcher, B., Dawkins, R., Fritzler, M. J., Gordon, T., Hardin, J. A., Kalden, J. R., Lahita, R. G., et al. 1997. 「健康」な個体における抗核抗体の範囲 (Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals). Arthritis Rheum 40:1601-1611.

【非特許文献22】Al-Allaf, A. W., Ottewell, L., and PULLAR, T. 2002. 線維筋痛症候群の患者における陽性の抗核抗体の普及および重要性: 2~4年間の追跡 (The prevalence and significance of positive antinuclear antibodies in patients with fibromyalgia syndrome: 2-4 years' follow-up). Clin Rheumatol 21:472-477.

【非特許文献23】Staud, R. 2004. 線維筋痛: 原因を知っていますか? (Fibromyalgia pain: do we know the source?) Curr Opin Rheumatol 16:157-163.

【発明の開示】

【0010】

#### 発明の要約

ゲノム調査は、評判の悪いノイズ、解釈が難しく、しかも研究室および平板全体を十分に比較しない転写データの分析で重大な困難に直面している。本発明者は分析の初期段階で生物学的に関連する遺伝子の選択を強調する分析法を開発し、これはマイクロアレイ平板間の矛盾を克服する分析モジュールに統合される。開発された転写モジュールは、膨大な遺伝子発現データベースの分析に使用することができる。この分析から派生する結果は、容易に解釈でき、そして市販のマイクロアレイ平板全体で観察される高い再現性の程度により証明されるように特に強固 (robust) である。

【0011】

この分析法に関する応用は、大きな組のPBMC転写プロファイルを調査することを介して具体的に説明される。4742遺伝子に再度グループ分けされる28の転写モジュールが同定された。本発明を使用することにより、疾患はモジュラーレベルで測定される例えば血中白血球における転写の変化の組み合わせにより独自に特徴付けられることを証明することが可能である。実際、血中白血球の転写レベルにおけるモジュール・レベルの変化は、疾患またはサンプルの分子指紋を構成する。

【0012】

本発明は、例えば任意の生物学系 (例えば末梢血単核細胞 (PBMC)、血液細胞、糞細胞、腹膜細胞、固体の臓器生検材料、切開した腫瘍、一次細胞、細胞株、細胞クローン等) のモジュラー転写成分を特徴付けるために広い範囲の応用を有する。この取り組みを介して集められたモジュールのPBMC転写データは、疾患の重篤度の分子診断的、予知的評価、薬剤処置に対する応答、薬剤毒性等に使用することができる。この取り組みを使用して処理した他のデータは、例えば薬剤化合物の機械作用的実験またはスクリーニングに使用することができる。実際に、データ分析法およびマイニングアルゴリズムは、一般的な遺伝子発現データ分析ソフトウェアで実施することができ、そしてさらに新たな疾患または状態に特異的なモジュールを見だし、開発し、そして試験するために使用することができる。また本発明は薬理遺伝学、分子診断、バイオインフォマティクス等にも使用することができる。ここで詳細な発現データを使用して臨床試験中に得ることができる結果を改善することができる (例えばサンプル群を改善し、またはそれからさらに選択することにより)。

10

20

30

40

50

## 【0013】

さらに詳細には本発明は、患者のトランスクリプトームを得：疾患または状態の指標となる1もしくは複数の転写モジュールに基づきトランスクリプトームを分析し：そして患者の疾患または状態を、1もしくは複数の転写モジュールのトランスクリプトーム内の遺伝子発現の存在、不存在またはレベルに基づき決定する、疾患または状態を診断するためのアレイ、装置、システムおよび方法を含む。転写モジュールは：疾患または状態毎に合う各クラスターからそのモジュールについての遺伝子を選択し；選択した遺伝子を分析から除き；そして疾患または状態の亜分画中に集まる遺伝子について遺伝子発現値を選択する工程を繰り返すことにより1もしくは複数の転写モジュールに関する遺伝子発現を反復して選択し；そしてすべての遺伝子クラスターが使用し尽されるまで、各クラスターについてモジュールの作成を繰り返し反復することにより得ることができる。

10

## 【0014】

本発明と共に使用するために選択されるクラスターの例には、限定するわけではないが発現値クラスター、キーワードクラスター、代謝クラスター、疾患クラスター、感染クラスター、移植クラスター、シグナル伝達クラスター、転写クラスター、複製クラスター、細胞サイクルクラスター、s i R N Aクラスター、m i R N Aクラスター、ミトコンドリアクラスター、T細胞クラスター、B細胞クラスター、サイトカインクラスター、リンホカインクラスター、熱ショッククラスターおよびその組み合わせを含む。本発明を使用して分析するため疾患または状態の例には、例えば自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、癌および移植拒絶がある。さらに詳細には、分析のための疾患は1もしくは複数の以下の状態：全身型若年性特発性関節炎、全身性エリテマトーデス、I型糖尿病、肝移植受容者、黒色腫患者および大腸菌、黄色ブドウ球菌のような細菌に感染している患者、インフルエンザAのようなウイルスに感染している患者、およびそれらの組み合わせから選択され得る。特異的アレイはさらに、バイオテロ物質に関連する特異的な疾患または状態を検出するために作成することができる。

20

## 【0015】

本発明を使用して分析することができる細胞には、例えば末梢血単核細胞(P B M C)、血液細胞、胎児細胞、腹膜細胞、固体の臓器生検材料、切除腫瘍、一次細胞、細胞株、細胞クローンおよびそれらの組み合わせを含む。本明細書に記載する分析ツールは、種々の生物、例えばマウス、ラット、イヌ、ウシ、ヒツジ、ウマ、縞模様の魚等の特定のモジュール内の遺伝子発現を分析するために使用することができる。細胞は単一細胞、細胞の集合、組織、細胞培養物、例えば血液のような体液中の細胞でよい。細胞は組織生検材料、1もしくは複数の分類された細胞群、細胞培養物、細胞クローン、形質転換細胞、生検材料または単一細胞から得ることができる。細胞のタイプは例えば脳、肝臓、心臓、腎臓、肺、脾臓、網膜、骨、ニューロンの、リンパ節、内分泌腺、生殖器官、血液、神経、血管組織および嗅覚上皮細胞でよい。細胞が単離された後、これら細胞からのこれらm R N Aを得、そして個々の遺伝子発現レベルの分析を例えばプローブアレイ、P C R、定量的P C R、ビーズに基づくアッセイおよびそれらの組み合わせを使用して行う。個々の遺伝子発現レベルの分析はさらに、逆転写酵素用の鋳型として細胞から集めたm R N Aから作成したc D N Aを使用して、固体支持体上の核酸のハイブリダイゼーションを使用して行うことができる。

30

40

## 【0016】

本発明は多変量の遺伝子発現分析を使用して、全身性エリテマトーデス(S L E)の予知、診断およびモニタリングにサンプルを分析するためのシステムおよび方法を含む。残る遺伝子発現の差異は、対合しない変動に対する高度な信頼性に帰することができる。このように同定された遺伝子発現の差異は、例えば疾患を診断し、生理学的状態を同定し、薬剤をデザインし、そして治療をモニタリングするために使用することができる。

## 【0017】

1つの態様では、本発明は本明細書で以下に記載するような：

## 【0018】

50

【表 1】

	転写産物の総数		転写産物の数		%転写産物	
	モジュールあたり		過剰発現	抑制発現	過剰発現	抑制発現
M1.1	76		34	0	45	0
M1.7	129		0	101	0	78
M2.1	95		2	20	2	21
M2.2	49		16	0	33	0
M2.3	148		39	4	26	3
M2.4	133		0	102	0	77
M2.5	315		3	86	1	27
M2.6	165		38	3	23	2
M2.7	71		1	22	1	31
M2.8	141		0	59	0	42
M3.1	122		111	0	91	0

10

20

## 【0019】

モジュール内の遺伝子のような、本明細書に記載する遺伝子モジュールの一部を形成する1もしくは複数のバイオマーカーの発現レベルを測定することにより、SLEに罹り易いヒト個体の同定法を含む。

## 【0020】

以下のモジュールは、この例で使用する文字および数字により列举されるが、モジュールには：M1.7、M2.2；M2.7；およびM3.1として挙げられるモジュールを形成する1もしくは複数の列举する遺伝子（およびそれらの相補鎖または等価物）を含む。それだけでは、モジュールの限界は、1もしくは複数の列举する遺伝子、例えば以下の遺伝子の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、50、75、100以上であり、これらは1もしくは複数の遺伝子の発現についてトランスクリプトームを分析するために使用でき、これらは次いで1もしくは複数の発現ベクターに処理される1もしくは複数の以下のモジュールに分けられ、これは診断、予知そしてさらに疾患の処置およびモニタリングのために、特定の自己炎症、自己免疫または他の疾患（遺伝的または後天的）が疑われる患者における発現レベル（およびその変化）の複合であり；モジュールには：

30

モジュールM1.7は1もしくは複数の以下の遺伝子または遺伝子断片を含む：UniGene ID；Hs.406683；Hs.514581；Hs.546356；Hs.374553；Hs.448226；Hs.381172；Hs.534255；Hs.406620；Hs.534255；Hs.410817；Hs.136905；Hs.546394；Hs.419463；Hs.5308；Hs.514581；Hs.387804；Hs.546286；Hs.300141；Hs.356366；Hs.433427；Hs.533624；Hs.546356；Hs.370504；Hs.433701；Hs.153177；Hs.150580；Hs.514581；Hs.356794；Hs.419463；Hs.433427；Hs.469473；Hs.380953；Hs.410817；Hs.421257；Hs.408054；Hs.433529；Hs.458476；Hs.439552；Hs.156367；Hs.546291；Hs.546290；Hs.514581；Hs.144835；Hs.439552；Hs.356502；Hs.397609；Hs.446628；Hs.5

40

50

4 6 3 5 6 ; H s . 2 6 5 1 7 4 ; H s . 4 2 5 1 2 5 ; H s . 3 7 4 5 9 6 ; H s . 3  
 8 1 1 2 6 ; H s . 3 8 1 0 6 1 ; H s . 4 0 6 6 2 0 ; H s . 5 3 3 9 7 7 ; H s . 4  
 4 7 6 0 0 ; H s . 1 4 8 3 4 0 ; H s . 4 2 1 9 0 7 ; H s . 4 4 8 2 2 6 ; H s . 4  
 1 0 8 1 7 ; H s . 1 1 9 5 9 8 ; H s . 4 3 3 4 2 7 ; H s . 4 1 0 8 1 7 ; H s . 8  
 1 0 2 ; H s . 4 4 6 6 2 8 ; H s . 3 5 6 5 7 2 ; H s . 3 8 1 1 2 3 ; H s . 5 1 5  
 3 2 9 ; H s . 4 0 8 0 5 4 ; H s . 4 8 3 8 7 7 ; H s . 3 8 6 3 8 4 ; H s . 3 3 7  
 7 6 6 ; H s . 4 0 8 0 7 3 ; H s . 5 4 6 2 8 9 ; H s . 3 7 4 5 9 6 ; H s . 5 1 2  
 1 9 9 ; H s . 1 1 9 5 9 8 ; H s . 4 9 9 8 3 9 ; H s . 4 4 6 5 8 8 ; H s . 3 5 6  
 5 7 2 ; H s . 3 9 7 6 0 9 ; H s . 3 5 6 5 7 2 ; H s . 1 4 4 8 3 5 ; H s . 5 1 5  
 3 2 9 ; H s . 5 3 4 8 3 3 ; H s . 3 7 4 5 8 8 ; H s . 1 4 4 8 3 5 ; H s . 8 0 5  
 4 5 ; H s . 5 4 6 3 5 6 ; H s . 4 0 0 2 9 5 ; H s . 1 1 9 5 9 8 ; H s . 4 0 8 0  
 7 3 ; H s . 4 1 2 3 7 0 ; H s . 4 0 1 9 2 9 ; H s . 4 2 5 1 2 5 ; H s . 3 7 4 5  
 8 8 ; H s . 3 7 4 5 8 8 ; H s . 3 5 6 3 6 6 ; H s . 1 8 6 3 5 0 ; および / または  
 H s . 1 8 6 3 5 0 ; および

10

M 2 . 2 は 1 もしくは複数の以下の遺伝子または遺伝子断片を含む ; U n i G e n e  
 I D ; H s . 5 1 3 7 1 1 ; H s . 3 7 5 1 0 8 ; H s . 1 7 6 6 2 6 ; H s . 2 9 6 2  
 ; H s . 4 1 ; H s . 9 9 8 6 3 ; H s . 5 3 0 0 4 9 ; H s . 5 1 1 2 0 ; H s . 4 8  
 0 0 4 2 ; H s . 3 6 9 7 7 ; H s . 2 9 4 1 7 6 ; H s . 5 2 9 0 1 9 ; H s . 2 5 8  
 2 ; H s . 5 5 0 8 5 3 ; H s . 5 2 9 5 1 7 ; および / または H s . 2 0 4 2 3 8 ; お  
 よび ;

20

M 2 . 4 は 1 もしくは複数の以下の遺伝子または遺伝子断片を含む ; H s . 5 1 8 8 2  
 7 ; H s . 8 1 0 2 ; H s . 1 9 0 9 6 8 ; H s . 5 0 8 2 6 6 ; H s . 5 2 3 9 1 3 ;  
 H s . 4 3 7 5 9 4 ; H s . 5 1 5 5 9 8 ; H s . 5 4 7 8 0 ; H s . 5 3 4 3 8 4 ; H  
 s . 5 2 7 1 0 5 ; H s . 5 2 2 8 8 5 ; H s . 4 6 2 3 4 1 ; H s . 1 2 7 6 1 0 ; H  
 s . 4 0 8 0 1 8 ; H s . 3 8 1 2 1 9 ; H s . 6 9 1 7 ; H s . 1 0 9 7 9 8 ; H s .  
 4 9 7 5 8 1 ; H s . 3 6 9 7 2 8 ; H s . 4 3 2 4 8 5 ; H s . 3 1 4 3 5 9 ; H s .  
 4 0 9 1 4 0 ; H s . 5 2 9 7 9 8 ; H s . 4 7 7 0 2 8 ; H s . 1 0 7 0 0 3 ; H s .  
 5 2 8 6 6 8 ; H s . 3 1 4 3 5 9 ; H s . 6 9 1 7 ; H s . 3 3 3 1 2 0 ; H s . 5 0  
 0 8 2 2 ; H s . 1 3 1 2 5 5 ; H s . 4 6 9 9 2 5 ; H s . 4 1 0 8 1 7 ; H s . 2 7  
 7 5 1 7 ; H s . 5 2 9 6 3 1 ; H s . 3 6 7 9 0 0 ; H s . 4 0 8 0 5 4 ; H s . 4 6  
 7 2 8 4 ; H s . 1 1 1 0 9 9 ; H s . 3 7 8 1 0 3 ; H s . 1 0 8 3 3 2 ; H s . 3 9  
 7 6 0 9 ; H s . 8 0 5 4 5 ; H s . 5 2 9 6 3 1 ; H s . 4 7 2 5 5 8 ; H s . 5 1 9  
 4 5 2 ; H s . 5 1 6 0 2 3 ; H s . 4 3 8 4 2 9 ; H s . 5 1 5 4 7 2 ; H s . 5 1 2  
 6 7 5 ; H s . 4 3 8 4 2 9 ; H s . 3 1 4 3 5 9 ; H s . 7 5 0 5 6 ; H s . 4 8 2 5  
 2 6 ; H s . 3 3 3 3 8 8 ; H s . 4 8 3 3 0 5 ; H s . 5 1 5 3 2 9 ; H s . 2 8 8 8  
 5 6 ; H s . 5 4 6 2 8 8 ; H s . 4 8 3 3 0 5 ; H s . 5 3 4 3 4 6 ; H s . 5 2 8 4  
 3 5 ; H s . 3 8 1 2 1 9 ; H s . 4 6 9 9 2 5 ; H s . 1 7 2 7 9 1 ; H s . 1 9 0 9  
 6 8 ; H s . 1 8 2 8 2 5 ; H s . 4 9 2 5 9 9 ; H s . 4 0 6 6 2 0 ; H s . 5 4 9 1  
 3 0 ; H s . 5 3 2 3 5 9 ; H s . 5 3 4 3 4 6 ; H s . 4 2 1 2 5 7 ; H s . 5 1 1 8  
 3 1 ; H s . 3 8 0 9 2 0 ; H s . 3 1 1 6 4 0 ; H s . 5 4 6 3 5 6 ; H s . 1 1 9 5  
 9 8 ; H s . 4 0 5 5 9 0 ; H s . 1 7 8 5 5 1 ; H s . 4 9 9 8 3 9 ; H s . 1 4 8 3  
 4 0 ; H s . 4 8 3 3 0 5 ; H s . 5 0 5 7 3 5 ; H s . 3 8 1 2 1 9 ; H s . 2 9 9 0  
 0 2 ; H s . 5 3 2 3 5 9 ; H s . 5 6 6 2 ; H s . 5 1 5 3 2 9 ; H s . 4 0 8 0 7 3  
 ; H s . 5 1 5 0 7 0 ; H s . 4 4 8 2 2 6 ; H s . 5 1 5 3 2 9 ; H s . 5 1 1 5 8 2  
 ; H s . 4 2 1 6 0 8 ; H s . 1 8 6 3 5 0 ; H s . 5 2 9 7 9 8 ; および / または H s  
 . 2 9 4 0 9 4 ; および ;

30

40

M 2 . 8 は 1 もしくは複数の以下の遺伝子または遺伝子断片を含む ; H s . 3 9 7 8 9  
 1 ; H s . 4 3 8 8 0 1 ; H s . 1 2 5 0 3 6 ; H s . 2 1 0 8 9 1 ; H s . 2 2 0 6 2  
 9 ; H s . 3 7 6 2 0 8 ; H s . 3 1 6 9 3 1 ; H s . 1 9 6 9 8 1 ; H s . 2 7 1 2 7  
 2 ; H s . 3 9 7 8 9 1 ; H s . 7 9 4 6 ; H s . 5 0 5 3 2 6 ; H s . 3 6 9 5 8 1 ;

50

Hs . 5 8 6 8 5 ; Hs . 7 2 3 6 ; Hs . 1 7 1 0 9 ; Hs . 4 9 1 4 3 ; Hs . 5 0  
 5 8 0 6 ; Hs . 6 0 3 3 9 ; Hs . 1 3 2 6 2 ; Hs . 2 2 3 8 0 ; Hs . 2 3 3 0 4  
 4 ; Hs . 1 3 3 3 9 7 ; Hs . 4 4 5 4 8 9 ; Hs . 6 0 3 3 9 ; Hs . 4 2 8 2 1 4  
 ; Hs . 4 3 1 4 9 8 ; Hs . 5 3 3 9 9 4 ; Hs . 5 3 3 9 9 4 ; Hs . 4 9 8 3 1 7  
 ; Hs . 5 3 3 9 9 4 ; Hs . 5 1 7 7 1 7 ; Hs . 1 7 3 1 3 5 ; Hs . 5 2 2 6 7 9  
 ; Hs . 4 4 6 1 4 9 ; Hs . 5 2 5 7 0 0 ; Hs . 5 1 9 5 8 0 ; Hs . 4 8 1 7 0 4  
 ; Hs . 3 7 9 4 1 4 ; Hs . 1 2 5 0 3 6 ; Hs . 4 4 0 7 7 6 ; Hs . 4 7 5 6 0 2  
 ; Hs . 1 7 3 1 3 5 ; Hs . 4 8 1 7 0 4 ; Hs . 1 6 7 0 8 7 ; Hs . 1 4 2 0 2 3  
 ; Hs . 5 2 4 1 3 4 ; Hs . 9 8 3 0 9 ; Hs . 4 3 3 7 0 0 ; Hs . 4 8 0 8 3 7 ;  
 Hs . 5 0 1 9 ; Hs . 5 2 5 7 0 0 ; Hs . 9 4 2 2 9 ; Hs . 4 4 6 1 4 9 ; Hs . 10  
 5 0 2 7 1 0 ;

M 3 . 1 は 1 もしくは複数の以下の遺伝子または遺伝子断片を含む： Hs . 2 7 6 9 2  
 5 ; Hs . 9 8 2 5 9 ; Hs . 4 7 8 2 7 5 ; Hs . 2 7 3 3 3 0 ; Hs . 1 7 5 1 2 0  
 ; Hs . 1 9 0 6 2 2 ; Hs . 1 7 5 1 2 0 ; Hs . 4 1 5 5 3 4 ; Hs . 6 2 6 6 1 ;  
 Hs . 3 4 4 8 1 2 ; Hs . 1 4 5 1 5 0 ; Hs . 5 1 4 8 ; Hs . 3 0 2 1 2 3 ; Hs  
 . 6 5 6 4 1 ; Hs . 6 2 6 6 1 ; Hs . 8 6 7 2 4 ; Hs . 1 2 0 3 2 3 ; Hs . 3 7  
 0 5 1 5 ; Hs . 2 9 1 0 0 0 ; Hs . 6 2 6 6 1 ; Hs . 1 1 8 1 1 0 ; Hs . 1 3 1  
 4 3 1 ; Hs . 4 6 4 4 1 9 ; Hs . 6 5 6 4 1 ; Hs . 1 4 5 1 5 0 ; Hs . 4 1 5 5  
 3 4 ; Hs . 5 4 4 8 3 ; Hs . 5 2 0 1 0 2 ; Hs . 4 1 4 5 7 9 ; Hs . 1 9 0 6 2  
 2 ; Hs . 3 7 4 9 5 0 ; Hs . 4 7 8 2 7 5 ; Hs . 3 6 9 0 3 9 ; Hs . 2 2 9 9 8 20  
 8 ; Hs . 4 5 8 4 1 4 ; Hs . 4 2 5 7 7 7 ; Hs . 5 3 1 3 1 4 ; Hs . 3 5 2 0 1  
 8 ; Hs . 5 2 6 4 6 4 ; Hs . 4 7 0 9 4 3 ; Hs . 5 1 4 5 3 5 ; Hs . 4 8 7 9 3  
 3 ; Hs . 4 8 1 1 4 3 ; Hs . 2 1 7 4 8 4 ; Hs . 5 2 4 1 1 7 ; Hs . 1 3 7 0 0  
 7 ; Hs . 4 5 8 4 1 4 ; Hs . 3 7 4 6 5 0 ; Hs . 4 7 0 9 4 3 ; Hs . 5 0 8 4 2  
 ; Hs . 1 1 8 6 3 3 ; Hs . 1 3 0 7 5 9 ; Hs . 3 8 4 5 9 8 ; Hs . 5 2 4 7 6 0  
 ; Hs . 4 4 1 9 7 5 ; Hs . 5 3 0 5 9 5 ; Hs . 5 4 6 4 6 7 ; Hs . 5 2 9 3 1 7  
 ; Hs . 1 7 5 6 8 7 ; Hs . 1 1 2 4 2 0 ; Hs . 1 7 0 6 ; Hs . 5 2 3 8 4 7 ; H  
 s . 3 8 8 7 3 3 ; Hs . 1 6 3 1 7 3 ; Hs . 4 7 0 9 4 3 ; Hs . 4 8 1 1 4 1 ; H  
 s . 1 7 1 4 2 6 ; Hs . 1 7 4 1 9 5 ; Hs . 5 1 8 2 0 1 ; Hs . 1 1 8 6 3 3 ; H  
 s . 4 8 9 1 1 8 ; Hs . 4 8 9 1 1 8 ; Hs . 1 9 3 8 4 2 ; Hs . 5 5 1 5 1 6 ; H 30  
 s . 5 1 8 2 0 3 ; Hs . 3 7 1 7 9 4 ; Hs . 5 2 9 3 1 7 ; Hs . 1 9 5 6 4 2 ; H  
 s . 1 2 3 4 1 ; Hs . 4 1 4 3 3 2 ; Hs . 5 2 4 7 6 0 ; Hs . 4 7 9 2 6 4 ; Hs  
 . 5 0 1 7 7 8 ; Hs . 4 1 4 3 3 2 ; Hs . 1 2 6 4 6 ; Hs . 5 1 8 2 0 0 ; Hs .  
 4 4 1 9 7 5 ; Hs . 4 4 1 9 7 5 ; Hs . 4 3 7 6 0 9 ; Hs . 1 3 0 7 5 9 ; Hs .  
 8 2 3 1 6 ; Hs . 5 1 8 2 0 0 ; Hs . 4 5 8 4 8 5 ; Hs . 3 1 8 6 9 ; Hs . 1 6  
 6 1 2 0 ; Hs . 5 4 9 0 4 1 ; Hs . 1 7 5 1 8 ; Hs . 5 4 6 4 6 7 ; Hs . 5 1 7  
 3 0 7 ; Hs . 5 4 9 0 4 1 ; Hs . 5 2 8 6 3 4 ; Hs . 3 8 9 7 2 4 ; Hs . 5 4 6  
 5 2 3 ; Hs . 8 2 3 1 6 ; Hs . 7 1 5 5 ; Hs . 5 2 1 9 0 3 ; Hs . 2 6 6 6 3 ;  
 Hs . 1 2 0 3 2 3 ; および / または Hs . 9 2 6

を含み、ここでバイオマーカーは S L E に対する素因および / または予知と関連する。 40

【 0 0 2 1 】

バイオマーカーは、これら遺伝子のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションから選択される転写調節遺伝子を含むことができる。

【 0 0 2 2 】

1 もしくは複数の遺伝子モジュールの特異的な組は：

M H C クラス I 分子： H L A - A , B , C , G , E ) + ベータ 2 - ミクログロブリン ( B 2 M )、リボゾームタンパク質： R P L s , R P S s を含んでなる 1 もしくは複数の「 M H C / リボゾーム遺伝子」： および添付する表のモジュール M 1 . 7 に列挙されている遺伝子：

ラクトトランスフェリン： L T F、デフェンシン： D E A F 1、細菌透過性増加タンバ 50

ク質 ( B P I )、カセリシジン抗微生物タンパク質 ( C A M P ) を含んでなる 1 もしくは複数の「好中球遺伝子」；および添付する表のモジュール M 2 . 2 に列挙されている遺伝子：

R P L s , R P S s、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー ( E E F s )、核小体タンパク質：N P M 1 , N O A L 2 , N A P 1 L 1 を含んでなる 1 もしくは複数の「リボゾームタンパク質遺伝子」；および添付する表のモジュール M 2 . 4 に列挙されている遺伝子：

C D 5 , C D 6 , C D 7 , C D 2 6 , C D 2 8 , C D 9 6、リンホトキシンベータ、I L 2 - 誘導性 T 細胞キナーゼ、T C F 7 , T 細胞分化タンパク質 m a 1 , G A T A 3 および S T A T 5 B を含んでなる 1 もしくは複数の T 細胞表面マーカー遺伝子；および添付する表のモジュール M 2 . 8 に列挙されている遺伝子；および

抗ウイルス分子 ( O A S 1 / 2 / 3 / L , G B P 1 , G 1 P 2 , E I F 2 A K 2 / P K R , M X 1 , P M L )、ケモカイン ( C X C L 1 0 / I P - 1 0 )、シグナル伝達分子 ( S T A T 1 , S T A t 2 , I R F 7 , I S G F 3 G ) を含んでなる 1 もしくは複数の「インターフェロン - 誘導性遺伝子」；および添付する表のモジュール M 3 . 1 に列挙されている遺伝子；からなる群から選択され、そして S L E、線維筋痛症、ウイルス感染バクテリア感染、癌および移植拒絶間を識別するために十分である。特に、参照により本明細書に編入する長い表では、S L E と線維筋痛症との間の区別を使用できるモジュールは、M 1 . 1、M 1 . 7、M 2 . 1、M 2 . 2、M 2 . 3、M 2 . 4、M 2 . 5、M 2 . 6、M 2 . 7、M 2 . 8 および M 3 . 1 を含むことができ、その各々が分析に 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 以上の遺伝子を有することができる。

#### 【 0 0 2 3 】

バイオマーカーは、m R N A、タンパク質または m R N A とタンパク質の両方のレベルのバイオマーカーを定量することによりスクリーニングすることができる。バイオマーカーが m R N A レベルである場合、これはポリメラーゼ連鎖反応、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応、リバーストランスクリプターゼポリメラーゼ連鎖反応、ハイブリダイゼーション、プローブハイブリダイゼーションおよび遺伝子発現アレイから選択される方法により定量され得る。スクリーニング法にはバイオマーカー中の多形の検出も含むことができる。あるいはスクリーニング工程はポリメラーゼ連鎖反応、ヘテロ二重鎖分析、一本鎖高次構造多型分析、リガーゼ連鎖反応、比較ゲノムハイブリダイゼーション、サザンブロットティング、ノーザンブロットティング、ウエスタンブロットティング、酵素連結免疫吸着アッセイ、蛍光共鳴エネルギー転移およびシークエンシングからなる群から選択される少なくとも 1 つの技術を使用して達成することができる。本発明と共に使用するために、サンプルは任意の数の免疫細胞、例えば全血液細胞、白血球またはその副成分でよい。

#### 【 0 0 2 4 】

別の態様には、組織サンプルから全身性エリテマトーデス ( S L E ) を診断するための方法を含み、これには組織サンプルから遺伝子発現プロファイルを得ることを含み、ここで正常な対照サンプルに対して比較するように、2 以上の以下の遺伝子の発現が M 1 . 1、M 1 . 7、M 2 . 1、M 2 . 2、M 2 . 3、M 2 . 4、M 2 . 5、M 2 . 6、M 2 . 7、M 2 . 8 および / または M 3 . 1 から測定される。バイオマーカー、例えば R N A の供給源に使用される組織は、血液またはその副成分でよい。

#### 【 0 0 2 5 】

本発明のアレイ、方法およびシステムは、予想される患者のトランスクリプトームを得；トランスクリプトームを、臨床試験で処置される疾患または状態の表示となる 1 もしくは複数の転写モジュールに対して比較し；そして患者が臨床試験の良い候補となる見込を、臨床試験での成功と相関する 1 もしくは複数の転写モジュール内の患者のトランスクリプトームで発現される 1 もしくは複数の遺伝子の存在、不存在またはレベルに基づき決定することにより臨床試験のために患者を選択するために使用することもできる。一般に、各モジュールについて、例えば各モジュールがベクターを含む場合、サンプル中の転写産物の比率の和と相関するベクターを使用することができ、そしてここで 1 もしくは複数の

疾患または状態が1もしくは複数のベクターに関連している。したがって、各モジュールは各モジュール中に1もしくは複数の遺伝子の発現レベルと相関するベクターを含むことができる。

#### 【0026】

また本発明はアレイ、例えばカスタムマイクロアレイ、ビーズアレイ、液体懸濁液アレイ等を含み、これには固体支持体に固定化された核酸プローブを含み、これは1もしくは複数の疾患の間を識別するために十分な比率で差次的に発現される遺伝子を提供する1もしくは複数のモジュールから十分なプローブを含み、このプローブは以下の表1から選択される。例えば固体支持体に固定化される核酸プローブのアレイ、ここでアレイは以下のモジュール：M1.1、M1.7、M2.1、M2.2、M2.3、M2.4、M2.5、M2.6、M2.7、M2.8および/またはM3.1の1もしくは複数に列挙される1もしくは複数の遺伝子から選択される少なくとも2組のプローブモジュールを含み、ここで第1組のプローブは1もしくは複数の疾患にそれぞれ対応する1もしくは複数の質問位置 (interrogation position) を有する。アレイは100から100,000の間のプローブを有することができ、そして各プローブは例えば9、15、20、30、40、50、75、100以上のヌクレオチド長であることができる。特定の態様では、プローブの長さは数十万の塩基でなく数千でよい(例えば制限断片、プラスミド、コスミド等)。組織化されたプローブ組に分けられる場合、これらは一緒に、または別個に質問される (interrogated)。

10

#### 【0027】

また本発明は、少なくとも1対の第1および第2組のプローブ群を含むモジュールアレイを形成するために、固体支持体上に固定化される1もしくは複数の核酸プローブを含み、各群は表3により定められる1もしくは複数のプローブを有する(例えばM1.7、M2.2、M2.4、M2.8およびM3.1として列挙されるモジュールに列挙されるもの)。このプローブ群は、マイクロアレイ平板全体に一貫した複合転写マーカ(ベクター)を提供するために選択される。事実、プローブ群はマイクロアレイ平板全体に一貫しており、そして調節承認 (regulatory approval) に関する要約を提示する複合転写マーカを提供するために使用され得る。当業者は本発明のモジュールを使用して、種々の疾患および/または状態間を迅速に診断または識別するために使用する1もしくは複数の疾患特異的アレイを開発することが可能であると考えらる。

20

30

#### 【0028】

患者からトランスクリプトームを得、1もしくは複数の転写モジュールに基づきトランスクリプトームを採点し;そして患者の疾患または状態を、SLEの表示である1もしくは複数の転写モジュールのトランスクリプトーム内の遺伝子の発現の存在、不存在またはレベルに基づき決定することによる個体が全身性エリテマトーデス(SLE)であるかどうかを決定する方法。より詳細には転写モジュールは、疾患または状態毎に合う各クラスターからそのモジュールについての遺伝子を選択し、選択した遺伝子を分析から除き、そして疾患または状態の亜分画中に集まる遺伝子について、遺伝子発現値を選択する工程を繰り返すことにより1もしくは複数の転写モジュールに関する遺伝子発現値を反復して選択し、そしてすべての遺伝子クラスターが使用し尽されるまで、各クラスターについてモジュールの作成を繰り返し反復することにより得られる。クラスターが発現値クラスター、キーワードクラスター、代謝クラスター、疾患クラスター、感染クラスター、移植クラスター、シグナル伝達クラスター、転写クラスター、複製クラスター、細胞サイクルクラスター、siRNAクラスター、miRNAクラスター、ミトコンドリアクラスター、T細胞クラスター、B細胞クラスター、サイトカインクラスター、リンホカインクラスター、熱ショッククラスターおよびその組み合わせから選択される。患者はヒトSLE患者でよく、そしてさらにグルココルチコイド、非ステロイド系抗炎症剤および免疫抑制剤からなる群から選択される治療に有効な量の薬剤が提供されてよい。

40

#### 【0029】

また本発明は、患者の自己免疫または慢性炎症疾患を診断またはモニタリングする方法

50

を含み、この方法は免疫グロブリン、好中球、インターフェロン、T細胞およびリボソームタンパク質から選択される遺伝子を含む2以上の遺伝子モジュールの発現レベルを検出することを含んでなる。1もしくは複数の遺伝子は、1もしくは複数の以下のモジュール：M1.7、M2.2、M2.4、M2.8およびM3.1に列挙される1もしくは複数の遺伝子から選択されることができ、そして疾患は全身性エリテマトーデス(SLE)である。

#### 【0030】

別の態様では、遺伝子またはその産物の発現レベルが、遺伝子により発現されるRNAレベルを測定することにより検出される。この方法はまた、遺伝子により発現されるRNAレベルを検出する前に患者がRNAを単離することを含むことができ、ここでRNAレベルはPCRにより、かつ/またはハイブリダイゼーション、例えば相補的オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションにより検出される。特定の態様では、遺伝子発現の分析は、DNA、RNA、cDNA、PNA、ゲノムDNAまたは合成オリゴヌクレオチドであるプローブを使用してもよい。あるいは上と一緒に、患者からの遺伝子発現のレベルは、遺伝子のタンパク質レベルを測定することにより検出することができる。

10

#### 【0031】

本発明のさらに別の態様には、自己免疫疾患(例えばSLE)、ウイルス感染、細菌感染、癌および移植拒絶間を識別するために十分な：

#### 転写モジュール

MHCクラスI分子：HLA-A, B, C, G, E) + ベータ2-ミクログロブリン(B2M)、リボソームタンパク質：RPLs, RPSsを含んでなる1もしくは複数のMHC/リボソーム遺伝子：および添付する表のモジュールM1.7に列挙されている遺伝子：

20

ラクトトランスフェリン：LTF、デフェンシン：DEF1、細菌透過性増加タンパク質(BPI)、カセリシジン抗微生物タンパク質(CAMP)を含んでなる1もしくは複数の好中球遺伝子；および添付する表のモジュールM2.2に列挙されている遺伝子：

RPLs, RPSs、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー(EEFs)、核小体タンパク質：NPM1, NOAL2, NAP1L1を含んでなる1もしくは複数のリボソームタンパク質遺伝子：および添付する表のモジュールM2.4に列挙されている遺伝子：

30

CD5, CD6, CD7, CD26, CD28, CD96、リンホトキシンベータ、IL2-誘導性T細胞キナーゼ、TCF7, T細胞分化タンパク質ma1, GATA3, STAT5Bを含んでなる1もしくは複数のT細胞表面マーカー遺伝子；および添付する表のモジュールM2.8に列挙されている遺伝子：および

抗ウイルス分子(OAS1/2/3/L, GBP1, G1P2, EIF2AK2/PKR, MX1, PML)、ケモカイン(CXCL10/IP-10)、シグナル伝達分子(STAT1, STAT2, IRF7, ISGF3G)を含んでなる1もしくは複数のインターフェロン-誘導性遺伝子：および添付する表のモジュールM3.1に列挙されている遺伝子；

