

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6931125号
(P6931125)

(45) 発行日 令和3年9月1日(2021.9.1)

(24) 登録日 令和3年8月16日(2021.8.16)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 2 0 0
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D
	G O 1 N 33/53 M

請求項の数 14 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2020-518644 (P2020-518644)	(73) 特許権者	590000248
(86) (22) 出願日	平成30年9月27日 (2018.9.27)		コーニンクレッカ フィリップス エヌ ヴェ
(65) 公表番号	特表2020-535822 (P2020-535822A)		KONINKLIJKE PHILIPS N. V.
(43) 公表日	令和2年12月10日 (2020.12.10)		オランダ国 5656 アーヘー アイン ドーフエン ハイテック キャンパス 5 2
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/076334	(74) 代理人	100107766
(87) 国際公開番号	W02019/068562		弁理士 伊東 忠重
(87) 国際公開日	平成31年4月11日 (2019.4.11)	(74) 代理人	100070150
審査請求日	令和3年1月14日 (2021.1.14)		弁理士 伊東 忠彦
(31) 優先権主張番号	17194291.5	(74) 代理人	100135079
(32) 優先日	平成29年10月2日 (2017.10.2)		弁理士 宮崎 修
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		
早期審査対象出願			
前置審査			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的遺伝子発現の数学的モデル化を使用する、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の評価

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

デジタル処理デバイスにより実施される、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための、コンピュータにより実施される方法であって、前記コンピュータにより実施される方法は、前記推測することが、

前記対象の試料中で測定される、前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルを受信するステップと、

前記対象の前記試料中の3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の転写を制御する、JAK-STAT1/2転写因子(TF)エレメントの活性レベルを決定するステップであって、前記決定するステップは、前記3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の前記発現レベルを、前記JAK-STAT1/2TFエレメントの前記活性レベルと関連付ける、較正された数学的経路モデルを査定することに基づく、前記決定するステップと、

前記対象における前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の前記活性を、前記対象の前記試料中の前記JAK-STAT1/2TFエレメントの決定された活性レベルに基づき推測するステップとを有し、

前記3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子が、BID、GNAZ、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、LGALS1、NCF4、NFAM1、OAS1、PDCD1、RAB36、RBX1、RFPL3、SAMM50、SMARCB1

、SSTR3、ST13、STAT1、TRMT1、UFD1L、USP18、及びZNR F3からなる群から、好ましくは、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、OAS1、PDCD1、ST13、STAT1、及びUSP18からなる群から選択され、

一方が、I型IFN活性に対して較正され、他方が、II型IFN活性に対して較正される、2つの較正された数学的経路モデルを使用することにより、前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の前記活性が、I型IFN活性又はII型IFN活性であると推測される、

コンピュータにより実施される方法。

【請求項2】

前記3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子が、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、OAS1、PDCD1、ST13、STAT1、及びUSP18からなる群から選択される、6つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子を含む、請求項1に記載のコンピュータにより実施される方法。

10

【請求項3】

前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路が前記対象において異常に作動しているのかどうかを、前記対象における前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づき決定するステップ

をさらに有する、請求項1又は2に記載のコンピュータにより実施される方法。

【請求項4】

前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の前記異常な作動を是正する薬物を、前記対象に処方することを推奨するステップをさらに有し、

20

前記推奨するステップは、前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路が、前記対象において異常に作動すると、前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された前記活性に基づき決定される場合に実施される、請求項3に記載のコンピュータにより実施される方法。

【請求項5】

前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の前記異常な作動が、前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路が前記対象において腫瘍プロモーターとして作動する作動である、請求項3又は4に記載のコンピュータにより実施される方法。

【請求項6】

30

前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づき、腫瘍抗原免疫療法に対する前記対象の応答を予測するステップをさらに有する、請求項1から5のいずれか一項に記載のコンピュータにより実施される方法。

【請求項7】

以下の活性：

前記対象における前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された前記活性に基づく薬物処方；

前記対象における前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された前記活性に基づく薬物有効性の予測；

前記対象における前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された前記活性に基づく有害作用の予測；

40

薬物有効性のモニタリング；

薬物の開発；

アッセイの開発；

経路の探索；

がんの病期分類；

前記対象における前記JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された前記活性に基づく臨床試験における前記対象の登録；

実施される後続の試験の選択；及び

コンパニオン診断試験の選択

50

のうちの少なくとも1つにおいて使用される、請求項1から6のいずれか一項に記載のコンピュータにより実施される方法。

【請求項8】

較正された前記数学的経路モデルが、前記 J A K - S T A T 1 / 2 T F エLEMENTの前記活性レベルと、前記3つ若しくはこれを超える J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子の前記発現レベルとを関連付ける条件付き確率に基づく確率モデル、好ましくは、ベイジアンネットワークモデルであるか、又は前記数学的経路モデルが、前記3つ若しくはこれを超える J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子の前記発現レベルの1つ若しくは複数の線形結合に基づく、請求項1から7のいずれか一項に記載のコンピュータにより実施される方法。

10

【請求項9】

対象における J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための非一時的記憶媒体であって、前記非一時的記憶媒体は、請求項1から8のいずれか一項に記載のコンピュータにより実施される方法を実施するための、デジタル処理デバイスにより実行可能な命令を保存する、非一時的記憶媒体。

【請求項10】

対象における J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の活性を推測するためのコンピュータプログラムであって、前記コンピュータプログラムは、前記コンピュータプログラムがデジタル処理デバイス上で実行される場合に、前記デジタル処理デバイスに、請求項1から8のいずれか一項に記載のコンピュータにより実施される方法を実施させるためのプログラムコード手段を含む、コンピュータプログラム。

20

【請求項11】

対象の試料中の前記 J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルを測定するためのキットであって、前記キットは、

前記3つ又はこれを超える J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子を対象とするポリメラーゼ連鎖反応用のプライマーと、

前記3つ又はこれを超える J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子を対象とするプローブと、

請求項9に記載の非一時的記憶媒体、又は請求項10に記載のコンピュータプログラムと、を含み、

30

前記3つ又はこれを超える J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子が、B I D、G N A Z、I R F 1、I R F 7、I R F 8、I R F 9、L G A L S 1、N C F 4、N F A M 1、O A S 1、P D C D 1、R A B 3 6、R B X 1、R F P L 3、S A M M 5 0、S M A R C B 1、S S T R 3、S T 1 3、S T A T 1、T R M T 1、U F D 1 L、U S P 1 8、及び Z N R F 3 からなる群から、好ましくは、I R F 1、I R F 7、I R F 8、I R F 9、O A S 1、P D C D 1、S T 1 3、S T A T 1、及び U S P 1 8 からなる群から選択される、キット。

【請求項12】

対象における J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の活性を推測するためのキットであって、前記キットは、

40

前記対象の試料中の前記 J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルを決定するための1つ又は複数の構成要素と、

請求項9に記載の非一時的記憶媒体、又は請求項10に記載のコンピュータプログラムとを含み、

前記1つ又は複数の構成要素が、好ましくは、DNAアレイチップ、オリゴヌクレオチドアレイチップ、タンパク質アレイチップ、抗体、複数のプローブ、例えば、標識されたプローブ、RNA逆転写酵素シーケンシング構成要素のセット、及び/又はcDNA、増幅プライマーを含む、RNA若しくはDNAからなる群から選択され、

ここで、前記3つ又はこれを超える J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子が、B I D、G

50

NAZ、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、LGALS1、NCF4、NFAM1、OAS1、PDCD1、RAB36、RBX1、RFPL3、SAMM50、SMARCB1、SSTR3、ST13、STAT1、TRMT1、UFD1L、USP18、及びZNRF3からなる群から、好ましくは、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、OAS1、PDCD1、ST13、STAT1、及びUSP18からなる群から選択される、キット。

【請求項13】

前記3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子が、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、OAS1、PDCD1、ST13、STAT1、及びUSP18からなる群から選択される、6つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子を含む、請求項11又は12に記載のキット。

10

【請求項14】

請求項1から8のいずれか一項に記載のコンピュータにより実施される方法の実施における、請求項11から13のいずれか一項に記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般に、バイオインフォマティクス、ゲノムデータ処理、プロテオームデータ処理、及び関連技術の分野に関する。より詳細には、本発明は、デジタル処理デバイスにより実施される、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための、コンピュータにより実施される方法であって、コンピュータにより実施される方法は、推測することが、対象の試料中で測定されるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルに基づく、コンピュータにより実施される方法に関する。本発明は、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための装置であって、装置は、方法を実施するように構成されたデジタルプロセッサを含む装置、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための非一時的記憶媒体であって、非一時的記憶媒体は、方法を実施するための、デジタル処理デバイスにより実行可能な命令を保存する非一時的記憶媒体、及び対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するためのコンピュータプログラムであって、コンピュータプログラムは、コンピュータプログラムがデジタル処理デバイス上で実行される場合に、デジタル処理デバイスに、方法を実施させるためのプログラムコード手段を含むコンピュータプログラムにさらに関する。本発明は、対象の試料中のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルを測定するためのキット、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するためのキット、及び方法の実施におけるキットの使用にさらに関する。