からなる群から選択される1もしくは複数の遺伝子を含む転写モジュールの一部である1もしくは複数のプローブを含む疾患分析ツールを含む。

40

#### 【0032】

別の態様は、1もしくは複数の転写モジュールの代表である遺伝子の組み合わせを含むカスタマイズされた遺伝子アレイである予知遺伝子アレイであり、ここでカスタマイズされた遺伝子アレイと接触する患者のトランスクリプトームがSLEの予知となる。アレイはSLEのための治療に対する患者の応答を監視するために使用され得る。またアレイは自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、癌および移植拒絶の間を識別するために使用され得る。特定の直接的測定のために、アレイは視覚的に走査され、そして発現の程度が目で、例えば裸眼および/または画像処理装置で分析され得る2以上の転写モジュールに組織化されることができ。例えばアレイは、1もしくは複数のサブモジュールが：

50

【 0 0 3 3 】

【 表 2 】

モジュール I. D.	プローブ の組数	キーワードの選択	評価
M 1.1	76	Ig、免疫グロブリン、骨、骨髄、PreB, IgM, Mu	形質細胞。免疫グロブリン鎖(例えば IGHM, IGJ, IGLL1, IGKC, IGHD) および形質細胞マーカー CD38 をコードする遺伝子を含む;
M 1.2	130	血小板、接着、凝集、内皮、脈管	血小板。血小板糖タンパク質(ITGA2B, ITGB3, GP6, GP1A/B)、および PPPB(プロ血小板塩基性タンパク質) および PF4(血小板因子4) のような血小板由来免疫メディエーターをコードする遺伝子を含む;
M 1.3	80	イムノレセプター BCR、B 細胞、IgG	B細胞。B細胞表面マーカー(CD72, CD79A/B, CD19, CD22) および他のB細胞関連分子: 初期B細胞因子(EBF)、B細胞リンカー(BLNK) およびBリンパ系チロシンキナーゼ(BLK)をコードする遺伝子を含む;
M 1.4	132	複製、抑制、修復、CREB、リンパ系、TNF-アルファ	未決定。この組は cAMP シグナル伝達経路のレギュレーター および標的(JUND, ATF4, CREM, PDE4, NR4A2, VIL2)、ならびに TNF-アルファ媒介型 NF-KB 活性化のリプレッサー(CYLD, ASK, TNFAIP3)を含む;
M 1.5	142	単球、樹状突起の、MHC、同時刺激、TLR4、MYD88	ミエロイド系。ミエロイド系細胞により発現される分子(CD86, CD163, FCGR2A)(その中には病原体の認識に関与するものもある: CD14, TLR2, MYD88)の細胞により発現される分子を含む。この組は TNF ファミリーメンバー(TNFR2, BAFF)も含む;
M 1.6	141	亜鉛、フィンガー、P53、RAS	未決定。この組はシグナル伝達分子、例えば活性化 STAT の亜鉛フィンガー含有インヒビター(PIAS1 および PIAS2)、または活性化T細胞の核因子 NFATC3 をコードする遺伝子を含む;
M 1.7	129	リボソーム、翻訳 40S, 60S, HLA	MHC/リボソームタンパク質。MHC クラスI分子(HLA-A,B,C,G,E)+ベータ 2-ミクログロブリン(B2M)またはリボソームタンパク質(RPLs, RPSs)をコードする遺伝子によりほとんど排他的に形成される;
M 1.8	154	代謝、生合成、複製、ヘリカーゼ	未決定。代謝酵素(GLS, NSF1, NAT1) および DNA複製に関与する因子(PURA, TERF2, EIF2S1)をコードする遺伝子を含む;
M 2.1	95	NK、キラー、細胞溶解、CD8、細胞媒介型、T細胞、CTL、IFN-g	細胞傷害性細胞。細胞傷害性T細胞およびNK細胞表面マーカー(CD8A, CD2, CD160, NKG7, KLRs)、細胞溶解分子(グランザイム、パーホリン、グラニュリシン)、ケモカイン(CCL5, XCL1) および CTL/NK-細胞関連分子(CTSW)を含む;

10

20

30

40

【 0 0 3 4 】

【表3】

モジュール I. D.	プローブ の組数	キーワードの選択	評価
M 2.2	49	顆粒球、好中球、 防御、ミエロイド、 骨髄	好中球。この組は好中球顆粒(ラクトランスフェリン: LTF、デフェンシン: DEAF1, 細菌透過性増加タンパク質: BPI、カセリシジン抗微生物タンパク質: CAMP…)に見いだされる内在性分子を含む;
M 2.3	148	赤血球、赤、 貧血、グロビン、 ヘモグロビン	赤血球。ヘモグロビン遺伝子(HGBs)および他の赤血球関連遺伝子(赤血球のアルキリン: ANK1、グリコホリン C: GYPC、ヒドロキシメチルビラン シンターゼ: HMBS、赤血球関連因子: ERAF)を含む;
M 2.4	133	リボヌクレオタン パク質、60S、 核小体、アッセン ブリー、延長	リボゾームタンパク質: リボゾームタンパク質(RPLs, RPSs)、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー (EEFs)および核小体タンパク質(NPM1, NOAL2, NAP1L1)をコードする遺伝子を含む;
M 2.5	315	腺癌、間質の、 間葉、樹状突起、 運動	未決定。このモジュールは免疫関連(CD40, CD80, CXCL12, IFNA5, IL4R)ならびに細胞骨格関連分子(ミオシン、サイトキネシスのデディケーター(Dedicator)、シンデカン 2、プレキシシン C1, ジストロブレピン)をコードする遺伝子を含む;
M 2.6	165	顆粒球、単球、 ミエロイド、ERK、 壊死	ミエロイド系。単球および好中球のようなミエロイド系細胞で発現する遺伝子(IGTB2/CD18、リンホトキシンベータ受容体、ミエロイド関連タンパク質 8/14 ホルミルペプチド受容体 1)を含む;
M 2.7	71	キーワードは抽出 されない	未決定。このモジュールは、未知の機能の転写産物からほぼ構成される。ケモカイン様因子スーパーファミリー(CKLFSF8)の1メンバーを含め、文献に関連するわずか 20 個の遺伝子;
M 2.8	141	リンパ腫、T細胞、 CD4, CD8, TCR、 胸腺、リンパ系、 IL2	T細胞:T細胞表面マーカー(CD5, CD6, CD7, CD26, CD28, CD96)およびリンパ系細胞により発現される分子(リンホトキシンベータ IL2-誘導性T細胞キナーゼ, TCF7, T細胞分化タンパク質 mal, GATA3, STAT5B)を含む;
M 2.9	159	ERK、トランス活性 化、細胞骨格、 MAPK, JNK	未決定。細胞骨格に関連する分子(アクチン関連タンパク質 2/3, MAPK1, MAP3K1, RAB5A)をコードする遺伝子を含む。また存在するのは、T細胞が発現する遺伝子(FAS, ITGA4/CD49D, ZNF1A1)である。
M 2.10	106	ミエロイド、 マクロファージ、 樹状突起、炎症 インターロイキン	未決定。免疫関連細胞表面分子(CD36, CD86, LILRB)、サイトカイン(IL15)およびシグナル伝達経路に関与する分子(FYB, TICAM2-Toll-様受容体経路)をコードする遺伝子を含む。

10

20

30

40

【表 4】

モジュール I. D.	プローブの組数	キーワードの選択	評価
M 2.11	176	複製、抑制、RAS、自己リン酸化作用、発癌遺伝子	未決定。キナーゼ(UHMK1, CSNK1G1, CDK6, WNK1, TAOK1, CALM2, PRKCI, ITPKB, SRPK 2, STK17B, DYRK2, PIK3R1, STK4, CLK4, PKN2) および RAS ファミリーメンバー(G3BP, RAB14, RAS A2, RAP2A, KRAS)を含む。
M 3.1	122	ISRE、インフルエンザ、抗ウイルス、IFN-ガンマ、IFN-アルファ、インターフェロン	インターフェロン誘導性。この組はインターフェロン誘導性遺伝子：抗ウイルス分子(OAS1/2/3/L, GBP1, G1P2, EIF2AK2/PKR, MX1, PML)、ケモカイン(CXCL10/IP-10)、シグナル伝達分子(STAT1, STAT2, IRF7, ISGF3G)を含む;
M 3.2	322	TGF-ベータ、TNF、炎症、アポトーシスの、リポ多糖	炎症I。炎症プロセスに関与する分子(例えば IL8, ICAM1, C5R1, CD44, PLAUR, IL1A, CXCL16)、およびアポトーシスのレギュレーター(MCL1, FOXO3A, RARA, BCL3/6/2A1, GADD45B)をコードする遺伝子を含む。
M 3.3	276	顆粒球、炎症防御、リソソームの、酸化的、LPS	炎症II。炎症が誘導する、またはそれにより誘導性の(IL18, ALOX5, ANPEP, AOA, HMOX1, SERPINB1)、ならびにリソソーム酵素を誘導する、またはそれにより誘導性の(PPT1, CTSB/S, NEU1, ASAH1, LAMP2, CAST)の分子を含む。
M 3.4	325	リガーゼ、キナーゼ、KIP1、ユビキチン、シャペロン	未決定。タンパク質ホスフェート(PPP1R12A, PTPRC, PPP1CB, PPM1B)およびホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)ファミリーメンバー(PIK3CA, PIK32A, PIP5K3)を含む。
M 3.5	22	キーワードは抽出されない	未決定。わずかな数の転写産物のみから構成される。ヘモグロビン遺伝子(HBA1, HBA2, HBB)を含む。
M 3.6	288	リポソームの、T細胞、ベーターカテニン	未決定。この組はミトコンドリアリボソームタンパク質(MRPLs, MRPs)、ミトコンドリア延長因子(GFM1/2)、Sortin Nexins(SN1/6/14)ならびにリボソーム ATPases(ATP6V1C/D)を含む。
M 3.7	301	スプライソソーム、メチル化、ユビキチン、	未決定。プロテアソームサブユニット(PSMA2/5, PSMB5/8); ユビキチンタンパク質リガーゼ HIP2, STUB1、ならびにユビキチンリガーゼ複合体(SUGT1)の成分をコードする遺伝子を含む。
M 3.8	284	CDR、TCR、CREB、グリコシラーゼ	未決定。酵素:アミノメチルトランスフェラーゼ、アルギニルトランスフェラーゼ、アスパラギンシンターゼ、ジアシルグリセロールキナーゼ、イノシトールホスファターゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヘリカーゼ...をコードする遺伝子を含む。
M 3.9	260	クロマチン、チェックポイント、複製、トランス活性化	未決定。キナーゼ(IBTK, PRKPIR, PRKDC, PRKCI)およびホスファターゼ(例えば PTPLB, PPP2CB/3CB, PTPRC, MTM1, MTMR2)をコードする遺伝子を含む。

10

20

30

40

## 【0036】

から選択される1もしくは複数のサブモジュールを含んでなる3以上の転写モジュールに組織化され、ここで1もしくは複数の遺伝子に特異的に結合するプローブが、3以上のモ

50

ジュール内から選択され、そして全身性エリテマトーデスの表示である。

【0037】

本発明の別の態様には、臨床試験の患者を選択するための方法を含み、この方法は、予想される患者のトランスクリプトームを得；トランスクリプトームを、臨床試験で処置される疾患または状態の表示となる1もしくは複数の転写モジュールに対して比較し；そして患者が臨床試験の良い候補となる見込を、臨床試験での成功と相関する1もしくは複数の転写モジュール内の患者のトランスクリプトームで発現される1もしくは複数の遺伝子の存在、不存在またはレベルに基づき決定することによる。この方法で使用するために、各モジュールはサンプル中の転写産物の比率の和と相関するベクターを含むことができ；ベクターはここで1もしくは複数の疾患または状態が1もしくは複数のベクターと関連し；ベクターは各モジュール内の1もしくは複数の遺伝子の発現レベルと相関し、かつ/またはベクターは正常対SLE患者（または他の患者（例えば線維筋痛症））の検出、特性決定、診断、予知および/またはモニタリングするためのモジュールを含み、それらは：

転写モジュール

M1.7 MHCクラスI分子：HLA-A, B, C, G, E) + ベータ2 - ミクログロブリン (B2M)、リボソームタンパク質：RPLs, RPSsを含んでなる1もしくは複数のMHC/リボソーム遺伝子；

M2.2 ラクトランスフェリン：LTF、デフェンシン：DEAF1、細菌透過性増加タンパク質 (BPI)、カセリシジン抗微生物タンパク質 (CAMP) を含んでなる1もしくは複数の好中球遺伝子；

M2.4 RPLs, RPSs、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー (EEFs)、核小体タンパク質：NPM1, NOAL2, NAP1L1を含んでなる1もしくは複数のリボソームタンパク質遺伝子；

M2.8 CD5, CD6, CD7, CD26, CD28, CD96、リンホトキシンベータ、IL2 - 誘導性T細胞キナーゼ, TCF7, T細胞分化タンパク質mal, GATA3, STAT5Bを含んでなる1もしくは複数のT細胞表面マーカー遺伝子；

および

M3.1 抗ウイルス分子 (OAS1/2/3/L, GBP1, G1P2, EIF2AK2/PKR, MX1, PML)、ケモカイン (CXCL10/IP-10)、シグナル伝達分子 (STAT1, STAT2, IRF7, ISGF3G) を含んでなる1もしくは複数のインターフェロン - 誘導性遺伝子；

の1もしくは複数、およびその組み合わせで列挙される遺伝子の1もしくは複数から選択される。

【0038】

さらに別の態様は固体支持体上に固定化された核酸プローブのアレイであり、支持体は1もしくは複数の疾患の間を識別するために、差次的に発現する遺伝子を十分な比率で提供する1もしくは複数のモジュールから十分なプローブを含んでなり、プローブは表4から選択される。別の態様は、SLEの予知となるプローブの組み合わせが上に配置され、そしてプローブがM1.7、M2.2、M2.4、M2.8およびM3.1から選択されるカスタマイズされた遺伝子アレイを含む予知遺伝子アレイである。

【0039】

発明の詳細な説明

本発明の様々な態様を作成し、そして使用することを以下で詳細に検討するが、本発明は広い様々な特定の内容で具現化され得る多くの応用可能な革新的概念を提供すると考えるべきである。本明細書で検討する特別な態様は、本発明を作成し、そして使用するための特定の方法の単に具体的説明であり、本発明の範囲に限界を定めるものではない。

【0040】

本発明の理解を容易にするために、多くの用語を以下に定義する。本明細書で定義する用語は、本発明に関する当業者が一般に理解している意味を有する。“a”、“an”お

10

20

30

40

50

よび“the”のような用語は、単数の物体を指すことのみを意図するのではなく、特定例の具体的説明に使用できる一般的種類を含む。本明細書の実用語法は、本発明の具体的態様を説明するために使用されるが、それらの用途は特許請求の範囲で境界を定めることを除き、本発明を限定しない。他に定義しない限り、本明細書で使用するすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者に通常に理解されている意味を有する。以下の参照は、本発明で使用される多くの用語の一般的定義を用いて技術の1つを提供する：Singleton et al., 微生物学および分子生物学辞典 (DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY) (2nd ed., 1994); 科学および技術のケンブリッジ辞書 (THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) (Walker ed., 1988); 遺伝学の実用語解説 (THE GLOSSARY OF GENETICS), 5TH ED., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991).

#### 【0041】

様々な生化学的および分子生物学的方法が当該技術分野では知られている。例えば核酸の分離および精製法は、国際公開第97/10365号、同第97/27317明細書、生物学および分子生物学の研究室技術：核酸プローブでのハイブリダイゼーション (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes) の第3章、I部、理論および核酸の調製 (Theory and Nucleic Acid Preparation), (P. Tijssen, ed.) エルセビア (Elsevier), N.Y. (1993); 生物学および分子生物学の研究室技術：核酸プローブでのハイブリダイゼーション (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes) の第3章、I部、理論および核酸の調製 (Theory and Nucleic Acid Preparation), (P. Tijssen, ed.) エルセビア (Elsevier), N.Y. (1993); および Sambrook et al., モレキュラークローニング：ア ラボラトリーマニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), コールドスプリングハーバー出版 (Cold Spring Harbor Press), N.Y., (1989); および分子生物学の現在の手法 (Current Protocols in Molecular Biology), (Ausubel, F.M. et al., eds.) ジョン ウィリー & サンズ社 (John Wiley & Sons, Inc.), ニューヨーク (1987 - 1999) (追補46 (1999年4月のような追補を含む) に詳細に記載されている)。

#### 【0042】

##### バイオインフォマティクスの定義

本明細書で使用する「オブジェクト (object)」は、問題とする任意の項目または情報を称する (一般に原文どおり、名詞、動詞、形容詞、副詞、句、文、記号、数字等を含む)。したがってオブジェクトは関係を形成することができる任意のもであり、また供給源から得られ、同定され、かつ/または調査される任意のものである。「オブジェクト」には限定するわけではないが、遺伝子、タンパク質、疾患、表現型、メカニズム、薬剤等のような問題の実態を含む。幾つかの観点では、オブジェクトは以下にさらに記載するようなデータでよい。

#### 【0043】

本明細書で使用する「関係」とは、同じ単位 (例えば、句、文、明細書中の2以上の行、段落、ウェブページの章、ページ、雑誌、新聞、本等の欄) 内でのオブジェクトの共

起を指す。これはテキスト、記号、数字およびその組み合わせでよい。

【0044】

本明細書で使用する「メタデータ コンテンツ (meta data content)」とは、データソース (data source) におけるテキストの組織化に関する情報を指す。メタデータは、ダブリン コア (Dublin Core) メタデータのような標準的メタデータを含んでなることができ、あるいはコレクション - スペシフィック (collection-specific) であることができる。メタデータ形式の例には限定するわけではないが、ライブラリータカログに使用されるマシーン リーダブル カタログ (Machine Readable Catalog: MARC) レコード、リソースディスクリプションフォーマット (Resource Description 10  
Format: RDF) およびエクステンシブル マークアップ ランゲイジ (Extensible Markup Language: XML) がある。メタデータ オブジェクトはマニュアルで、または自動化情報抽出アルゴリズムを介して作成することができる。

【0045】

本明細書で使用する「エンジン」は、他のプログラムの中心または本質的機能を行うプログラムを指す。例えばエンジンは、他のプログラムの全体的操作を調整する操作システムまたはアプリケーションプログラムの中心的プログラムであり得る。また用語「エンジン」は、変更することができるアルゴリズムを含むプログラムも指すことができる。例えば関係を同定することに対するそのアプローチを変更するために、知識発見エンジンを設計し、同定およびランキングの関係の新規法則を反映させることができる。 20

【0046】

本明細書で使用する「統計分析」とは各用語 (言葉、語源、語幹、n-グラム、句等) の発生数の計数に基づく技術を指す。主題に対して無制限に集めると、異なる内容で使用される同じ句が、異なる概念を表すか可能性がある。同時に存在する句の統計的分析は、言葉の意味の曖昧さを解決するために役立つ。「シンタクス分析 (Syntactic analysis)」は、品詞分析によりさらに曖昧さを減らすために使用することができる。本明細書で使用するように、1もしくは複数のそのような分析は、さらに一般的に「字句解析 (lexical analysis)」と呼ばれる。「人工知能 (AI)」は、コンピューターのような人間以外のデバイスにより、ヒトが価値があると、または「知的」であると見なす作業を行う方法を指す。例には絵を識別すること、会話または書かれた内容を理解すること、および問題を解決することを含む。 30

【0047】

様々な情報ファセットをデータフィールド内に見いだすことができる場合でも、本明細書で使用する用語「データベース」は、生の、またはコンパイルされたデータに関する貯蔵所を指す。データベースは典型的にはその内容にアクセスでき、管理でき、そして更新できるように組織化される (例えばデータベースは動的である)。また用語「データベース」および「ソース」は、データおよび情報の主な供給源がデータベースであるので、本発明では互換的に使用される。しかし「ソースデータベース」または「ソースデータ」は一般にデータ、例えばオブジェクトを同定し、そして関係を決定するためにシステムに入力される非構造テキストおよび/または構造データを指す。ソースデータベースはリレーショナル (relational) データベースであってもなくてもよい。しかしシステムデータベースは通常、リレーショナルデータベースまたは同じ均等なタイプのデータベースを含み、これらはオブジェクト間の関係を関連づける値を保存する。 40

【0048】

本明細書で使用する「システムデータベース」および「リレーショナルデータベース」は、互換的に使用され、そして予め定義されたカテゴリーに合うデータを含む1組の表として組織化されたデータの1もしくは複数の集合を称する。例えばデータベースの表は、カラム (例えば属性) に定められる1もしくは複数のカテゴリーを含んでなること 50

ができ、同時にデータベースの横行はカラムにより定まるカテゴリについて、独自のオブジェクトを含むことができる。すなわち遺伝子の同定のようなオブジェクトはその存在、不存在および/または遺伝子発現のレベルについてのカラムを有する。またリレーショナルデータベースの横行は「組」とも呼ばれ、そして一般にそのカラムの値により定められる。リレーショナルデータベースの内容における「ドメイン」は有効な値の範囲であり、カラムのような場を含むことができる。

【0049】

本明細書で使用する「知識のドメイン」は、システムが作動する実験のエリア、例えばすべての生物医学データを指す。この多様なデータは、1つの分野または調査/研究にのみ精通している(1ドメイン)標準的な人が、一緒にすることはできない事柄を時折、連結することができるので、幾つかのドメインからデータ(例えば生物医学データおよびエンジニアリングデータ)を組み合わせることは有利であると指摘すべきである。「分散データベース」とはネットワークの異なる点に分散または複製され得るデータベースを指す。

10

【0050】

「データ」および「情報」のような用語は、「情報」および「知識」のようにしばしば互換的に使用される。本明細書で使用する「データ」は、経験的測定値または測定値の組である最も基本的な単位である。データは情報の一助となるように処理されるが、基本的には情報から独立している。対照的に情報は興味から派生し、例えばデータ(単位)は、心血管疾患の危険性と相関し得る変数を見いだす目的で、民族性、性別、身長、体重、および食事について集めることができる。しかし同じデータを使用して式を開発するか、または食事の嗜好についての「情報」、すなわち特定の製品がスーパーマーケットでより良く売れる高い見込みを作成することができる。

20

【0051】

本明細書で使用するように「情報」にはデータの組から生じるまたは引き出される数、文字、数の組、文字の組または結果を含むことができる。次いで「データ」は、情報の測定値または統計および基準単位である。また「情報」は、言葉、記号のような他の種類のデータ、非構造フリーテキストのようなテキスト、コード等を含むことができる。「知識」は、原因および効果をモデル化するために系に十分な理解を与える情報の組として大雑把に定義される。以前の例を拡大するために、人口統計学、性別およびこれまでの買い物に関する情報を使用して、食品販売に関する地域的マーケティング戦略を開発し、一方、購買者による民族性に関する情報を製品の輸入のための指針として使用することができる。データ、情報および知識の間には厳密な境界が無いことに注目することは重要である: 3つの用語は時折、等価と考えられる。一般に、データは調査から生じ、情報は相関から生じ、そして知識はモデル化から生じる。

30

【0052】

本明細書で使用する「プログラム」または「コンピュータープログラム」とは、一般に特定のプログラミング言語の規則に従わせる統辞論単位を指し、そしてそれは特定の機能、作業または問題を解決または実行するために必要な「コードセグメント」に分けることができる宣言(declaration)および文(statement)またはインストラクション(instruction)からなる。プログラミング言語は一般にプログラムを記述する人工言語である。

40

【0053】

本明細書で使用する「システム」または「コンピューターシステム」は、一般に1もしくは複数のコンピューター、端末装置およびデータ処理を行うソフトウェアを指す。「ユーザー」または「システムオペレーター」は一般に、データ処理および情報交換の目的で「ユーザーデバイス」(例えばコンピューター、無線デバイス等)を介してコンピューターネットワークを使用する人を含む。「コンピューター」は一般に、人の介入無しに膨大な数の計算操作および論理操作を含む実質的なコンピューター処理を行うことができる基本単位である。

50

## 【0054】

本明細書で使用する「アプリケーションソフトウェア」または「アプリケーションプログラム」は、一般にアプリケーションのトラブルの解決に特異的なソフトウェアまたはプログラムを指す。「アプリケーションの問題」は、一般にエンドユーザーにより提起され、そしてその解決のための情報処理を必要とする問題である。

## 【0055】

本明細書で使用する「自然言語」は、規則が特殊に記載されない現行使用に基づく、例えば英語、スペイン語または中国語を指す。本明細書で使用する「人工言語」は、規則がその使用前に実験的に確立された言語、例えばC、C++、Java、BASIC、FORTRANまたはCOBOLのようなコンピュータプログラム言語を指す。

10

## 【0056】

本明細書で使用する「統計的関連性」は、1もしくは複数のランキングスキームを使用することを指し(O/E比、強度等)、ここで関連性はそれが無作為の機会により期待されるよりも有意に頻繁に起こる場合に、統計的に関連性があると定められる。

## 【0057】

本明細書で使用する「調和して(coordinate)調節される遺伝子」または「転写モジュール」という用語は互換的に使用され、特異的遺伝子のグループ分けされた遺伝子発現プロファイル(例えば特異的遺伝子配列と関連したシグナル値)を指す。各転写モジュールは2つの重要なデータ部分(piece)、文献調査部分、および遺伝子マイクロアレイから得た実際の経験的な遺伝子発現値データと相関する。転写モジュールに選択された遺伝子の組は、遺伝子発現データの分析に基づく(上記のモジュール抽出アルゴリズム)。さらなる工程はChaussabel, D. & Sher, 文献のプロファイリングによるマイクロアレイ発現データのマイニング(A. Mining microarray expression data by literature profiling). Genome Biol 3, RESEARCH0055(2002), (<http://genomebiology.com/2002/3/10/research/0055>)により教示され、関連の部分は引用により本明細書に編入され、そして発現データは目的の疾患または状態、例えば全身性エリテマトーデス、関節炎、リンパ腫、悪性腫瘍、黒色腫、急性感染、自己免疫障害、自己炎症障害等から得られる。

20

## 【0058】

以下の表は文献調査部分、または転写モジュールへの貢献を開発するために使用されたキーワードの例を列挙する。当業者は他の用語を他の状態、例えば特異的な癌、特異的な感染性疾患、移植等に選択できると認識する。例えばT細胞活性化に関連する遺伝子およびこれらの遺伝子に関するシグナルを以下にモジュールID "M2.8" と記載し、ここで特定のキーワード(例えばリンパ腫、T細胞、CD4、CD8、TCR、胸腺、リンパ系、IL2)は、重要なT細胞関連遺伝子、例えばT細胞表面マーカー(CD5、CD6、CD7、CD26、CD28、CD96);リンパ系細胞により発現される分子(リンホトキシンベータ、IL-2誘導性T細胞キナーゼ、TCF7;およびT細胞分化タンパク質mal、GATA3、STAT5B)を同定するために使用された。次に完全なモジュールは、患者群からのデータをこれらの遺伝子と相関させることにより開発されて(平板、存在/不存在および/またはアップもしくはダウンレギュレーションにかかわらず)、転写モジュールが作成される。場合により、遺伝子プロファイルはこれらの疾患状態およびデータについていかなる特定の遺伝子クラスターとも合わないことがある(この時点で)が、特定の生理学的経路(例えばcAMPシグナル伝達、亜鉛フィンガータンパク質、細胞表面マーカー等)が「未決定」モジュール内に見いだされる。実際に、遺伝子発現データ組は、キーワードの調査と合わせる前に発現が調整された遺伝子を抽出するために使用でき、すなわちいずれかのデータ組を第2のデータ組と相互参照する前に相関させることができる。

30

40

## 【0059】

【表5】

表1. 転写モジュールの例

モジュール I. D. の例	キーワード選択 の例	遺伝子プロファイル評価	
M 1.1	Ig、免疫グロブリン、 骨、骨髄、PreB, IgM, Mu.	形質細胞。免疫グロブリン鎖(例えば IGHM, IGJ, IGLL1, IGKC, IGHD)および形質細胞マーカーCD38をコードする遺伝子を含む。	
M 1.2	血小板、接着、 凝集、内皮 脈管	血小板。血小板糖タンパク質(ITGA2B, ITGB3, GP6, GP1A/B)、および PPPB(プロ血小板塩基性タンパク質)および PF4(血小板因子4)のような血小板由来免疫メディエーターをコードする遺伝子を含む。	10
M 1.3	イムノレセプター BCR、B細胞、IgG	B細胞。B細胞表面マーカー(CD72, CD79A/B, CD19, CD22)および他のB細胞関連分子: 初期B細胞因子(EBF)、B細胞リンカー(BLNK)およびBリンパ系チロシンキナーゼ(BLK)をコードする遺伝子を含む。	
M 1.4	複製、抑制、修復、 CREB、リンパ系、 TNF-アルファ	未決定: この組は cAMP シグナル伝達経路のレギュレーターおよび標的(JUND, ATF4, CREM, PDE4, NR4A2, VIL2)、ならびに TNF-アルファ媒介型 NF- $\kappa$ B 活性化のリプレッサー(CYLD, ASK, TNFAIP3)を含む。	20
M 1.5	単球、樹状突起の、 MHC、同時刺激、 TLR4、MYD88	ミエロイド系: ミエロイド系細胞により発現される分子(CD86, CD163, FCGR2A)(その中には病原体の認識に関与するものもある: CD14, TLR2, MYD88)を含む。この組は TNF ファミリーメンバー(TNFR2, BAFF)も含む。	
M 1.6	亜鉛、フィンガー、 P53、RAS	未決定: この組はシグナル伝達分子、例えば活性化 STAT (PIAS1 および PIAS2)の亜鉛フィンガー含有インヒビター、または活性化T細胞の核因子 NFATC3をコードする遺伝子を含む;	30
M 1.7	リボゾーム、翻訳 40S, 60S, HLA	MHC/リボゾームタンパク質。MHC クラスI分子(HLA-A,B,C,G,E)+ベータ2-ミクログロブリン(B2M)またはリボゾームタンパク質(RPLs, RPSs)をコードする遺伝子によりほとんど排他的に形成される。	
M 1.8	代謝、生合成、 複製、ヘリカーゼ	未決定: 代謝酵素(GLS, NSF1, NAT1)およびDNA複製に関与する因子(PURA, TERF2, EIF2S1)をコードする遺伝子を含む。	
M 2.1	NK, キラー、 細胞溶解、CD8、 細胞媒介型、 T細胞、CTL, IFN-g	細胞傷害性細胞。細胞傷害性T細胞およびNK細胞表面マーカー(CD8A, CD2, CD160, NKG7, KLRs)、細胞溶解因子(グランザイム、パーホリン、グラニュリシン)、ケモカイン(CCL5, XCL1)および CTL/NK-細胞関連分子(CTSW)を含む。	40
M 2.2	顆粒球、好中球、 防御、ミエロイド、 骨髄	好中球。この組は好中球顆粒に見いだされる内在性分子(ラクトランスフェリン: LTF、デフェンシン: DEAF1, 細菌透過性増加タンパク質: BPI、カセリシジン抗微生物タンパク質: CAMP...)を含む。	

【表6】

モジュール I. D. の例	キーワード選択 の例	遺伝子プロファイル評価	
M 2.3	赤血球、赤、貧血、 グロビン、 ヘモグロビン	赤血球。ヘモグロビン遺伝子(HGBs)および他の赤血球関連遺伝子(赤血球のアルキリン: ANK1、グリコホリン C: GYPC、ヒドロキシメチルピラン シンターゼ: HMBS、赤血球関連因子: ERAF)を含む。	
M 2.4	リボヌクレオタンパク 質、60S、核小体、 アッセンブリー、 延長	リボゾームタンパク質。リボゾームタンパク質(RPLs, RPSs)、真核生物翻訳伸長因子ファミリーメンバー (EEFs) および核小体タンパク質(NPM1, NOAL2, NAP1L1)をコードする遺伝子を含む。	10
M 2.5	腺癌、間質の、 間葉、樹状突起、 運動	未決定。このモジュールは免疫関連(CD40, CD80, CXCL12, IFNA5, IL4R)ならびに細胞骨格関連分子(ミオシン、サイトキネシスのデディケーター、シンデカン 2、プレキシシン C1, ジストロブレピン)をコードする遺伝子を含む。	
M 2.6	顆粒球、単球、 ミエロイド、ERK、 壊死	ミエロイド系。M1.5 に関連する。単球および好中球のようなミエロイド系細胞で発現する遺伝子 (IGTB2/CD18、リンホトキシンベータ受容体、ミエロイド関連タンパク質 8/14ホルミルペプチド受容体1)を含む；	20
M 2.7	キーワードは抽出さ れない	未決定。このモジュールは、未知の機能の転写産物からほぼ構成される。ケモカイン様因子スーパーファミリー(CKLFSF8)の1メンバーを含め、文献に関連するわずか20個の遺伝子。	
M 2.8	リンパ腫、T細胞、 CD4, CD8, TCR、 胸腺、リンパ系、IL2	T細胞: T細胞表面マーカー(CD5, CD6, CD7, CD26, CD28, CD96)およびリンパ系細胞により発現される分子(リンホトキシンベータ IL2-誘導性T細胞キナーゼ, TCF7, T細胞分化タンパク質 mal, GATA3, STAT5B)を含む。	
M 2.9	ERK、トランス活性 化、細胞骨格、 MAPK, JNK	未決定。細胞骨格に関連する分子(アクチン関連タンパク質 2/3, MAPK1, MAP3K1, RAB5A)をコードする遺伝子を含む。また存在するのは、T細胞が発現する遺伝子(FAS, ITGA4/CD49D, ZNF1A1)。	30
M 2.10	ミエロイド、 マクロファージ、 樹状突起、炎症 インターロイキン	未決定。免疫関連細胞表面分子(CD36, CD86, LILRB)、サイトカイン(IL15)およびシグナル伝達経路に参与する分子(FYB, TICAM2-Toll様受容体経路)をコードする遺伝子を含む。	
M 2.11	複製、抑制、RAS、 自己リン酸化作用、 発癌遺伝子	未決定。キナーゼ(UHMK1, CSNK1G1, CDK6, WNK1, TAOK1, CALM2, PRKCI, ITPKB, SRPK 2, STK17B, DYRK2, PIK3R1, STK4, CLK4, PKN2) および RAS ファミリーメンバー(G3BP, RAB14, RAS A2, RAP2A, KRAS)を含む。	40
M 3.1	ISRE、インフルエン ザ、抗ウイルス、 IFN-ガンマ、 IFN-アルファ、 インターフェロン	インターフェロン誘導性。この組はインターフェロン誘導性遺伝子: 抗ウイルス分子 (OAS1/2/3/L, GBP1, G1P2, EIF2AK2/PKR, MX1, PML)、ケモカイン (CXCL10/IP-10)、シグナル伝達分子(STAT1, STAT2, IRF7, ISGF3G)を含む。	

【表 7】

モジュール	キーワード選択 の例	遺伝子プロファイル評価	
I. D. の例			
M 3.2	TGF-ベータ、TNF、 炎症、 アポトーシスの、 リポ多糖	炎症I。炎症プロセスに関与する分子(例えば IL8, ICAM1, C5R1, CD44, PLAUR, IL1A, CXCL16)、およびアポトーシスのレギュレーター(MCL1, FOXO3A, RARA, BCL3/6/2A1, GADD45B)をコードする遺伝子を含む。	
M 3.3	顆粒球、炎症 防御、酸化する、 リソソームの	炎症II。顆粒球-マクロファージCSFを誘導する、またはそれにより誘導性の(SPI1, IL18, ALOX5, ANPEP)、ならびにリソソーム酵素を誘導する、またはそれにより誘導性の(PPT1, CTSS/S, CES1, NEU1, ASAH1, LAMP2, CAST)分子を含む。	10
M 3.4	キーワードは抽出され ない	未決定。タンパク質ホスフェート(PPP1R12A, PTPRC, PPP1CB, PPM1B)およびホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)ファミリーメンバー(PIK3CA, PIK32A, PIP5K3)を含む。	
M 3.5	キーワードは抽出され ない	未決定。わずかな数の転写産物からなる。ヘモグロビン遺伝子(HBA1, HBA2, HBB)を含む。	
M 3.6	補体、宿主 酸化的、細胞骨格、 T細胞	未決定。この大変大きい組はT細胞表面マーカー(CD101, CD102, CD103)、ならびに血中白血球の回りで偏在的に発現される分子(CXCR1: フラクタルキン受容体, CD47, P-セレクチンリガンド)を含む。	20
M 3.7	スプライソソーム、 メチル化、 ユビキチン、 ベーターカテニン	未決定。プロテアソームサブユニット(PSMA2/5, PSMB5/8); ユビキチンタンパク質リガーゼ HIP2, STUB1、ならびにユビキチンリガーゼ複合体(SUGT1)の成分をコードする遺伝子を含む。	
M 3.8	CDC、TCR、CREB、 グリコシラーゼ	未決定。幾つかの酵素: アミノメチルトランスフェラーゼ、アルギニルトランスフェラーゼ、アスパラギンシンテターゼ、ジアシルグリセロールキナーゼ、イノシトールホスファターゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヘリカーゼをコードする遺伝子を含む。...	30
M 3.9	クロマチン、 チェックポイント、 複製、 トランス活性化	未決定。プロテインキナーゼ(PRKPIR, PRKDC, PRKCI)およびホスファターゼ(例えば PTPLB, PPP1R8/2CB)をコードする遺伝子を含む。また RAS 癌遺伝子ファミリーメンバーおよびNK細胞受容体 2B4 (CD244)も含む。	