20

30

【背景技術】

【0002】

ゲノム解析及びプロテオーム解析は、多様ながんが、がんの増殖及び進化、例えば、細胞の増殖及び転移において役割を果たす、特異的な遺伝子について、ゲノム突然変異/変異の特異的な組合せ、及び/又は高度若しくは低度の発現レベルと関連することが知られている腫瘍学など医療分野における臨床適用にとって相当に実現され、潜在的な可能性を有する。

40

【0003】

STAT1及びSTAT2とは、免疫応答及びがんに関与する多くの遺伝子の発現を調節する、誘導型転写因子である。JAK-STAT1/2経路は、免疫系が直面する、多様な課題であって、多様な課題は、感染への抵抗から、免疫寛容の維持、障壁機能の強化、及びがんに対する防御に至る、多様な課題に関与する、鍵となるシグナル伝達経路である。IFNなどの異なる刺激は、JAK-STAT1/2経路が、潜在的な、細胞質ゾル

50

STAT単量体をリン酸化することを誘発して、それらが、STAT1ホモ二量体及びSTAT1/2ヘテロ二量体を形成し、これが、特異的なDNA標的部に結合し、遺伝子の転写を調節することを可能とする。I型インターフェロンが、典型的に、転写因子としてのSTAT1/2ヘテロ二量体を活性化させるのに対し、II型インターフェロンは、主に、STAT1/1ホモ二量体を活性化させる。両方の転写因子複合体は、それぞれ、ISRE及びGASと称する、個別に規定された応答エレメントを介して、標的遺伝子の転写を活性化させる(また、Platanias L.C.、「Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling」、Nature Reviews Immunology、5巻、2015年5月、375~386頁に基づく、図1も参照されたい)。この理由で、それらの標的遺伝子は、一般に、重複する可能性が高く、どの標的遺伝子が、転写複合体のうち的一方又は他方に特異的であるのかが完全に明らかでないが、STAT1/2による転写と、STAT1/1による転写を識別しうるモデルを有することが好ましい。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

例えば、ターゲティングされた薬物処置の正しい選択を可能とするために、がんにおけるJAK-STAT1/2シグナル伝達に関して、JAK-STAT1/2シグナル伝達活性の異常を検出できることが重要である。現在、抗JAK-STAT1/2療法が開発されつつある(Liu B.ら、「Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1」、Cell Biology、95巻、1998年9月、10626~10631頁を参照されたい)。しかし現在、その活性の状態において、例えば、その不活性状態と比較して、腫瘍促進性である可能性が高いことを指し示す、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の機能状態及び活性のそれぞれについて評価するのに利用可能な臨床アッセイは存在しない。したがって、がん、例えば、乳がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、卵巣がん、膵臓がん、若しくは前立腺がん、又は免疫障害などの疾患であって、異常なJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性により、少なくとも部分的に駆動され、したがって、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の阻害剤に反応する可能性が高い疾患を有する患者を特徴付ける可能性を改善することが可能であることが所望される。

20

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の主要な態様に従い、上記の問題は、デジタル処理デバイスにより実施される、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための、コンピュータにより実施される方法であって、コンピュータにより実施される方法は、推測することが、

対象の試料中で測定される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える、例えば、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルを受信するステップと、

40

対象の試料中の3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の転写を制御する、JAK-STAT1/2転写因子(TF)エレメントの活性レベルを決定するステップであって、決定するステップは、3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の発現レベルを、JAK-STAT1/2 TFエレメントの活性レベルと関連付ける較正された数学的経路モデルを査定することに基づく、決定するステップと、

対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を、対象の試料中のJAK-STAT1/2 TFエレメントの決定された活性レベルに基づき推測するステップと

を有し、

3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子が、BID、GNAZ、IR

50

F 1、IRF 7、IRF 8、IRF 9、LGALS 1、NCF 4、NFAM 1、OAS 1、PDCD 1、RAB 3 6、RBX 1、RFPL 3、SAMM 5 0、SMARCB 1、STR 3、ST 1 3、STAT 1、TRMT 1、UFD 1 L、USP 1 8、及びZNR 3 からなる群から、好ましくは、IRF 1、IRF 7、IRF 8、IRF 9、OAS 1、PDCD 1、ST 1 3、STAT 1、及びUSP 1 8 からなる群から選択される、コンピュータにより実施される方法により解決される。

【0006】

本明細書に、TFエレメントの「活性レベル」とは、その標的遺伝子の転写に関する、TFエレメントの活性のレベルを表示する。

【0007】

本発明は、JAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路内で生じる作用を同定する、適切な方式は、(他にもまして)JAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路により制御される、JAK-STAT 1/2転写因子(TF)エレメントにより制御される、標的遺伝子の転写である、JAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路シグナル伝達出力の測定に基づきうるという、本発明者らによる、新しい考え方に基づく。本発明者らによる、この新しい考え方は、TF活性レベルが、試料では、準定常状態にあり、これは、(他にもまして)JAK-STAT 1/2標的遺伝子の発現値により検出されうることを仮定する。本明細書で標的とされるJAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路は、増殖、分化、及び創傷の治癒など、ヒトの、多くの細胞型において、多くの機能を制御することが知られている。がん(例えば、乳がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、卵巣がん、膵臓がん、又は前立腺がん)などの病理学的障害に関して、異常なJAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達活性は、重要な役割を果たしており、これは標的遺伝子の発現プロファイル内で検出可能であり、したがって、較正された数学的経路モデルの手段として利用される。

【0008】

本発明は、(i)対象の試料中の、JAK-STAT 1/2 TFエレメントの活性レベルを決定するステップであって、決定するステップは、その転写が、JAK-STAT 1/2 TFエレメントにより制御される、JAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルを、JAK-STAT 1/2 TFエレメントの活性レベルと関連付ける、較正された数学的モデルを査定することに基づく、決定するステップと、(ii)対象におけるJAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路の活性を、対象の試料中のJAK-STAT 1/2 TFエレメントの決定された活性レベルに基づき推測するステップとにより、対象におけるJAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路の活性を決定することを可能とする。これは、がん、例えば、乳がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、卵巣がん、膵臓がん、又は前立腺がんなどの疾患であって、異常なJAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路の活性により、少なくとも部分的に駆動され、したがって、JAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路の阻害剤に応答する可能性が高い疾患を有する患者を特徴付ける可能性の改善を可能とすることが好ましい。特定の実施形態では、処置の決定は、特異的なJAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路活性に基づきうる。特定の実施形態では、JAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達状態は、JAK-STAT 1/2細胞シグナル伝達経路が活性であるオッズのカットオフ値、例えば、10:1、5:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:4、1:5、又は1:10に設定することができる。

【0009】

本明細書では、「JAK-STAT 1/2転写因子エレメント」又は「JAK-STAT 1/2 TFエレメント」又は「TFエレメント」という用語は、特異的なDNA配列、好ましくは、それぞれ、ISRE(結合モチーフAGTTTCNNTTCNC/T)応答エレメント又はGAS(結合モチーフTTC/ANNNG/TAA)応答エレメントに結合し、これにより、標的遺伝子の転写を制御することが可能である、少なくとも、STAT 1-STAT 2ヘテロ二量体又はSTAT 1ホモ二量体を含有するタンパク質複合体であると規定される。好ましくは、用語は、下流のシグナル伝達を結果としてもたらす、

10

20

30

40

50

刺激リガンドの、その受容体への結合により誘発される、I F Nなど、異なる刺激により形成される、タンパク質又はタンパク質複合体である転写因子を指す。

【0010】

較正された数学的経路モデルは、J A K - S T A T 1 / 2 T Fエレメントの活性レベルと、3つ若しくはこれを超えるJ A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子の発現レベルとを関連付ける条件付き確率に基づく確率モデル、好ましくは、ベイジアンネットワークモデルであってもよく、又は3つ若しくはこれを超えるJ A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子の発現レベルの1つ若しくは複数の線形結合に基づいてもよい。特に、J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の活性の推測は、その内容が、それらの全体において本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第W O 2 0 1 3 / 0 1 1 4 7 9 A 2号(「標的遺伝子発現の確率モデル化を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)において開示される通りに、又は国際特許出願公開第W O 2 0 1 4 / 1 0 2 6 6 8 A 2号(「標的遺伝子発現の線形結合を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)において記載される通りに実施される。標的遺伝子発現の数学的モデル化を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の推測に関するさらなる詳細は、Verhaegh W.ら、「Selection of personalized patient therapy through the use of knowledge-based computational models that identify tumor-driving signal transduction pathways」、Cancer Research、74巻、11号、2014年、2936~2945頁において見出されうる。

10

20

【0011】

本明細書で使用される「対象」という用語は、任意の生物を指す。一部の実施形態では、対象は、動物、好ましくは、哺乳動物である。ある特定の実施形態では、対象は、ヒト対象、好ましくは、医学的对象である。さらに他の実施形態では、対象は、細胞系である。

【0012】

本明細書で使用される「標的遺伝子」という用語は、その転写が、J A K - S T A T 1 / 2 転写因子エレメントにより、直接的に、又は間接的に制御される遺伝子を意味する。「標的遺伝子」は、「直接的標的遺伝子」及び/又は「間接的標的遺伝子」(本明細書で記載される)である。さらに、「標的遺伝子」は、「直接的標的遺伝子」及び/又は「間接的標的遺伝子」(本明細書で記載される)である。

30

【0013】

特に適するJ A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子については、以下の本文の節のほか、下記の例(例えば、下記の表1及び表2を参照されたい)においても記載される。

【0014】

したがって、好ましい実施形態に従い、J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子は、下記の表1又は表2に列挙されるJ A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子からなる群から選択される。

【0015】

本発明者らにより、短いリストの中のJ A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子が、J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の活性を決定するための強力な証拠となることが見出されている。

40

【0016】

本発明の別の態様は、一方が、I型I F N活性に対して較正され、他方が、II型I F N活性に対して較正される、2つの較正された数学的経路モデルを使用することにより、J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の活性が、I型I F N活性又はII型I F N活性であると推測される方法(本明細書で記載される)に関する。推測するステップは、好ましくは、決定された活性レベルの比較を含む。例えば、J A K - S T A T 1 / 2 I型I F Nモデルが、活性経路を報告し、かつ、J A K - S T A T 1 / 2 II型I F Nモデルが、活性レベルを報告しないか、又はJ A K - S T A T 1 / 2 I型I F Nモデル

50

より低度の活性レベルを報告する場合、試料は、I型IFN活性化JAK-STAT1/2であると結論づけられる。他方、JAK-STAT1/2 II型IFNモデルが、活性経路を報告し、かつ、JAK-STAT1/2 I型IFNモデルが、活性レベルを報告しないか、又は低度の活性レベルを報告する場合、II型IFN活性化JAK-STAT1/2を結論づけることができる。代替的に、両方のモデルの間の活性レベルの差を計算することもでき、差が正であるのか、負であるのかを決定する代わりに、差を、ゼロ以外の閾値と比較することもできる。

【0017】

本発明の別の態様は、

JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路が対象において異常に作動しているのかどうかを、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づき決定するステップ

をさらに有する方法（本明細書に記載される）に関する。

【0018】

本発明はまた、

JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の異常な作動を是正する薬物を、対象に処方することを推奨するステップ

をさらに有し、

推奨するステップは、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路が、対象において異常に作動すると、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づき決定される場合に実施される、方法（本明細書に記載される）にも関する。

【0019】

「細胞シグナル伝達経路は、作動が異常である」という語句は、経路の「活性」が、予期される通りではない場合を指し、この場合、「活性」という用語は、標的遺伝子を発現へと駆動するときの、転写因子複合体の活性、すなわち、標的遺伝子が転写される速度を指す。「正常」とは、不活性であることが予期される組織内で不活性であり、活性であることが予期される組織内で活性である場合である。さらに、「正常」と考えられる、ある特定のレベルの活性が存在し、これより高いか、又は低い、何らかのレベルは、「異常」と考えられる。

【0020】

本発明はまた、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の異常な作動が、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路が対象において腫瘍プロモーターとして作動する作動である方法（本明細書に記載される）にも関する。

【0021】

本発明の別の態様は、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づき、腫瘍抗原免疫療法に対する対象の応答を予測するステップをさらに有する方法（本明細書に記載される）に関する。

【0022】

本発明に従い使用される試料は、抽出された試料、すなわち、対象から抽出された試料でありうる。試料の例は、対象の組織、細胞、血液、及び/又は体液を含むがこれらに限定されない。対象が、がんを有するか、又はがんを有する可能性がある医学的对象である場合、試料は、例えば、好ましくは、生検手順又は他の試料抽出手順を介して、がん病変、又はがんが疑われる病変、又は転移性腫瘍、又は体液が存在する体腔であって、がん細胞で汚染された体腔（例えば、胸腔又は腹腔又は膀胱腔）、又はがん細胞を含有する他の体液などから得られた試料でありうる。試料が抽出される細胞はまた、血液悪性腫瘍（白血病又はリンパ腫など）に由来する腫瘍細胞でもある。場合によって、細胞試料はまた、循環腫瘍細胞、すなわち、血流に入り、適切な単離技法、例えば、アフエレーシス又は従来の静脈の血採取法を使用して抽出される腫瘍細胞でもある。血液以外に、試料が抽出される体液は、尿、消化管内容物、又は滲出物である。本明細書で使用される「試料」という用語はまた、例えば、対象の組織及び/又は細胞及び/又は体液が、対象から採取され

10

20

30

40

50

、例えば、顕微鏡のスライドガラス上に置かれ、特許請求される方法を実施するために、この試料の一部が、例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション（LCM）により、又はスライドガラスから、関心のある細胞を削ぎ落とすことにより、又は蛍光活性化細胞分取技法により抽出される場合も包摂する。加えて、本明細書で使用される「試料」という用語はまた、例えば、対象の組織及び／又は細胞及び／又は体液が、対象から採取され、顕微鏡のスライドガラス上に置かれ、特許請求される方法が、スライドガラス上で実施される場合も包摂する。

【0023】

開示される別の態様に従い、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための装置は、本明細書に記載される、本発明の方法を実施するように構成されたデジタルプロセッサを含む。

10

【0024】

開示される別の態様に従い、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための非一時的記憶媒体は、本明細書に記載される、本発明の方法を実施するための、デジタル処理デバイスにより実行可能な命令を保存する。非一時的記憶媒体は、ハードドライブ若しくは他の磁気記憶媒体、光学ディスク若しくは他の光学記憶媒体、ランダムアクセスメモリ（RAM）、リードオンリーメモリ（ROM）、フラッシュメモリなどのコンピュータ-読取り型記憶媒体、又は他の電子記憶媒体、ネットワークサーバーなどである。デジタル処理デバイスは、携帯型デバイス（例えば、パーソナルデータアシスタント又はスマートフォン）、ノート型コンピュータ、デスクトップ型コンピュータ、タブレット型コンピュータ又はタブレット型デバイス、リモートネットワークサーバーなどである。

20

【0025】

開示される別の態様に従い、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するためのコンピュータプログラムは、コンピュータプログラムが、デジタル処理デバイス上で実行される場合に、デジタル処理デバイスに、本明細書に記載される、本発明の方法を実施させるためのプログラムコード手段を含む。デジタル処理デバイスは、携帯型デバイス（例えば、パーソナルデータアシスタント又はスマートフォン）、ノート型コンピュータ、デスクトップ型コンピュータ、タブレット型コンピュータ又はタブレット型デバイス、リモートネットワークサーバーなどでありえる。

30

【0026】

開示される別の態様に従い、対象の試料中のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える、例えば、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルを測定するためのキットは、

対象の試料中の3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の発現レベルを決定するための1つ又は複数の構成要素を含み、

3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子は、BID、GNAZ、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、LGALS1、NCF4、NFAM1、OAS1、PDCD1、RAB36、RBX1、RFPL3、SAMM50、SMARCB1、SSTR3、ST13、STAT1、TRMT1、UFD1L、USP18、及びZNRF3からなる群から、好ましくは、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、OAS1、PDCD1、ST13、STAT1、及びUSP18からなる群から選択される。

40

【0027】

3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の発現レベルを測定するための1つ又は複数の構成要素又は手段は、DNAアレイチップ、オリゴヌクレオチドアレイチップ、タンパク質アレイチップ、抗体、複数のプローブ、例えば、標識されたプローブ、RNA逆転写酵素シーケンシング構成要素のセット、及び／又はcDNA、増幅プライマーを含む、RNA若しくはDNAからなる群から選択されうる。ある実施形態では、キットは、本明細書に記載される、3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝

50

子の、mRNA配列又はcDNA配列の部分を対象とする標識されたプローブのセットを含む。ある実施形態では、キットは、3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の、mRNA配列又はcDNA配列の部分を対象とするプライマー及びプローブのセットを含む。ある実施形態では、標識されたプローブは、標準化された96ウェルプレート内に含有される。ある実施形態では、キットは、基準遺伝子のセットを対象とするプライマー又はプローブをさらに含む。このような基準遺伝子は、例えば、本明細書に記載される、標的遺伝子発現レベルの正規化又は標準化に有用な、構成的に発現させた遺伝子でありうる。

【0028】

ある実施形態では、対象の試料中のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える、例えば、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルを測定するためのキットは、

3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子を対象とするポリメラーゼ連鎖反応プライマーと、

3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子を対象とするプローブとを含み、

3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子は、BID、GNAZ、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、LGALS1、NCF4、NFAM1、OAS1、PDCD1、RAB36、RBX1、RFPL3、SAMM50、SMARCB1、STR3、ST13、STAT1、TRMT1、UFD1L、USP18、及びZNR3からなる群から、好ましくは、IRF1、IRF7、IRF8、IRF9、OAS1、PDCD1、ST13、STAT1、及びUSP18からなる群から選択される。