## 【 0 0 6 2 】

## 生物学的定義

本明細書で使用する「アレイ」という用語は、支持体に1もしくは複数のペプチドまたは核酸プローブが結合した固体支持体または基体を指す。アレイは、異なる既知の位置の基体表面にカップリングされた典型的には1もしくは複数の異なる核酸またはペプチドプローブを有する。これらのアレイは、既知のゲノム、例えばヒトゲノムに基づき10,000; 20,000、30,000または40,000種の異なる同定可能な遺伝子を有することができる「マイクロアレイ」、「遺伝子チップ」またはDNAチップとも記載される。これらのパン-アレイ(pan-array)は、サンプル中で発現、または見いだされる全「トランスクリプトーム」または遺伝子の転写プール、例えばDNAレプリコンの相補的組を作成するためにRTおよび/またはRT-PCRにかけることができるRNA、mRNA等として発現される核酸を検出するために使用される。アレイは、非リトグラフおよび/またはフォトリトグラフ法および固相合成法の組み合わせを包含する機械

40

50

的合成法、光直接合成法等を使用して製造することができる。3マイクロメートルのビーズに結合した50-merのオリゴヌクレオチドプローブを含むビーズアレイを使用することができ、ビーズは例えばガラススライドの表面でマイクロウェルに打ち込まれるか (l o d g e d i n t o )、あるいは液相懸濁アレイ (例えばルミネックス (L i m i n e x ) またはイルミナ (I l l u m i n a ) ) の一部でよく、これは液相中のデジタルビーズアレイであり、そして「バーコード」が付いたガラス棒を検出および同定に使用する。

#### 【0063】

これら核酸アレイの合成のための様々な技術がこれまで記載されており、例えば事実上任意の形状の表面上またはさらに多表面上でも作成された。アレイはビーズ、ゲル、ポリマー表面、光ファイバーのようなファイバー、ガラスまたは任意の他の適切な基体上のペプチドまたは核酸であることができる。アレイは診断またはすべてを含むデバイスの他の操作を可能とする様式で包装されることができ、例えば本明細書に編入する米国特許第6,955,788号明細書、関連部分を参照にされたい。

10

#### 【0064】

本明細書で使用する用語「疾患」とは、細胞に任意の異常な生物学的状態がある生物の生理学的状態を指す。疾患には限定するわけではないが、遺伝的な、遺伝した、感染により生じた、異常な細胞機能、異常な細胞分裂等により生じた細胞、組織、身体機能、系または臓器の妨害、休止または障害を含む。「疾患状態」を導く疾患は、一般に生物系、すなわち疾患の宿主に対して有害である。本発明に関して、疾患または障害と関連する感染 (例えばウイルス、バクテリア、真菌、寄生虫等)、炎症、自己炎症、自己免疫、アナフィラキシー、アレルギー、前悪性、悪性、外科的、移植、生理学的等のような任意の生物学的状態は、疾患状態と考えられる。病的状態は一般に疾患状態と等価である。

20

#### 【0065】

また疾患状態は、異なるレベルの疾患状態に分類することもできる。本明細書で使用するように、疾患または疾患状態のレベルは、疾患または疾患状態の進行、ならびに処置時、最中および後の生理学的応答を反映する任意の尺度である。一般に疾患または疾患状態はレベルまたは段階を経て進行し、ここで疾患の影響は次第に重篤になる。疾患状態のレベルはサンプル中の細胞の生理学的状態により影響を受け得る。

#### 【0066】

本明細書で使用する用語「治療」または「治療計画」は、疾患状態を緩和または改変するために取る医学的段階、例えば薬理的、外科的、食事のおよび/または他の技術を使用して疾患の影響または症状を下げるか、または排除することを意図した過程を指す。治療計画には1もしくは複数の薬剤または外科治療の処方された投与を含むことができる。治療の多くは有益であり、そして疾患状態を下げるが、多くの場合、治療の効果は望ましくない作用、すなわち副作用を有する。また治療の効果は宿主の生理学的状態、例えば年齢、性別、遺伝子、体重、他の疾患状態等により影響され得る。

30

#### 【0067】

本明細書で使用する「薬理学的状態 ( s t a t e ) 」または「薬理学的状況 ( s t a t u s ) 」という用語は、サンプル中の1もしくは複数の核酸の薬理学的状態に影響を及ぼすことができる1もしくは複数の薬剤、外科医術等で処置される、および/またはされたサンプル、例えば薬理学的介入により新たに転写、安定化かつ/または脱安定化されたサンプルを指す。サンプルの薬理学的状態は、薬剤処置の前、最中および/または後の生物学的状態の変化に関連し、そして本明細書に教示する診断的または予知的機能に役立つことができる。薬剤処置または外科的治療後の幾つかの変化は、疾患状態と関連するかもしれないし、かつ/または無関係な副作用であるかもしれない。薬理学的状態の変化は、治療期間、処方した薬剤の種類および用量、与える治療過程のコンプライアンスの程度、および/または摂取した処方以外の薬剤の結果であろう。

40

#### 【0068】

本明細書で使用する「生物学的状態」という用語は、発現の変化を分析するために単離

50

および精製した細胞サンプルのトランスクリプトーム（すなわちRNA転写産物の全集合）の状態を指す。生物学的状態は、細胞成分の量および/または活性の測定、形態学的表現型の特性決定、または転写産物の検出法の組み合わせによりサンプル中の細胞の生理学的状態を反映する。

#### 【0069】

本明細書で使用する「発現プロファイル」という用語は、RNA、DNAまたはタンパク質の量（abundance）または活性レベルの相対的量を指す。発現プロファイルは、例えば任意の数の方法による、および任意の数の遺伝子チップ、遺伝子アレイ、ビーズ、マルチプレックスPCR、定量的PCR、ラン-オンアッセイ、ノーザンブロット分析、ウエスタンブロット分析、タンパク質発現、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、化学発光実験、酵素アッセイ、増殖実験または市販されているものから容易に入手可能な遺伝子発現の測定および/または分析用の他の方法、装置および系を使用した、転写状態または翻訳状態の測定値であることができる。

10

#### 【0070】

本明細書で使用するサンプルの「転写状態」という用語には、サンプル中に存在するRNA種、特にmRNAの同一性および相対的量を含む。サンプルの全転写状態、すなわちRNAの同一性および存在量の組み合わせを本明細書ではトランスクリプトームと呼ぶ。一般にサンプル中のRNA種の全組の全相対的成分の実質的画分が測定される。

20

#### 【0071】

本明細書で使用する「転写ベクター」、「発現ベクター」および「ゲノムベクター」（互換的に使用する）という用語は、「差次的に発現される遺伝子の比率」を反映する転写発現データを指す。例えば各モジュールについて、少なくとも2つの群（例えば健康な個体対患者）間で差次的に発現される転写産物の比率。このベクターは2つの群のサンプルの比較により引き出される。第1の分析工程は、各モジュール内で疾患に特異的な転写産物の組の選択に使用される。次いで「発現レベル」がある。所定の疾患に関する群の比較により、各モジュールについて差次的に発現される転写産物のリストが提供される。異なる疾患が異なるサブセットのモジュール転写産物を生じることが見いだされた。この発現レベルを用いて、次に差次的に発現されると同定された遺伝子の疾患特異的サブセットの発現値を平均することにより、1つのサンプルについて各モジュール（1もしくは複数）に関するベクターを算出することが可能である。この取り組みにより1つのサンプルについて、モジュール発現ベクターのマップ、例えば本明細書に開示するモジュールマップを作成することが可能となる。これらのベクターモジュールマップは、各サンプルについて誘導され得る各モジュールの平均化発現レベルを表す（差次的に発現される遺伝子の比に代わり）。これらの複合「発現ベクター」は、1）実験グループ全体で有意に変化したモジュール、および2）実験グループ全体で有意に変化したこれらモジュール内の遺伝子を連続して選択することを介して形成される。引き続き発現レベルは、転写産物を形成するベクターのサブセットについて得られた値を平均化することにより引き出される。次いで患者のプロファイルは、これら各ベクターについて得られた発現レベルをグラフにプロットすることにより表すことができる（例えばラダープロット上）。したがって、1組のベクターが2回の選択、1回目はモジュールレベル、そして次に遺伝子レベルから生じる。ベクター発現値は、転写産物を形成するベクターの平均発現値から引き出されるように構築される。

30

40

#### 【0072】

本発明を使用して、モジュールレベルだけでなく、遺伝子レベルでも疾患を同定し、そして識別することが可能であり；すなわち2つの疾患は同じベクターを有することができるが（同一比の差次的に発現される転写産物、同一「極性」）、それでも発現ベクターの遺伝子組成は疾患特異的となり得る。この疾患特異的なニーズに合わせた改造により、使用者はその特異性を上げることにより与えられたマーカーの組の性能を至適化することができる。

50

## 【0073】

土台としてモジュールを使用することは、発現ベクターにノイズが最少量で含まれる整合性のある機能的な転写単位を与える。さらに本発明は複合転写マーカ―を利用する。本明細書で使用する「複合転写マーカ―」という用語は、マーカ―として個別の遺伝子を使用することに比べて、複数の遺伝子（モジュールのサブセット）の平均発現値を指す（そしてこれらマーカ―の組成は、疾患特異的であることができる）。複合転写マーカ―法は、使用者が例えばSLE患者の疾患重篤度を評価するために、または本明細書に開示する発現ベクターを引き出すために多変量マイクロアレイスコアを開発できるので独自である。発現ベクターが複合的であるという事実（すなわち、転写産物の組み合わせにより形成される）は、さらにこれらマーカ―の安定性に貢献する。最も重要であるのは、本発明の複合モジュール転写マーカ―を使用して、本明細書で見いだされた結果がマイクロアレイ平板全体で再現性があり、これにより調節承認の大きな信頼性を提供することが見いだされた点である。実際、ベクター発現値はマイクロアレイ平板全体で得られる優れた再現性により；ならびに独立した組の小児狼瘡患者で得られる検証結果により示されるように極めて強いことが証明された。これらの結果はマイクロアレイデータの信頼性を向上することが、臨床的実践においてこの技術の広く知られた使用に欠くことができないため重要である（例えばFDA MAQCプログラムを参照にされたい。これはアレイ平板全体の再現性を確立することを目的としている）。

10

## 【0074】

本発明と一緒に使用するための遺伝子発現モニタリングシステムには、1もしくは複数の標的疾患に特異的および/またはカスタマイズされた限定数および/または基本数の遺伝子を有するカスタマイズされた遺伝子アレイを含むことができる。通常使用されている一般的なパン-ゲノムアレイとは異なり、本発明は特異的平板を使用することを必要としない過去の遺伝子およびゲノム分析用の一般的パン-アレイの使用を提供するだけでなく、より重要なことは、数千もの他の無関係遺伝子を必要としない分析に最適な遺伝子組を提供するカスタマイズされたアレイの開発を提供する。既存の技術に優る本発明の最適化されたアレイおよびモジュールの1つの明らかな利点は、経費の削減（例えばアッセイ毎の、材料、装置、時間、人的、訓練等の経費）であり、そしてさらに重要なことは、ほとんどのデータが無関係であるパン-アレイを製造するための環境的経費の削減である。本発明のモジュールは、単純な設計、シグナル対ノイズ比を最大にすると同時に最少数のプローブで最適なデータを提供するカスタムアレイを初めて可能にする。分析のための遺伝子総数を削減することにより、例えばほとんど無関係な膨大な量のデータを提供するパン-遺伝子チップの製造中に、フォトリトグラフィー用の数千もの高価な白金マスクを製造する必要性を削減することが可能である。本発明を使用して、本発明の限定されたプローブ組（1もしくは複数）はデジタル光化学アレイ、ボールビーズアレイ、ビーズ（例えばLuminescence）、マルチプレックスPCR、定量的PCR、ラン-オンアッセイ、ノーザンブロット分析、あるいはさらにタンパク質の分析は例えばウエスタンブロット分析、2Dおよび3Dゲルタンパク質発現、MALDI、MALDI-TOF、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）（細胞表面または細胞内）、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、化学発光実験、酵素アッセイ、増殖実験または市販されているものから容易に入手可能な遺伝子発現の測定および/または分析用の任意の他の方法、装置および系と一緒に使用されれば、マイクロアレイの必要性を完全に回避することが可能である。

20

30

40

## 【0075】

本発明の「分子のフィンガープリンティング系」は、異なる細胞または組織、同じ細胞または組織の異なる部分集合、同じ細胞または組織の異なる生理学的状態、同じ細胞または組織の異なる発達段階、あるいは同じ組織の異なる細胞群における発現を、他の疾患および/または正常な細胞対照に対して比較分析することを容易にし、そして行うために使用することができる。幾つかの場合では、正常または野生型発現データは、同時もしくはほぼ同時に分析したサンプルに由来してよく、あるいはそれは既存の遺伝子アレイ発現データベース、例えばNCBI遺伝子発現多目的データベースのような公的なデータベース

50

から得た、または集めた発現データでよい。

【0076】

本明細書で使用するように、用語「差次的に発現する」とは、2以上のサンプル、例えば疾患のサンプルと正常サンプルとの間で変動する細胞の構成成分（例えば核酸、タンパク質、酵素活性等）の測定値を指す。細胞の構成成分はオンもしくはオフ（存在もしくは不存在）、参照に対してアップレギュレートされるか、または参照に対してダウンレギュレートされることができる。遺伝子チップまたは遺伝子アレイを用いた使用には、核酸、例えばmRNAまたは他のRNA（miRNA、siRNA、hnRNA、rRNA、tRNA等）の差次的遺伝子発現を使用して、細胞型または核酸間を識別することができる。最も普通には、細胞の転写状態の測定は、定量的逆転写酵素（RT）および/または定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、ゲノム発現分析、翻訳後分析、ゲノムDNAに対する修飾、トランスロケーション、in situハイブリダイゼーション等によりなされる。

10

【0077】

幾つかの疾患状態には、特に疾患状態の初期レベルで細胞または形態学的差異を同定することが可能である。本発明は、細胞そのものの自体の遺伝子のモジュールを調べることにより、さらに重要なことには細胞の通常の生理学的内容、すなわち免疫賦活化、免疫寛容またはさらに免疫エネルギーで作用している免疫エフェクター細胞に由来する遺伝子の細胞性RNAの発現を調べることにより、それら特異的変異または1もしくは複数の遺伝子を同定する必要性を回避する。遺伝的変異は遺伝子群の発現レベルに劇的な変化を生じることができるが、生物系はしばしば他の遺伝子の発現を改変することにより変化を補償する。これらの内部補償応答の結果として、多くの混乱（perturbation）は系において観察可能な表現型の効果が最少かもしれないが、細胞の構成成分の組成には顕著な効果を有する可能性がある。同様に、遺伝子転写産物の実際のコピーは増加も減少もしないかもしれないが、転写産物の寿命もしくは半減期が影響を受けて、タンパク質生産を大きく増加させる可能性がある。本発明は1つの態様では、1つのメッセージおよび/または変異よりもむしろエフェクター細胞（例えば白血球、リンパ球および/またはそれらの亜群）に注目することにより、実際のメッセージを検出する必要性を排除する。

20

【0078】

当業者は、サンプルが例えば単一細胞、細胞集団、組織、細胞培養物等を含む様々な供給源から得ることができると直ちに考えるだろう。特定の場合、例えば尿、血液、唾液、組織または生検サンプル等に見いだされる細胞から十分なRNAを単離することさえ可能となり得る。特定の状況では、十分な細胞および/またはRNAを：粘膜分泌物、糞、涙、血漿、腹腔液、間質液、硬膜液、脳脊髄液、汗または他の体液から得ることができる。核酸供給源、例えば組織もしくは細胞の供給源には、組織生検サンプル、1もしくは複数の分類した細胞群、細胞培養物、細胞クローン、形質転換細胞、生検材料または単一細胞を含む。組織供給源には、例えば脳、肝臓、心臓、腎臓、肺、脾臓、網膜、骨、神経系、リンパ節、内分泌腺、生殖器、血液、神経、脈管組織および嗅覚上皮を含むことができる。

30

【0079】

本発明は、単独または組み合わせて使用できる以下の基本的構成要素、すなわち1もしくは複数のデータマイニングアルゴリズム：1もしくは複数のモジュール-レベルの分析プロセス；血中白血球の転写モジュールの特性決定；ヒトの疾患の分子的診断/予知のための多変数分析における総（aggregated）モジュールデータの使用；および/またはモジュール-レベルのデータおよび結果の視覚化を含む。本発明を使用して、さらに1つの多変数スコアに集めることができる複合転写マーカーを開発および分析することも可能である。

40

【0080】

データ獲得速度の爆発的急増も、マイクロアレイデータおよび生物医学的知識を活用するためのマイニングツールおよびアルゴリズムの開発に拍車をかけた。転写系のモジュラ

50

一組織および機能を暴露する目的の取り組みは、疾患の強固な分子的兆候の同定に有望な方法を構成する(14-16, 17)。実際にそのような分析は、大規模な転写実験の概念を、個々の遺伝子のレベルまたは遺伝子のリストを越えたマイクロアレイデータの概念化を取ることにより転換することができる。

【0081】

本発明者は、現在のマイクロアレイに基づく調査が、評判の悪い「ノイズが高い」データ分析、すなわちデータは解釈が難しく、そして研究室および平板全体で十分に比較できないという重大な難題に直面していることを認識した。マイクロアレイデータの分析に広く受け入れられている取り組みは、実験群の間で差次的に発現する遺伝子のサブセットの同定から始まる。次いで使用者は引き続き、パターン発見アルゴリズムおよび既存の科学的知識を使用して生じた遺伝子リストに「意味を見いだす」。

10

【0082】

平板全体で膨大な変数を扱うというよりは、むしろ本発明者は分析の初期段階で生物学的に関連する遺伝子の選択を強調する方法を開発した。簡単に説明すると、この方法は所定の生物学的系を特徴付ける転写成分の同定を含み、このために改善されたデータマイニングアルゴリズムが開発され、大きなデータの集合から調和して発現される遺伝子または転写モジュールの群を分析、そして抽出した。

【0083】

本明細書に記載するバイオマーカー発見法は、全体的規模で得たマイクロアレイデータの活用によく適している。~44,000個の転写産物から始めて、5000に近い転写産物からなる28組のモジュールが定められた。次いで疾患特異的複合発現ベクターの組が誘導された。ベクター発現値(発現ベクター)は、マイクロアレイ平板全体をわたり得られる優れた再現性により示されるように極めて強固である。この知見はマイクロアレイデータの信頼性を向上することが臨床的実践においてこの技術の広く知られた用途に欠くことができないため重要である。最後に発現ベクターは次いで独自の多変量スコアを得るために合わせられることができ、したがって主流の臨床的実践と適合性がある状態の結果を送る。興味深いことに、多変量スコアは個々のマーカーにおける変化よりもむしろ全体的なパターンの変化を再現する。そのような「全体的バイオマーカー」の開発は、診断および薬理ゲノミクス分野の両方で有用となることができる。

20

【0084】

1例では、4742個のプロープ組にさらにグループ分けされる28個の転写モジュールが239個の血中白血球転写プロファイルから得られた。これらのモジュールを形成する遺伝子間の機能的収束(functional convergence)は、文献のプロファイリングを介して証明された。第2段階は、モジュール基準つ転写系の混乱(perurbation)を実験することからなる。この概念を具体的に説明するために、健康な有志および患者から得た白血球転写プロファイルを得、比較し、そして分析した。さらにこの遺伝子フィンガープリンティング法の検証は、公開されているマイクロアレイのデータセットの分析を介して得た。注目すべきは、既存のデータを使用した本発明のモジュラー転写装置、システムおよび方法が、2つの市販されているマイクロアレイ平板全体で高度な再現性を示した点である。

30

40

【0085】

本発明は転写系のモジュラー分析用に設計された広い応用性の2段階のマイクロアレイデータマイニング法の実行を含む。この新規取り組みは、血中白血球の転写的兆候を特徴付けるために使用され、これは臨床的に関連性のある情報の最もアクセス可能な供給源を構成する。

【0086】

本明細書で証明するように、たとえベクターが2つの疾患について同一(+ / +)(例えばSLEおよびFLUの両方についてM1.3 = 53%低下)でも、各ベクターの組成はそれらを区別するために使用できるので、2つのベクターに基づき2つの疾患の間を測定し、示差し、かつ/またはそれらを識別することが可能である。例えば差次的に発現さ

50

れる転写産物の比率および極性がM 1 . 3 の2つの疾患の間で同一であっても、遺伝子組成は疾患特異的となり得る。遺伝子レベルおよびモジュールレベルの分析を組み合わせることにより、解像度がかなり上昇する。さらに2、3、4、5、10、15、20、25、28以上のモジュールを使用して、疾患を区別することが可能である。

【0087】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド（例えば）、前駆体またはRNA（例えばmRNA）の生産に必要なコード配列を含む核酸（例えばDNA）配列、を指す。ポリペプチドは完全長のコード配列により、または完全長または断片の所望の活性または機能的特性（例えば酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性等）が保持される限り、コード配列の任意の部分によりコードされることができる。またこの用語は、構造遺伝子のコード領域および遺伝子が完全長のmRNAおよび遺伝子の転写特性に影響を及ぼす5'調節配列に対応するように、コード領域に5'および3'の両端で、各々の末端に約2 kb以上離れて隣接して配置された配列を包含する。コード領域の5'に位置し、そしてmRNA上に存在する配列は、5'-非翻訳配列と称する。5'-非翻訳配列は通常、調節配列を含む。コード領域の3'または下流に位置し、そしてmRNA上に存在する配列は、3'-非翻訳配列と称する。用語「遺伝子」は、cDNAおよび遺伝子のゲノム状態の両方を包含する。遺伝子のゲノム形またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と呼ばれる非-コード配列に中断されているコード領域を含む。イントロンは核のRNA（hnRNA）に転写される遺伝子のセグメントであり；イントロンはエンハンサーのような調節要素を含んでよい。イントロンは核または1次転写産物から除去または「スプライス」される；故にイントロンはメッセンジャーRNA（mRNA）転写産物中には不存在である。翻訳中、mRNAは発生のポリペプチド中のアミノ酸の配列または順序を特定するように機能する。

10

20

【0088】

本明細書で使用する用語「核酸」は、限定するわけではないがDNA、cDNAおよびRNAを含む任意の核酸含有分子を指す。特に用語「表X中の遺伝子」は、以下に見いだされるような特定の表に列挙される少なくとも1つの部分または完全長の配列を指す。さらに遺伝子はゲノム形態、すなわち1もしくは複数のイントロンを含む形態でも見いだすか、または検出することができる。ゲノム形態の遺伝子は、RNA転写産物に存在するコード配列の5'および3'末端の両方に配置される配列も含むことができる。これらの配列は「フランキング」配列または領域と称する。5'フランキング領域は、遺伝子の転写を制御し、またはそれに影響を及ぼすプロモーターおよびエンハンサーのような調節配列を含むことができる。3'フランキング領域は、転写終結、転写後開裂、mRNAの安定性およびポリアデニル化に影響を及ぼす配列を含むことができる。

30

【0089】

本明細書で使用する「野生型」とは、自然に存在する供給源から単離された遺伝子または遺伝子産物を指す。野生型遺伝子は、集団中で最も頻りに観察されるものであり、したがって任意に遺伝子の「標準」または「野生型」と命名される。対照的に、用語「修飾された」または「変異体」とは、野生型または遺伝子産物と比較した時、配列および/または機能的特性に修飾（すなわち、改変された特性）を表す遺伝子または遺伝子産物を指す。自然に存在する変異体を単離できることに注目されたい：これらは野生型遺伝子または遺伝子産物と比較した時、それらが改変された特性（改変された核酸配列を含む）を有するという事実により同定される。

40

【0090】

本明細書で使用する「多型」とは、単一の交配群で常に、および同時に遺伝子の2以上に対立遺伝子が生じることを指し、ここで異例（rare）な対立遺伝子の頻度は再発する突然変異のみにより説明できるより高い（典型的には1%より高い）。

【0091】

本明細書で使用する用語「をコードする核酸分子」、「をコードするDNA配列」および「をコードするDNA」とは、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチ

50

ドの順序または配列を指す。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、ポリペプチドタンパク質鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。このようにDNA配列はアミノ酸配列をコードする。

#### 【0092】

本明細書で使用する用語「相補的」または「相補性」は、塩基対の法則により関連付けられたポリヌクレオチドに関して使用される（すなわちヌクレオチドの配列）。例えば配列「A - G - T」は配列「T - C - A」に相補的である。相補性は「部分的」でよく、ここで幾つかの核酸塩基のみが塩基対の法則に従い対合する。すなわち核酸間の「完全」または「全」相補性が存在してよい。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強さに有意な効果を有する。これは増幅反応、ならびに核酸間の結合に依存する検出法に特に重要である。

10

#### 【0093】

本明細書で使用する用語「ハイブリダイゼーション」は、相補的な核酸の対合に関して使用する。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強度（すなわち核酸間の会合の強度）は、核酸間の相補性の程度、関与する条件のストリンジェンシー、形成するハイブリッドの $T_m$ 、および核酸内のG:C比のような因子に影響を受ける。その構造内に対合する相補的核酸を含む単一分子は、「セルフ-ハイブリダイズ」と言われる。

#### 【0094】

本明細書で使用する用語「ストリンジェンシー」は、温度、イオン強度のような条件および有機溶媒のような他の化合物の存在に関して使用され、この下で核酸のハイブリダイゼーションが行われる。「低ストリンジェンシー条件」下で、目的の核酸配列はその正確な相補鎖、1つの塩基誤対合がある配列、緊密に関連する配列（例えば、90%以上の相同性がある配列）および部分的な相同性のみを有する配列（例えば50~90%の相同性がある配列）にハイブリダイズする。「中程度のストリンジェンシー条件」下で、目的の核酸配列はその正確な相補鎖、1つの塩基誤対合がある配列および緊密に関連する配列（例えば90%以上の相同性がある配列）にのみハイブリダイズする。「高いストリンジェンシー条件」下で、目的の核酸配列はその正確な相補鎖、および（温度のような条件に依存し）1つの塩基誤対合がある配列にのみハイブリダイズする。換言すると、高いストリンジェンシー条件下では温度を上げて、1つの塩基誤対合がある配列へのハイブリダイゼーションを排除することができる。

20

30

#### 【0095】

本明細書で使用する「プローブ」とは、精製された制限酵素消化物の状態のような自然に存在するか、または合成的、組換え的、もしくはPCR増幅により生産されているにせよオリゴヌクレオチド（すなわちヌクレオチドの配列）を指し、これは目的の別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。プローブは単鎖または二本鎖でよい。プローブは特定の遺伝子配列の検出、同定および単離に有用である。本発明で使用する任意のプローブは、限定するわけではないが酵素（例えばELISAならびに酵素に基づく組織化学的アッセイ）、蛍光、放射性、発光系等を含む任意の検出系で検出できるように、任意の「レポーター分子」で標識することができる。本発明はいかなる特定の検出系または標識にも限定されないことを意図している。

40

#### 【0096】

本明細書で使用する用語「標的」は、プライマーにより結合される核酸の領域を指す。すなわち「標的」には他の核酸配列から分類されることが求められる。「セグメント」は標的配列中の核酸の領域と定義される。

#### 【0097】

本明細書で使用する用語「サザンプロット」とは、DNAをサイズに従い分画し、続いてDNAをゲルからニトロセルロースまたはナイロン膜のような固体支持体に移すためのアガロースまたはアクリルアミドゲルでのDNAの分析を指す。次いで固定化DNAは、標識されたプローブで釣り上げられ（probe d）、使用したプローブに相補的なDN

50

A種を検出する。DNAは電気泳動前に制限酵素で開裂され得る。電気泳動後、DNAは部分的に脱プリン化され、そして固体支持体に移される前または最中に変性される。ザンブロットは分子生物学の標準的ツールである(Sambrook et al., モレキュラークローニング: アラボラトリーマニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバー出版、ニューヨーク、pp 9.31~9.58、1989)。

【0098】

本明細書で使用する用語「ノーザンブロット」とは、RNAをサイズに従い分画し、続いてRNAをゲルからニトロセルロースまたはナイロン膜のような固体支持体に移すためのアガロースゲルでのRNAの電気泳動による分析を指す。次いで固定化RNAは、標識されたプローブで釣り上げられ(probed)、使用したプローブに相補的なRNA種が検出される。ノーザンブロットは分子生物学者の標準的ツールである(Sambrook et al. 同上、pp 7.39~7.52、1989)。

10

【0099】

本明細書で使用する用語「ウエスタンブロット」とは、ニトロセルロースまたは膜のような支持体に固定化されたタンパク質(1もしくは複数)(またはポリペプチド)の分析を指す。タンパク質をアクリルアミドゲル上に流してタンパク質を分離し、続いてタンパク質をゲルからニトロセルロースまたはナイロン膜のような固体支持体に移す。次いで固定化されたタンパク質は、目的の抗原と反応性の抗体に暴露される。抗体の結合は放射標識抗体の使用を含め、様々な方法により検出される。

20

【0100】

本明細書で使用する用語「ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)」は、K. B. Mullis(引用により編入する米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号および同第4,965,188号明細書)の方法を指し、これはクローニングまたは精製無しでゲノムDNAの混合物中に標的配列のセグメントの濃度を上げる方法を記載する。標的配列を増幅するこのプロセスは、大過剰の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを、所望の配列を含むDNA混合物に導入すること、続いてDNAポリメラーゼの存在下での正確な順序の熱循環からなる。2つのプライマーは、二本鎖標的配列のそれらの各鎖に相補的である。増幅を行うために、混合物を変性させ、そして次いでプライマーを標的分子内のそれらの相補配列にアニーリングさせる。アニーリング後、プライマーは新規の相補鎖対が形成するようにポリメラーゼで延長される。変性、プライマーのアニーリングおよびポリメラーゼ延長の工程は、所望する標的配列が増幅された高濃度のセグメントを得るために、多数回反復することができる(すなわち変性、アニーリングおよび延長は1回の「サイクル」を構成し;多数の「サイクル」が存在できる)。所望の標的配列の増幅したセグメントの長さは、互いにプライマーの相対的位置により決定され、したがってこの長さは制御可能なパラメーターである。この反復する工程の観点により、この方法は「ポリメラーゼ連鎖反応」(今後「PCR」と呼ぶ)と呼ばれる。標的配列の所望する増幅したセグメントは、混合物中で優勢な配列(濃度という意味で)となるので、それらは「PCRで増幅された」と言う。

30

【0101】

本明細書で使用する用語「PCR産物」、「PCR断片」および「増幅産物」とは、2サイクル以上の変性、アニーリングおよび延長のPCR工程が完了した後に生じる化合物の混合物を指す。これらの用語は、1もしくは複数の標的配列を1もしくは複数のセグメントの増幅があった場合を指す。

40

【0102】

本明細書で使用する用語「リアルタイムPCR」は、反応の完了後に対して増幅が反応中に測定される様々なPCRの応用を指す。本発明のリアルタイムPCRの態様に適する試薬には、限定するわけではないがTaqManプローブ、分子ビーコン、スコルピオン(Scorpions)プライマーまたは二本鎖DNA結合色素を含む。

【0103】

50

本明細書で使用する用語「転写のアップレギュレーション」、「過剰発現」および「過剰発現される」とは、DNA鋳型を使用してRNAポリメラーゼによるRNAの合成の増加を指す。例えば本発明の方法を参照にして使用する場合、用語「転写のアップレギュレーション」は、SLEに対する素因がない個体に由来するサンプル中で検出されるものと比較した時、SLEに対して素因がある個体に由来するサンプル中に検出される目的遺伝子に対応するmRNAの量に、約1倍、2倍、2～3倍、3～10倍およびさらに10倍より高い増加を指す。しかし系および評価は十分特異的であり、検出される発現で要求される変化はその2倍未満未満である。さらに発現の変化は、細胞レベルでよく（単一の細胞または細胞群内の発現における変化）、あるいは組織レベルで評価されてもよく、ここでは遺伝子を発現している多くの細胞中に変化がある。組織の分析の内容において、遺伝子発現の変化は遺伝子活性の調節または細胞組成における相対的变化のいずれかによることができる。特に有用な差異は、統計的に有意であるものである。

10

**【0104】**

逆に用語「転写のダウンレギュレーション」、「抑制発現 (under expression)」および「抑制発現される (under expressed)」という用語は互換的に使用され、そしてDNA鋳型を使用してRNAポリメラーゼによるRNAの合成の減少を指す。例えば本発明の方法を参照にして使用する場合、用語「転写のダウンレギュレーション」は、SLEのような状態に対する素因がない個体に由来するサンプル中で検出されるもの、または野生型および/または正常対照、例えば線維筋痛症に関する情報のデータベースと比較した時、SLEに対して素因がある個体に由来するサンプル中に検出される目的遺伝子に対応するmRNAの量に、少なくとも1倍、2倍、2～3倍、3～10倍および10倍より高い減少を指す。ここでも系および評価は十分特異的であり、検出される発現で要求される変化はその2倍未満である。特に有用な差異は、統計的に有意であるものである。

20

**【0105】**

転写の「アップレギュレーション」/過剰発現、および転写の「ダウンレギュレーション」/抑制発現の両方とも、目的遺伝子に対応する翻訳産物またはタンパク質レベルの測定を介して間接的にモニタリングすることができる。本発明は転写のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションに関するいかなる所定のメカニズムにも限定されない。

30

**【0106】**

本明細書で使用する用語「真核細胞」は、膜に結合し、構造的に別個の核および他の十分に発達した細胞下区画を持つ細胞または生物を指す。真核生物には、ウイルス、バクテリアおよび藍藻を除くすべての生物を含む。

**【0107】**

本明細書で使用する用語「インビトロ転写」は、プロモーターを含む精製されたDNA鋳型、リボヌクレオチド三リン酸、還元剤およびカチオン、例えばDTTおよびマグネシウムイオンを含むバッファー系、および適切なRNAポリメラーゼを含んでなる転写反応を指し、これは生きている細胞または生物の外側で行われる。

40

**【0108】**

本明細書で使用する用語「増幅試薬」は、プライマー、核酸鋳型および増幅酵素を除き、増幅に必要な試薬（デオキシリボヌクレオチド三リン酸、バッファー等）を指す。典型的には増幅試薬は他の反応成分と一緒に、反応容器（試験管、マイクロウェル等）に置かれ、そして含まれる。

**【0109】**

本明細書で使用する用語「診断」とは、疾患の症例の性質を決定すること指す。本発明の幾つかの態様では、SLEの決定を可能にする診断を作成する方法が提供される。

**【0110】**

本発明は疾患の進行および/または患者の管理をモニタリングするために単独で、または疾患療法と組み合わせて使用することができる。例えば患者は1もしくは複数回検査さ

50

れて、処置の最適な過程を決定し、処置が意図する医学効果を有するかどうか、患者が特定の治療およびその組み合わせの候補となるかどうかを決定することができる。当業者は1もしくは複数の発現ベクターが1もしくは複数の疾患の指標となり得、そして急性または慢性の他の状態により影響を受け得ることを認識している。

【0111】

本明細書で使用する用語「薬理遺伝学試験」とは、例えば薬剤吸収および素因（薬物動態学）または薬剤作用（薬力学）に関連するDNA配列中の個体内変動を実験することを意図するアッセイを指し、これには機能、例えば輸送、代謝酵素、受容体および他のタンパク質をコードする1もしくは複数の遺伝子の多型の変化を含むことができる。

【0112】

本明細書で使用する用語「薬理ゲノミック試験」とは、全ゲノムまたは候補遺伝子における個体内変化、例えば単一ヌクレオチド多型（SNP）マップまたはハプロタイプマーカー、ならびに薬理的機能および治療的応答と関連し得る遺伝子発現の改変または不活性化を実験するために使用するアッセイを指す。

【0113】

本明細書で使用する「発現プロファイル」とは、複数の細胞構成成分の相対的量（abundance）の測定を指す。そのような測定には、例えばRNAまたはタンパク質量または活性レベルを含むことができる。発現プロファイルは例えば転写状態または翻訳状態の尺度であることができる。引用により本明細書に編入する米国特許第6,040,138号、同5,800,992号、同第6,020,135号、同第6,033,860号明細書の関連部分を参照にされたい。遺伝子発現モニタリング系は、核酸プローブアレイ、膜プロット（ノーザン、サザン、ドット等のようなハイブリダイゼーション分析に使用するような）、またはマイクロウェル、サンプル管、ゲル、ビーズまたはファイバー（または結合した核酸を含んでなる任意の固体支持体）を含む。例えば引用により本明細書に編入する米国特許第5,770,722号、同5,874,219号、同第5,744,305号、同第5,677,195号および同第5,445,934号明細書の関連部分を参照にされたい。遺伝子発現モニタリング系は溶液状の核酸プローブも含んでなることができる。