【0029】

開示される別の態様に従い、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するためのキットは、

本明細書に記載される、本発明のキットと、

本明細書に記載される、本発明の装置、本明細書に記載される、本発明の非一時的記憶媒体、又は本明細書に記載される、本発明のコンピュータプログラムとを含む。

【0030】

開示される別の態様に従い、本明細書に記載される、本発明のキットは、本明細書に記載される、本発明の方法の実施において使用される。

【0031】

本明細書に記載される本発明は、例えば、以下の活性：

対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づく診断；

対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づく予後診断；

対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づく薬物処方；

対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づく薬物有効性の予測；

対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づく有害作用の予測；

薬物有効性のモニタリング；

薬物の開発；

アッセイの開発；

経路の探索；

がんの病期分類；

対象における、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づく

10

20

30

40

50

く臨床試験における対象の登録；
実施される後続の試験の選択；及び
コンパニオン診断試験の選択

のうちの少なくとも1つにおいてもまた、有利に使用されうる。

【0032】

さらなる利点は、添付の図面、以下の記載を読み、これらを理解すれば、特に、本明細書の下記に提示される詳細な例を読めば、当業者に明らかであろう。

【0033】

請求項1に記載の方法、請求項9に記載の装置、請求項10に記載の非一時的記憶媒体、請求項11に記載のコンピュータプログラム、請求項12から14のいずれか一項に記載のキット、及び請求項15に記載のキットの使用は、特に、従属請求項において規定される通り、類似の好ましい実施形態及び/又は同一の好ましい実施形態を有することを理解されたい。

10

【0034】

本発明の好ましい実施形態はまた、従属請求項又は上記の実施形態の、それぞれの独立請求項との任意の組合せでもありうることを理解されたい。

【0035】

本発明のこれらの態様及び他の態様は、本明細書の後出で記載される実施形態から明らかであり、これらを参照することにより解明されるであろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0036】

【図1】JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路を、概略的、かつ、例示的に示す図である。IFNなどの異なる刺激は、JAK-STAT1/2経路が、潜在的な、細胞質ゾルSTAT単量体をリン酸化することを誘発して、それらが、STAT1ホモ二量体及びSTAT1/2ヘテロ二量体を形成し、これが、特異的なDNA標的部に結合し、遺伝子の転写を調節することを可能とする。I型インターフェロンが、典型的に、転写因子としてのSTAT1/2ヘテロ二量体を活性化させるのに対し、II型インターフェロンは、主に、STAT1/1ホモ二量体を活性化させる。両方の転写因子複合体は、それぞれ、ISRE及びGASと称する、個別に規定された応答エレメントを介して、標的遺伝子の転写を活性化させる(また、Platanias L.C., 「Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling」、Nature Reviews Immunology、5巻、2015年5月、375~386頁に基づく、図1も参照されたい)。

30

【図2】本明細書では、ベイジアンネットワークモデルである、数学的モデルであって、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の転写プログラムをモデル化するのに使用される数学的モデルを、概略的、かつ、例示的に示す図である。

【図3】対象の試料中で測定される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の標的遺伝子の発現レベルに基づき、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための工程を例示的に図解するためのフローチャートを示す図である。

40

【図4】本明細書で記載される、較正された数学的経路モデルを得るための工程を例示的に図解するためのフローチャートを示す図である。

【図5】本明細書で記載される、対象の試料中の、JAK-STAT1/2転写因子(TF)エレメントの活性レベルを決定するための工程を例示的に図解するためのフローチャートを示す図である。

【図6】離散可観測量を使用して、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための工程を例示的に図解するためのフローチャートを示す図である。

【図7】連続可観測量を使用して、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための工程を例示的に図解するためのフローチャートを示す図で

50

ある。

【図8】JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の標的遺伝子についてのRT-qPCR解析から、Cq値を決定するための工程を例示的に図解するためのフローチャートを示す図である。

【図9】データセットであるGSE38351による、11例の健常ドナーに由来する、血中単球について公開されている発現データセットを使用する、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)、及び本明細書で記載される方法に基づく、ベイジアンネットワークモデルの、I型IFNについての較正結果を示す図である。

【図10】データセットであるGSE38351による、11例の健常ドナーに由来する、血中単球について公開されている発現データセットを使用する、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)、及び本明細書で記載される方法に基づく、ベイジアンネットワークモデルの、II型IFNについての較正結果を示す図である。

【図11】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す図である。

【図12】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す図である。

【図13】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す図である。

【図14】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す図である。

【図15】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す図である。

【図16】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す図である。

【図17】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す図である。

【図18】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す図である。

【図19】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデル、及び表2による、9つの標的遺伝子についてのショートリストを使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルのそれぞれの

10

20

30

40

50

間の相関を示す図である。

【図20】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベジアンネットワークモデル、及び表2による、9つの標的遺伝子についてのショートリストを使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベジアンネットワークモデルのそれぞれの間の相関を示す図である。

【図21】表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なベジアンネットワークモデルについての、さらなるバリデーション結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

以下の例は、特に、好ましい方法、及びこれに関連する、選択された態様を例示するだけのものである。例においてもたらされる教示は、例えば、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の異常な活性を検出、予測、及び/又は診断するためのいくつかの試験及び/又はキットの構築に使用される。さらに、本明細書に記載される方法を使用すると、薬物処方を、有利に誘導することができ、薬物応答の予測及び薬物の有効性(及び/又は有害作用)のモニタリングを行うことができ、薬物耐性を予測及びモニタリングして、例えば、(コンパニオン診断試験のような)実施される後続の試験を選択することができる。以下の例は、本発明の範囲を限定するものとは見なさないものとする。

【0038】

[実施例1]

数学的モデルの構築

国際特許出願公開第WO2013/011479A2号(「標的遺伝子発現の確率モデル化を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)において、詳細に記載されている通り、確率モデル、例えば、ベジアンネットワークモデルを構築し、本明細書では、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路である細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルと、本明細書では、細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の転写を制御するTFエレメントであるJAK-STAT1/2TFエレメントである転写因子(TF)エレメントの活性レベルとの間に、条件付き確率関係を組み込むことにより、このようなモデルを使用して、細胞シグナル伝達経路の活性を、高精度で決定することができる。さらに、確率モデルは、条件付き確率を補正し、かつ/又はさらなる情報源を表すように、新たなノードを、モデルへと付加することにより、その後の臨床研究により得られる、さらなる知見を組み込むように、たやすく更新することができる。このようにして、確率モデルは、最新の医学的知見を具体化するために、適宜更新されうる。

【0039】

国際特許出願公開第WO2014/102668A2号(「標的遺伝子発現の線形結合を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)において、詳細に記載されている、理解及び解釈が容易な、別の手法では、本明細書では、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路である、細胞シグナル伝達経路の活性は、細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルと、本明細書では、細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の転写を制御するTFエレメントである、JAK-STAT1/2TFエレメントである転写因子(TF)エレメントのレベルとの間の関係を組み込むことで、線形モデル又は(疑似)線形モデルを構築及び査定することにより、決定することができる、この線形モデルは、3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルの1つ又は複数の線形結合に基づく。

【0040】

いずれの手法でも、3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルは、好ましくは、例えば、標的遺伝子のmRNA配列と関連するプローブを使用する、(RT)PCR技法及びマイクロアレイ技法、並びにRNAシーケンシングの結果でありうる、mRNAレベル

10

20

30

40

50

の測定値である。別の実施形態では、3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルは、タンパク質レベル、例えば、標的遺伝子によりコードされるタンパク質の濃度及び/又は活性により測定することもできる。

【0041】

前述の発現レベルは、任意選択で、適用によく適合する場合もあり、よく適合しない場合もある、多くの方式で転換される。例えば、発現レベル、例えば、マイクロアレイベースのmRNAレベルの、4つの異なる変換は、

「連続データ」、すなわち、MAS5、0及びfRMAなど、よく知られているアルゴリズムを使用して、マイクロアレイの前処理の後で得られる発現レベル、

「zスコア」、すなわち、全ての試料にわたる平均が0であり、標準偏差が1であるようにスケールされた、連続発現レベル、

「離散」、すなわち、ある特定の閾値を上回る、あらゆる発現を1とし、これを下回る値を0とする(例えば、プローブセットについての閾値は、多数の陽性臨床試料、及び同じ数の陰性臨床試料のセット内のその値の(重み付け)中央値として選び出される)、

「ファジー」、すなわち、以下のフォーマット： $1 / (1 + \exp(-(thr - expr) / se))$ のシグモイド関数を使用して、連続発現レベルが、0～1の間の値へと転換されるが、式中、 $expr$ は、連続発現レベルであり、 thr は、前述の閾値であり、 se は、0～1の間の差違に影響を及ぼすソフトニングパラメータである、連続発現レベル

である。

【0042】

構築されうる、最も簡単な線形モデルのうちの1つは、本明細書では、JAK-STAT1/2 TFエレメントである、転写因子(TF)エレメントを表すノードを、第1の層に有し、例えば、マイクロアレイ実験又は(q)PCR実験において、特定の標的遺伝子と、特に、高度に相関する、例えば、1つのプローブセットによる、標的遺伝子発現レベルの直接的測定を表す、重み付けノードを、第2の層に有するモデルである。重みは、トレーニングデータセットに由来する計算に基づくか、計算専門家の知見に基づくかのどちらかである。標的遺伝子1つ当たり、おそらく、複数の発現レベルが測定される場合に(例えば、1つの標的遺伝子が、複数のプローブセットにより測定されうる、マイクロアレイ実験の場合に)、標的遺伝子1つ当たり、1つの発現レベルだけを使用する、この手法は、特に、簡単である。特定の標的遺伝子に使用される、1つの発現レベルを選択する、具体的な方式は、トレーニングデータセットの活性試料と、不活性試料とを、最も良好に分離することが可能なプローブセットに由来する発現レベルを使用することである。このプローブセットを決定する1つの方法は、統計学的検定、例えば、t検定を実施し、p値が最小となるプローブセットを選択することである。p値が最小となるプローブセットの、トレーニングデータセットの発現レベルとは、定義上、(知られている)活性試料の発現レベルと、及び不活性試料の発現レベルとが重複する確率が最小となるプローブセットの発現レベルである。別の選択方法は、オッズ比に基づく。このようなモデルでは、1つ又は複数の発現レベルは、3つ又はこれを超える標的遺伝子の各々についてもたらされ、1つ又は複数の線形結合は、3つ又はこれを超える標的遺伝子の各々について、重み付け項を含む線形結合を含み、各重み付け項は、それぞれの標的遺伝子についてもたらされる、1つ又は複数の発現レベルのうちの、1つの発現レベルだけにに基づく。上記で記載した標的遺伝子1つ当たり、1つの発現レベルだけが選び出される場合、モデルを、「最も弁別力のあるプローブセット」モデルと呼ぶ。