【0114】

本発明の遺伝子発現モニタリング系は、異なる細胞もしくは組織、同じ細胞もしくは組織の異なる部分集団、同じ細胞もしくは組織の異なる生理学的状態、同じ細胞もしくは組織の異なる発達段階、または同じ組織の異なる細胞集団の発現の比較分析を容易にするために使用できる。

【0115】

本明細書で使用する用語「差次的（differentially）に発現される」とは、2以上のサンプルで変動する細胞成分の測定を指す。細胞成分は、試験サンプル中で参照に対してアップレギュレートされるか、あるいは試験サンプル中で1もしくは複数の参照に対してダウンレギュレートされる。差次的遺伝子発現はまた、細胞型または核酸間を識別するためにも使用することができる。引用により本明細書に編入する米国特許第5,800,992号明細書の関連部分を参照にされたい。

【0116】

治療または治療的処方：疾患状態を緩和または改変するために、治療または治療的処方しばしば行われる。本明細書で使用する治療または治療的処方は、疾患の影響または症状を減らすか、または排除することを意図する処置の過程を指す。治療的処方は典型的には、1もしくは複数の薬剤の処方された投薬または外科医術を含んでなるが、これらに限定されない。治療は理想的には有益であり、そして疾患状態を減らすか、多くの場合、治療の効果には望ましくない副作用もある。治療の効果はサンプルの生理学的状態によっても影響を受けるだろう。

【0117】

モジュールは異なる「転写挙動」を提示する。これは広く、同時発現する遺伝子が機能

10

20

30

40

50

的に関連していると考えられている。この「連合による活性化 (guilt by association)」の概念は、遺伝子が多くのサンプルにわたり複雑な発現パターンに従う場合に特に強要されている (compelling)。本発明者は転写モジュールが整合的な生物学的単位を形成し、したがって我々の初期のデータセットで同定された同時発現特性が独立したサンプルの組で保存されると予想した。データは21名の健康な有志の血液から単離したP B M Cについて得た。これらのサンプルは上記のモジュール選択プロセスでは使用しなかった。

**【0118】**

M1.2に高度に特異的なキーワードには、血小板、凝集または血栓症を含み、そしてITGA2B (インテグリンアルファ2b、血小板糖タンパク質IIb)、PF4 (血小板因子4)、SELP (セレクトインP) およびGP6 (血小板糖タンパク質6) のような遺伝子に関連した。

10

**【0119】**

M1.3に高度に特異的なキーワードには、B細胞、免疫グロブリンまたはIgGを含み、そしてCD19、CD22、CD72A、BLNK (B細胞リンカータンパク質)、BLK (Bリンパ球チロシンキナーゼ) およびPAX5 (ペアードボックス遺伝子5、B細胞系特異的アクチベーター) のような遺伝子に関連した。

**【0120】**

M1.5に高度に特異的なキーワードには単球、樹状突起の、CD14またはToll様を含み、そしてMYD88 (ミエロイド分化一次応答遺伝子88)、CD86、TLR2 (Toll様受容体2)、LILRB2 (白血球免疫グロブリン様受容体B2) およびCD163のような遺伝子と関連した。

20

**【0121】**

M3.1に高度に特異的なキーワードには、インターフェロン、IFN-アルファ、抗ウイルスまたはISREを含み、そしてSTAT1 (シグナル伝達および転写1のアクチベーター)、CXCL10 (CXCKeモカインリガンド10、IP-10)、OAS2 (オリゴアデニル酸シンターゼ2) およびMX2 (ミクソウイルス耐性2) のような遺伝子に関連した。

**【0122】**

この用語の存在の対比パターンは、各モジュールの注目すべき機能的整合性を表す。同定されたすべてのモジュールについて文献から抽出された情報は、転写レベルでP B M C系の包括的な機能的特性決定を可能とする。28のサンプルの各P B M C転写モジュールについて同定された機能的関連の説明を表2に提供する。

30

**【0123】**

【表 8】

表2: 28の転写モジュールの完全な機能的評価

モジュール I. D.	プローブ の組数	キーワードの選択	評価	
M 1.1	69	Ig、免疫グロブリン、骨、骨髄、PreB, IgM, Mu	形質細胞。免疫グロブリン鎖(例えば IGHM, IGJ, IGLL1, IGKC, IGHD)および形質細胞マーカー CD38 をコードする遺伝子を含む;	
M 1.2	96	血小板、接着、凝集、内皮脈管	血小板。血小板糖タンパク質 (ITGA2B, ITGB3, GP6, GP1A/B)、および PPPB(プロ-血小板塩基性タンパク質)および PF4(血小板因子4)のような血小板由来免疫メディエーターをコードする遺伝子を含む;	10
M 1.3	47	イムノレセプター BCR、B 細胞、IgG	B細胞。B細胞表面マーカー(CD72, CD79A/B, CD19, CD22)および他のB細胞関連分子: 初期B細胞因子(EBF)、B細胞リンカー(BLNK)およびBリンパ系チロシンキナーゼ(BLK)をコードする遺伝子を含む;	
M 1.4	87	複製、抑制、修復、CREB、リンパ系、TNF-アルファ	未決定。この組は cAMP シグナル伝達経路のレギュレーターおよび標的(JUND, ATF4, CREM, PDE4, NR4A2, VIL2)、ならびに TNF-アルファ媒介型 NF-KB 活性化のリプレッサー(CYLD, ASK, TNFAIP3)を含む;	20
M 1.5	130	単球、樹状突起の、MHC、同時刺激、TLR4、MYD88	ミエロイド系。ミエロイド系細胞により発現される分子(CD86, CD163, FCGR2A)(その中には病原体の認識に関与するものもある: CD14, TLR2, MYD88)の細胞により発現される分子を含む。この組は TNF ファミリーメンバー(TNFR2, BAFF)も含む;	30
M 1.6	28	亜鉛、フィンガー、P53、RAS	未決定。この組はシグナル伝達分子、例えば活性化 STAT (PIAS1 および PIAS2)の亜鉛フィンガー含有インヒビター、または活性化T細胞の核因子 NFATC3 をコードする遺伝子を含む;	
M 1.7	127	リボゾーム、翻訳 40S, 60S, HLA	MHC/リボゾームタンパク質。MHC クラスI分子 (HLA-A,B,C,G,E)+ベータ 2-ミクログロブリン (B2M)またはリボゾームタンパク質(RPLs, RPSs)をコードする遺伝子によりほとんど排他的に形成される;	40
M 1.8	86	代謝、生合成、複製、ヘリカーゼ	未決定。代謝酵素(GLS, NSF1, NAT1)およびDNA複製に関与する因子(PURA, TERF2, EIF2S1)をコードする遺伝子を含む;	

【表 9】

モジュール I. D.	プローブ の組数	キーワードの選択	評価	
M 2.1	72	NK, キラー、 細胞溶解、CD8、 細胞媒介型、 T細胞、CTL、 IFN-g	細胞傷害性細胞。細胞傷害性T細胞およびNK 細胞表面マーカー(CD8A, CD2, CD160, NKG7, KLRs)、細胞溶解分子(グランザイム、パーホリ ン、グラニュリシン)、ケモカイン(CCL5, XCL1)お よび CTL/NK-細胞関連分子(CTSW)を含む;	10
M 2.2	44	顆粒球、好中球、 防御、ミエロイド、 骨髄	好中球。この組は好中球顆粒(ラクトランスフェ リン: LTF、デフェンシン: DEAF1, 細菌透過性増 加タンパク質: BPI、カセリシジン抗微生物タンパ ク質: CAMP…)に見いだされる内在性分子を含 む;	
M 2.3	94	赤血球、赤、 貧血、グロビン、 ヘモグロビン	赤血球。ヘモグロビン遺伝子(HGBs)および他の 赤血球関連遺伝子(赤血球のアルキリン: ANK1、グリコホリン C: GYPC、ヒドロキシメチル ピラン シンターゼ: HMBS、赤血球関連因子: ERAF)を含む;	20
M 2.4	118	リボヌクレオタン パク質、60S、 核小体、アッセン ブリー、延長	リボゾームタンパク質: リボゾームタンパク質 (RPLs, RPSs)、真核生物翻訳伸長因子ファミリ メンバー (EEFs)および核小体タンパク質(NPM1, NOAL2, NAP1L1)をコードする遺伝子を含む;	
M 2.5	242	腺癌、間質の、 間葉、樹状突起、 運動	未決定。このモジュールは免疫関連(CD40, CD80, CXCL12, IFNA5, IL4R)ならびに細胞骨格 関連分子(ミオシン、サイトキネシスのデディケー ター、シンデカン 2、プレキシシン C1, ジストロブレ ピン)をコードする遺伝子を含む;	
M 2.6	110	顆粒球、単球、 ミエロイド、ERK、 壊死	ミエロイド系。M1.5 に関連する。単球および好中 球のようなミエロイド系細胞(IGTB2/CD18、リンホ トキシンベータ受容体、ミエロイド関連タンパク質 8/14 ホルミルペプチド受容体 1)で発現する遺伝 子を含む;	30
M 2.7	43	キーワードは抽出 されない	未決定。このモジュールは、未知の機能の転写 産物からほぼ構成される。ケモカイン様因子スー パーファミリー(CKLFSF8)の1メンバーを含め、文 献に関連するわずか20個の遺伝子;	
M 2.8	104	リンパ腫、T細胞、 CD4, CD8, TCR、 胸腺、リンパ系、 IL2	T細胞: T細胞表面マーカー(CD5, CD6, CD7, CD26, CD28, CD96)およびリンパ系細胞により発 現される分子(リンホトキシンベータ IL2-誘導性T 細胞キナーゼ, TCF7, T細胞分化タンパク質 mal, GATA3, STAT5B)を含む;	40

【表 10】

モジュール I. D.	プローブ の組数	キーワードの選択	評価	
M 2.9	122	ERK、 トランス活性化、 細胞骨格、MAPK、 JNK	未決定。細胞骨格に関連する分子（アクチン関連タンパク質 2/3, MAPK1, MAP3K1, RAB5A)をコードする遺伝子を含む。また存在するのは、T細胞が発現する遺伝子 (FAS, ITGA4/CD49D, ZNF1A1);	
M 2.10	44	ミエロイド、 マクロファージ、 樹状突起、炎症 インターロイキン	未決定。免疫関連細胞表面分子(CD36, CD86, LILRB)、サイトカイン(IL15)およびシグナル伝達経路に関与する分子(FYB, TICAM2-Toll-様受容体経路)をコードする遺伝子を含む;	10
M 2.11	77	複製、抑制、 RAS、自己リン酸化作用、 発癌遺伝子	未決定。キナーゼ(UHMK1, CSNK1G1, CDK6, WNK1, TAOK1, CALM2, PRKCI, ITPKB, SRPK 2, STK17B, DYRK2, PIK3R1, STK4, CLK4, PKN2) および RAS ファミリーメンバー(G3BP, RAB14, RAS A2, RAP2A, KRAS)を含む;	
M 3.1	80	ISRE、 インフルエンザ、 抗ウイルス、 IFN-ガンマ、 IFN-アルファ、 インターフェロン	インターフェロン誘導性。この組はインターフェロン誘導性遺伝子：抗ウイルス分子(OAS1/2/3/L, GBP1, G1P2, EIF2AK2/PKR, MX1, PML)、ケモカイン (CXCL10/IP-10)、シグナル伝達分子(STAT1, STAT2, IRF7, ISGF3G)を含む;	20
M 3.2	230	TGF-ベータ、 TNF、炎症、 アポトーシスの、 リポ多糖	炎症I。炎症プロセスに関与する分子(IL8, ICAM1, C5R1, CD44, PLAUR, IL1A, CXCL16)、およびアポトーシスのレギュレーター(MCL1, FOXO3A, RARA, BCL3/6/2A1, GADD45B)をコードする遺伝子を含む;	
M 3.3	230	顆粒球、炎症 防御、酸化する、 リソソームの	炎症II。顆粒球-マクロファージCSFを誘導する、またはそれにより誘導性の(SPI1, IL18, ALOX5, ANPEP)、ならびにリソソーム酵素を誘導する、またはそれにより誘導性の(PPT1, CTSS/S, CE S1, NEU1, ASAHL, LAMP2, CAST)の分子を含む;	30
M 3.4	323	キーワードは抽出 されない	未決定。タンパク質ホスフェート(PPP1R12A, PTPRC, PPP1CB, PPM1B)およびホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K)ファミリーメンバー(PIK3CA, PIK32A, PIP5K3)を含む;	40
M 3.5	19	キーワードは抽出 されない	未決定。わずかな数の転写産物から構成される。ヘモグロビン遺伝子(HBA1, HBA2, HBB)を含む;	

【 0 1 2 6 】

【表 1 1】

モジュール I. D.	プローブ の組数	キーワードの選択	評価	
M 3.6	233	補体、宿主 酸化、 細胞骨格、T細胞	未決定。この大変大きい組はT細胞表面マーカー(CD101, CD102, CD103)、ならびに血中白血球の回りで偏在的に発現される分子(CXCR1: フラクタルキン受容体, CD47, P-セレクチンリガンド)を含む;	
M 3.7	80	スプライソソーム、 メチル化、 ユビキチン、 ベーターカテニン	未決定。プロテアソームサブユニット(PSMA2/5, PSMB5/8); ユビキチンタンパク質リガーゼ HIP2, STUB1、ならびにユビキチンリガーゼ複合体(SUGT1)の成分をコードする遺伝子を含む;	10
M 3.8	182	CDC、TCR、 CREB、 グリコシラーゼ	未決定。幾つかの酵素: アミノメチルトランスフェラーゼ、アルギニルトランスフェラーゼ、アスパラギンシンテターゼ、ジアシルグリセロールキナーゼ、イノシトールホスファターゼ、メチルトランスフェラーゼ、ヘリカーゼ... をコードする遺伝子を含む;	
M 3.9	261	クロマチン、 チェックポイント、 複製、 トランス活性化	未決定。プロテインキナーゼ(PRKPIR, PRKDC, PRKCI)およびホスファターゼ(例えば PTPLB, PPP1R8/2CB)をコードする遺伝子を含む。また RAS 癌遺伝子ファミリーメンバーおよび NK 細胞受容体 2B4 (CD244)も含む。	20

## 【0 1 2 7】

本発明は、モジュールレベルのマイクロアレイデータ分析法の手段および免疫転写ベクターの特性決定の実行を含む。血中白血球転写プロファイルのモジュールの分解は、疾患の病因の理解を改善し、例えば黒色腫および肝移植受容体の患者に共通する免疫抑制のサインの同定を導く。本明細書では、免疫転写ベクターが診断マーカーおよび疾患の重篤度の指標として使用できることが証明される。

## 【0 1 2 8】

従来技術のマイクロアレイデータマイニング法。「従来の」マイクロアレイ分析からの結果はノイズで評判が悪く、そして解釈が難しい。通常の遺伝子レベルのマイクロアレイ分析は、3つの基礎段階を含む(図1a); I. グループ比較: 差次的に発現される遺伝子は異なる実験グループを比較することにより同定される。II. パターン発見: 差次的に発現される遺伝子は、多くの条件にわたりそれらの転写プロファイルに従いグループ分けされる。III. 機能的注釈/分析: 転写のサインを形成する遺伝子間の機能的関係は、オントロジーに基づく、および/または文献に基づく分析ツールを使用して暴露される。この遺伝子レベルの分析法は、一般的なマイクロアレイデータマイニングソフトウェアにより支援され、そしてマイクロアレイの刊行物で通常に使用されている(例えば(Borovecki et al., 2005; Calvano et al., 2005; Ockenhouse et al., 2005; Willinger et al., 2005))。

## 【0 1 2 9】

対照的に、代わりに本明細書に記載するマイクロアレイデータマイニング法は、分析の後期段階で独立した統計的なグループ比較を行うために基本として役立つ転写モジュールの初期特性決定に依存する(図1b): I. モジュール抽出: 協調して発現される遺伝子の組は、カスタムモジュール抽出アルゴリズムを使用して同定される(詳細については図1c、および以下に教示する方法)。重要なのは、分析が実験グループ間の遺伝子発現レ

ベルにおける差異を考慮しない点である：代わりにこれは生物学的変動から生じる複雑な遺伝子発現パターンに注目する（例えば患者群の個体間変動、または異なる処置により導入された変動）。I I . 機能的注釈 / 分析：転写モジュールを形成する遺伝子間の機能的関係は、オントロジーに基づく、および / または文献に基づく分析ツールを使用して暴露される。I I I . グループ比較：差次的に発現される遺伝子は、モジュール毎の基準で実験グループを比較することにより、この段階で同定される。各モジュールのレベルで統計比較を行うことは、数千の試験がマイクロアレイプローブの全組をわたって行われる時、生じるノイズを回避するので注目すべきである。I V . 視覚化 / 解釈：最後にデータは、すべてのモジュールにわたり起こる全体的な転写の変化をマッピングすることにより解釈される。

10

## 【0130】

本明細書に記載するマイクロアレイ分析は、協調して発現される転写産物または転写モジュールの組の同定に基づき、これはデータマイニングアルゴリズムを使用して引き出される：すなわちこの「データにより支配される (data-driven)」選択法は、調査者の側からのいかなる介入も必要とせず、そして遺伝子機能に関するいかなる事前の知識も必要としない。転写モジュールは選択法が取られた後にのみ機能的分析にかけられる。モジュール組は、それらが由来する生物学的系に特異的であることに注目されたい。その結果、モジュールは定められた生物学的系の内容で得られたデータを分析するための骨格を形成する（すなわち血液の転写モジュールは別の組織から得られるデータを分析することを可能にしない：種々のモジュール組が生成されなければならない）。

20

## 【0131】

末梢血細胞中の転写モジュールの同定：上記のモジュールマイニング法は、末梢血単核細胞 (P B M C) 転写データセットについて実施された。血中白血球の転写モジュールの同定は、広い範囲の疾患：全身型若年性突発性関節炎、全身性エリテマトーデス (S L E) 、I 型糖尿病、転移性黒色腫、急性感染 (大腸菌、黄色ブドウ球菌、インフルエンザ A) および免疫抑制療法を受けている肝移植受容体について作成されたマイクロアレイ遺伝子発現プロファイルの詳細な収集の分析に基づいた。全部で 239 種の P B M C 転写プロファイルが、アフィメトリックス (A f f y m e t r i x) U 133A および U 133B GeneChips (> 44,000 プローブ組) を使用して得られた。転写モジュールはカスタムアルゴリズム (詳細は方法の章を参照されたい) を使用して抽出した。この分析に、28 のモジュールに分布する 4742 個の転写産物が選択された (完全なリストは追補の表 1 に提供される)。各モジュールは回数および選択の順番を示す独自の確認番号が割り当てられた (すなわち M 3 . 1 は第 3 回の選択で最初に同定されたモジュールであった)。

30

## 【0132】

P B M C 転写モジュールの機能的特性決定。モジュールは整合性のある転写単位を形成し、したがって初期のデータセットで同定される同時発現特性は、独立したサンプルの組で保存されることが分かった。1 つのデータの組で確認されたこの考察が、上記のモジュール選択法で使用しなかった 21 名の個体の血液から単離した P B M C について得られた (図 2 c)。次いで各モジュールは機能的に特性決定された (図 1 b : 工程 I I)。各モジュールを形成する遺伝子と関係がある Pub Med 要約に存在するキーワードは、文献プロファイリングにより分析された (Chaussabel and Sher, 2002) に記載されている)。差次的キーワードの分布は、図 2 d の 4 つのモジュールについて具体的に説明され、そして 28 個の P B M C 転写モジュールの各々に関して同定された機能的関係の記載を、追補の表 2 に提供する。この分析は、転写モジュールが整合性のある機能的単位を形成することを証明する。28 個の P B M C モジュールの 14 個で、本発明は幾つかの遺伝子を免疫プロセスに関連する経路および細胞型と関連させるために使用した。機能的収束 (functional convergence) も残る 14 個のモジュールで観察されたが、実際の係わりあいには不明なままである (例えば M 2 . 5 は免疫に関連する C D 40、C D 80、C X C L 12、I F N A 5、I L 4 R、ならびに細胞

40

50

骨格関連分子 - ミオシン、サイトキネシスのデディケーター ( D e d i c a t o r )、シンデカン2、プレキシンC1、ジストロプレピンをコードする遺伝子を含み；あるいはM2.11、これは多くのキナーゼ - U H M K 1、C S N K 1 G 1、C D K 6、W N K 1、T A O K 1、C A L M 2、P R K C I、I T P K B、S R P K 2、S T K 1 7 B、D Y R K 2、P I K 3 R 1、S T K 4、C L K 4、P K N 2 および R A S ファミリーメンバー、G 3 B P、R A B 1 4、R A S A 2、R A P 2 A、K R A S を含む)。

#### 【0133】

健康および疾患でのPBM C転写プロファイルのモジュールレベルの分析。遺伝子レベルの分析：PBM Cマイクロアレイ転写プロファイルは、16名の転移性黒色腫患者、および免疫抑制の薬剤処置を受けている16名の肝移植受容体、および適合した健康な対照個体から得た。図1aに記載する遺伝子レベルの分析は、患者および各々の健康な対照グループの間で差次的に発現された転写産物を同定した(マンホイットニーのU検定、 $p < 0.001$ )。階層クラスタリングは各グループ内で2つのサインを定め、過剰発現した、および抑制発現した転写産物を分けた(図2a)。

10

#### 【0134】

モジュールレベルの分析：この分析は前以て抽出し、そして特性決定したPBM C転写モジュールを使用して行った(図1bの工程IおよびII)。患者と健康なグループ間の統計的なグループの比較は、モジュール毎の基準で独立して行った(図1b：工程III、マンホイットニーU検定、 $p < 0.05$ )。各モジュールについて、差次的に発現される遺伝子の転写プロファイルをグラフ上に表し、パイ・チャート(pie-chart)は差次的に発現される転写産物の比率を示す(図2b、例えばモジュールM1.2を形成する130の転写産物のうちの61%が、健康な対照に比べて黒色腫患者で過剰に発現される)。興味深いことに、各モジュール中の差次的に発現される遺伝子は、主に抑制発現されるか、または過剰発現されるかのいずれかであった(図2b、追補の表2)。モジュールはグループ間の発現レベルの差異に基づき抽出されなかったため、遺伝子発現における変化がほとんど合意されているという事実は、各モジュールを特徴付ける転写挙動の一貫性を反映している。

20

#### 【0135】

モジュールの転写変化のマッピング：データの視覚化は、複雑なデータセットの解釈に最高であり、そしてこれらはグラフにより全体的なモジュールの変化を具体的に説明するために使用された(図1b：工程IV)。モジュールレベルのデータは、格子上に並んだスポットにより表示され、各位置は異なるモジュールに対応する(図2c)。スポットの強度は、各モジュールについて有意に変化した遺伝子の比を示す。スポットの色は、変化の極性を示す(赤：過剰発現した遺伝子の比、青：抑制発現された遺伝子の比)。この表示はPBM C転写系の混乱(perurbation)の全体的評価を可能とする。モジュールの座標は、データの解釈を容易にするために機能的な注釈と関連させることができる(図2d、追補の表2)。

30

#### 【0136】

モジュール分析は、PBM C転写プロファイルの疾患特異的混乱を暴露する：モジュールマップは、4グループの患者について、彼らの年齢および性別が合った健康な供与体からなる各対照グループと比較するために作成した(22名のSLE患者、16名の急性インフルエンザ感染、16名の転移性黒色腫および16名の肝移植受容体を、10~12名の健康な個体からなる対照グループと比較した)。各モジュールは、その遺伝子がどのようなかによって4つの可能な状態の1つを有する：過剰発現(赤点)、抑制発現(青点)、過剰-および抑制発現の両方(紫の点、ここでは観察されない)、変化なし(空)。注目すべきは、M1.1およびM1.2に関する結果だけで4種のすべての疾患を識別するに十分であった(M1.1/M1.2：SLE = + / 0；FLU = 0 / 0；黒色腫 = - / +；移植 = - / -)。M3.2(「炎症」)の多数の遺伝子がすべての疾患で過剰に発現され(特に移植群で過剰)、一方、M3.1の遺伝子(インターフェロン)は、SLE患者、インフルエンザ感染およびある程度の移植受容体で過剰に発現された。M2.1

40

50

および M 2 . 8 はそれぞれ、細胞傷害性細胞および T 細胞転写産物を含み、これらはリンパ球減少症 S L E 患者および免疫抑制剤で処置を受けている移植受容体で抑制して発現される。このように本発明は、疾患がモジュールの転写産物の変化の独自の組み合わせにより特徴付けられることを証明するために使用された。さらに従来の遺伝子レベルの分析を行うことにより得られるヒートマップ ( h e a t m a p ) と比較して ( 図 2 a )、提案された同じデータの組に関するモジュールレベルのマイニング法は、精巧で解釈可能なマイクロアレイの結果の提示をもたらすことが分かった ( 図 2 c )。

#### 【 0 1 3 7 】

疾患の病原に対する洞察を得ること：転写産物の組は、転移性黒色腫および免疫抑制剤での処置を受けている肝移植受容体で優先的に過剰発現される：予め定められた転写モジュールの組のマイクロアレイデータを分析することは、疾患の病原のメカニズムに対する新規洞察を提供することができる。M 1 . 4 を形成する転写産物の重要な比率は、黒色腫患者および肝移植受容体の両方で変化することが分かった。一方、急性インフルエンザおよび狼瘡の患者では変化は検出されなかった ( 図 2 c )。これらの知見によりさらに詳細な調査をするようになった。血液のマイクロアレイデータは、全部で 3 5 名の転移性黒色腫患者、3 9 名の肝移植受容体および 2 5 名の健康な個体から作成した。転移性黒色腫患者および肝移植患者間で観察される類似性の程度は、測定したこれら 2 つの患者グループに特異的であった。統計的なグループの比較は、患者と健康な対照との間で遺伝子レベルで行った。この分析で肝移植受容体および転移性黒色腫の患者の両方で有意に過剰発現された 3 2 3 の転写産物を同定した ( マンホイットニー U 検定、 $p < 0 . 0 1$ 、フィルター  $> 1 . 2 5$  倍の変化)。次いでこれらの転写産物に関するグループの比較を、全身性エリテマトーデス ( S L E )、急性感染 ( 連鎖球菌性肺炎、黄色ブドウ球菌、大腸菌およびインフルエンザ A )、または対宿主性移植片病 ( G V H D ) 対それぞれの健康な対照グループからのサンプルを使用して行った。この分析により作成した p - 値は、有意性のパターンにおける類似性に基づき階層的クラスタリングによりグループ分けした ( 図 3 a : この取り組みは ( C h a u s s a b e l e t a l . , 2 0 0 5 ) に詳細に記載されている)。偏在的に過剰発現される遺伝子の組は、パターン P 1 を形成した ( 追補の表 3 ) : 逆に転移性黒色腫および移植受容体の患者でより特異的に発現された転写産物は、パターン P 2 を形成した ( 追補の表 4 )。

#### 【 0 1 3 8 】

このように黒色腫および移植グループに共通する転写サインを形成する遺伝子は、2 つの特性に基づき明確に異なる組に分配できることが分かった：( 1 ) 協調された発現 ( 転写モジュール：図 2 b ) ; および ( 2 ) 疾患全体で発現が変化 ( 有意パターン：図 3 a )。これら 2 つの異なる取り組みからの結果を相互に検証するために、偏在的 ( P 1 ) および特異的 ( P 2 ) な P B M C の転写サインのモジュール分布を決定した。図 3 b は、今日までに同定された 2 8 の P B M C 転写モジュール全体の P 1 および P 2 の分布がランダムではないことを示す。実際、P 1 転写産物は M 3 . 2 の付近に優先的に見いだされ ( 炎症に関連する転写産物により特徴付けられる)、一方、M 1 . 4 の転写産物はほとんど排他的に P 2 に属し、これには黒色腫患者および肝移植受容体でより特異的に過剰発現される遺伝子を含む。

#### 【 0 1 3 9 】

黒色腫患者は、肝移植受容体と共通する免疫抑制の転写サインを表す：黒色腫と移植グループで最も特異的に過剰発現する遺伝子に注目した ( P 2 )。6 9 のプローブ組から、5 5 の独自の遺伝子確認物を見いだした。マイクロアレイの遺伝子発現データの解釈を補助するために、遺伝子により索引をつけた文献のデータベースに対するクエリを開発して、4 7 遺伝子に関連する 6 5 2 7 の刊行物を同定し、そのうちの 3 0 が 1 0 以上の刊行物と関連した。この遺伝子にまつわる注目すべき機能的収束がこのサインを形成することが分かった ( 図 3 c )。モジュールは免疫調節活性を提示する分子：( 1 ) T N F A I P 3 または C I A S 1 ( クリオピリン ) のような N F - k B 経路のインヒビターをコードする遺伝子を含み、これは N F - カッパ B 活性化および前炎症サイトカインの生産を調節する

。この遺伝子の突然変異は、幾つかの炎症障害で同定された (Agostini et al., 2004)。D S I P I、ロイシンジッパータンパク質は、グルココルチコイドおよび I L - 10 の免疫抑制効果を、広い範囲のシグナル伝達経路 (N F - カッパ B、N F A T / A P - 1、M E K、E R K 1 / 2) で妨害することにより媒介して、マクロファージでの炎症反応の一般的阻害および T 細胞での I L - 2 受容体のダウンレギュレーションを導くことが知られている。注目すべきは、免疫細胞における D S P I P の発現が薬剤処置 (デキサメタゾン) (D' Adamio et al., 1997) または腫瘍細胞への長期暴露 (Burkitt Lymphoma) (Berrebi et al., 2003) の後に増大した点である。(2) M A P キナーゼ経路のインヒビター: 例えば二重特異性ホスファターゼ 2、5 および 10 (D U S P 2、D U S P 5 および D U S P 10) は、カルシニューリンインヒビターの標的として知られている M A P キナーゼ E R K 1 / 2 を妨害する (タクロリムス / F K 5 0 6 のような)。(3) I L - 2 生産のインヒビター: C R E M、F O X K 2 および T C F 8 は直接 I L - 2 プロモーターに直接結合し、そしてアネルギー T 細胞で I L - 2 生産の抑制に貢献することができる (Powell et al., 1999)。興味深いことに、D U S P 5 は T 細胞において I L - 2 シグナル伝達のネガティブフィードバックの役割を有することが分かった (Kovanen et al., 2003)。(4) 細胞増殖のインヒビター (例えば B T G 2、T O B 1、A R E G、S U I 1 および R N F 1 3 9)。B H L H B 2 (S t r a 1 3) のような他の分子は、リンパ球発生およびインビボ機能をネガティブに調節する (Seimiy a et al., 2004)。

#### 【0140】

このように転移性黒色腫患者は、肝移植受容体における薬理的処方により誘導されるサインに類似する免疫抑制のサインを提示する。

#### 【0141】

バイオマーカー発見 I : 全身性狼瘡患者の血液中のマイクロアレイ免疫転写ベクターの特性決定。血液は血流および組織で得られるサインに対して応答する細胞のリザーバーとして役立ち、そして血液から細胞が移動する。したがって血液は臨床的に関連する情報が入手可能な供給源となる。実際に、血液から作成されたマイクロアレイ遺伝子発現データは、疾患の病原のメカニズムに対して価値ある洞察を提供するだけでなく、バイオマーカーの有望な供給源も構成する。しかし難点は、膨大なゲノム全体の発現走査により作成されたデータから有望な臨床的価値の指標を抽出することにある。モジュール転写データをバイオマーカー発見法の基礎として使用し、そしてこの新規取り組みの実施を全身性エリテマトーデス (S L E) の小児患者のコホートから作成したデータセットを使用して具体的に説明するために使用した。

#### 【0142】

狼瘡の血液転写サイン: S L E は、先天的および適応免疫の調節不全を特徴とする自己免疫疾患である (Carroll, 2004; Grammer and Lipsky, 2003; Kong et al., 2003; Manderson et al., 2004; Manzi et al., 2004; Nambiar et al., 2004)。遺伝子レベルの分析は、小児および成人の S L E 患者から得た末梢血単核細胞で行った (Baechler et al., 2003; Bennett et al., 2003; Crow et al., 2003; Kirou et al., 2004)。早期世代のアフィメトリックスアレイ (~ 12, 600 プローブ組) を使用して、I 型インターフェロン (I F N) のサインがすべての活性な小児患者で同定された (Bennett et al., 2003)。このデータは I 型 I F N 経路の活性化が小児 S L E の全般的特徴であることを確認するものである。この分析は、S L E 血液中で低密度顆粒球、形質細胞前駆体の存在、およびリンパ球数の減少にそれぞれ関連する好中球、免疫グロブリン (I g) およびリンパ球のサインの存在も明らかにする (Bennett et al., 2003)。本実験では、これらのサインはモジュール M 3 . 1、M 2 . 2、M 1 . 1 および M 2 . 8 (それぞれインターフェロン誘導性、好中球、形質細胞および T R

ンパ球)で観察される有意な変化によりモジュールレベルで反映された。これらの結果は、診断時および処置の開始前にサンプル採取した小児狼瘡患者の新規コホートにおいて、44,000を越える転写産物をアフィメトリックスのU133遺伝子チップで分析して得られた。さらに7つの他のモジュール(図2b:M1.7、M2.1、M2.3、M2.4、M2.5、M2.6およびM2.7)で転写的変化が見いだされた。興味深いことに、M1.7およびM2.4には、急性感染および敗血症の内容において、発現が最近改変されること分かったリボゾームタンパク質ファミリーメンバーをコードする多くの転写物を含む(Calvano et al., 2005; Thach et al., 2005) - 図2bも参照にされたい:急性インフルエンザ感染)。

#### 【0143】

転写ベクターのアッセンブリー:開発したバイオマーカー発見法は、対照個体(例えば健康な有志)に比べて有意に変化する初期のモジュール選択に依存する。この例では、11のモジュールを使用し、これについて変化が未処置の小児SLE患者で観察された(図4、工程I)。次いで「転写ベクター」は、各11モジュールについて健康な個体と比べて有意に変化した遺伝子の選択を介して形成された(図4、工程II)。発現レベルは引き続き、各ベクターを形成する転写産物のサブセットについて得られた値を平均することにより引き出された(図4、工程III)。次いで患者のプロファイルはこれらの各ベクターについて得られた発現レベルをグラフ上にプロットすることにより表すことができる(例えば階段状のプロット)。ベクターの組は、構築が2回の選択、第1回はモジュールレベルで(工程I:例えばSLEを対象として28モジュールのうちの11)、次いで

#### 【0144】

狼瘡の血液転写ベクター:プロファイルは、未処置の小児SLE患者の全コホートについて上記で得たSLEベクターの組を使用して引き出されたが(図5a:各線は1名の患者であり、より太い線はすべての患者に関する平均である)、図5bは同じベクターについて健康な有志に特徴的な規則的なパターンを提示する。このマーカーのマスター組を他のサンプルの組についての発現レベルを引き出すために参照として使用することができる。患者のプロファイルは、ステロイド(高投与量のステロイドを受けている患者は除く)および/または細胞傷害性剤および/またはヒドロキシクロロキンで経口的に処置したSLE小児の独立した組について作成した(N=31;図5c)。興味深いことに、処置および未処置患者のコホートの両方に関する平均プロファイルは、ほぼ重ねることができた(図5d)。この予期せぬ結果は、両グループの患者が臨床指数SLEDAI(SLE疾患活性指数-未処置患者の平均=11.5±7.9;処置患者=9.4±6.4, スチューデントt-検定p=0.3)により測定されるとき類似の疾患活性を提示したという事実により説明することができる。実際、疾患活性に基づくサンプルの層別化、そして処置にかかわらず対照的なプロファイルを生じた:軽い疾患を有する患者からのサンプルは、処置または未処置患者のコホートのいずれと比較しても、より規則的なプロファイルを提示した(図5e、SLEDAI[0-6]);一方、高い疾患活性の患者は悪化プロファイルを提示した(図5f、SLEDAI[14-28])。このようにこれらの結果は、SLE患者で同定された免疫転写ベクターが疾患プロセスと直接連結していることを証明する。注目すべきは、処置の効果が、処置した小児SLE患者についてモジュールの転写変化をマッピングする場合に観察できたことである(図5g)。しかし未処置患者で得られた中心となる疾患のサインは残っている。

#### 【0145】

診断マーカーとしての転写ベクターの関連性。未処置の小児SLEベクターを参照として使用して、遺伝子プロファイルをSLEの成人患者について作成した。これらの個体は小児患者で観察されたものと一致する混乱した発現パターンを提示した(図6a)。これはSLEサイン(図6b)の特徴をほとんど提示しない成人の線維筋痛症患者とは対照的であり、そしてより健康な成人に似ている(図6c)。この知見は、線維筋痛症患者が全