【0043】

「最も弁別力のあるプローブセット」モデルに対する代替法では、標的遺伝子1つ当たり、おそらく、複数の発現レベルが測定される場合に、標的遺伝子1つ当たりにもたらされる、全ての発現レベルを使用することも可能である。このようなモデルでは、1つ又は複数の発現レベルは、3つ又はこれを超える標的遺伝子の各々についてもたらされ、1つ又は複数の線形結合は、3つ又はこれを超える標的遺伝子についてもたらされる、1つ又

は複数の発現レベルの、全ての発現レベルの線形結合を含む。言い換えれば、3つ又はこれを超える標的遺伝子の各々について、それぞれの標的遺伝子についてもたらされる、1つ又は複数の発現レベルの各々は、線形結合において、それ自身の（個別の）重みにより重み付けされる。この変化形は、「全てのプローブセット」モデルと呼ばれる。「全てのプローブセット」は、もたらされる全ての発現レベルを使用しながら、比較的簡単であることの利点を有する。

【0044】

上記で記載したいずれのモデルも、それらが、TFエレメントの活性レベルが、3つ又はこれを超える標的遺伝子についての、1つ又は複数のプローブセットの発現レベルの線形結合に基づき計算される「単一層」モデルと考えられるものであるという点を共有する

10

【0045】

それぞれのモデルを査定することにより、本明細書では、JAK-STAT1/2 TFエレメントである、TFエレメントの活性レベルを決定した後で、本明細書では、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路である、細胞シグナル伝達経路の活性を推測するために、決定されたTFエレメントの活性レベルを閾値化することができる。このような適切な閾値を計算するのに好ましい方法は、不活性の細胞シグナル伝達経路を有することが知られているトレーニング試料の、決定されたTFエレメントの活性レベル wlc （重み付け線形結合）と、活性の細胞シグナル伝達経路を伴うトレーニング試料の wlc とを比較することによる方法である。このようにし、また、これらの群における分散も考慮する方法は、閾値

20

【数1】

$$thr = \frac{\sigma_{wlc_{pas}} \mu_{wlc_{act}} + \sigma_{wlc_{act}} \mu_{wlc_{pas}}}{\sigma_{wlc_{pas}} + \sigma_{wlc_{act}}} \quad (1)$$

を使用することにより与えられ、式中、 σ 及び μ は、トレーニング試料についての、決定された、TFエレメントの活性レベル wlc の標準偏差及び平均値である。活性のトレーニング試料中及び/又は不活性のトレーニング試料中で、少数の試料だけが利用可能な場合、2つの群の分散の平均に基づき、シュードカウントを計算された分散に加算する：

30

【数2】

$$\tilde{v} = \frac{v_{wlc_{act}} + v_{wlc_{pas}}}{2}$$

$$\tilde{v}_{wlc_{act}} = \frac{x \tilde{v} + (n_{act} - 1)v_{wlc_{act}}}{x + n_{act} - 1} \quad (2)$$

$$\tilde{v}_{wlc_{pas}} = \frac{x \tilde{v} + (n_{pas} - 1)v_{wlc_{pas}}}{x + n_{pas} - 1}$$

40

が、式中、 \tilde{v} は、群について決定されたTFエレメントの活性レベル wlc の分散であり、 x は、正のシュードカウント、例えば、1又は10であり、 n_{act} 及び n_{pas} は、

50

活性試料及び不活性試料のそれぞれの数である。次に、分散の平方根を取ることにより、標準偏差を得ることができる。

【0046】

解釈を容易とするために、閾値を、決定されたTFエレメントの活性レベルであるwlcから差し引く結果として、負の値が、不活性の細胞シグナル伝達経路に対応し、正の値が、活性の細胞シグナル伝達経路に対応する、細胞シグナル伝達経路の活性スコアをもたらすことができる。

【0047】

上記で記載された「単一層」モデルに対する代替法として、例ではまた、「二層」も使用される。このようなモデルでは、合計値は、その関連するプローブセットの、測定された強度に基づく線形結合を使用して、あらゆる標的遺伝子について計算される（「第1（下）層」）。その後、さらなる線形結合を使用して、計算された合計値を、細胞シグナル伝達経路の、他の標的遺伝子についての合計値と組み合わせる（「第2（上）層」）。ここでもまた、重みは、トレーニングデータセットから学習されるか、専門家の知見に基づくかのどちらか、又はこれらの組合せもある。言い換えれば、「二層」モデルでは、1つ又は複数の発現レベルは、3つ又はこれを超える標的遺伝子の各々についてもたらされ、1つ又は複数の線形結合は、3つ又はこれを超える標的遺伝子の各々について、それぞれの標的遺伝子についてもたらされる、1つ又は複数の発現レベルの、全ての発現レベルのうちの、第1の線形結合を含む。モデルは、3つ又はこれを超える標的遺伝子の各々について、重み付け項を含む、さらなる線形結合にさらに基づき、各重み付け項は、それぞれの標的遺伝子についての、第1の線形結合に基づく（「第2（上）層」）。

【0048】

「二層」モデルの好ましい変化形では、合計値の計算は、トレーニングデータを使用して、各標的遺伝子について、閾値を規定することと、計算された線形結合から、閾値を差し引くことと、標的遺伝子の合計を求めることとを含む。この場合、閾値は、負の標的遺伝子合計値が、下方調節される標的遺伝子に対応し、正の標的遺伝子合計値が、上方調節される標的遺伝子に対応するように選び出される。また、例えば、上記で記載された変換（ファジー変換、離散変換など）のうちの1つを使用して、標的遺伝子の合計値を、「第2（上）層」において組み合わせる前に変換することも可能である。

【0049】

「二層」モデルを査定することにより、TFエレメントの活性レベルを決定した後で、上記で記載した通りに、細胞シグナル伝達経路の活性を推測するために、決定されたTFエレメントの活性レベルを、閾値化することができる。

【0050】

以下では、上記で記載したモデルを、「（疑似）線形」モデルとして、総体的に表示する。トレーニング及び確率モデル、例えば、ベイジアンネットワークモデルの使用についてのより詳細な記載は、下記の実施例3に提示される。

【0051】

[実施例2]

標的遺伝子の選択

転写因子（TF）とは、特異的DNA配列への結合により、標的遺伝子からの転写を調節し、これにより、DNAから、mRNAへの遺伝情報の転写を制御することが可能な、タンパク質複合体（すなわち、特異的構造内で一体に結合したタンパク質の組合せ）又はタンパク質である。本明細書では、TF複合体のこの作用により直接的に産生されるmRNAを、「直接的標的遺伝子」（転写因子の）と称する。細胞内シグナル伝達経路の活性化はまた、「間接的標的遺伝子」と称する、より副次的な遺伝子転写も結果としてもたらす。以下では、細胞シグナル伝達経路活性と、mRNAレベルとの直接的連関としての、直接的標的遺伝子を含むか、又はこれからなる、（疑似）線形モデル、又はベイジアンネットワークモデル（例示的な数学的モデルとしての）が好ましいが、直接的標的遺伝子と、間接的標的遺伝子との区別は、常に明白であるわけではない。本明細書では、利用

10

20

30

40

50

可能な学術文献データに基づくスコアリング関数を使用して、直接的標的遺伝子を選択する方法が提示される。しかしながら、限定的な情報のほか、生物学的ばらつき、及び不確実性に起因して、間接的標的遺伝子の、意外の選択を除外することはできない。標的遺伝子を選択するために、「www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed」においてアクセス可能であり、本明細書ではさらに、「Pubmed」とも称する、米国立保健研究所のMEDLINEデータベースを援用して、標的遺伝子のリストを作成した。さらに、それらの発現の証拠となる性質に基づき、標的遺伝子の、1つのさらなるリストを選択した。

【0052】

2017年の第1四半期及び第2四半期の期間において、「“JAK-STAT1/2” AND “target gene”」などのクエリーを使用して、推定JAK-STAT1/2標的遺伝子を含有する刊行物を検索した。結果として得られる刊行物を、下記で、より詳細に記載される方法に従い、手作業で、さらに解析した。