10

20

30

40

50

身性狼瘡と一致する症状を提示し、場合により診断のジレンマを導くことがあるので、注目すべきである (Blumenthal, 2002)。これらの結果は、患者血液のマイクロアレイ分析から引き出される免疫転写ベクターの有力な診断価値を具体的に説明している。

#### 【0146】

バイオマーカー発見 I I : 全身性狼瘡患者の疾患重篤度の評価のための多変量マイクロアレイスコア。SLE は高い罹患率の発赤を特徴とする疾患である。少なくとも SLE の全体的疾患活性の 6 つの複合的尺度が利用可能である (Bae et al., 2001; Bencivelli et al., 1992; Bombardier et al., 1992; Hay et al., 1993; Liang et al., 1989; Petri et al., 1999)。これらの道具は疾患の活性を記録し、そして定量するための測定基準を提供し、そして臨床試験に使用されてきた。しかし含まれる尺度の中には、得ることが容易でないものもある。逆に、臨床的疾患の異質性を仮定すると、すべての SLE の発現がこれらの道具でコンピューター処理されるわけではなく、患者の状態の全体的評価を難しくしている。1 つの目的は、血中白血球のマイクロアレイ転写データに基づき、対象となる疾患の活性の指数を確立することであった。

#### 【0147】

多変量マイクロアレイ転写スコアの定義：上記で行った小児 SLE 患者のプロファイルの分析は (図 5)、転写ベクターと臨床的な疾患の発現とを明確に結び付けた。また、関連する複合発現値が個々のベクターについて得られ、そして臨床的活性指数 (SLEDAI) が未処置コホートの各患者についてコンピューター処理された。2 つの転写ベクターが疾患活性と正に相関するが (図 7 : M2.2 および M3.1、それぞれ「好中球」および「インターフェロン誘導性」モジュール)、3 つの他のベクターは負に相関する (図 7 : M1.7、M2.4 および M2.8、「リボゾームタンパク質」および「T 細胞」に関連する転写産物を含む) ことが分かった。別個のベクターのマイクロアレイ転写データを分解することは、これら 5 個のパラメーターを 1 つの多変量指示体に合わせることを可能にした。多変量の順序データを分析するための新規な非パラメーター法を使用して、患者にスコアを付けた (Wittkowski et al., 2004 に詳細に記載されている)。未処置コホートのすべての患者について得られたマイクロアレイ「U - スコア」を、次いで SLEDAI と相関させた (図 8 a : Spearman,  $R = 0.82$ ,  $p < 0.0001$ )。このグループは、高い SLEDAI および比較的低いマイクロアレイ U - スコアを持つ 1 つのアウト라이어 (SLE98) を含んだ。興味深いことに、この患者は 2 つの自己免疫診断を持つ唯一の人であった : SLE および甲状腺機能低下。さらにこの患者は SLE 腎炎クラス IV と診断されたが、最終的には通例の IV シクロホスファミドでの治療に反応しなかった。同じ 5 つのベクターを使用して、処置した、小児 SLE 患者のコホート ( $n = 31$ ) についてのスコアを作成した。「転写 U - スコア」と疾患活性指数との間の相関は、ここでも強力に有意であった (図 8 b ; スピアマン相関  $R = 0.66$ ,  $p < 0.0001$ ) (図 4 b)。

#### 【0148】

疾患重篤度の長期追跡：高い罹病率の一過性発現と関係する狼瘡疾患の発赤は、患者の状態の不可逆的な悪化を導く恐れがある。上記のマイクロアレイ多変量スコアの関連性を、狼瘡患者の疾患活性の長期モニタリングに関して試験した。20 名の小児 SLE 患者のコホートを、疾患活性について経時的に追跡した。トランスクリプトームのマイクロアレイデータを、これらの各患者から多くの時点で得た (2 ~ 4 時間の時点、各時点の間隔は、1 カ月から 18 カ月まで変動した)。マイクロアレイ U スコアは、上記のようにこれらの患者についてコンピューター処理した。患者の半分がこの長期実験に登録する前に交差分析に含まれた。追跡期間の間、SLEDAI は 10 名の患者で変動する一方 (図 9 a)、他の 10 名では一定のままであった (図 9 b)。平行した傾向は、患者の大部分で転写 U スコアと SLEDAI 長期測定との間で観察された。さらに全体的な SLEDAI 指数およびマイクロアレイ U - スコアは、6 名の患者 (SLE31、SLE78、SLE

125、SLE130、SLE135およびSLE99)を除き、それらの個々のスケールに従い類似の活性を反映し、この6名のマイクロアレイU-スコアは、SLEDAIスコアに比べて不均衡に高かった。最高の不均衡患者の1名(SLE78)は、追跡期間中に命を脅かす合併症と診断され(肺高血圧症)、これはSLEDAIではコンピューター処理されない。したがってU-スコアは、この患者の全体的な疾患活性をより良く反映した。さらに1名の患者(SLE31)で疾患の発赤、続く回復がSLEDAIおよびマイクロアレイスコア両方の長期追跡で検出された。しかし興味深いのは、マイクロアレイU-スコアの場合に観察された変化の幅がかなり大きいだけではないらしく(SLEDAIに関して0~40対6~10)、上昇は第2時点ですでに検出でき、この患者の臨床状態が悪化する2カ月前にSLEDAIにより検出できたということである。このようにこれらのデータは個別のSLE患者における疾患活性の長期追跡にマイクロアレイの疾患活性スコアが有力な価値があることを具体的に説明している。

10

## 【0149】

モジュールの転写データは、マイクロアレイ平板全体で再現性がある。診断指示体として真に持続可能なものとなるように、免疫転写ベクターは信頼性を証明しなければならない。早くから、異なる研究室および平板全体で得られたマイクロアレイの結果の良くない再現性は、これらの結果の有効性に関して疑惑を生じ、そして特に臨床的状况で大きな懸念が残る(Bammler et al., 2005; Ioannidis, 2005; Irizarry et al., 2005; Larkin et al., 2005; Michiels et al., 2005)。モジュール転写プロファイルを得、そして市販の2種のマイクロアレイ平板、アフィメトリックスおよびイルミナ(Illumina)を使用して比較した。PBMCは、4名の健康な有志および10名の肝移植受容体から単離した。同じ起源の全RNAから出発して、標的を独立して生成し、そしてアフィメトリックスU133GeneChip(パイロール免疫研究所: Baylor Institute for Immunology Research)およびイルミナHuman Ref8BeadChips(イルミナ社)を使用して分析した。基本的な差異が2つのマイクロアレイ技術間に存在する(詳細については方法を参照にされたい)。各製造元により提供されるプローブIDを、遺伝子発現プロファイルを合わせるために使用する共通のIDに転換した。直接的に比較した場合、アフィメトリックスおよびイルミナ平板により生成される遺伝子発現レベルは、うまく相関しなかった(種々のサンプルに関するアフィメトリックスおよびイルミナ平板により測定される遺伝子発現レベル間のピアソン相関:  $R^2$  中央値(範囲) = M1.2を形成する遺伝子について0.13(0.02~0.5); M3.1を形成する遺伝子について0.36(0.17~0.55); およびM3.2を形成する遺伝子について0.19(0.06~0.4)。これらの結果は公開されたマイクロアレイの相互平板比較実験の知見と一致する(Bammler et al., 2005; Irizarry et al., 2005; Jarvinen et al., 2004; Larkin et al., 2005; Tan et al., 2003)。

20

30

## 【0150】

モジュールM1.2(「血小板」)、M3.1(「インターフェロン」)およびM3.2(「炎症」)について、共通する組の遺伝子について得た発現プロファイルを図10に示す。興味深いことに各モジュールについて、イルミナ系により測定されたサンプル全体の遺伝子発現の変化は、しっかりと対応しているようであった。この知見は同時発現する遺伝子(転写モジュール)の組の初期選択がアフィメトリックスのGeneChipsを使用して作成された遺伝子発現データに排他的に基づいているので特に意味深い。次いでモジュールレベルでの転写の変化を反復する独自の発現値(図4、工程IIIを参照にされたい)が引き出された。アフィメトリックスおよびイルミナの平板により作成されるモジュール発現レベルは高度に比較可能である(図10: M1.2、M3.1およびM3.2について、移植グループのピアソン相関係数はそれぞれ $R^2 = 0.83$ 、 $0.98$ および $0.93$ ;  $p < 0.0001$ )。合わせると、これらの結果はモジュール転写データが

40

50

マイクロアレイ平板全体で再現できることを証明している。

【0151】

マイクロアレイデータはノイズが高い傾向があり、そして結果として利用することが難しい可能性がある (Michiels et al., 2005; Tuma, 2005)。実際、数千の転写産物についてグループ比較を行うことは、疑惑がもたれる発見を導く恐れがある有意な比率のノイズ (疑陽性の結果) を含むデータセットを生成する (Ioannidis, 2005; Tuma, 2005)。この基本的な論点に取り組むために、広範囲の疾患の内容において生成した大量のマイクロアレイのデータ集から、協調して発現される転写産物の組 (すなわち転写モジュール) の抽出を含む予備段階を使用した。モジュールは、数百のサンプルにわたり同じ複雑な発現パターンの後の転写産物のグループから形成され、したがって生物学的に関連性があるらしい。利点は、各モジュールを形成する遺伝子と関連する文献の分析により確認された (図2c)。まとめると、マイクロアレイ転写データのモジュール分解は、低減した量のノイズを含み、そして同定可能な生物学的意味を持つ協調して発現される遺伝子の十分に定められたグループに関する分析に集中することを可能とする。このデータマイニング法は、より大きな内容、例えば他の生物系 (他の組織、腫瘍サンプルならびに一次細胞または細胞株) に、そして他の種類のデータ (例えばプロテオミクス) に応用することができる。

10

【0152】

全体的レベルに関して得たデータを活用するための新規取り組みが、「omics革新」の技術的利点を主流のヘルスケアに翻訳するために要求される (Bilello, 2005; Weston and Hood, 2004)。免疫転写ベクターの開発は、この目標に達するために重要な段階となり得る。本明細書では、この取り組みから派生する有力な臨床的応用が2つの分野で具体的に説明されている: (1) 病原のメカニズムの同定、および (2) 疾患のバイオマーカーの発見。

20

【0153】

遺伝子発現プロファイリングは、疾患プロセスを支える分子メカニズムに大変貴重な洞察を提供することができるが (Bennett et al., 2003; Pascual et al., 2005)、ノイズの存在およびマイクロアレイデータセットの規模が生物学的解釈を妨害する (Ioannidis, 2005)。十分に特徴付けられたモジュールの組を対象として転写プロファイルを分解することは、これらのデータの解明を容易にする概念の枠組を提供する。「モジュールマップ」に関する転写的変化の表示 (図2b) は、疾患全体、特に血液のような万人の組織の研究において行われる比較分析に対し特に伝導性である。モジュールM1.4に属する転写産物が、黒色腫患者および肝移植受容体で優先的に過剰発現され、続いてこの知見は、別の取り組みを使用して確認されることが観察された (有意性パターンの分析)。これらの転写産物は、インターロイキン-2転写のインヒビター、NF-カッパBおよびMAPK経路のインヒビターならびに細胞の増殖を遮断することができる分子を含む。これらの知見は、進行した黒色腫患者および薬理学的に処置された移植受容体で作動する免疫抑制メカニズム間の機能的収束に注意を向ける。免疫抑制患者で特異的に誘導される転写産物も、グルココルチコイド誘導性遺伝子 (例えばDSIP1、CXCR4、JUN) およびTリンパ球の発生およびエフィクター機能において鍵となる役割を果たすと考えられるホルモン核受容体 (NR4A2およびRORA) を含むという事実は (Winoto and Littman, 2002)、黒色腫に媒介される免疫抑制におけるステロイドホルモンの役割となる可能性を示唆している。

30

40

【0154】

免疫転写ベクターは新規クラスの疾患バイオマーカーを表す。本明細書に記載するモジュールデータマイニング法の直接的延長は、モジュールおよび遺伝子レベルの両方で観察される全体的変化を捕捉する発現ベクターの使用である。疾患はモジュール変化の独自の組み合わせにより特徴付けることができることが分かった。モジュールレベルで観察される変化 (1回目の選択) に加えて、ベクターは遺伝子レベルで観察できる差異も反映する

50

(2回目選択)。その結果、転写ベクターの組は高度に疾患特異的となる。注目すべきは、各患者について、「ベクタープロファイル」の組が全体的スケールで得た同じデータに基づき、任意の数の疾患について得ることが可能であるということである。各ベクターについて誘導した平均化した転写値は、マイクロアレイ平板および研究室全体で得た優れた再現性により示されるように極めてしっかりしている。この知見は、信頼性のある転写マーカーの同定が、臨床的状況でのマイクロアレイ技術で主流となる応用を開発することに向けて重要な段階を構成するので特に意味がある。

#### 【0155】

血液サンプルの処理。すべての血液サンプルはクエン酸デキストロースまたはEDTA管(BDバキュテイナー: Vacutainer)に集め、そして処理するために直ちに室温でテキサス州、ダラスのバイロール免疫調査研究所(Baylor Institute for Immunology Research)に運んだ。末梢血単核細胞(PBMC)はFicoll勾配を介して単離し、そして直ちにベータ-メルカプトエタノール(ME)を含むRLT試薬中(キアゲン: Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州)で溶解し、そしてRNA抽出工程前に-80で保存した。

10

#### 【0156】

マイクロアレイ分析。全RNAはRNeasyキット(キアゲン)を使用して、製造元の使用説明に従い単離し、そしてRNAの完全性をアギレント(Agilent)2100バイオアナライザー(Bioanalyzer)(アギレント、パロアルト、カリフォルニア州)を使用して評価した。

20

#### 【0157】

アフィメトリックスGeneChips: これらのマイクロアレイは、石英ウェーハー上のその場で合成された短いオリゴヌクレオチドプローブ組からなる。標的の標識化は製造元の標準プロトコールに従って行った(アフィメトリックス社、サンタクララ、カリフォルニア州)。ピオチン化cRNA標的を精製し、そして引き続きアフィメトリックスのHG-U133AおよびU133B GeneChips(>44,000プローブ組)にハイブリダイズさせた。アレイはアフィメトリックスの共焦点レーザーキャナーを使用して走査された。Microarray Suite、バージョン5.0(MAS5.0; アフィメトリックス)ソフトウェアを使用して蛍光ハイブリダイゼーションシグナルを評価し、シグナルを標準化し、そしてシグナル検出コールを評価した。チップあたりのシグナル値の標準化は、GeneChipあたり500の標的強度値に対するMAS5.0のグローバルなスケリング法を使用して達成された。遺伝子発現分析ソフトウェアプログラムであるGeneSpring、バージョン7.1(アギレント)を使用して、統計分析および階層的クラスタリングを行った。

30

#### 【0158】

イルミナBeadChip: これらのマイクロアレイは、3μmビーズに結合した50merのオリゴヌクレオチドプローブを含み、これらはマイクロウェルにガラススライドの表面上で付けられた。サンプルを処理し、そしてデータをイルミナ社(サンディエゴ、カリフォルニア州)により得た。標的はイルミナのRNA増幅キット(アンピオン: Ambion、オースチン、テキサス州)を使用して調製した。cRNA標的をSentrix Human Ref 8 BeadChip(>25,000プローブ)にハイブリダイズし、これをイルミナのBeadStation 500で走査した。イルミナのBeadStudioソフトウェアを使用して蛍光ハイブリダイゼーションシグナルを評価した。

40

#### 【0159】

モジュール抽出アルゴリズム: 協調的に調節される遺伝子、または転写モジュールの組を、カスタマイジングアルゴリズムを使用して白血球マイクロアレイのデータセットから抽出した(図1b: 工程Iおよび図1c)。アフィメトリックスU133AおよびU133B GeneChips(>44,000プローブ組)を使用して作成した全239のPBMCサンプルからの遺伝子発現プロファイルは、8グループの患者について得た(全身型若年性突発性関節炎、全身性エリテマトーデス、I型糖尿病、転移性黒色腫、急性感

50

染 - 大腸菌、黄色ブドウ球菌およびインフルエンザ A - 、および肝移植受容体)。各グループについて、すべての状態の少なくとも 50% に存在した転写産物を 30 のクラスターに分けた (k - 平均クラスタリング: C1 から C30 のクラスター)。各遺伝子に関するクラスターの割り当ては表に記録し、そして分布パターンをすべての遺伝子間で比較した。モジュールはすべての実験グループにわたり同じクラスターに属する最大の遺伝子組から始めて、反復プロセスを介して選択された (すなわち 8 実験グループのうちの 8 つにおいて同じクラスター内に見いだされる)。次いで選択はこのコア参照パターンから 7/8、6/8 および 5/8 の対合を持つ遺伝子へと拡大された。生じた遺伝子の組は転写モジュールを形成し、そして選択プールから引き出された。このプロセスを、遺伝子の 2 番目に大きいグループから始めて、厳密度のレベルを漸次下げながら進めて繰り返す。

10

U - スコア: この方法の詳細な説明が最近公開され (Wittkowski et al., 2004)、そして必要なツールは <http://Mustat.Rockefeller.edu> から入手可能である。簡単に説明すると、スコアは SLE P BMCs で差次的に発現されると同定されたモジュール内のすべての転写産物について、平均標準化発現レベルをコンピューター処理することにより得た。

#### 【0160】

文献プロファイリング: この実験で採用した文献プロファイリングアルゴリズムは、以前に詳細に記載された (Chaussabel and Sher, 2002)。この方法は類似のキーワードを共有する遺伝子を連結する。これは文献の要約中に存在する用語をパターン分析するために階層クラスタリングを使用する。

20

#### 【0161】

バイオマーカー発見は、新規診断および治療における開発に重要な役割を果たし (Ratner, 2005)、そしてマイクロアレイデータが大変魅力的な候補マーカーの供給源を構成する一方、かたわらで応用の開発に向けてほとんど進歩がなされなかった。実際に、マイクロアレイ分析からのマーカーは検証することが難しく、そして安定でないことが証明された (Frantz, 2005; Michiels et al., 2005)。モジュールデータマイニング法および複合発現ベクターの使用は、モジュールおよび遺伝子レベルで観察される全体的変化と一致することが分かった。モジュールを土台として使用することは、発現ベクターに整合性のある機能的な、そして最少量のノイズを含む転写単位を与える。ベクターが複合的であるという事実 (すなわち転写産物の組み合わせにより形成される) は、さらにこれらマーカーの安定性に貢献する。実際、ベクター発現値はマイクロアレイ平板全体で得られる高い再現性 (図 10); ならびに独立した組の小児狼瘡患者で得られた検証結果により示されるように (図 5d)、非常にしっかりしていることが証明された。さらに重要なことには、これらのデータおよび実験は、複合発現ベクターが臨床的な疾患活性と直接連結できることを証明する (例えば狼瘡患者で; 図 7 ~ 10)。これらは臨床的实施におけるこの技術の広く知られた使用に欠くことのできないマイクロアレイデータの信頼性を改善する (Shi, 2006)。

30

#### 【0162】

我々が開発したバイオマーカー発見法は、全体的スケールで得られるデータの活用に特に十分に適合する。~ 44,000 の転写産物から初めて、我々はほぼ 5000 の転写産物からなる 28 のモジュールを定めた。次いで複合ベクターの組が、モジュールおよび遺伝子レベルで行った 2 回の選択を介して形成された。この正確な仕立てにより、特異性を上げることにより所定のマーカーの組の性能を至適化させることが可能となる。最後に、ベクターが次に合わせられて独自の多変量スコアを得、故に結果を主流の臨床的プラクティスと適合させた状態で送達することができる。興味深いことに、多変量スコアは個々のマーカーの変化というよりむしろ変化の全体的パターンを要約する。そのような「全体的バイオマーカー」の開発は、診断および薬理ゲノミクス分野の両方に有望な展望を構成する。

40

#### 【0163】

結論すると、新規クラスのバイオマーカーに属する発現ベクターは、全体的スケールで

50

得たデータを強化することができる。全身性狼瘡の患者において、疾患の進行の診断および評価に関するこの取り組みの臨床的関連性が、本明細書で証明される。我々の結果により具体的に説明されるように、複合的発現ベクターは新規薬剤の効力、安全性および作用機作の評価にも有用な指示体となる。他の有望な応用には疾患の予知および健康のモニタリングがある。

【0164】

本明細書に記載する特定の態様は、具体的説明の目的で示し、本発明を限定するものではないと理解される。本発明の主な特徴は本発明の範囲から逸脱せずに様々な態様で採用することができる。当業者は日常的な実験だけで、本明細書に記載する特異的手順の多くの等価物を認識し、または確認することができる。そのような等価物は本発明の範囲内にあると考えられ、そして特許請求の範囲により網羅される。

10

【0165】

本明細書に挙げたすべての刊行物および特許出願は、本発明が関連する当業者の技術レベルの指標である。すべての刊行物および特許出願は、各刊行物または特許出願が引用により具体的かつ個別に引用により包含されると示されるように、同程度まで参照により編入する。

【0166】

本明細書に開示し、そして特許請求するすべての組成物および/または方法は、本開示に照らして過度な実験を行わずに作成し、そして実行することができる。本発明の組成物および方法は、好適な態様という意味で記載してきたが、当業者には本発明の概念、精神および範囲から逸脱せずに本明細書に記載する組成物、および/または方法、および方法の段階または段階の順序に変化を適用できることは明らかである。さらに詳細には、化学的および生理学的の両方に関連する特定の作用物質を、本明細書に記載する作用物質と置き換えても、同じまたは類似の結果を達成できることは明らかである。当業者には明白であるすべてのそのような類似の置換および修飾は、添付する特許請求の範囲により定められる本発明の精神、範囲および概念の中にあるものと見なす。

20

【0167】

参考文献

1. Carroll, M. C. 2004. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Immunol* 4: 825 - 831.
2. Manderson, A. P., Botto, M., and Walport, M. J. 2004. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 22: 431 - 456.
3. Manzi, S., Ahearn, J. M., and Salmon, J. 2004. New insights into complement: a mediator of injury and marker of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13: 298 - 303.
4. Nambiar, M. P., Juang, Y. T., Krishnan, S., and Tsokos, G. C. 2004. Dissecting the molecular mechanisms of TCR zeta chain downregulation and T cell signaling abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 23: 245 - 263.
5. Kong, P. L., Odegard, J. M., Bouzahzah, F., Choi, J. Y., Eardley, L. D., Zielinski, C. E., and Craft, J. E. 2003. Intrinsic T cell defects in systemic autoimmunity. *Ann N Y Acad*

30

40

50

Sci 987:60-67.

6. Grammer, A.C., and Lipsky, P.E. 2003. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 5 Suppl 4:S22-27.

7. Jorgensen, T.N., Gubbels, M.R., and Kotzin, B.L. 2003. Links between type I interferons and the genetic basis of disease in mouse lupus. *Autoimmunity* 36:491-502.

8. Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. 2001. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Science* 294:1540-1543.

9. Santiago-Raber, M.L., Baccala, R., Haraldsson, K.M., Choubey, D., Stewart, T.A., Kono, D.H., and Theofilopoulos, A.N. 2003. Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J Exp Med* 197:777-788.

10. Bencivelli, W., Vitali, C., Isenberg, D.A., Smolen, J.S., Snaith, M.L., Sciuto, M., and Bombardieri, S. 1992. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of disease activity. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 10:549-554.

11. Hay, E.M., Bacon, P.A., Gordon, C., Isenberg, D.A., Maddison, P., Snaith, M.L., Symmons, D.P., Viner, N., and Zoma, A. 1993. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 86:447-458.

12. Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D., and Chang, C.H. 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35:630-640.

13. Liang, M.H., Socher, S.A., Larson, M.G., and Schur, P.H. 1989. Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32:11

10

20

30

40

50

07 - 1118 .

14. Bae, S. C., Koh, H. K., Chang, D. K., Kim, M. H., Park, J. K., and Kim, S. Y. 2001. Reliability and validity of systemic lupus activity measure-revised (SLAM-R) for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10:405-409.

15. Petri, M., Buyon, J., and Kim, M. 1999. Classification and definition of major flares in SLE clinical trials. *Lupus* 8:685-691.

16. Jimenez, S., Cervera, R., Font, J., and Ingelmo, M. 2003. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 25:3-12.

17. Rood, M. J., ten Cate, R., van Suijlekom-Smit, L. W., den Ouden, E. J., Ouwkerk, F. E., Breedveld, F. C., and Huizinga, T. W. 1999. Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus: clinical presentation and prognosis in 31 patients. *Scand J Rheumatol* 28:222-226.

18. Brunner, H. I., Silverman, E. D., To, T., Bombardier, C., and Feldman, B. M. 2002. Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: cumulative disease activity and medication use predict disease damage. *Arthritis Rheum* 46:436-444.

19. Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N., and Winchester, R. J. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277.

20. Hochberg, M. C. 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725.

21. Tan, E. M., Feltkamp, T. E., Smolen, J. S., Butcher, B., Dawkins, R., Fritzler, M. J., Gordon, T., Hardin, J. A., Kalden, J. R., Lahita, R. G., et al. 1997. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 40:1601-1611.

22. Al-Allaf, A. W., Ottewell, L., and Pullar, T. 2002. The prevalence and significance of positive antinuclear antibodies in patients with fibromyalgia syndrome: 2-4 y

10

20

30

40

50

- ears' follow-up. *Clin Rheumatol* 21:472-477.
23. Staud, R. 2004. Fibromyalgia pain: do we know the source? *Curr Opin Rheumatol* 16:157-163.
24. Bennett, L., Palucka, A.K., Arce, E., Cantrell, V., Borvak, J., Banchemereau, J., and Pascual, V. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197:711-723. 10
25. Baechler, E.C., Batliwalla, F.M., Karypis, G., Gaffney, P.M., Ortmann, W.A., Espe, K.J., Shark, K.B., Grande, W.J., Hughes, K.M., Kapur, V., et al. 2003. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2610-2615.
26. Crow, M.K., Kirou, K.A., and Wohlgemuth, J. 2003. Microarray analysis of interferon-regulated genes in SLE. *Autoimmunity* 36:481-490. 20
27. Kirou, K.A., Lee, C., George, S., Louca, K., Papagiannis, I.G., Peterson, M.G., Ly, N., Woodward, R.N., Fry, K.E., Lau, A.Y., et al. 2004. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:3958-3967.
28. Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., and Fukuhara, S. 2001. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* 166:2961-2969. 30
29. Santini, S.M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., and Belardelli, F. 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 191:1777-1788. 40
30. Arce, E., Jackson, D.G., Gill, M.A., Bennett, L.B., Banchemereau, J., and Pascual, V. 2001. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 167:2361-2369.
31. Jegou, G., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. 2001. Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts 50

ts. Blood 97:1817-1822.

32. Odendahl, M., Jacobi, A., Hansen, A., Feist, E., Hiepe, F., Burmester, G.R., Lipsky, P.E., Radbruch, A., and Dorner, T. 2000. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus [In Process Citation]. J Immunol 165:5970-5979.

33. Shodell, M., Shah, K., and Siegal, F.P. 2003. Circulating human plasmacytoid dendritic cells are highly sensitive to corticosteroid administration. Lupus 12:222-230.

34. Gladman, D.D., Ibanez, D., and Urowitz, M.B. 2002. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. J Rheumatol 29:288-291.

35. Tibshirani, R., Hastie, T., Narasimhan, B., and Chu, G. 2002. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 99:6567-6572.

36. Wittkowski, K.M., Lee, E., Nussbaum, R., Chamian, F.N., and Krueger, J.G. 2004. Combining several ordinal measures in clinical studies. Stat Med 23:1579-1592.

37. Segal, E., Friedman, N., Kaminski, N., Regev, A., and Koller, D. 2005. From signatures to models: understanding cancer using microarrays. Nat Genet 37 Suppl:S38-45.

38. Choi, P., and Chen, C. 2005. Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer.

39. Thach, D.C., Agan, B.K., Olsen, C., Diao, J., Lin, B., Gomez, J., Jesse, M., Jenkins, M., Rowley, R., Hanson, E., et al. 2005. Surveillance of transcriptomes in basic military trainees with normal, febrile respiratory illness, and convalescent phenotypes. Gene S Immun.

40. Kirou, K.A., Lee, C., George, S., Louca, K., Peterson, M.G., and Crow, M.K. 2005. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. Arthritis Rheum 52:1491-1503.

41. Wittkowski, K., Lee, E., Nussbaum, R., Chamian, F., and Krueger, J.G. 2004. Combining several ordinal measures in clinical stu

10

20

30

40

50

d i e s . S t a t i s t M e d 2 3 .

【図面の簡単な説明】

【0168】

本発明の特徴および利点をさらに完全に理解するために、添付する図面と一緒に本発明の詳細な説明を作成するための参考を作成し、図面には；

【図1】図1 a ~ 1 c は、受けた遺伝子レベルのマイクロアレイデータ分析に含まれる工程を表すマイクロアレイデータ分析法のスキーム（図1 A）、および提案されるモジュールデータ分析法（1 b）をまとめる。モジュール抽出アルゴリズムの完全サイズの提示は、図1 c に提供する。図1 c：モジュール抽出アルゴリズム。データは定めた実験系（例えばエクスピボのP B M C）の内容で生成される。転写プロファイルが幾つかの実験グループ（例えばG 1 - 8）について得られる。各グループについて、遺伝子が類似の発現プロファイルに基づきx クラスタ（例えばx = 3 0）付近に分布する（K - 平均クラスタリングアルゴリズムを使用して）。異なる実験グループにわたる各遺伝子のクラスタ分布が表に記録され、そして分布パターンが合う。モジュールがすべての実験グループをわたり同じクラスタに分布する最大の遺伝子組から始めて、反復プロセスを介して選択される（例えば8グループのうち8つについて同じクラスタ内に見いだされる）。選択はこのコア参照パターンから7 / 8、6 / 8 および5 / 8 の対合を持つ遺伝子へと拡大される。いったんモジュールが形成されれば、遺伝子は選択プールから引き出される。次いでこのプロセスを、遺伝子の2番目に大きいグループから始めて、厳密度のレベルを漸次下げながら進めて繰り返す。

【図2】図2 a ~ 2 d は患者の血中白血球転写プロファイルの分析を表し、そしてまとめる。図2 a は転移性黒色腫患者または肝移植受容体と、それらの各対照との間で差次的に発現される転写産物に関する発現パターンを表す通例の遺伝子レベルの分析の結果である（ $p < 0.001$ 、マンホイットニー-U検定）。クラスタリング分析は遺伝子を発現パターンに基づきグループ分けし、そして結果がヒートマップにより表される（過剰発現した転写産物 = 赤、抑制発現した転写産物 = 青；各遺伝子の発現は対照グループの中央発現値に対して標準化される）。（図2 b）モジュールレベルの分析：モジュール、M 1 . 2、M 1 . 3、M 1 . 4 および M 2 . 1 において、患者について得られた遺伝子発現レベル（「黒色腫」または「移植」）、およびそれぞれ健康な有志のP B M Cを比較した（ $p < 0.05$ 、マン・ホイットニーのU検定）。パイチャートは、有意に変化した遺伝子の比率を示す。グラフは有意に変化した遺伝子の転写プロファイルを表し、各線は多くの条件（サンプル、x - 軸）をわたり1つの転写産物の発現レベル（y - 軸）を示す。各遺伝子の発現は、対照グループの中央発現値に対して標準化される。（中央パネル）28個のP B M C転写モジュールについて得られた結果を格子中に表す。座標はモジュールのI D（例えばM 2 . 8 は行M 2、カラム8）を示すために使用する。スポットは各モジュールについて有意に変化した遺伝子の比率を表す。赤点：過剰発現した遺伝子の比率（すなわち患者対健康者で増加した遺伝子活性）、青点：抑制されて発現した遺伝子の比率（すなわち患者対健康者で減少した遺伝子活性）。（下パネル）機能的解釈は色付きコードにより格子上で示す。各モジュールに関するさらに詳細な機能的説明は、追補の表1に見いだすことができる（横長の表として添付し、そして引用により本明細書に編入する）。図2 c および2 d：モジュールは整合性のある転写および機能的単位を形成する a）転写挙動における整合性は、21名の健康な有志から得たサンプル組で具体的に説明される。これらのサンプルはモジュール選択工程で使用しなかった。グラフは転写プロファイルを表し、各線は多くの条件にわたり1つの転写産物の発現レベル（y - 軸）を示す（サンプル、x - 軸）。モジュール1 . 2、1 . 7、2 . 1 および2 . 1 1 の転写プロファイルを示す。各遺伝子の発現は、すべてのサンプルをわたり遺伝子について得た測定値の中央値に対して標準化される。b）要約中、用語の存在レベルは少なくとも10の公報に関連するM 3 . 1、M 1 . 5、M 1 . 3 および M 1 . 2 内のすべての遺伝子についてコンピューターで計算した（26,000以上の要約を表す）。キーワードプロファイルは各モジュールについて抽出し、そして選択を使用してこの図を生成した。要約中、キーワードの存在のレベ

10

20

30

40

50

ルは色付きの尺度で示し、黄色は高い存在を示す。M3.1 (例えばSTAT1、CXCL10、OAS2、MX2) はインターフェロンに関連し、M1.5 (例えばMYD88、DC86、TLR2、LILRB2、CD163) は病原体認識分子/ミエロイド系細胞に関連し、M1.3 (例えばCD19、CD22、CD72A、BLNK、PAX5) はB細胞に関連し、そしてM1.2 (例えばITGA2B、PF4、SELP、GP6) は血小板に関連する。

【図3】図3a~3cは有意性パターンの分析を示す。図3aは、健康な有志と比較して第IV段階の黒色腫および肝移植患者の両方で有意に高いレベルで発現される遺伝子を表す。P-値は他の疾患：SLE、GVHDまたはインフルエンザウイルス(Inf l u e n z a A)、大腸菌、連鎖球菌性肺炎(Strep. pneumo)、または黄色ブドウ球菌(Staph. aureus)での急性感染で生じた遺伝子発現プロファイルから得た。これらの各コホートは、それらの各対照グループと比較された(これら実験の内容において集めた有志)。この遺伝子は上に列挙したすべての条件について作成したp-値の階層クラスタリングによりランク付けされる。P-値は色付棒に従い表示される：緑=低いp-値/有意、白=高いp-値/有意ではない。明確な有意パターンが同定される：P1=偏在的；P2=黒色腫および肝移植グループに最も特異的。図3bは黒色腫および肝移植グループに共通の偏在的および特異的遺伝子サインのモジュール分布を表す。28のPMBc転写モジュールについてP1(特異的-赤)およびP2(偏在的-青)の転写産物の分布が決定された。各モジュールについて、P1またはP2のいずれかと共有される遺伝子の比率を棒グラフで表す。図3cは免疫抑制の転写サインを表す。黒色腫および移植患者(P1)で最も特異的に過剰発現される転写産物には：(1)NF-kBトランスロケーション；(2)インターロイキン-2生産およびシグナル伝達；(3)MAPK経路および(4)細胞増殖；を阻害する免疫応答のリプレッサーを含む。これら因子の幾つかは十分に特性決定された抗-炎症分子であり、そして他のはアネルギーT細胞で発現される。

【図4】疾患特異的な発現ベクターの特性決定を導く選択工程を表すスキームを示す。

【図5】図5a~5gは治療の開始前にサンプル採取した小児SLE患者群から同定された免疫転写ベクターの幾つかを示す。レーダープロット上の各線は、患者のプロファイルを表す。図5aでは、太い線がこの患者グループに関する平均標準化発現プロファイルを表す。プロファイルは健康な有志(図5b)および処置を受けている小児SLE患者(図5c)の独立したコホートから単離したPMBcに関する同じベクター組を使用して作成した。処置した(緑)および未処置(オレンジ)SLE患者のコホートについて平均した標準化発現プロファイルがプロットされる(図5d)。患者のプロファイルは処置にかかわらず臨床的活性(SLEDAI)の基準に基づき同じベクター上にプロットされた。低い疾患活性(0から6のSLEDAI)の患者を図5eで表し、そして高い疾患活性(14から28のSLEDAI)の患者を(図5f)に表す。さらに図5gのパネルでは、処置した小児SLE患者についてモジュール転写の変化をまとめた。

【図6】図6a~6cは治療の開始前にサンプル採取した小児SLE患者群から同定された免疫転写ベクターを示す。レーダープロット上の各線は、患者のプロファイルを表す。太い線はこの患者グループに関する平均標準化発現プロファイルを表す。プロファイルは処置中の成人SLE患者(図6a)、健康な成人(図6b)および線維筋痛症と診断された成人患者(図6c)から単離したPMBcについてのこのベクター組を使用して作成した。

【図7】臨床的SLE疾患活性指数(SLEDAI)と相関する転写ベクターM1.7<sub>SLE</sub>、M2.2<sub>SLE</sub>、M2.4<sub>SLE</sub>、M2.8<sub>SLE</sub>およびM3.1<sub>SLE</sub>を構成する遺伝子の発現プロファイルを表す。グラフは12名の健康な個体および21名の未処置小児SLE患者において、各ベクターを形成する個別の転写産物の発現レベルを表す。各ベクターを形成する転写産物全体の平均発現値は、黄色いグラフ上に示す。平均ベクター発現値とSLEDAIとの間の相関を以下に示す(スベルマン相関)。