【0053】

証拠が蓄積される科学的実験の種類に応じて、特異的な標的遺伝子についての科学的証拠に評価を与える、ランク付けシステムを使用することにより、特異的な細胞シグナル伝達経路のmRNA標的遺伝子を、学術文献から選択した。一部の実験の証拠が、例えば、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路が活性であることが知られている細胞系のマイクロアレイ上の、プローブセットの強度の増大により検出される、mRNAの増大のように、遺伝子が、直接的標的遺伝子であることを示唆するに過ぎないのに対し、他の証拠は、同定されたJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路のTF結合部位と、細胞内の特異的な細胞シグナル伝達経路の刺激の後の、クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイにおける、この部位の回収と、細胞系内の細胞シグナル伝達経路の、特異的な刺激の後における、mRNAの増大との組合せのように、極めて強力でありうる。

【0054】

学術文献では、特異的な細胞シグナル伝達経路の標的遺伝子を見出すための、いくつかの種類の実験を同定することができる：

1. 関心のある細胞シグナル伝達経路のTFの、ゲノム上のその結合部位への、直接的結合を示すChIP実験。例：例えば、JAK-STAT1/2を伴う刺激による、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の能動的誘導を伴うクロマチン免疫沈降(ChIP)技術、及びこの能動的誘導を伴わないChIP技術を使用することにより、細胞系のDNA内の、推定機能性JAK-STAT1/2 TF結合部位を、ヌクレオチド配列に純粋に基づいて認識される結合部位のサブセットとしてその後同定した。推定機能性は、TFが、DNA結合部位に結合することを見出す、ChIP由来の証拠として同定した。

2. *in vitro*における、TFの、結合配列を含有するDNAの断片への結合を示す、電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)。ChIPベースの証拠と比較して、EMSAベースの証拠は、*in vivo*状況へと置きかえることができないので、それほど強力ではない。

3. 細胞シグナル伝達経路の刺激、及びマイクロアレイ、RNAシーケンシング、定量的PCR、又は他の技法を使用する、mRNAの発現の測定であり、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路誘導型細胞系を使用し、少なくとも1つであるが、好ましくは、誘導(タンパク質への翻訳を阻害するので、誘導されたmRNAを、直接的標的遺伝子であると仮定する、シクロヘキシミドの存在下における)の後の、いくつかの時点において測定される、mRNAプロファイルを測定する。

4. 3と同様であるが、代替的に、さらに下流における、ウェスタンブロットなど、タンパク質の存在度の測定を伴いながら、mRNAの発現を測定する。

5. バイオインフォマティクス法を使用する、ゲノム内のTF結合部位の同定。JAK-STAT1/2TFエレメントについての例：ISRE結合性モチーフである「AGTTTCNNTTCNC/T」及びGAS結合性モチーフである「TTC/ANNNG/T

10

20

30

40

50

AA」を使用して、遺伝子プロモーター領域内の、潜在的結合部位を同定した。

6. シクロヘキシミドの非存在下であることを除き、3と同様である。

7. シクロヘキシミドの非存在下であることを除き、4と同様である。

【0055】

最も簡単な形態では、遺伝子を、転写因子のJAK-STAT1/2ファミリーの標的遺伝子であると同定した、これらの実験の手法の各々について、あらゆる潜在的な遺伝子に、1ポイントを与えることができる。この相対ランク付け戦略を使用して、最も信頼できる標的遺伝子のリストを作成することができる。

【0056】

代替的に、*in vivo*における直接的標的遺伝子の、最も大きな証拠をもたらす技術に、大きな数のポイントを与えることによる、別の方式によるランク付けを使用して、直接的標的遺伝子である可能性が最も高い標的遺伝子と同定することができる。上記のリストでは、これは、実験の手法1)については、7ポイント、2)については、6ポイントを意味し、実験の手法7)については、1ポイントへと低下することを意味する。このようなリストは、「標的遺伝子についての一般リスト」と呼ばれる。

10

【0057】

生物学的変動及び不確実性にもかかわらず、本発明者らは、直接的標的遺伝子が、組織非依存的に誘導される可能性が最も高いことを仮定した。これらの標的遺伝子のリストは、「標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト」と呼ばれる。このような、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリストを使用して、異なる組織供給源に由来する試料へと適用されうる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の算出モデルを構築した。

20

【0058】

以下は、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路について、証拠をキュレートした標的遺伝子リストの選択を、どのように具体的に構築したのかを、例示的に説明する。

【0059】

ChIP、EMSA、示差的発現、ノックダウン/ノックアウト、ルシフェラーゼ遺伝子レポーターアッセイ、刊行物において報告された配列解析など、各種の実験の証拠にポイントを与える、スコアリング関数を導入した。場合によって、同じ実験の証拠が、複数の刊行物において言及される結果として、対応するポイント数がもたらされる、例えば、2つの刊行物が、ChIP所見に言及する結果として、単一のChIP所見に与えられるスコアは2倍になる。さらなる解析を実施して、1種類の実験の証拠、例えば、示差的発現だけでなく、多様な種類の実験の証拠を有する遺伝子だけを許容した。2種類以上の利用可能な実験の証拠を有する遺伝子(表1において示される)を選択した。

30

【0060】

本発明者らは、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(表2に列挙される)のさらなる選択を行った。トレーニング試料から、JAK-STAT1/2シグナル伝達経路の活性を決定するときに、強力な証拠となる証拠をキュレートしたリストの標的遺伝子を選択した。本明細書では、データセットであるGSE38351による、11例の健常ドナーに由来する血中単球についての、利用可能な発現データセットを使用した。刺激を伴わずにインキュベートされた単球を伴う、11例の試料と、採血直後に単離された単球を伴う、8例の試料とを含む、19例の試料は、STAT1/2不活性であった。JAK-STAT1/2活性群は、IFN γ により刺激された7例の試料と、IFN γ

40

により刺激された7例の試料とを含んだ。表1による、「標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト」(23の標的遺伝子のリスト)についての遺伝子発現値を、GSE38351データセットによる、STAT1/2活性試料と、STAT1/2不活性試料との間で比較した。標的遺伝子の発現レベルが、経路活性群と、経路不活性の群との間で、明らかに差別化された場合、これは、標的遺伝子を使用して、経路活性群と、経路不活性群とを識別しうることを意味し、この場合に、標的遺伝子を選択した。これは、表2に示される、「9つの標的遺伝子についてのショートリスト」を結果としてもたらした

50

。

【 0 0 6 1 】

表1: JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路モデルにおいて使用される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の「標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト」(23の標的遺伝子リスト)、及び標的遺伝子のmRNAの発現レベルを測定するのに使用される、関連するプローブセット

【表 1】

標的遺伝子	プローブセット	標的遺伝子	プローブセット
BID	229321_s_at	SAMM50	201569_s_at
	227143_s_at		201570_at
	204493_at		243239_at
	211725_s_at		230396_at
GNAZ	220105_at	SMARCB1	212167_s_at
	204993_at		206532_at
IRF1	202531_at		231324_at
IRF7	208436_s_at		228897_at
IRF8	204057_at		228898_s_at
IRF9	220788_s_at		SSTR3
	225122_at		1553178_a_at
	231635_x_at	ST13	208666_s_at
	203882_at		208667_s_at
LGALS1	201105_at		207040_s_at
NCF4	205147_x_at	STAT1	200887_s_at
	207677_s_at		232375_at
NFAM1	243099_at		
	230322_at	TRMT1	203701_s_at
OAS1	205552_s_at		210463_x_at
PDCD1	207634_at		216454_at
RAB36	211471_s_at	UFD1L	209103_s_at
	1555158_at	USP18	219211_at
RBX1	218117_at	ZNRFB3	226360_at
RFPL3	207936_x_at		244820_at
			243014_at

10

20

30

40

【 0 0 6 2 】

50

表2: JAK-STAT1/2標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリストに基づく、JAK-STAT1/2標的遺伝子の「9の標的遺伝子についてのショートリスト」(関連するプローブセットは、表1の場合と同じである)

【表2】

標的遺伝子
IRF1
IRF7
IRF8
IRF9
OAS1
PDCD1
ST13
STAT1
USP18

10

20

【0063】

[実施例3]

数学的モデルのトレーニング及び使用

数学的モデルを使用して、対象における、本明細書では、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路である、細胞シグナル伝達経路の活性を推測しうる前に、モデルを、適切にトレーニングしなければならない。

【0064】

数学的経路モデルが、JAK-STAT1/2 TFエレメントの活性レベルと、対象の試料中で測定される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルとを関連付ける条件付き確率に基づく確率モデル、例えば、ベイジアンネットワークモデルである場合、トレーニングは、好ましくは、国際特許出願公開第WO2013/011479A2号(「標的遺伝子発現の確率モデル化を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)において、詳細に記載されている通りに実施される。

30

【0065】

数学的経路モデルが、対象の試料中で測定される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルの1つ又は複数の線形結合に基づく場合、トレーニングは、好ましくは、国際特許出願公開第WO2014/102668A2号(「標的遺伝子発現の線形結合を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)において、詳細に記載されている通りに実施される。