【図8】図8aおよび8bは、ベクターM1.7<sub>SLE</sub>、M2.2<sub>SLE</sub>、M2.4<sub>SLE</sub>

10

20

30

40

50

$M2.8_{SLE}$ 、 $M3.1_{SLE}$  および  $SLEDAI$  (x 軸) を形成する遺伝子の平均化発現値を使用して得た多変量マイクロアレイスコア (または「ゲノムスコア」) のスペルマン相関を示すグラフである。(a) スコアは 22 名の未処置小児  $SLE$  患者について得た。(b) 同じ分析を、異なる併用療法を受けている 31 名の小児  $SLE$  患者に適用した。

【図 9】図 9 a および 9 b は、長期間追跡した (x 軸) 小児患者の  $SLEDAI$  スコア (青、右 y 軸)、およびマイクロアレイスコア (赤、左 y 軸) を表す (図 9 a)。サンプリング間に経過した時間は、月で示す。図 9 b は長期間追跡した (x 軸) 小児患者の  $SLEDAI$  スコア (青、右軸) および U - スコア (赤、左 y 軸) を表す。サンプリング間に経過した時間は、月で示す。

【図 10】2 つの異なるマイクロアレイ平板：アフィメトリックス  $U133A \& B$  GeneChips およびイルミナ  $Sentrix$  Human Ref 8 BeadChips で分析した、健康な供与体および肝移植受容体からの  $PMB$  サンプルを使用した相互平板比較である。同じ起源の全  $RNA$  を使用して、ビオチン - 標識化  $cRNA$  標的を独立して調製した。結果は両平板で見いだされた転写産物について示す。各遺伝子の発現は、すべてのサンプルをわたり得た測定 of 中央値に対して標準化する。各転写モジュールを形成する遺伝子の平均化発現値を、アフィメトリックスおよびイルミナの両平板について表す。

【 図 1 A 】

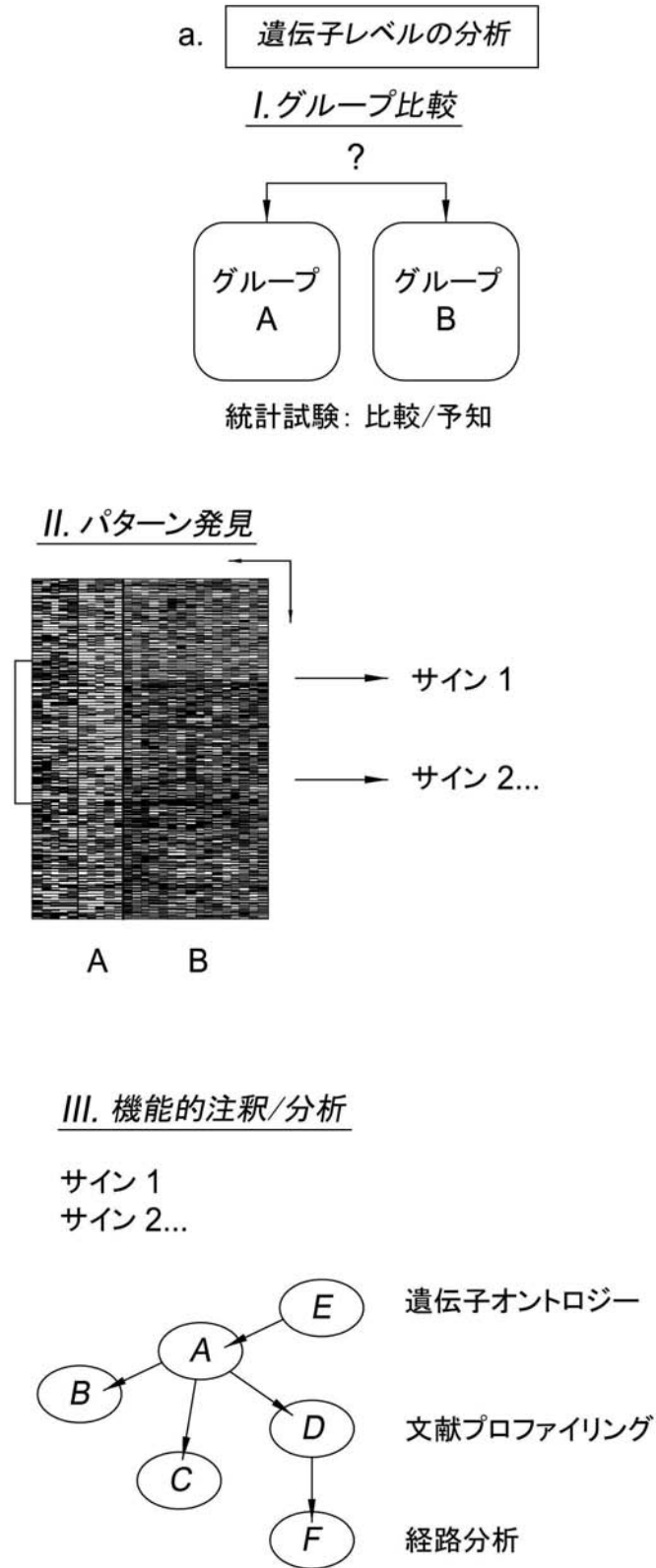


FIG. 1A

a. モジュールレベルの分析  
I. モジュール抽出アルゴリズム

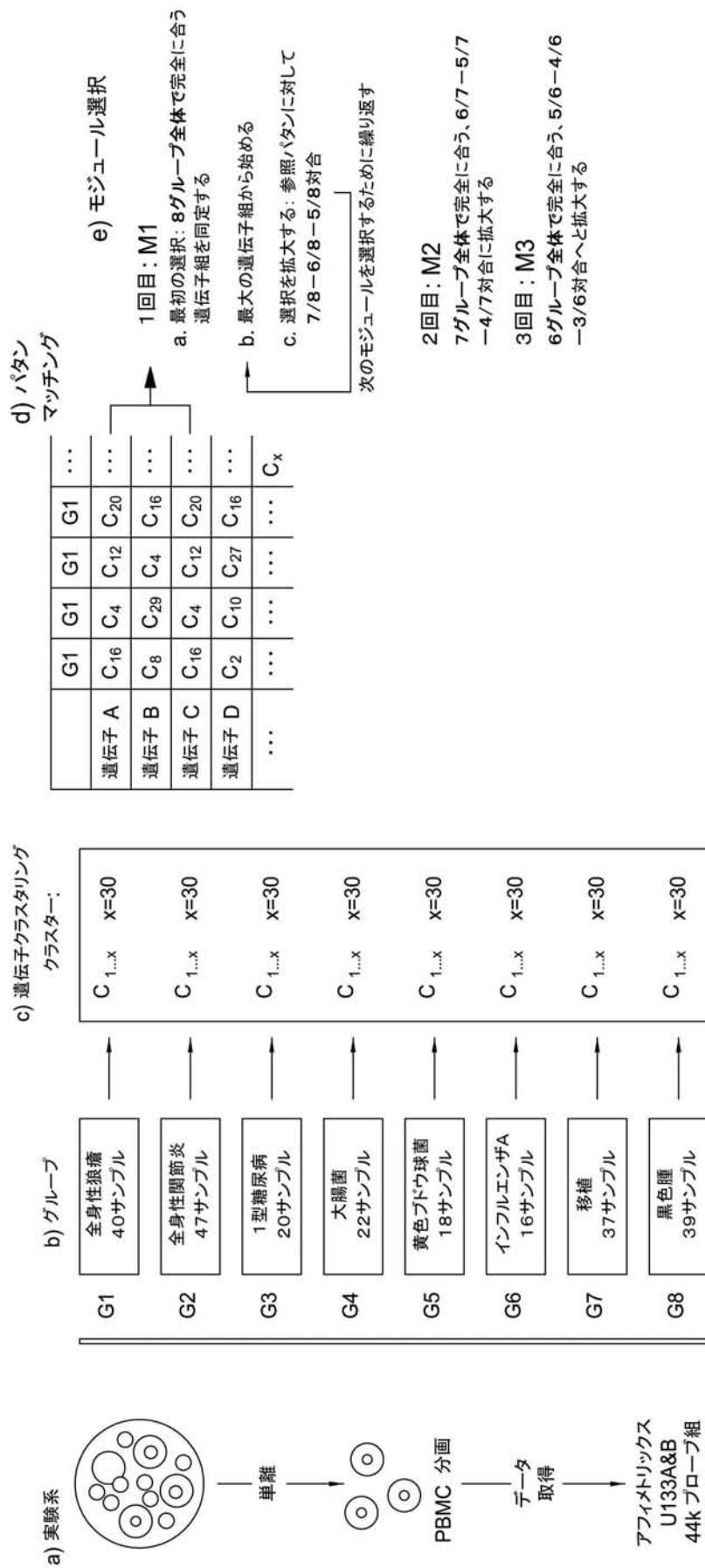


FIG. 1B-1



【図 1 C - 1】

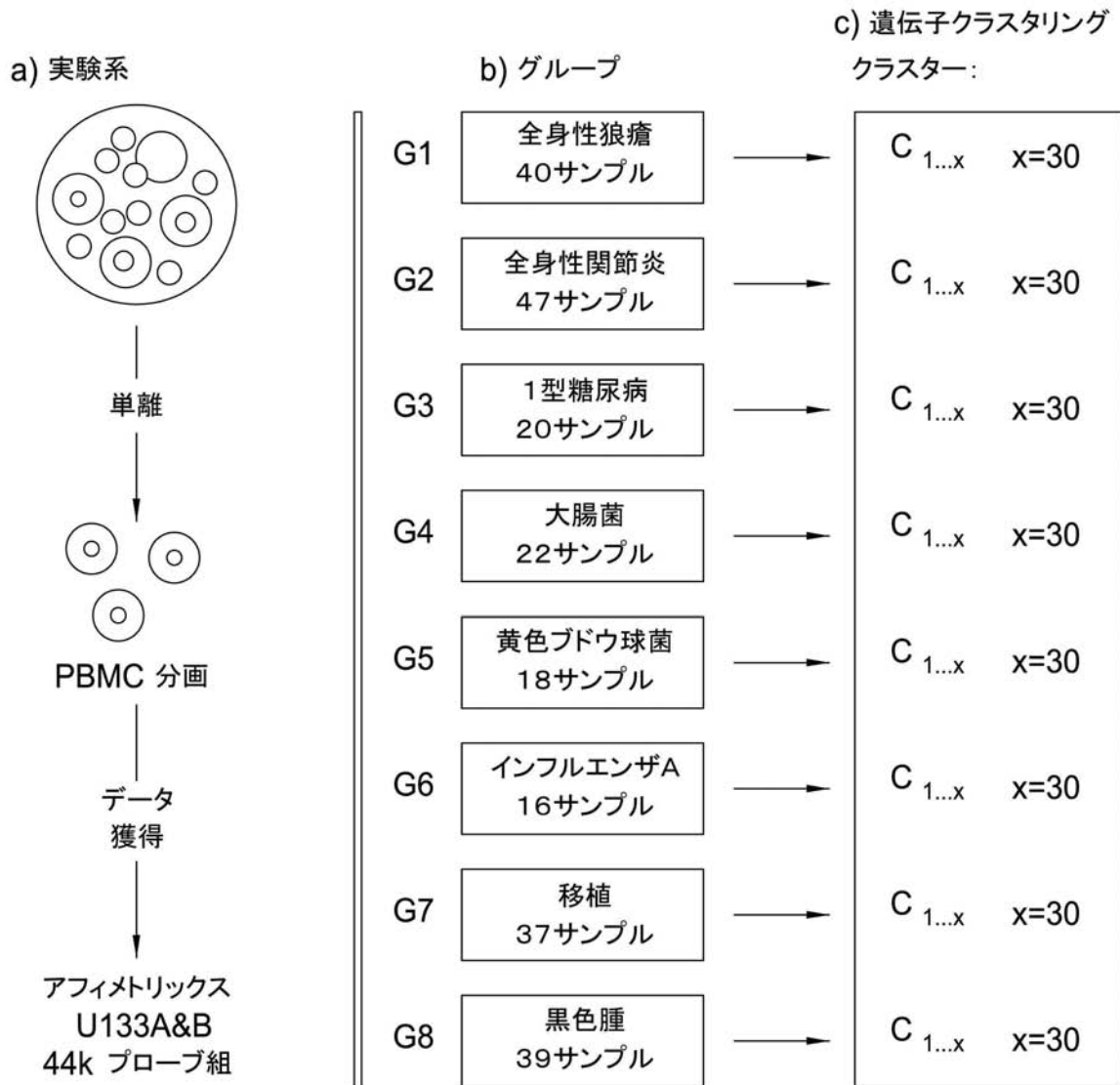


FIG. 1C-1

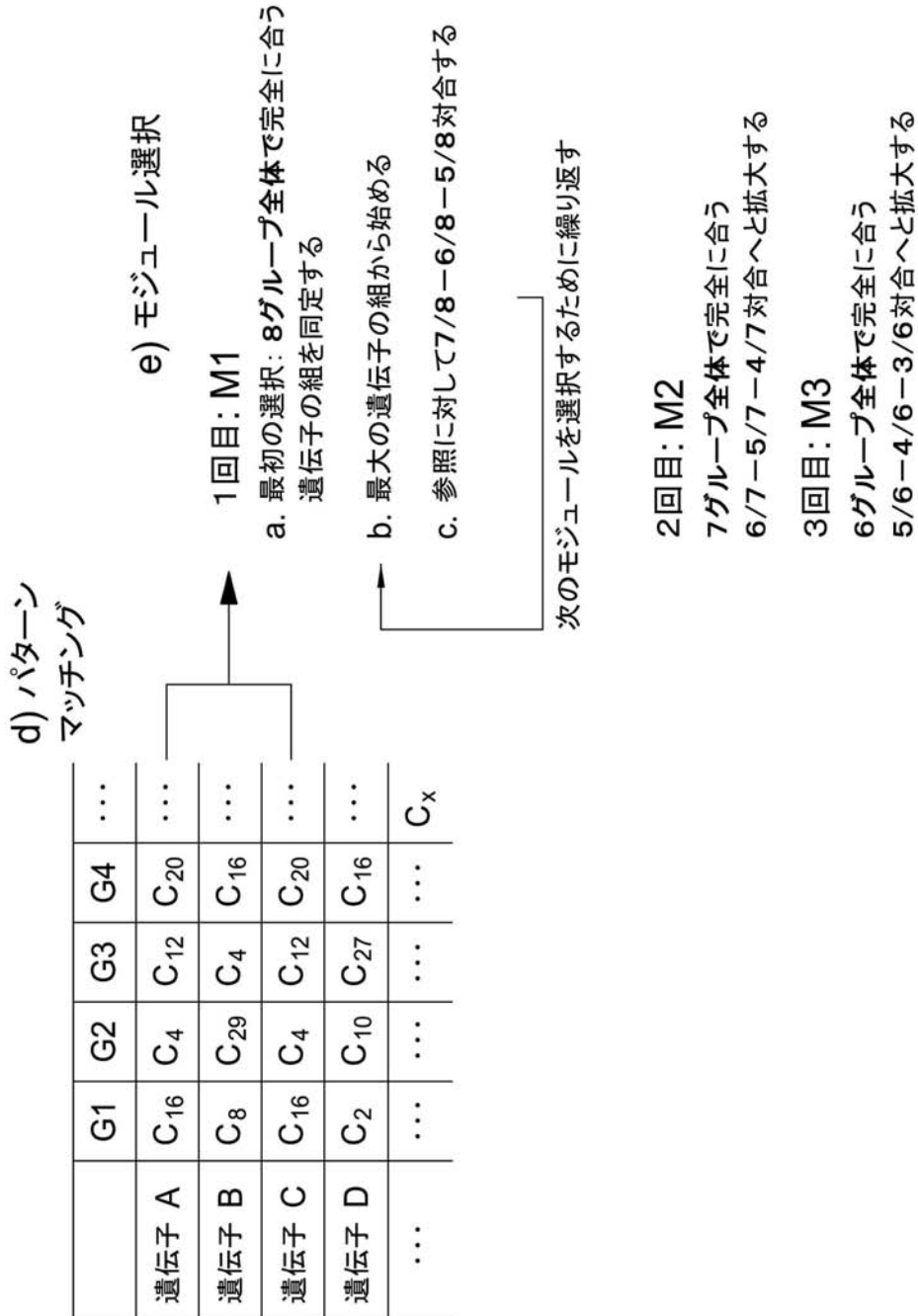


FIG. 1C-2

【 図 2 A 】

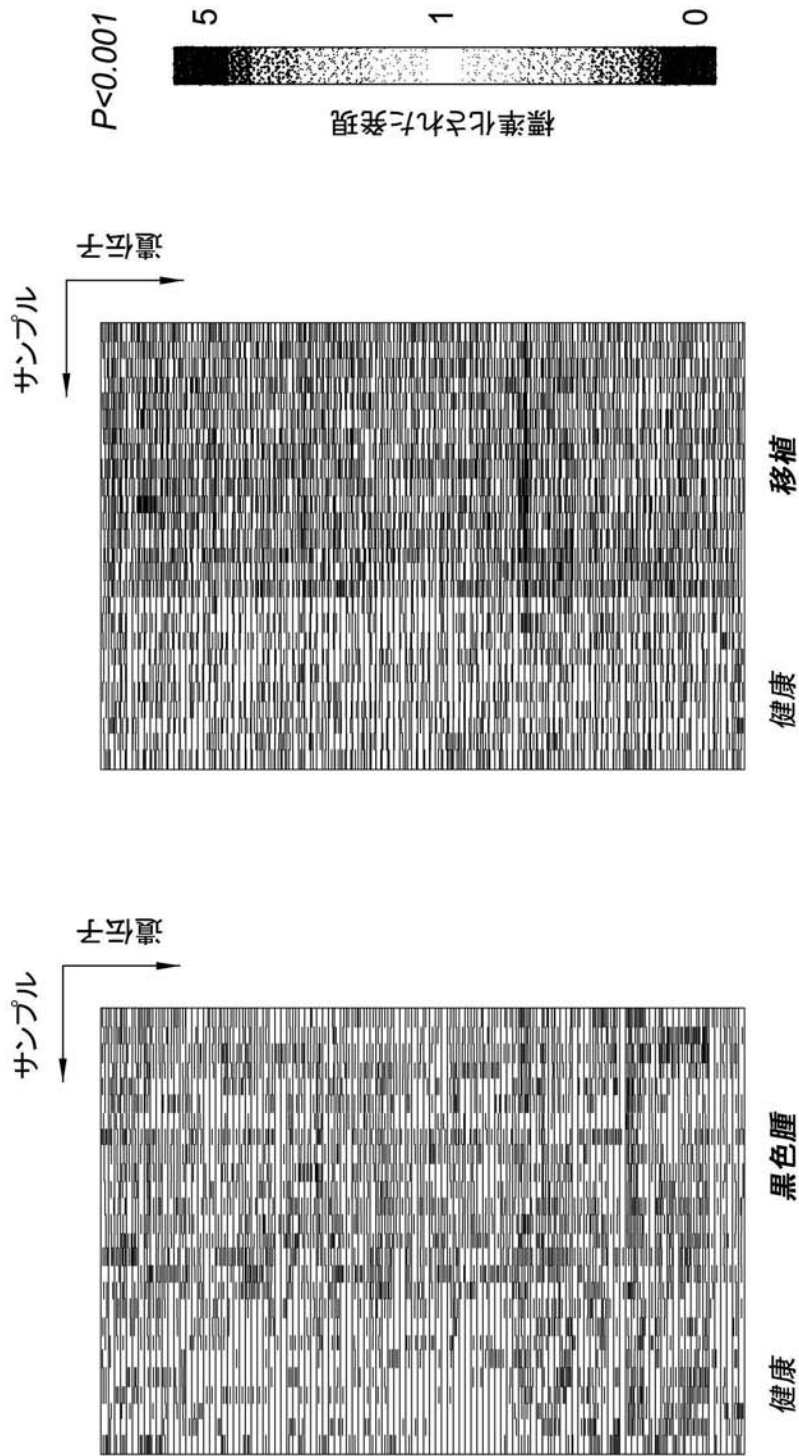
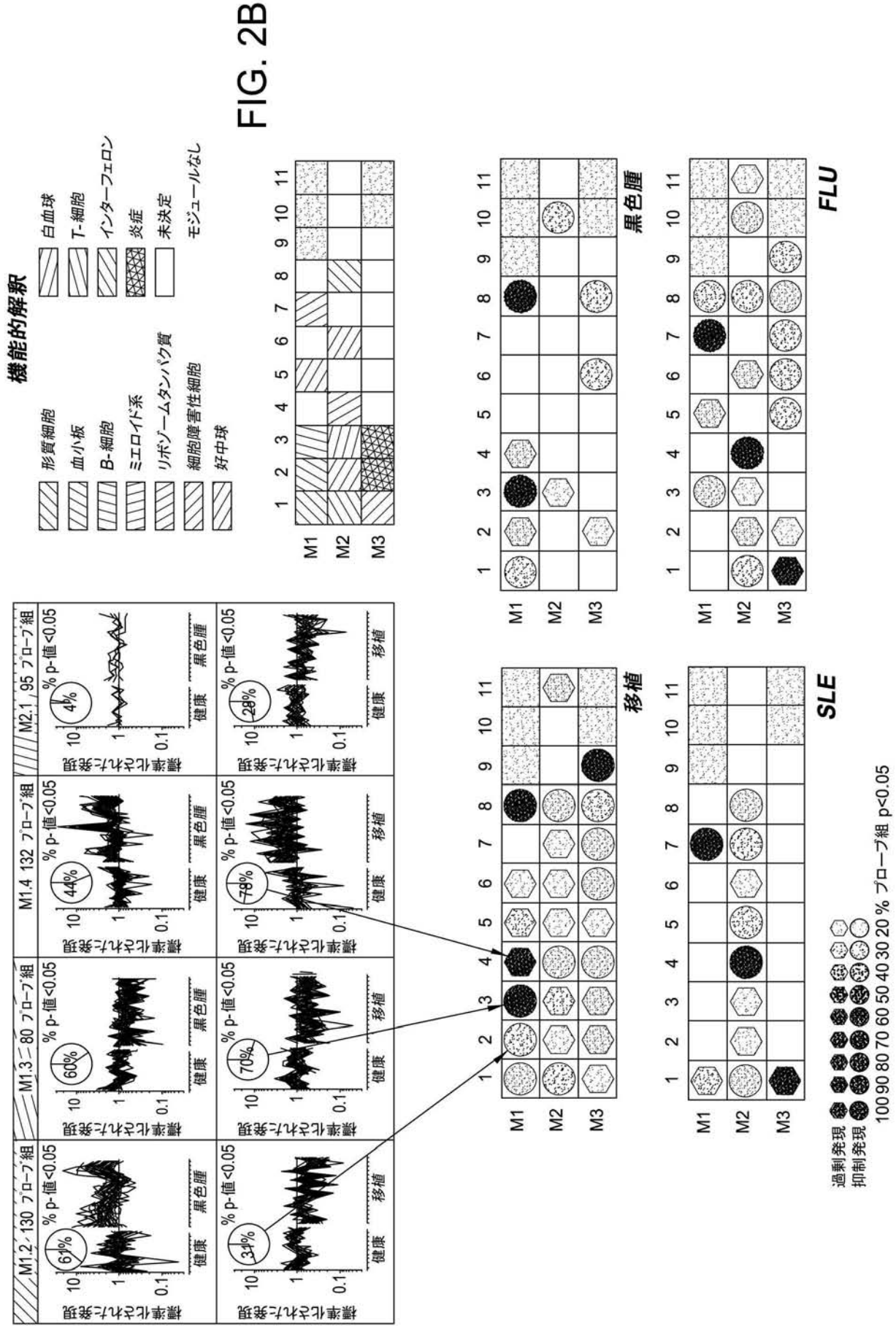


FIG. 2A

【 図 2 B 】



【図 2 C】

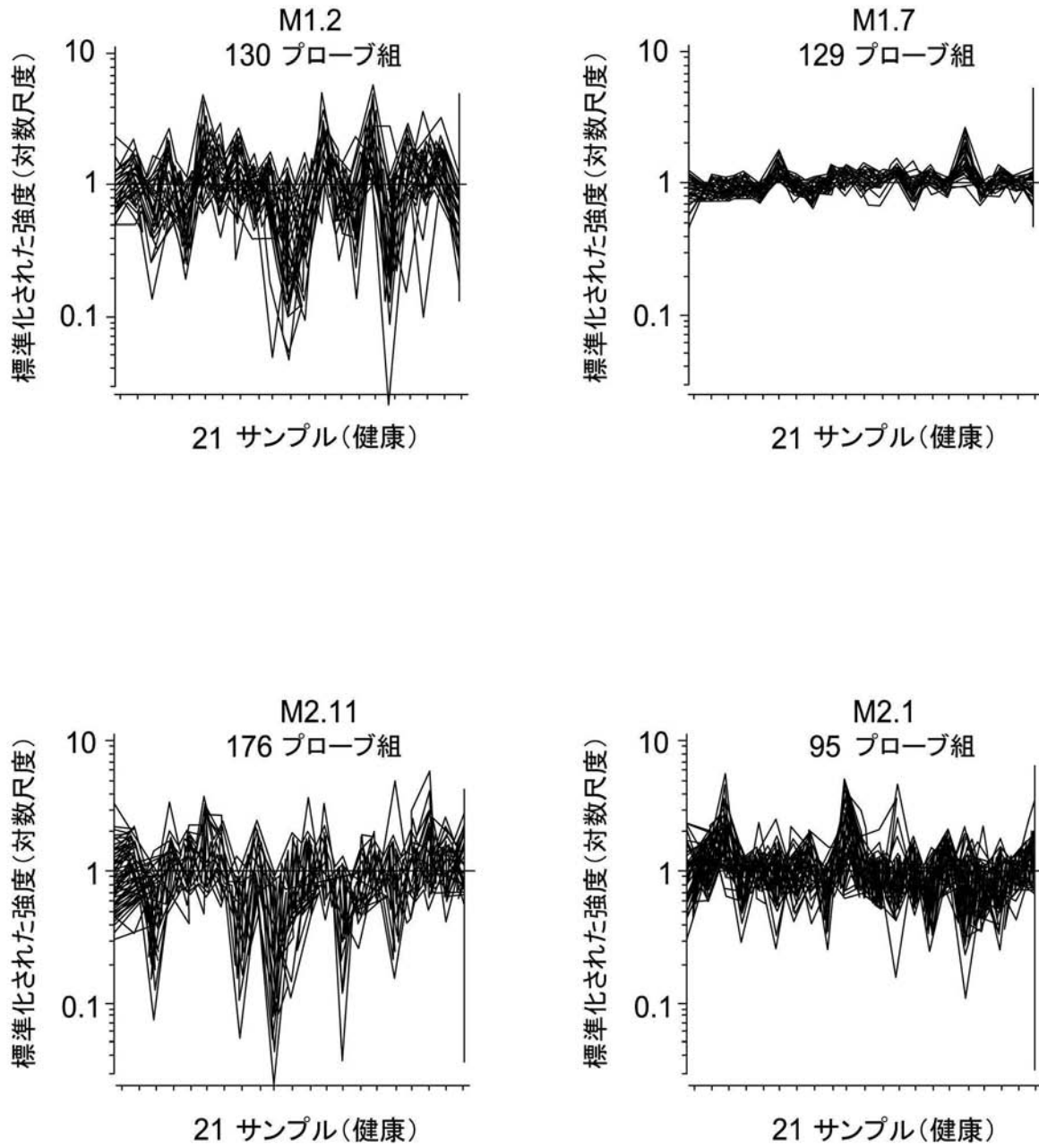


FIG. 2C

【 図 2 D 】

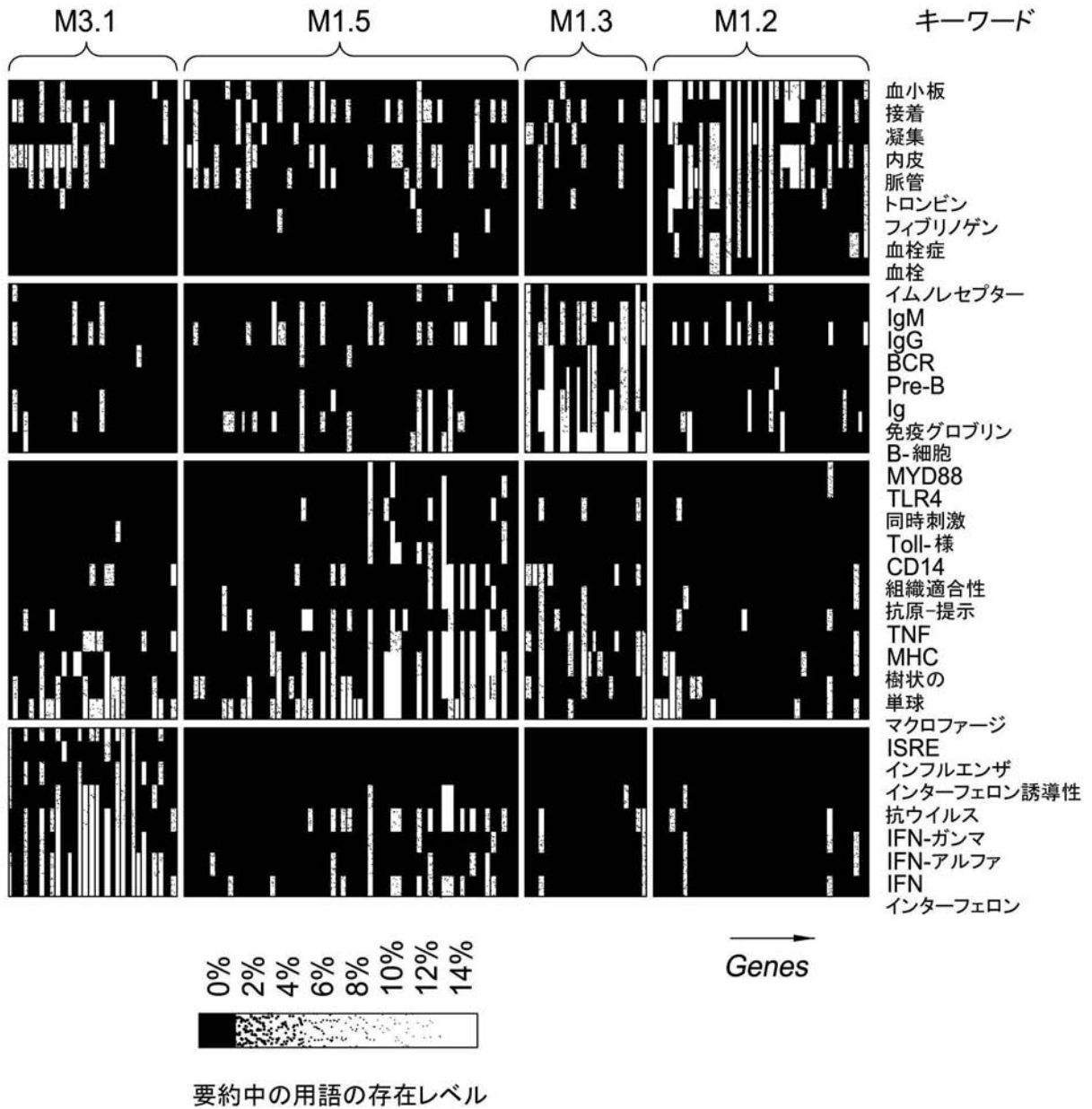
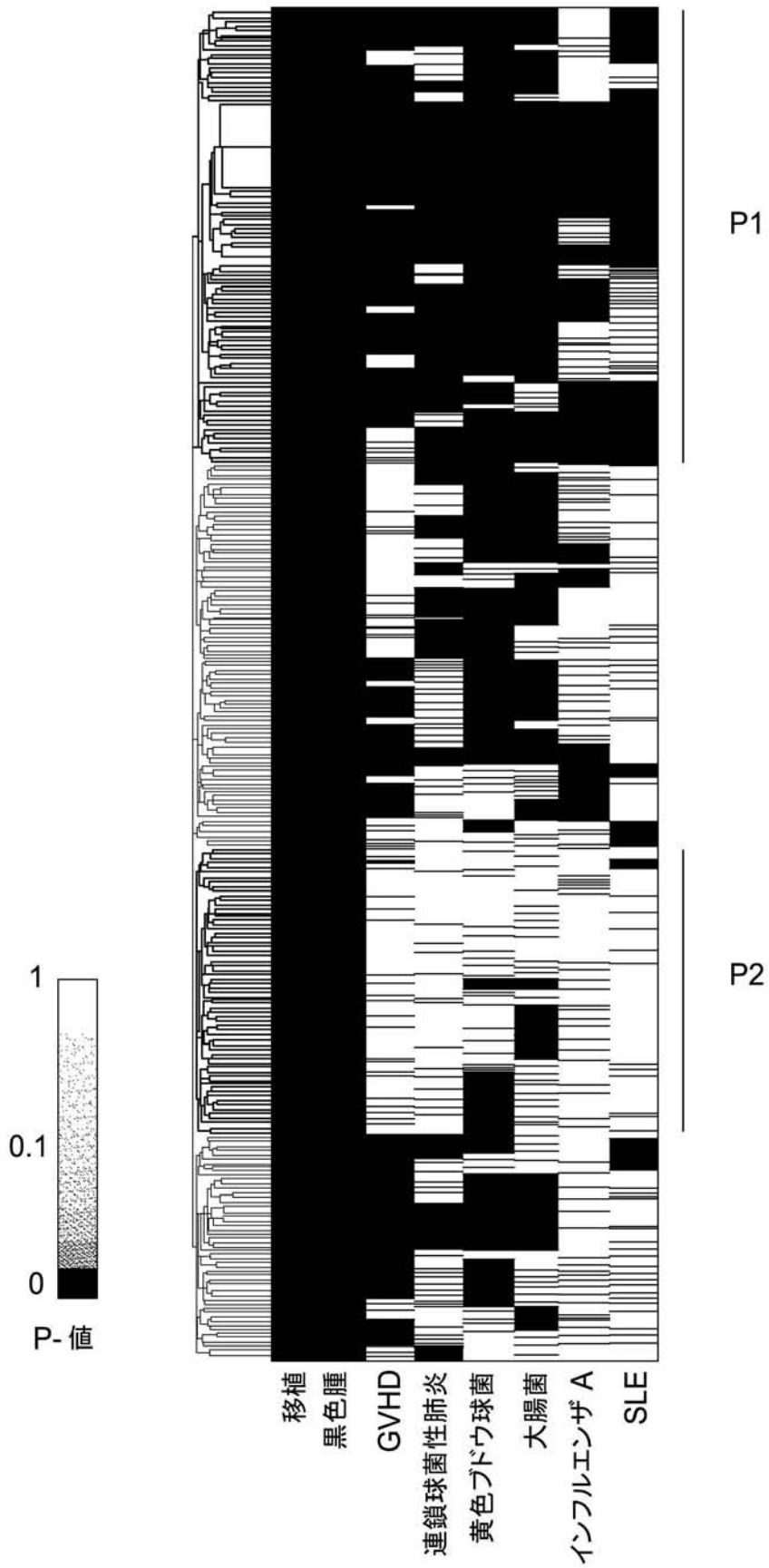