40

【0066】

本明細書では、図2に示される、例示的なベイジアンネットワークモデルを使用して、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の転写プログラムを、簡単にモデル化した。モデルは、3種類のノード：(a)第1の層である1における、転写因子(TF)エレメント(「存在しない」状態及び「存在する」状態を伴う)；(b)第2の層である2における、標的遺伝子TG₁、TG₂、TG_n(「低下」状態及び「上昇」状態を伴う)、及び；(c)第3の層である3における、標的遺伝子の発現レベルへと関連させた測定ノードからなる。これらは、好ましくは、本明細書で使用されるマイクロアレイプローブセットである、PS_{1,1}、PS_{1,2}、PS_{1,3}、PS_{2,1}、PS_{n,1}、PS_{n,}

50

m (「低度」状態及び「高度」状態を伴う)でありうるが、また、RNAseq又はRT-qPCRなど、他の遺伝子発現測定値でもありうる。

【0067】

本明細書では、例示的なベイジアンネットワークモデルである数学的モデルの適切な実施は、マイクロアレイデータに基づく。モデルは、(i) 標的遺伝子の発現レベルが、TFエレメントの活性化に、どのくらい依存するのか、及び(ii) 同様に、プローブセットの強度が、それぞれの標的遺伝子の発現レベルに、どのくらい依存するのかについて記載する。(ii)のために、プローブセットの強度は、遺伝子発現オムニバス(GEO、www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)及びArrayExpress(www.ebi.ac.uk/arrayexpress)から、広く入手可能な、fRMAにより前処理された、Affymetrix HG-U133Plus2.0マイクロアレイから取る。

10

【0068】

例示的なベイジアンネットワークモデルは、本明細書では、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路である、細胞シグナル伝達経路についての生物学の簡略化であり、生物学的測定は、典型的に、ノイズに富むので、確率的手法を選び取る、すなわち、(i) TFエレメントと、標的遺伝子との関係、及び(ii) 標的遺伝子と、それらのそれぞれのプローブセットとの関係を、確率的に記載する。さらに、腫瘍の増殖を駆動する、発がん性の細胞シグナル伝達経路の活性は、一過性、かつ、劇的に変更されるのではなく、長期的又はさらに不可逆的に変更されることを仮定した。したがって、静的な細胞状態を解釈するための、例示的なベイジアンネットワークモデルを開発した。この理由で、複雑な動的細胞シグナル伝達経路の特徴は、モデルへと組み込まなかった。

20

【0069】

例示的なベイジアンネットワークモデルを、構築し、較正したら(下記を参照されたい)、第3層である3における観測値としてのプローブセットの測定値を入力し、TFエレメントが「存在する」ためには、確率はいくつでなければならなかったのかを、モデルにおいて後ろ向きに推測することにより、モデルを、新たな試料のマイクロアレイデータに対して使用することができる。この場合、「存在する」とは、TFエレメントが、DNAに結合し、細胞シグナル伝達経路の標的遺伝子の転写を制御している現象であると考えられ、「存在しない」とは、TFエレメントが、転写を制御していない現象であると考えられる。よって、この確率は、本明細書では、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路である、細胞シグナル伝達経路の活性を指し示すのに使用される、一次リードアウトである。これは、次に、細胞シグナル伝達経路が活性である確率に対する細胞シグナル伝達経路が不活性である確率との比(すなわち、オッズは、 $p/(1-p)$)により与えられ、ここで、 p は、細胞シグナル伝達経路が活性であることの予測確率である)を取ることで、細胞シグナル伝達経路が活性であるオッズへと置きかえることができる。

30

【0070】

例示的なベイジアンネットワークモデルでは、定量的な確率的推測を可能とするために、確率的関係は定量化された。組織型にわたる一般化挙動を改善するために、(i) TFエレメントと、標的遺伝子との確率的関係について記載するパラメータを、注意深く厳選した。TFエレメントが「存在しない」場合、標的遺伝子は「低下」する可能性が極めて高く、よって、0.95の確率を、このために選び出し、0.05の確率を、標的遺伝子が「上昇」することのために選び出す。0.05(非ゼロ)の確率は、標的遺伝子が、他の因子により調節されるか、又は意外に「上昇」することが観察される(例えば、測定ノイズのために)、(稀少な)確率に相応する。TFエレメントが「存在する」場合、0.70の確率で、標的遺伝子は「上昇」すると考えられ、0.30の確率で、標的遺伝子は「低下」すると考えられる。0.3の値は、標的遺伝子は、TFエレメントが存在する場合であっても、高度に発現しない原因がいくつかあるために、例えば、遺伝子のプロモーター領域がメチル化されているため、このように選び出される。標的遺伝子が、TFエレメントにより上方調節されず、下方調節される場合も、確率は、同様に選び出されるが

40

50

、TFエレメントの存在時における下方調節を反映する。(ii) 標的遺伝子と、それらのそれぞれのプローブセットとの関係について記載するパラメータを、実験データ上で校正した。後者について、この例では、実験データのために、活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路を有することが知られている患者試料に由来するマイクロアレイデータを使用する一方で、同じデータセットに由来する正常な健常試料を、不活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路試料として使用したが、これはまた、細胞系による実験、又は既知の細胞シグナル伝達経路活性状態を伴う、他の患者試料を使用しても実施される。結果として得られる条件付き確率表を、以下により示す：

【0071】

【表3】

A: 上方調節された標的遺伝子について

	$PS_{i,j}$ =低度	$PS_{i,j}$ =高度
TG_i =低下	$\frac{AL_{i,j}+1}{AL_{i,j}+AH_{i,j}+2}$	$\frac{AH_{i,j}+1}{AL_{i,j}+AH_{i,j}+2}$
TG_i =上昇	$\frac{PL_{i,j}+1}{PL_{i,j}+PH_{i,j}+2}$	$\frac{PH_{i,j}+1}{PL_{i,j}+PH_{i,j}+2}$

10

20

【0072】

【表4】

B: 下方調節された標的遺伝子について

	$PS_{i,j}$ =低度	$PS_{i,j}$ =高度
TG_i =低下	$\frac{PL_{i,j}+1}{PL_{i,j}+PH_{i,j}+2}$	$\frac{PH_{i,j}+1}{PL_{i,j}+PH_{i,j}+2}$
TG_i =上昇	$\frac{AL_{i,j}+1}{AL_{i,j}+AH_{i,j}+2}$	$\frac{AH_{i,j}+1}{AL_{i,j}+AH_{i,j}+2}$

30

【0073】

これらの表では、変数である、 $AL_{i,j}$ 、 $AH_{i,j}$ 、 $PL_{i,j}$ 、and $PH_{i,j}$ は、それぞれ、「低度」(L)又は「高度」(H)のプローブセットの強度を有する、転写複合体が「存在しない」(A)か、又は「存在する」(P)校正試料の数を指し示す。0~1の極端な確率を回避するために、ダミーカウントを加算した。

【0074】

観察されたプローブセットの強度を離散化するために、各プローブセット $PS_{i,j}$ について、それを下回る観測値が「低度」と呼ばれ、それを上回る観測値が「高度」と呼ばれる、閾値 $t_{i,j}$ を使用した。この閾値は、使用される校正データセット内のプローブセットの、(重み付け)中央値強度となるように選び出された。マイクロアレイデータのノイズ性のために、観察されたプローブセットの強度を、その閾値と比較する場合に、報告された強度の近傍において、標準偏差を0.25とする(log2スケール上で)正規分布を仮定し、閾値を下回る確率質量及び閾値を上回る確率質量を決定することにより、ファジー法を使用した。

40

【0075】

上記で記載した、例示的なベイジアンネットワークの代わりに、上記の実施例1に記載された(疑似)線形モデルを援用した場合、ノードと閾値との相関の符号及び大きさを指し示す重みであって、ノードが「存在しない」のか、「存在する」のかを判定する重みを

50

、モデルを使用して、被験試料中の、細胞シグナル伝達経路活性を推測しうる前に決定する必要がある。専門家の知見を使用して、重み及び閾値を、事前に充填しうるが、典型的には、好ましくは、そのグラウンドトゥールズが知られている、トレーニング試料の代表的セット、例えば、既知の「存在する」転写因子複合体（＝活性の細胞シグナル伝達経路）、又は「存在しない」転写因子複合体（＝不活性の細胞シグナル伝達経路）を伴う、試料中のプローブセットの発現データを使用して、モデルをトレーニングする。

【0076】

本分野では、モデルの出力、ここでは、重み付け線形スコアを最適化するように、モデルトポロジーを考慮に入れ、モデルパラメータ、ここでは、重み及び閾値を変化させる、多数のトレーニングアルゴリズム（例えば、回帰）が知られている。代替的に、また、最適化アルゴリズムを必要とせずに、観察された発現レベルから直接、重みを計算することも可能である。

10

【0077】

本明細書で「ブラックアンドホワイト」法と称する第1の方法は、各重みが、集合{-1、0、1}の要素である、三元システムへと縮約される。これを生物学的文脈で述べれば、-1及び1は、細胞シグナル伝達経路活性の場合、それぞれ、下方調節及び上方調節された、標的遺伝子又はプローブセットに対応する。プローブセット又は標的遺伝子が、上方調節又は下方調節されることが、統計学的に実証できない場合、プローブセット又は標的遺伝子は、0の重みを受け取る。一例では、活性の細胞シグナル伝達経路試料の発現レベルを、不活性の細胞シグナル伝達経路を伴う試料の発現レベルと対比した、左側及び右側の、2つのt検定を使用して、使用されるトレーニングデータを与えたときに、プローブ又は遺伝子が、上方調節されるのか、下方調節されるのかを決定することができる。活性試料の平均が、不活性試料の平均より、統計学的に大きい、すなわち、p値が、ある特定の閾値、例えば、0.3を下回る場合、標的遺伝子又はプローブセットは、上方調節されることが決定される。逆に、活性試料の平均が、不活性試料の平均より、統計学的に小さい場合、標的遺伝子又はプローブセットは、細胞シグナル伝達経路の活性化時に、下方調節されることが決定される。万一、最小のp値（左側又は右側）が、前述の閾値を超える場合、標的遺伝子又はプローブセットの重みは、0であると規定することができる。