FIG. 2D

【図 3 A】

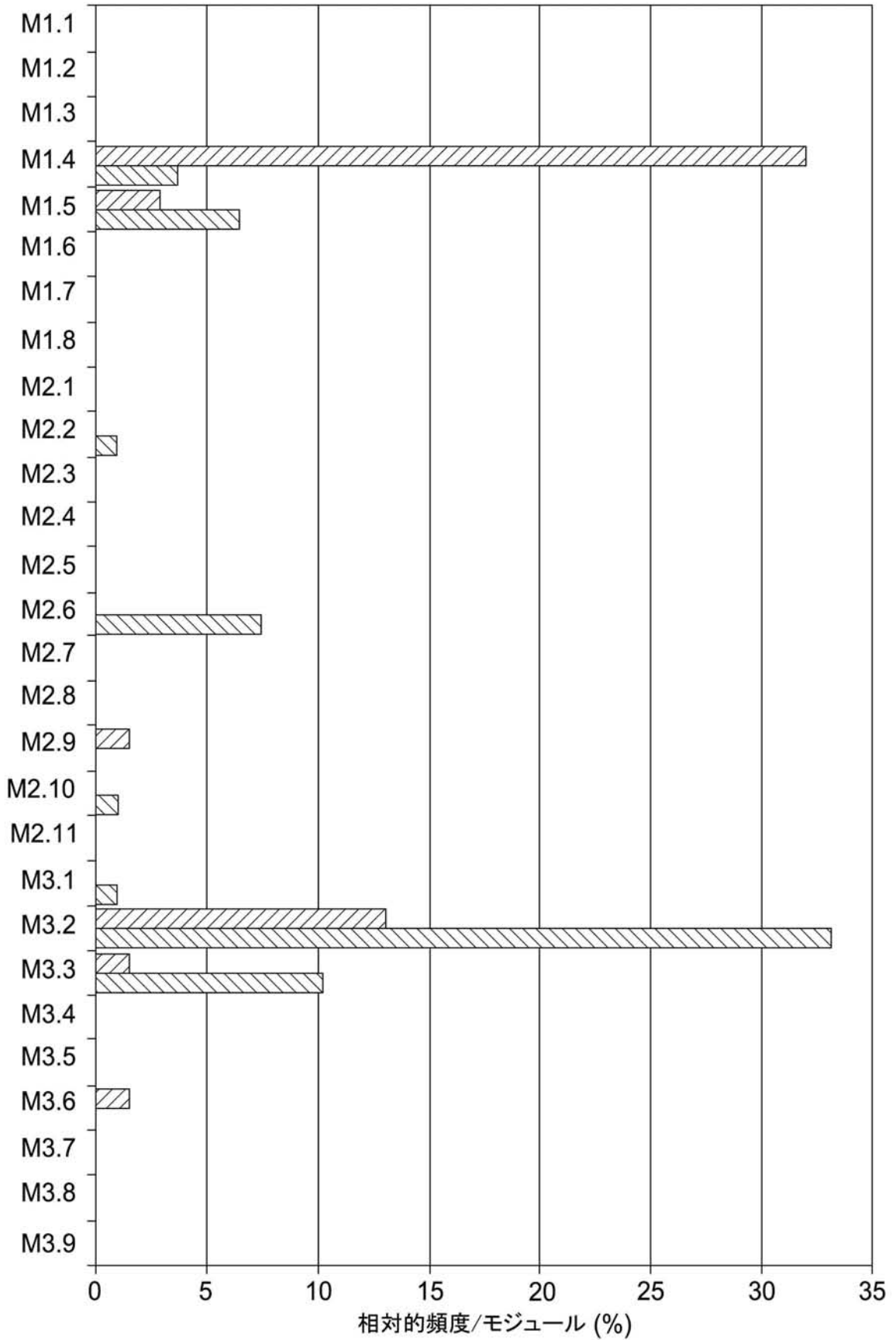
FIG. 3A



【 図 3 B 】

FIG. 3B

P1およびP2転写産物の分布



【 図 3 C 】

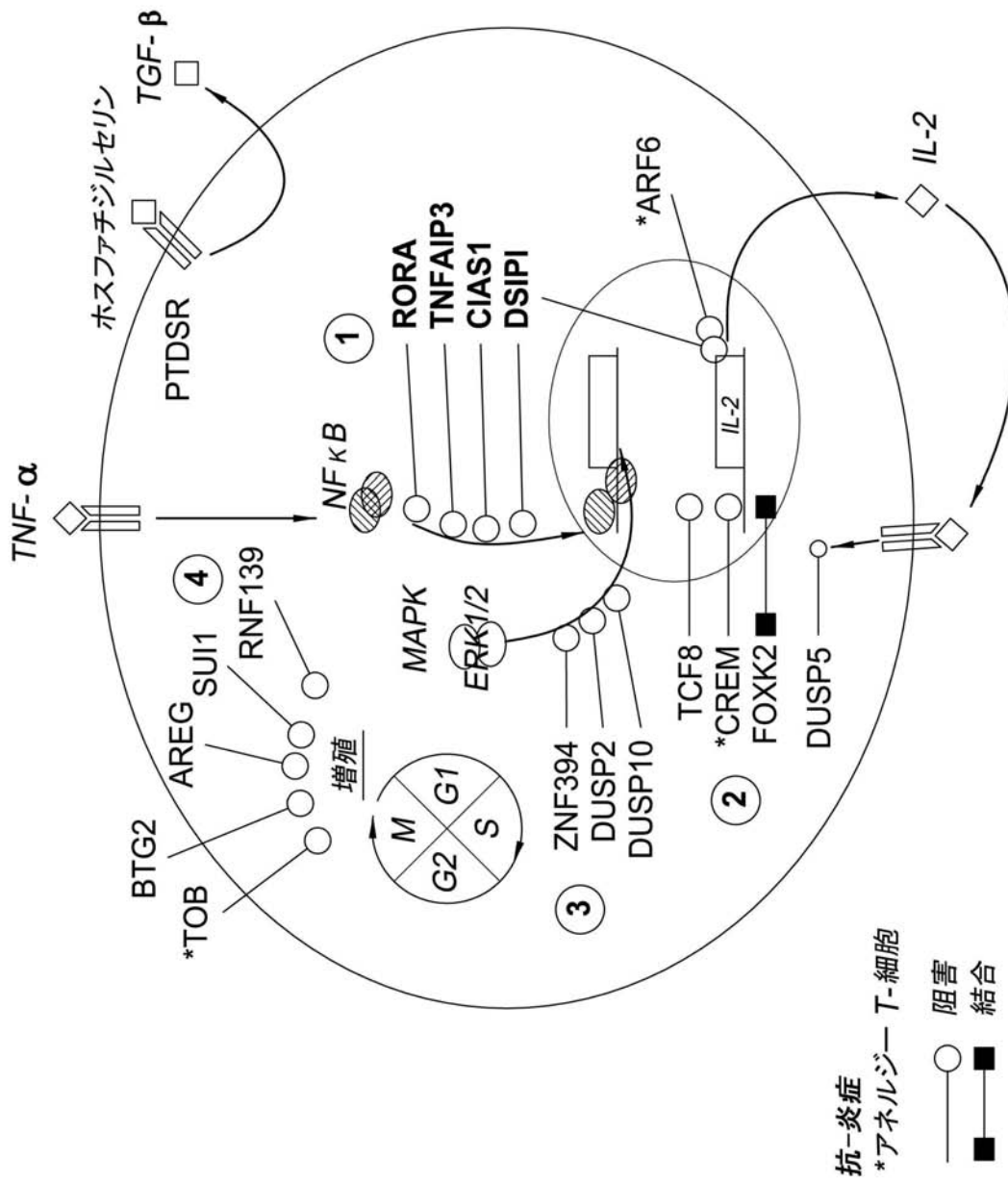


FIG. 3C

I. モジュールの転写の変化のマッピング

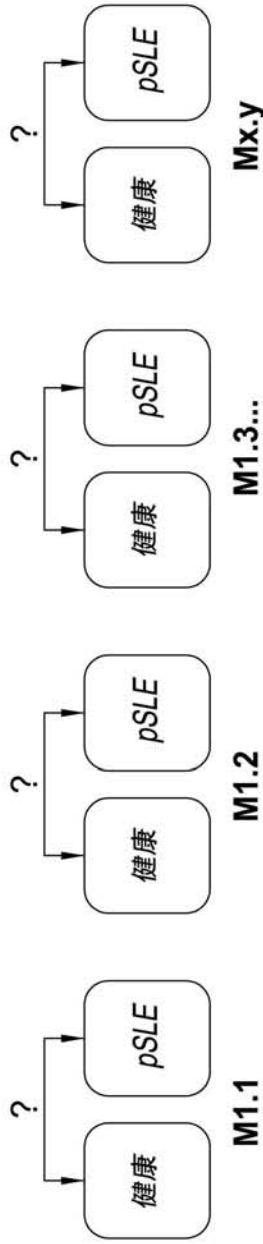
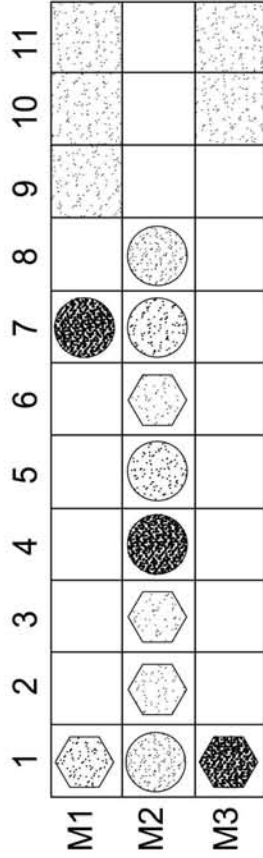
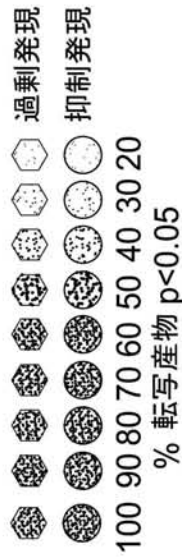


FIG. 4A

> 28のPBMC転写モジュール全体についてクラス比較を行う:

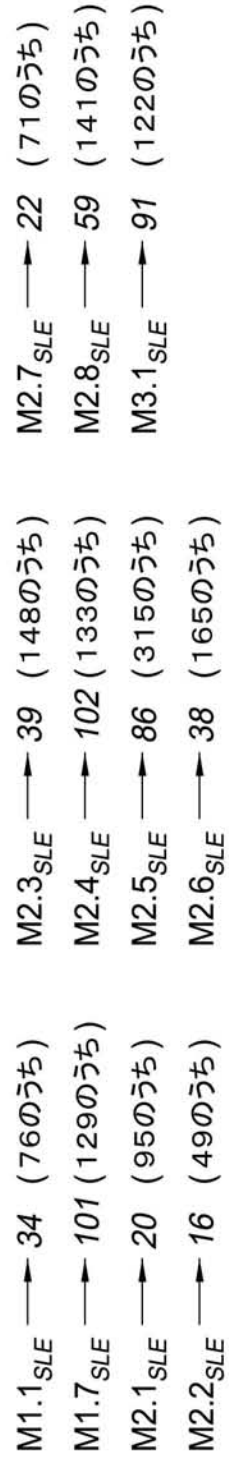


II. 疾患転写ベクターを形成する

< 転写産物を選択する  $p < 0.05$

$Mx.y_{SLE} = Mx.y$  転写産物;  $p < 0.05$

FIG. 4B



【 図 4 C 】

### III. 各ベクターについて発現値を誘導する

> 発現レベルを計算する: 各ベクターを形成する転写産物の平均発現値

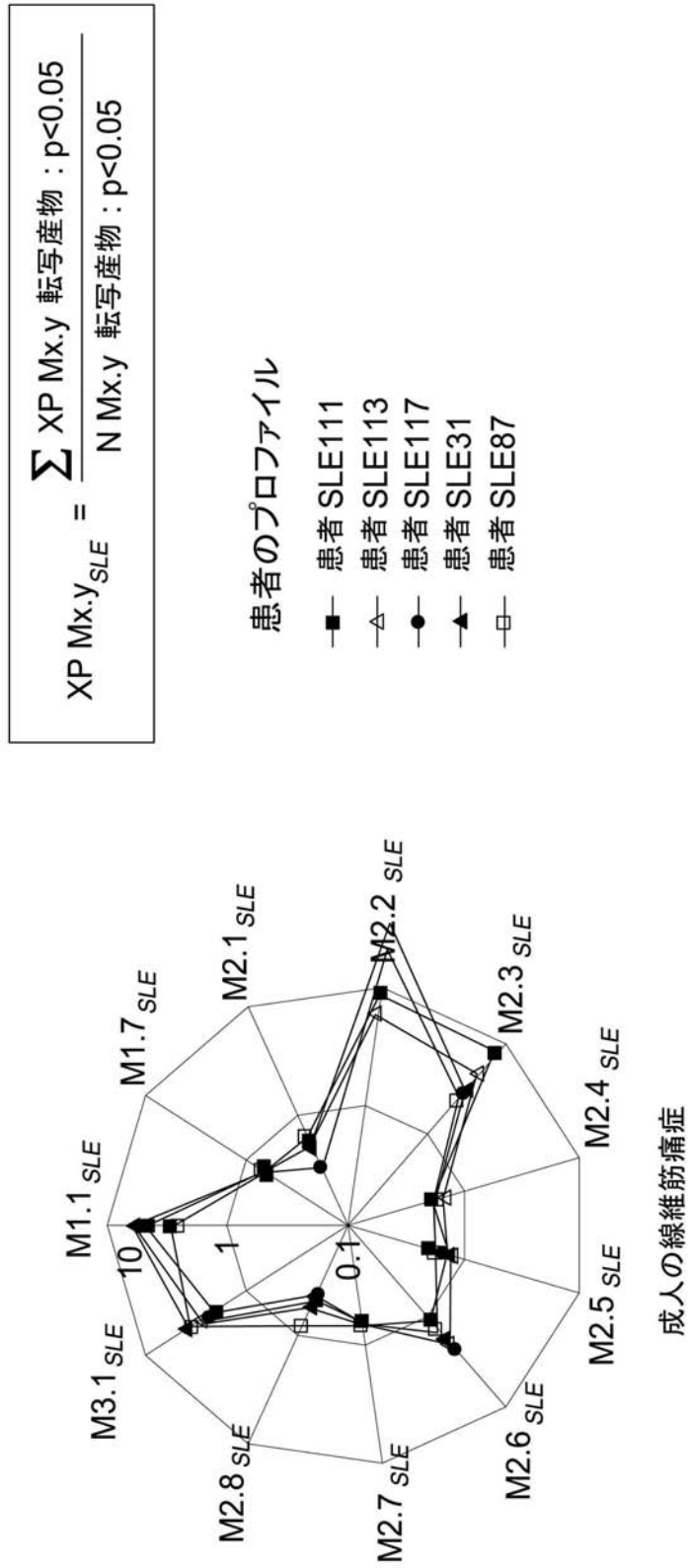


FIG. 4C

【 図 5 A 】

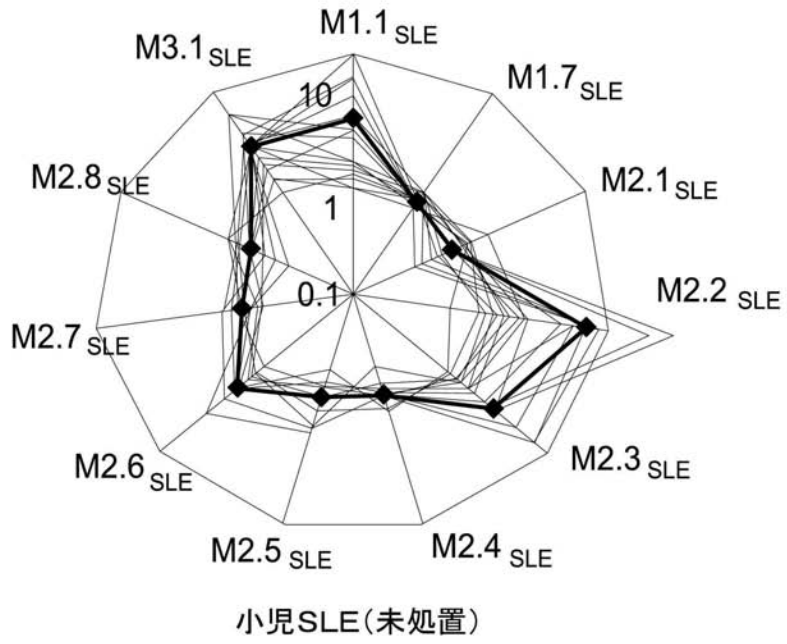


FIG. 5A

【 図 5 B 】

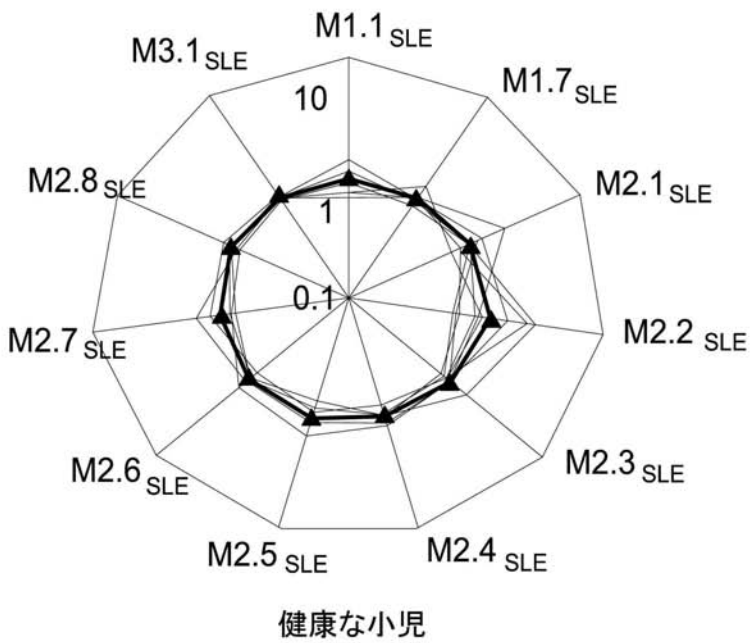


FIG. 5B

【 図 5 C 】

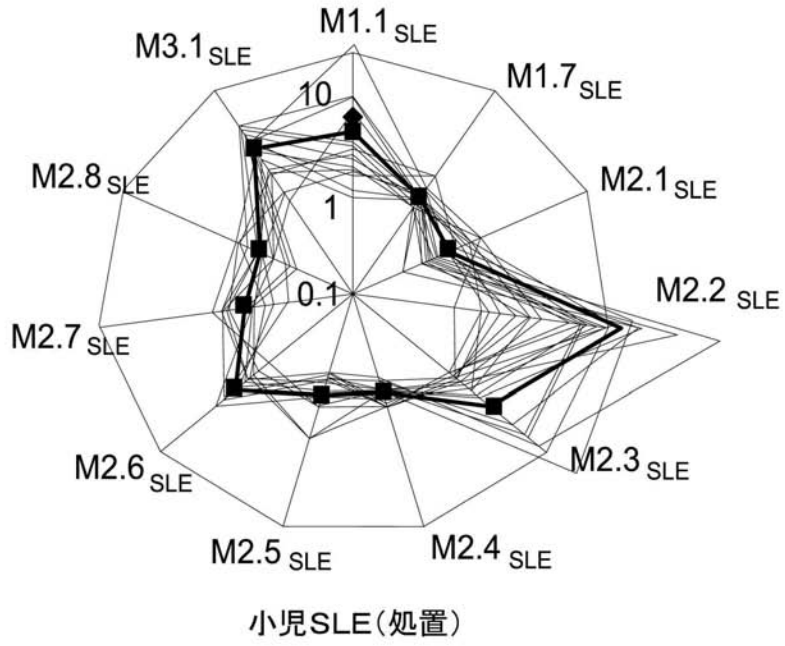


FIG. 5C

【 図 5 D 】

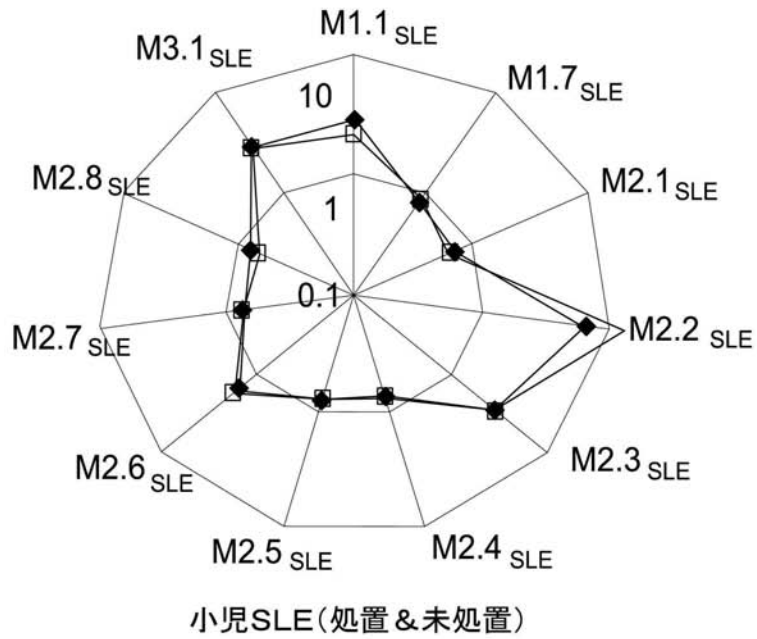


FIG. 5D

【 図 5 E 】

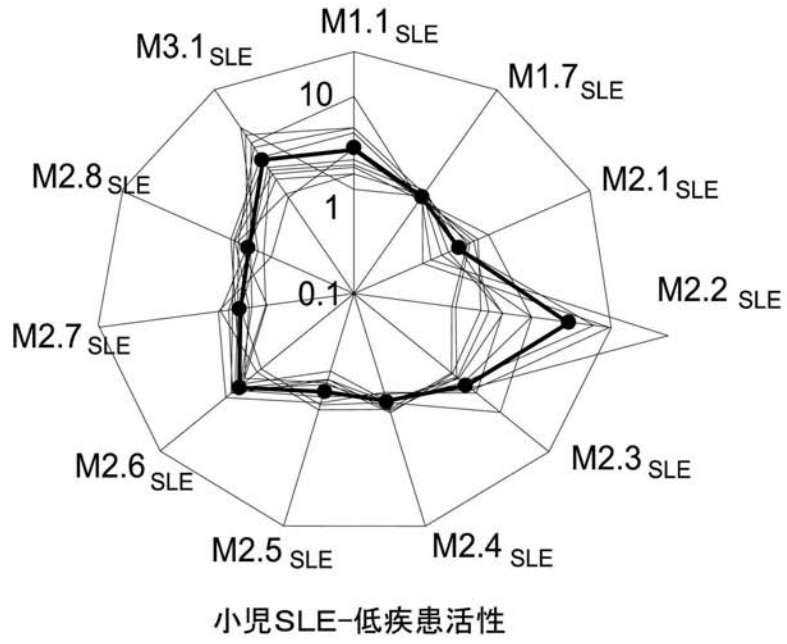


FIG. 5E

【 図 5 F 】

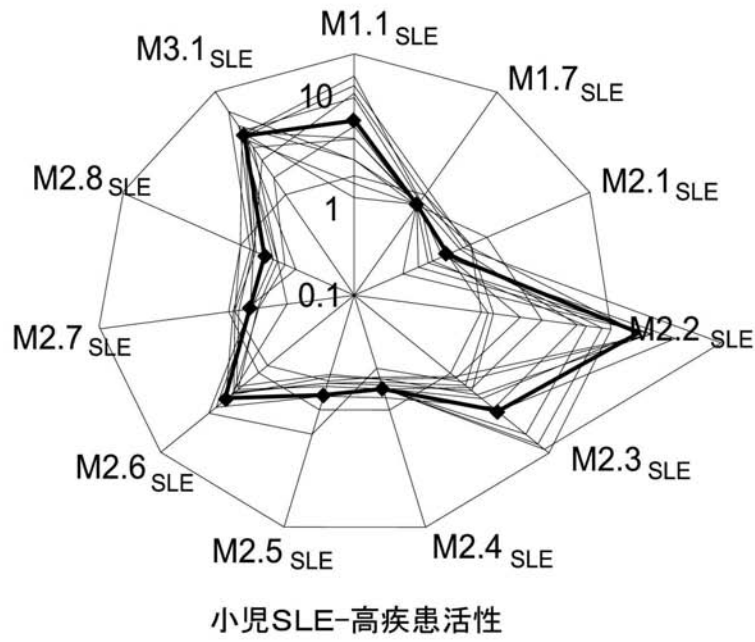


FIG. 5F

【 図 5 G 】

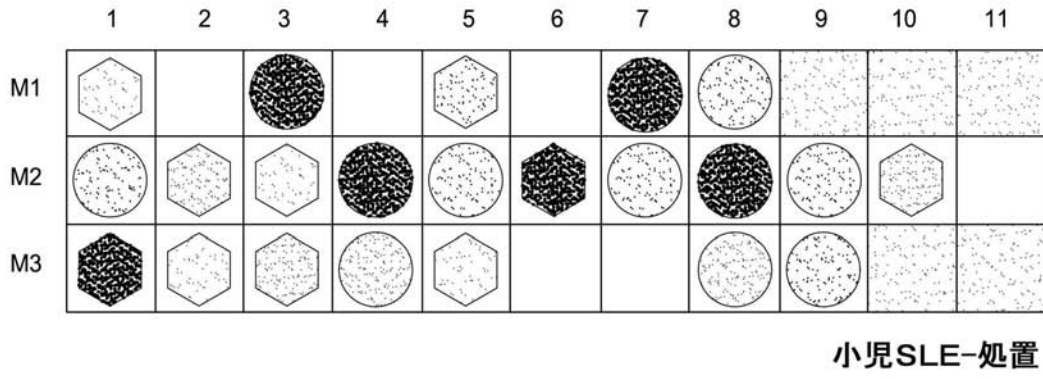


FIG. 5G

【 図 6 A 】

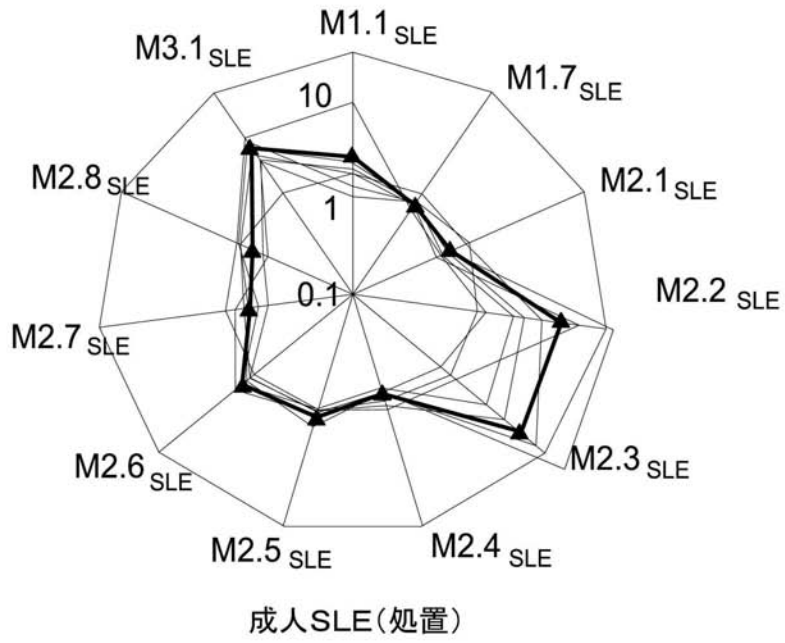


FIG. 6A

【 図 6 B 】

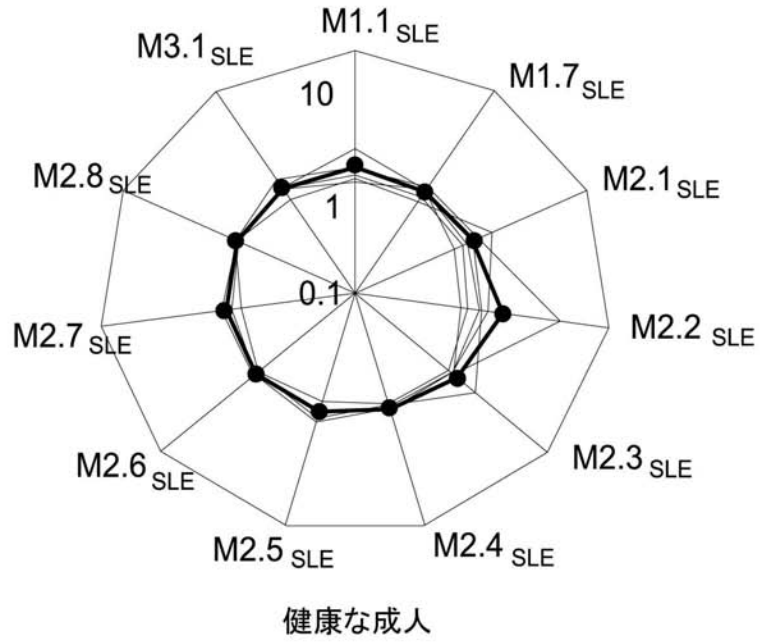


FIG. 6B

【 図 6 C 】

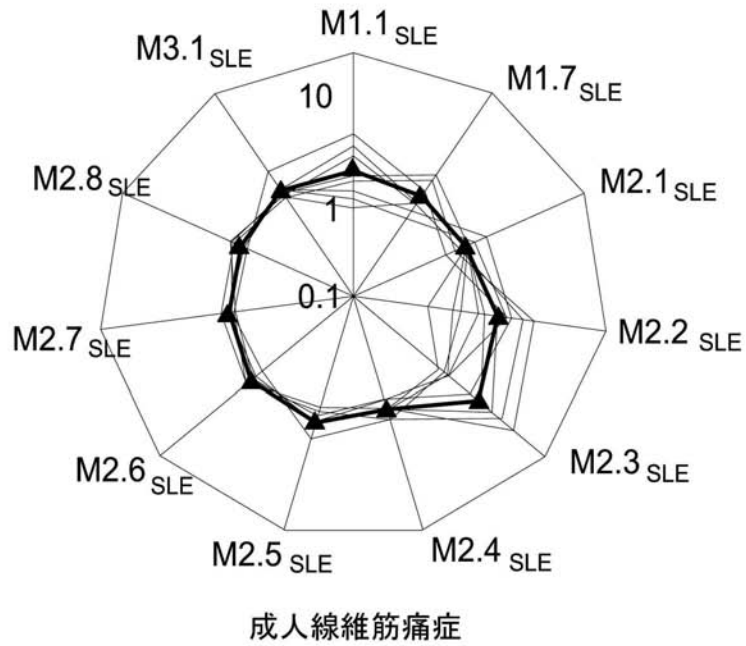


FIG. 6A

【図7A - 7B】

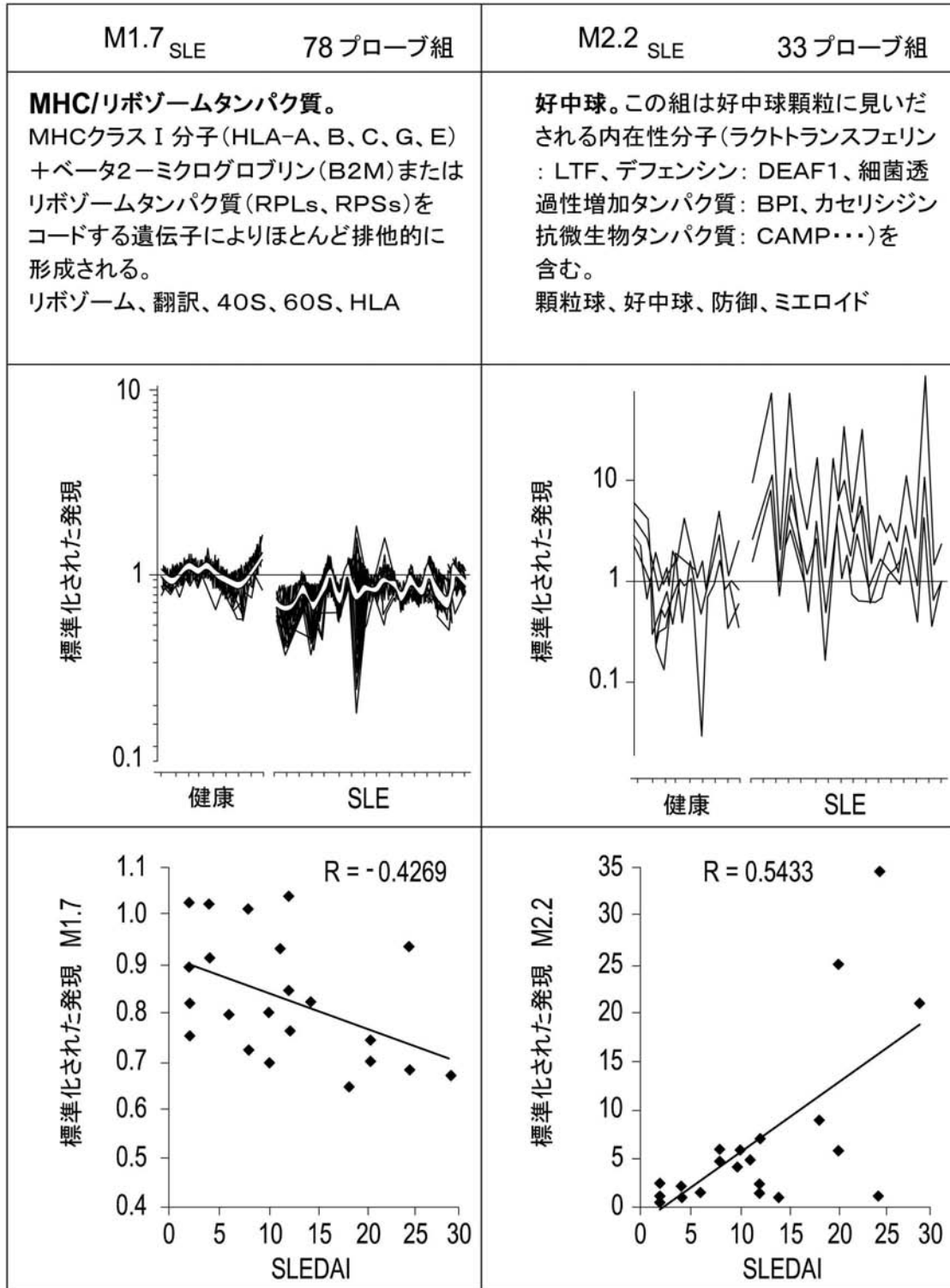


FIG. 7A

FIG. 7B

【図7C - 7D】

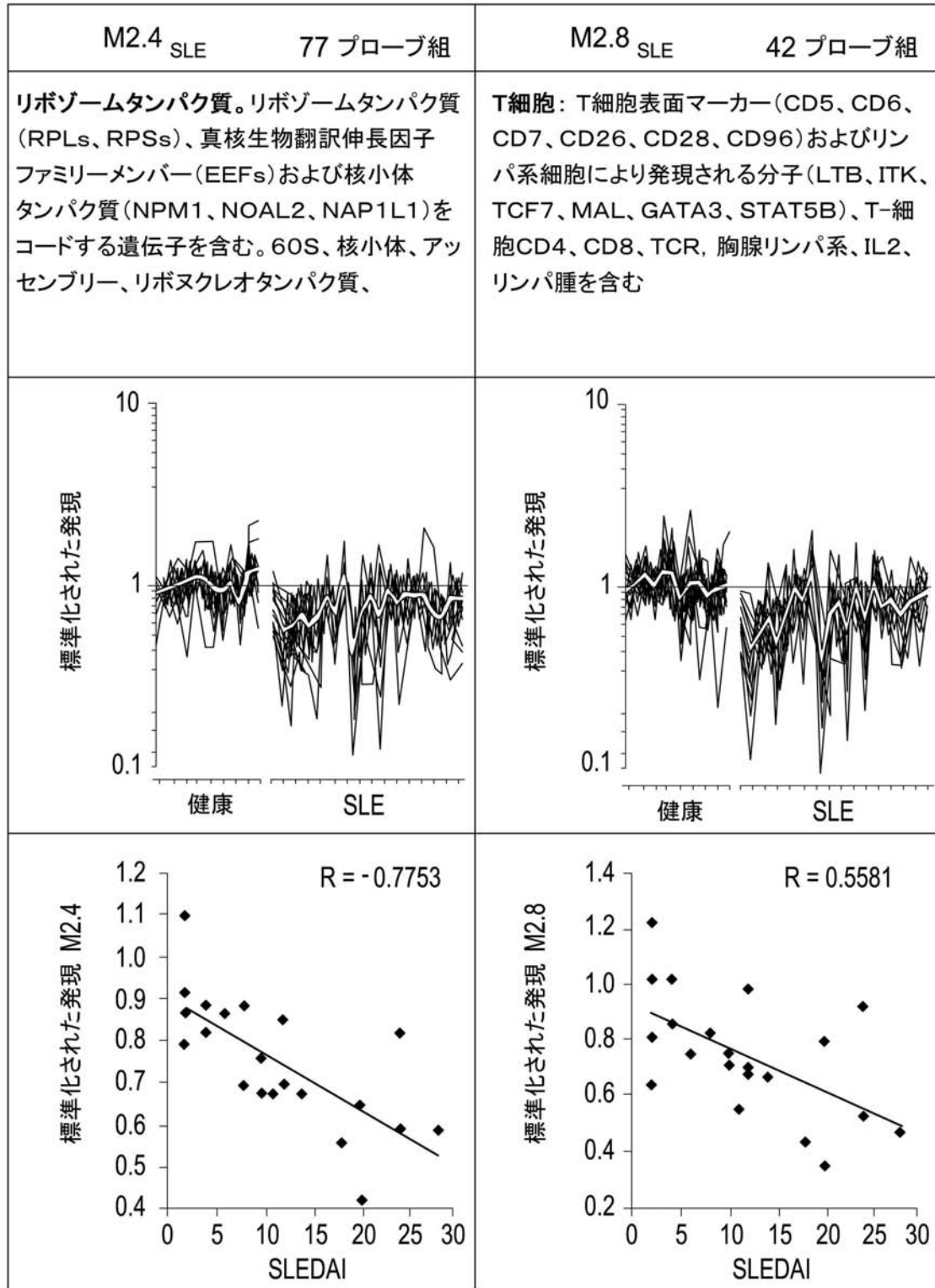


FIG. 7C

FIG. 7D

【 図 7 E 】

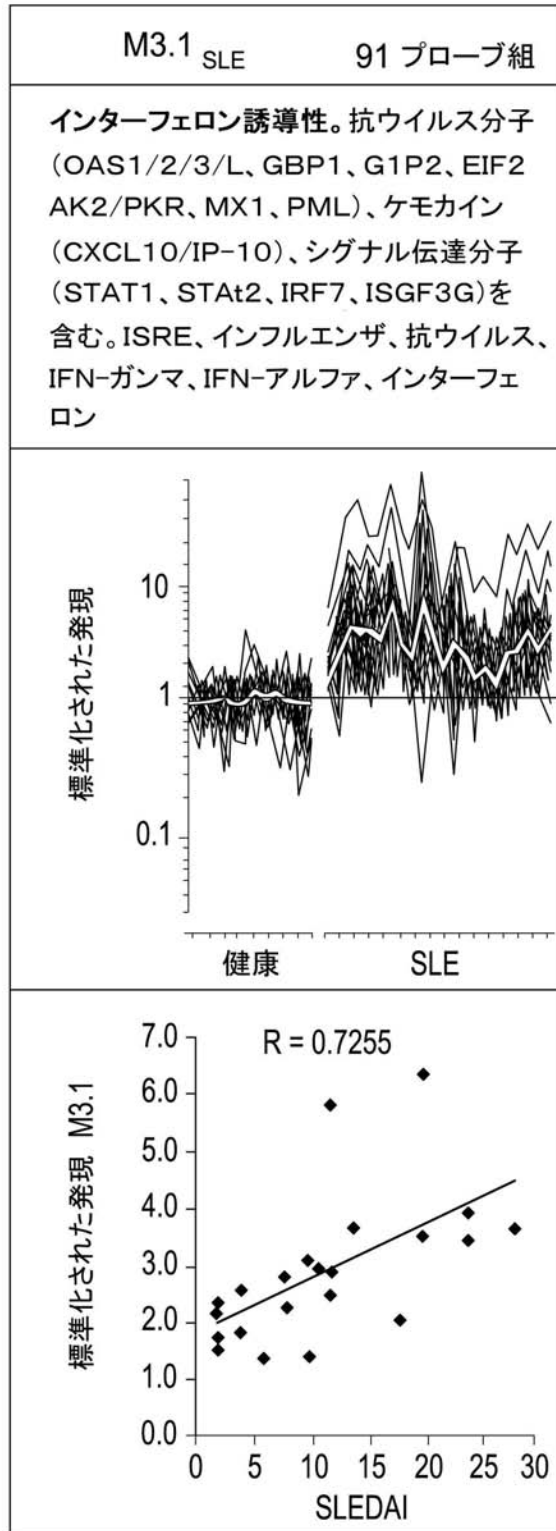


FIG. 7E

【 図 8 A 】

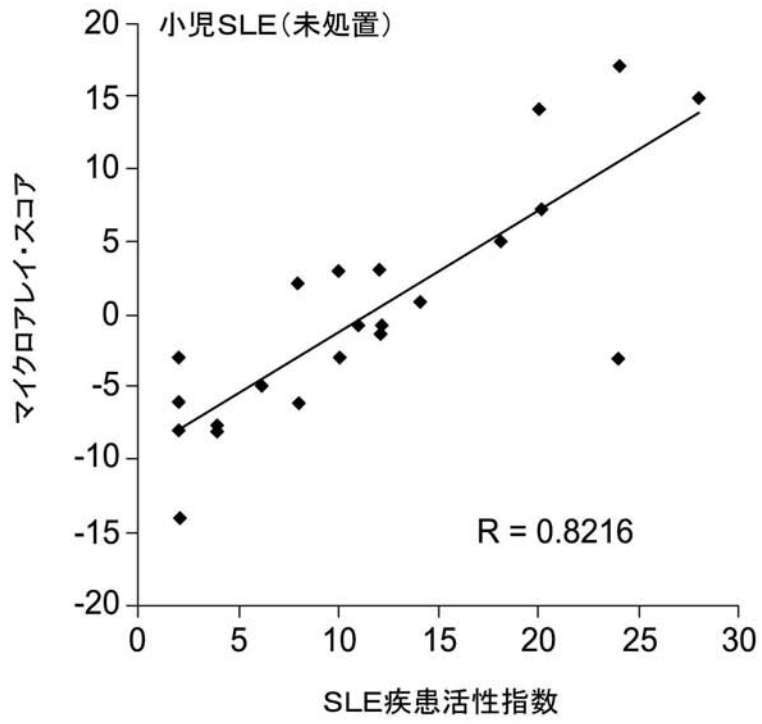


FIG. 8A

【 図 8 B 】

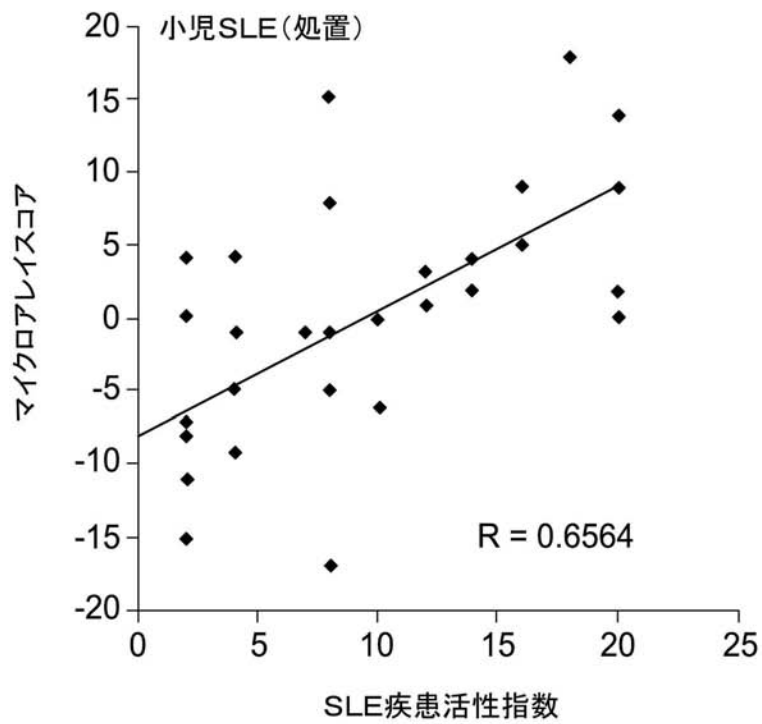


FIG. 8B

【 図 9 A - 1 - 9 A - 6 】

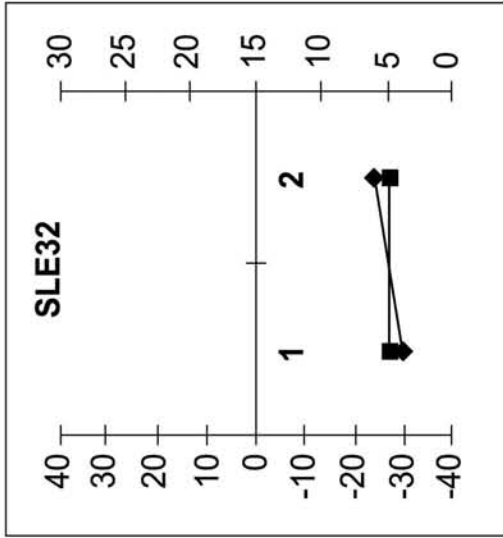


FIG. 9A-1

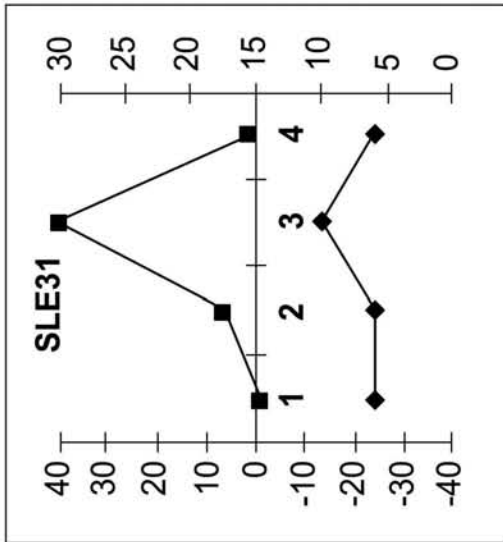


FIG. 9A-2

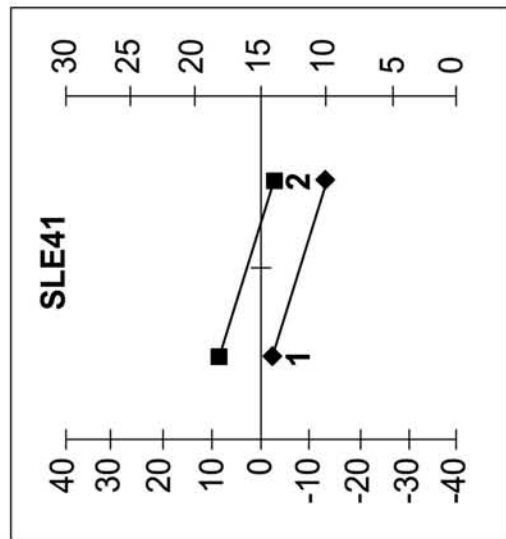


FIG. 9A-4

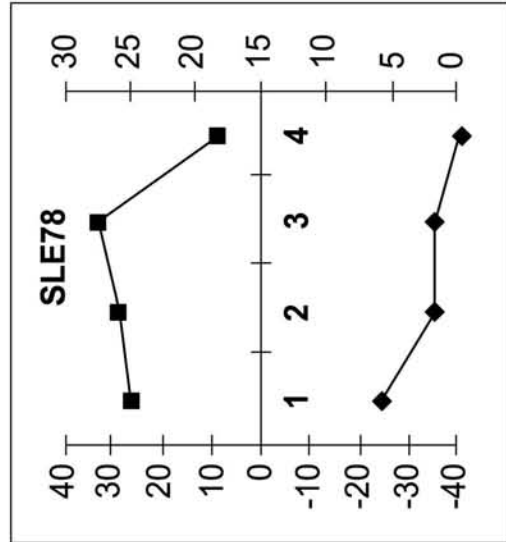


FIG. 9A-5

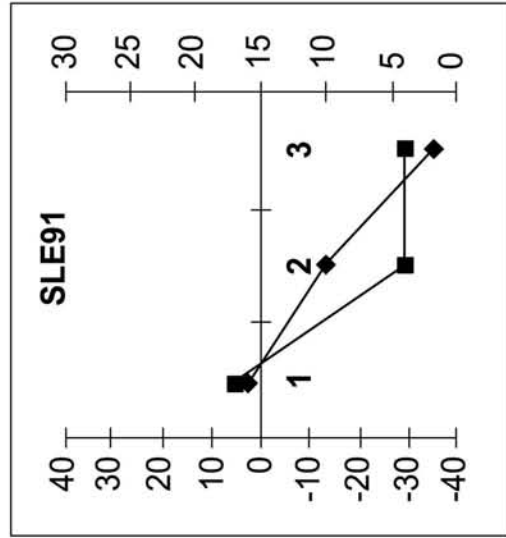


FIG. 9A-6

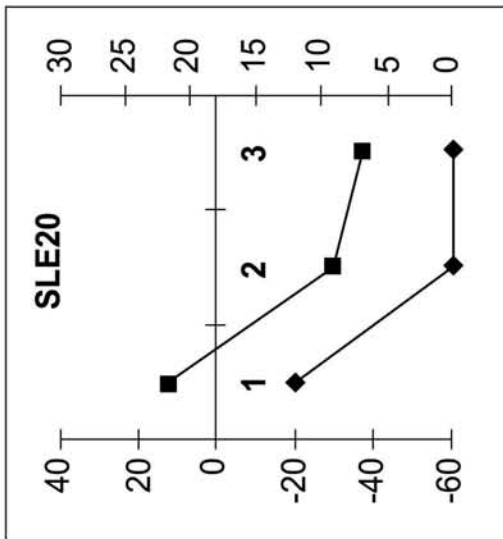
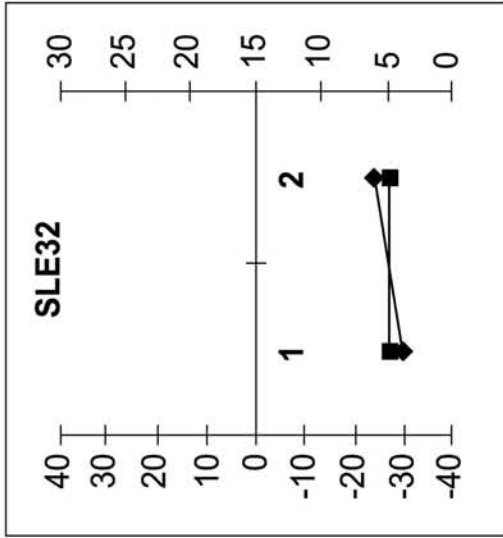


FIG. 9A-3



【 図 9 A - 7 - 9 A - 10 】

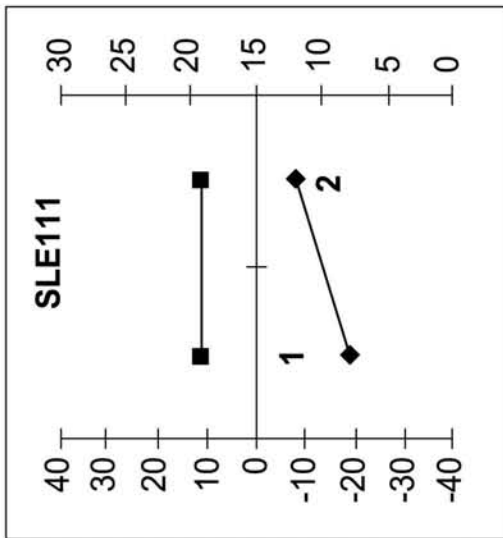


FIG. 9A-7

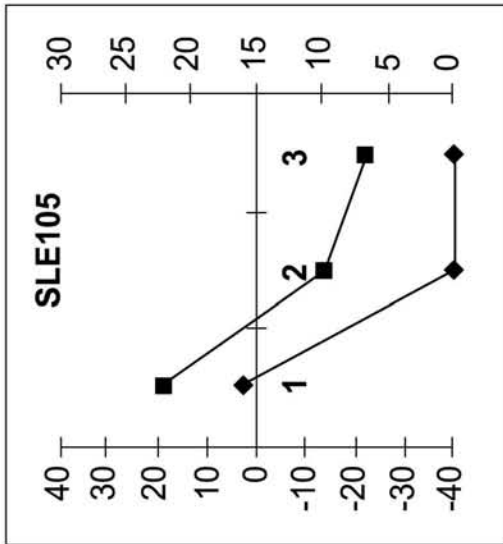


FIG. 9A-8

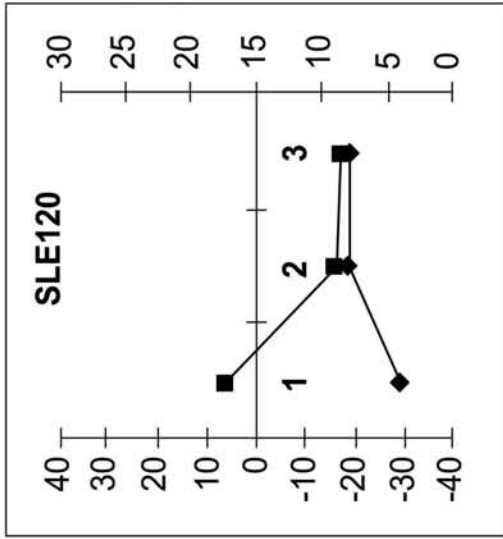


FIG. 9A-9

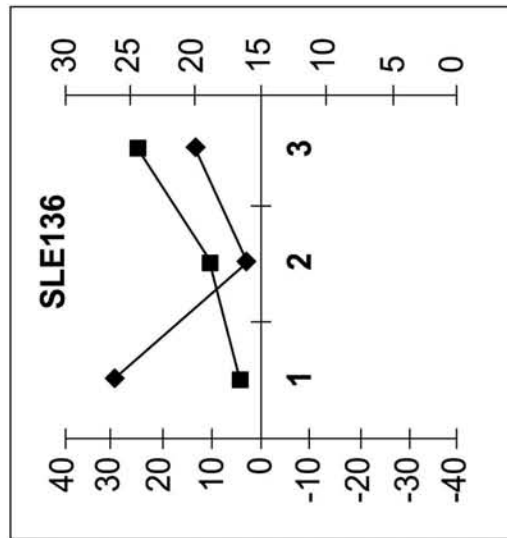


FIG. 9A-10

■ マイクロアレイスコア  
◆ SLE 疾患活性指数

【 図 9 B - 1 - 9 B - 6 】

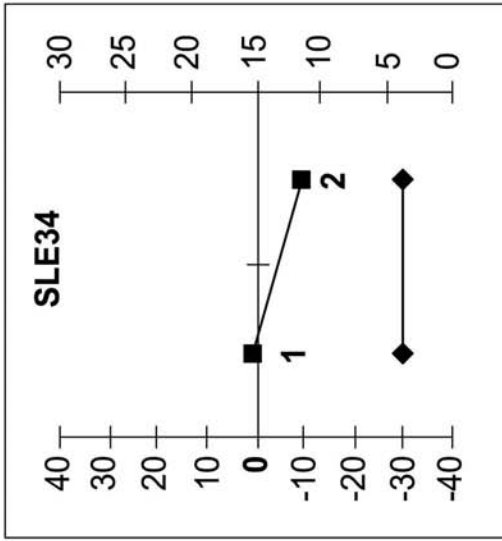


FIG. 9B-1

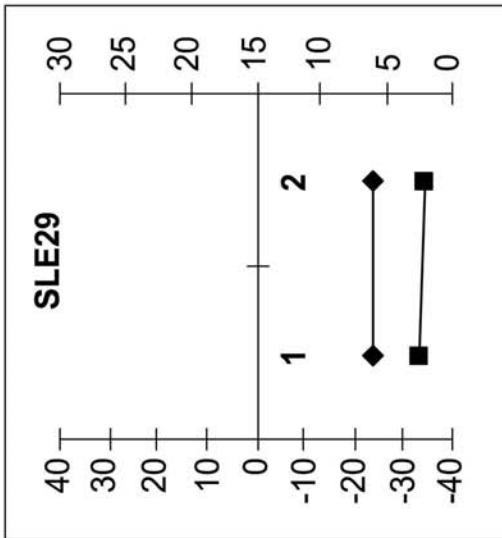


FIG. 9B-2

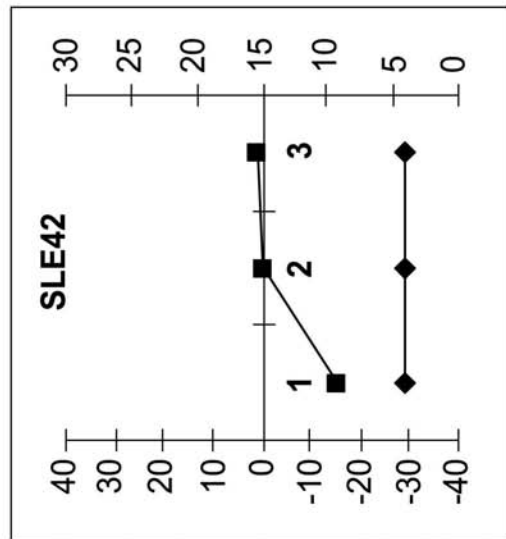


FIG. 9B-3

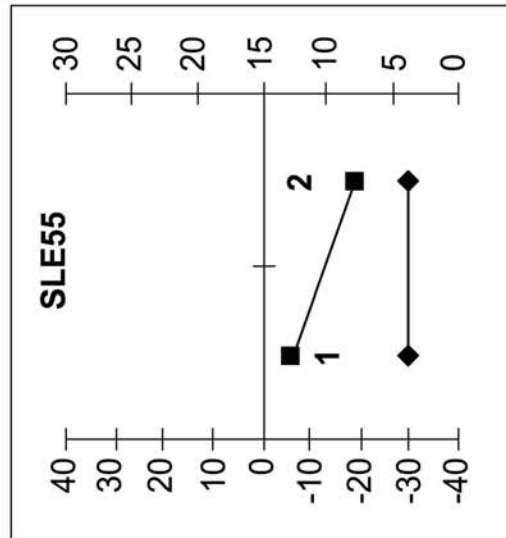


FIG. 9B-4

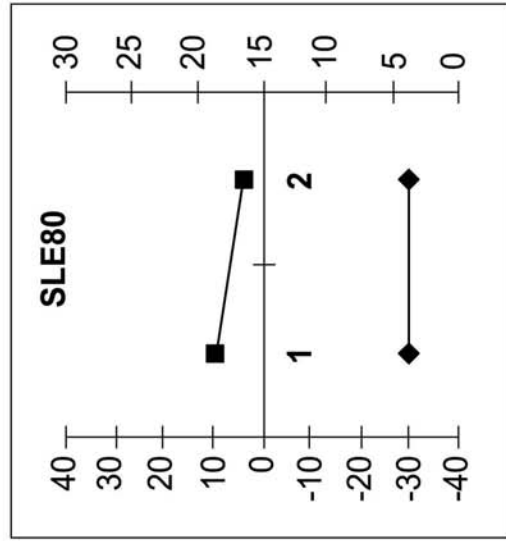


FIG. 9B-5

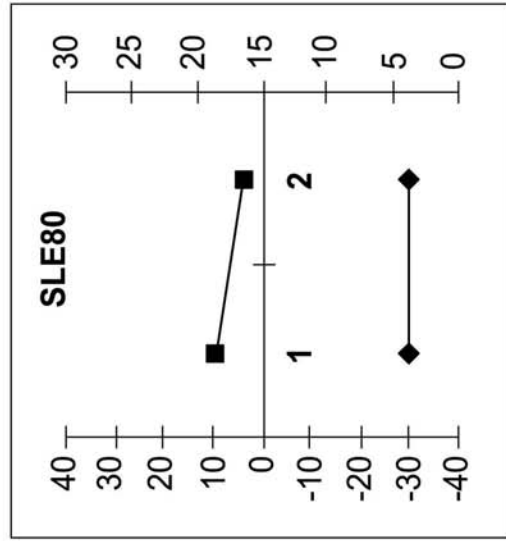


FIG. 9B-6

【 図 9 B - 7 - 9 B - 10 】

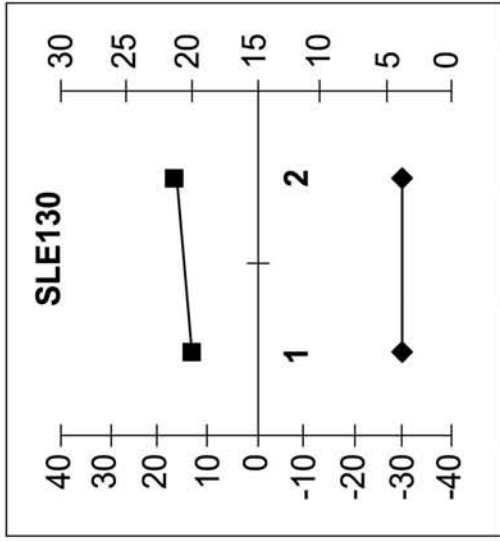


FIG. 9B-9

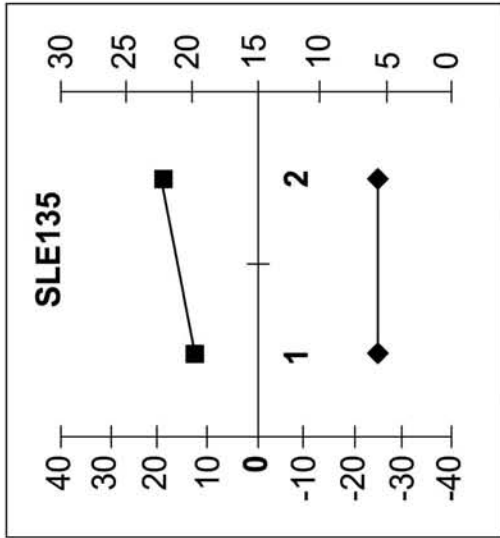


FIG. 9B-8

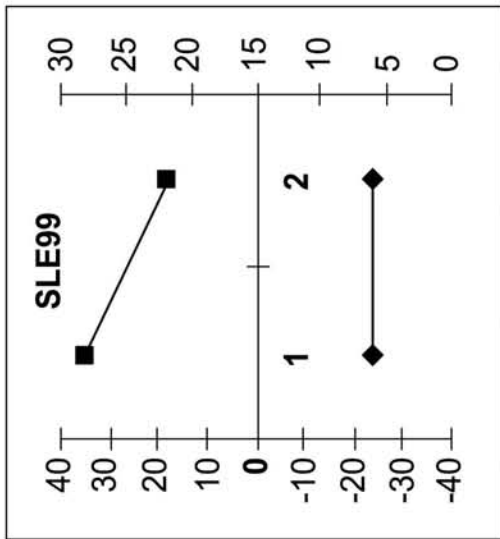


FIG. 9B-7

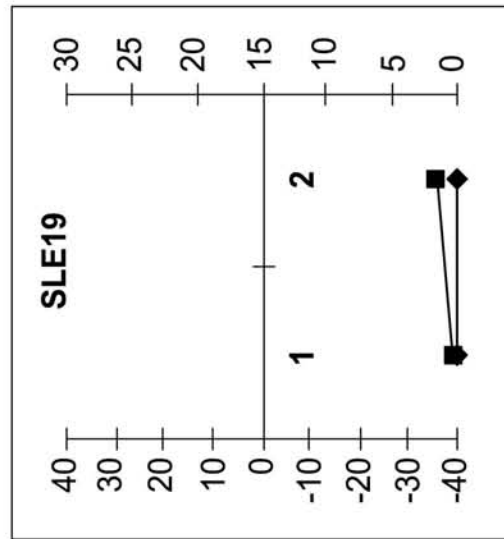


FIG. 9B-10

■ マイクロアレイスコア  
◆ SLE 疾患活性指数

【 図 1 0 A 】

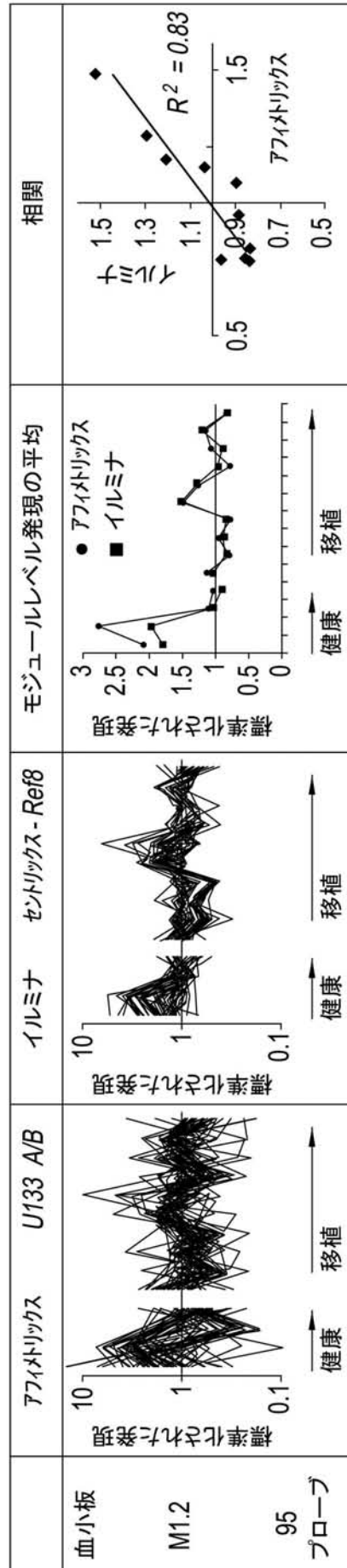


FIG. 10A

【 図 1 0 B 】

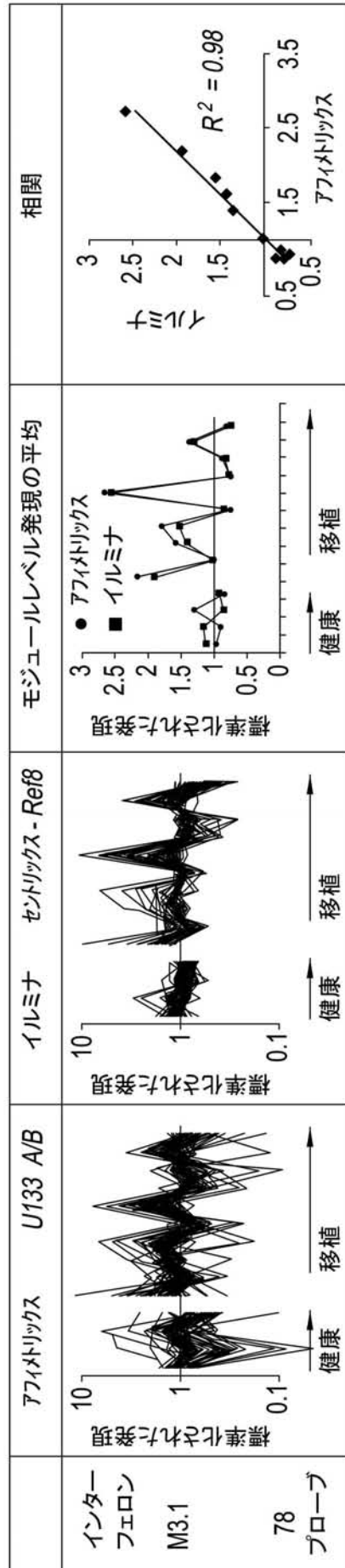


FIG. 10B

【 図 1 0 C 】

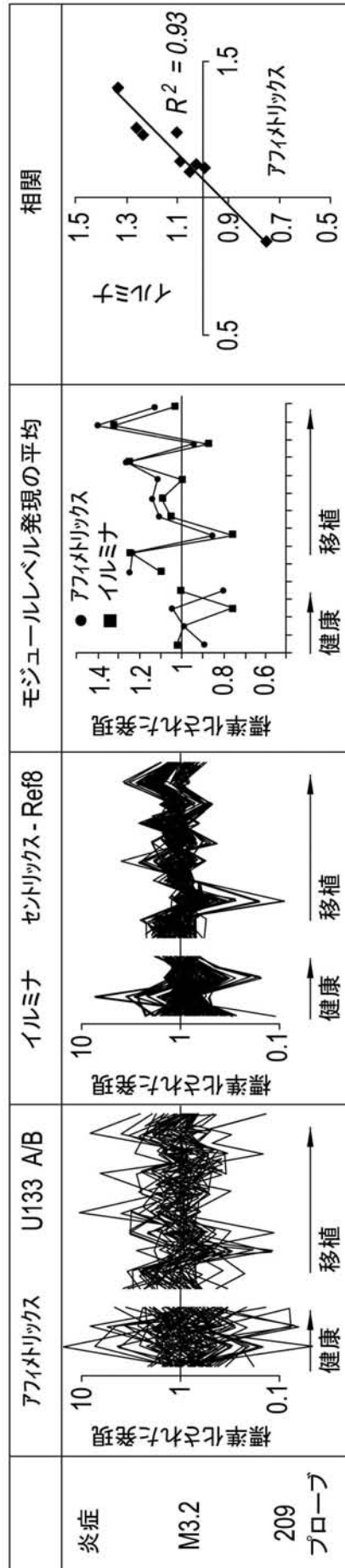


FIG. 10C

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 06/46862
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(B) - A61K 31/70; C07H 21/04 (2008.01) USPC - 514/44; 536/23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/44; 536/23.1  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) WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB), Google Scholar: lupus, SLE, microarray, leukocyte, Banchemreau, transcription modules, gene expression, expression analysis		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	BENNETT et al. Interferon and Granulopoiesis Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Blood J. Exp. Med. March 2003, 197(6):711-723; abstract, pg 712, col 1; pg 714, col 1; pg 717	1,4-5 ----- 2-3
Y	IHMELS et al. Defining transcription modules using large-scale gene expression data. Bioinformatics March 2004, 20(13):1993-2003; pg 1994, col 2; pg 1993, col 2	2-3
A	US 2004/0241726 A1 (LIEW et al.) 02 Dec 2004 (02.12.2004)	1-5
A	US 2004/0009479 A1 (WOHLGEMUTH et al.) 15 Jan 2004 (15.01.2004)	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 January 2008 (12.01.2008)		Date of mailing of the international search report <b>26 FEB 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: <b>Lee W. Young</b>  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 06/46862

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claims Nos.: 27  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
Claim 27, directed to an array of nucleic acid probes immobilized on a solid support comprising sufficient probes from one or more modules selected from Table 4, is unsearchable because it refers to Table 4 which does not exist in the present application.
  
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

\*\*\*\*\*SEE SUPPLEMENTAL SHEET\*\*\*\*\*

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
- 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.:  
Claims 1-5

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/US 06/46862

BOX III: Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet):

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-5 directed to a method for determining whether an individual has systemic lupus erythematosus (SLE) by determining a level of expression of genes that are indicative of SLE.

Group II+: Claims 6-15, directed to a method of diagnosing or monitoring an autoimmune or chronic inflammatory disease in a patient, comprising detecting the expression level of two or more gene modules that include genes selected from: immunoglobulin, neutrophils, interferon, T cells, and ribosomal proteins, wherein claim 7 is limited to genes from two or more genes modules selected from M 1.7, M 2.2, M 2.4, M 2.8, and M 3.1; wherein claim 12 is limited to genes selected from two or more modules among M 1.1, M 1.7, M 2.1, M 2.2, M 2.3, M 2.4, M 2.5, M 2.6, M 2.7, M 2.8, and M 3.1; wherein claim 13 is limited to genes selected from two or more among five listed modules. Applicant is required to select a specific combination of gene modules and genes.

Group III: Claim 16, directed to a disease analysis tool comprising one or more gene probes selected from the specified group, sufficient to distinguish between an autoimmune disease, a viral infection a bacterial infection, cancer and transplant rejection. Applicant is required to select a specific combination of gene probes.

Group IV: Claims 17-21, directed to a gene array for prognosis of SLE, wherein claim 21 is limited to the array is organized into three or more transcriptional modules comprising one or more claimed submodules. Applicant is required to select a specific combination of submodules.

Group V: Claims 22-26 and 28, directed to a method for selecting patients for a clinical trial, wherein claims 26 and 28 are limited to the modules and probes, respectively, selected from the claimed list of genes. Applicant is required to select a corresponding specific combination of the modules and probes.

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

The common technical feature of the Groups I-VI is determination of expression level of known genes associated with SLE in human. However, this is not an improvement over the prior art of US 2004/0009479 A1 (WOHLGEMUTH et al) 15 Jan 2004 (15.01.2004) that teaches methods of diagnosing or monitoring an autoimmune or chronic inflammatory disease, particularly SLE, in a patient by detecting the expression level of one or more genes (abstract). Thus, said common technical feature is known and cannot function as a novel technical feature to maintain unity of invention.

In addition, each of Groups 2-6 is directed to an unspecified number of inventions. For example, claim 13 of Group 2 is directed to genes selected from two or more among five listed modules, i.e. from 10 possible combinations of two modules chosen from five modules. In addition, first module includes one hundred (100) known genes or genes fragments. Similarly, second, third, fourth, and fifth module includes sixteen (16), ninety eight (98), seventy eight (78), one hundred nine (109), respectively, known genes or genes fragments. Thus, said genes or genes fragments cannot function as a novel technical feature to maintain unity of invention among genes and genes fragments or the first module. In order for more than one invention to be searched, the additional fees must be paid as indicated above, and the specific combination of genes desired must be specified.

---

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, IS, IT, LT, LU, LV, 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . J A V A

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB20 CC03 FA15  
4B063 QA01 QA19 QQ42 QQ52 QR32 QR56

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009518041A5</a>	公开(公告)日	2010-01-28
申请号	JP2008544530	申请日	2006-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	贝勒研究协会		
申请(专利权)人(译)	贝勒研究仪器希希士		
[标]发明人	シヨサベルダミアン バンシユロジャツクエフ		
发明人	シヨサベル,ダミアン バンシユロ,ジャツク・エフ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12M1/00 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G16B20/00 G16B25/00 G16B40/00 Y02A90/24 Y02A90/26		
FI分类号	C12Q1/68.A C12N15/00.F C12M1/00.A G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR56		
优先权	60/748884 2005-12-09 US 11/446825 2006-06-05 US		
其他公开文献	JP5670615B2 JP2009518041A		

#### 摘要(译)

本发明包括通过从一个或多个患有疾病或病症的患者获得的细胞获得个体基因表达水平来开发和使用转录模块的装置，系统和方法；记录分成簇的表中每个基因的表达值；通过以下方式迭代地选择一个或多个转录模块的基因表达值：从每个簇中选择在每种疾病或病症中匹配的基因；从分析中删除选定的基因；并且重复基因表达值选择过程，用于聚集在疾病或病症的亚分数中的基因；并迭代地重复模块的生成。