20

【0078】

本明細書で「対数オッズ」法と称する第2の方法は、対数（例えば、底をeとする）オッズ比に基づく。各標的遺伝子又は各プローブセットについてのオッズ比は、プローブセット/標的遺伝子のレベルが、対応する閾値、例えば、全てのトレーニング試料の（重み付け）中央値を上回る場合、及びこれを下回る場合の、陽性のトレーニング試料の数及び陰性のトレーニング試料の数に基づき計算する。ゼロによる除算を回避するために、疑似カウントを加算することができる。さらなる精緻化は、プローブセット/標的遺伝子レベルが、例えば、ある特定の指定された標準偏差（例えば、2logスケールで、0.25）、その観察された値の近傍に正規分布することを仮定し、閾値を上回る確率質量及び下回る確率質量をカウントすることにより、或る程度確率的に、閾値を上回る/下回る試料をカウントすることである。本明細書に、決定論的測定値の代わりに、疑似カウントと組み合わせ、確率質量を使用して計算されたオッズ比を、「ソフトな」オッズ比と呼ぶ。

30

40

【0079】

標的遺伝子発現の数学的モデル化を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の推測に関するさらなる詳細は、Verhaegh W.ら、「Selection of personalized patient therapy through the use of knowledge-based computational models that identify tumor-driving signal transduction pathways」、Cancer Research、74巻、11号、2014年、2936～2945頁において見出されうる。

【0080】

本明細書においては、in vitroにおいて、サイトカイン：IFN 2a（I型

50

I F N) 及び I F N (I I 型 I F N) により刺激された、健常ドナーに由来する血中単球についての、A f f y m e t r i x U 1 3 3 P l u s 2 . 0 による、公開されている m R N A 発現データを使用した。標的遺伝子発現レベルに対する影響がわずかに異なる、S T A T 1 / 2 経路は、I 型 I F N 又は I I 型 I F N により活性化させられうるため、それぞれ、I 型 I F N 刺激及び I I 型 I F N 刺激による刺激として規定される、S T A T 1 / 2 活性化の 2 つの方式を表す、2 つの異なる校正データセットを使用した。刺激を伴わない、健常ドナーに由来する、血中単球は、対照群を形成する。よって、同じ標的遺伝子リスト (表 1 を参照されたい) を使用して、2 つの異なるモデルを、I F N 2 a 刺激 (I 型 I F N) 又は I F N 刺激 (I I 型 I F N) を伴う校正試料に対して、個別に校正した。

10

【 0 0 8 1 】

以下では、I 型 I F N 刺激及び I I 型 I F N 刺激を伴うデータセットに対する、ベイジアンネットワークモデルの校正結果を、図 9 及び図 1 0 に示す。

【 0 0 8 2 】

図 9 は、データセットである G S E 3 8 3 5 1 による、1 1 例の健常ドナーに由来する、血中単球について公開されている発現データセットを使用する、表 1 による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト (2 3 の標的遺伝子のリスト)、及び本明細書で記載される方法に基づく、ベイジアンネットワークモデルの、I 型 I F N についての校正結果を示す。刺激を伴わずにインキュベートされた血中単球を伴う、1 1 例の試料と、採血直後に単離された単球を伴う、8 例の試料血液とを含む、1 9 例の試料を、対照群、すなわち、不活性の校正試料 (群 3) として使用する。トレーニング群、すなわち、活性の校正試料は、I F N 2 a により刺激された、7 例の試料 (I 型 I F N ; 群 1) を含んだ。モデルを、I F N (I I 型 I F N ; 群 2) により刺激された、同じドナーに由来する、別の 7 例の試料上でテストした。略図では、垂直軸は、活性の J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路及び不活性の J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路のそれぞれに対応する、T F エlement が「存在する」オッズ及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示し、ここで、水平軸を上回る値は、T F エlement が「存在する」/ 活性であるオッズが大きいことに対応し、水平軸を下回る値は、T F エlement が「存在しない」/ 不活性であるオッズが、「存在する」/ 活性であるオッズより大きいことを指し示す。J A K - S T A T 1 / 2 I 型 I F N モデルは、不活性の校正試料を、活性の校正試料から、明確に分離することが可能であった。

20

30

【 0 0 8 3 】

図 1 0 は、データセットである G S E 3 8 3 5 1 による、1 1 例の健常ドナーに由来する、血中単球について公開されている発現データセットを使用する、表 1 による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト (2 3 の標的遺伝子のリスト)、及び本明細書で記載される方法に基づく、ベイジアンネットワークモデルの、I I 型 I F N についての校正結果を示す。刺激を伴わずにインキュベートされた血中単球を伴う、1 1 例の試料と、採血直後に単離された単球を伴う、8 例の試料血液とを含む、1 9 例の試料を、対照群、すなわち、不活性の校正試料 (群 3) として使用する。トレーニング群、すなわち、活性の校正試料は、I F N により刺激された、7 例の試料 (I I 型 I F N ; 群 1) を含んだ。モデルを、I F N 2 a (I 型 I F N ; 群 2) により刺激された、同じドナーに由来する、別の 7 例の試料上でテストした。略図では、垂直軸は、活性の J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路及び不活性の J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路のそれぞれに対応する、T F エlement が「存在する」オッズ及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示し、ここで、水平軸を上回る値は、T F エlement が「存在する」/ 活性であるオッズが大きいことに対応し、水平軸を下回る値は、T F エlement が「存在しない」/ 不活性であるオッズが、「存在する」/ 活性であるオッズより大きいことを指し示す。J A K - S T A T 1 / 2 I I 型 I F N モデルは、不活性の校正試料を、活性の校正試料から、明確に分離することが可能であった。

40

【 0 0 8 4 】

50

経路活性レベルを、同一の試料上で、JAK-STAT1/2 I型IFNモデル(図9)と、JAK-STAT1/2 II型IFNモデル(図10)との間で比較することにより、JAK-STAT1/2活性が、I型刺激又はII型刺激により誘導されるのかがどうかを推測することができる。IFN-2a(I型IFN;群1)により刺激された試料について、図9におけるI型モデル活性スコアは、図10におけるII型モデル活性スコアより高く、それらのI型IFN刺激と、明らかに符合する。IFN-(II型IFN;群2)により刺激された試料について、図10における、JAK-STAT1/2 II型IFNモデル活性スコアは、図9における、JAK-STAT1/2 I型IFNモデル活性スコアより高く、それらのII型IFN刺激と符合する。刺激が未知である試料について、このような比較は、どの型の刺激が、JAK-STAT1/2活性化を誘発したのかを指し示しうる。

10

【0085】

以下では、表1の、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なベイジアンネットワークモデルについてのバリデーション結果を、図11~図16に示す。

【0086】

図11は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す。5例の健常対照の、末梢血単核細胞(PBMC)のうちのNK細胞を、直接(群1)、又は刺激を伴わずに、6時間にわたり培養した後で(群2)単離した(データセット: GSE15743)。100ng/ml及び1ng/mlの組換えIFN-2bによる、6時間にわたる刺激(I型IFN刺激)(それぞれ、群3及び群4)により、JAK-STAT1/2を活性化させる。略図では、垂直軸は、活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路及び不活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路のそれぞれに対応する、TFエレメントが「存在する」オッズ及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示し、ここで、水平軸を上回る値は、TFエレメントが「存在する」/活性である可能性が高いことに対応し、水平軸を下回る値は、TFエレメントが「存在しない」/不活性であるオッズが、「存在する」/活性であるオッズより大きいことを指し示す。JAK-STAT1/2 I型IFNモデルは、IFN-2b(I型IFN)刺激を伴う試料についての、高JAK-STAT1/2活性を正確に予測し、高用量のIFN-2bで刺激された試料が、高度の経路活性を有することも正確に予測する。

20

30

【0087】

図12は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す。IFN-による処置(I型IFN)の開始の前及び後に、形質細胞様樹状細胞(pDC)を、健常ドナー及びMS(多発性硬化症)患者から分離した(データセット: GSE37750)。略図では、グラフの左側における単一のドットは、対照群における健常ドナーを表す。グラフの垂直軸において、log₂(オッズ)単位で与えられた活性値から見られる通り、対照群に由来する試料は、JAK-STAT1/2不活性である。これに対し、結びつけられたドットは、処置の前(グラフの左側)及び処置の後(グラフの右側)における、MSを伴う、9例の患者のSTAT1/2活性値を表す。各直線は、各患者について、処置の前におけるSTAT1/2活性と、処置の後におけるSTAT1/2活性とを結びつけるが、これは、STAT1/2活性が、8例の患者について、処置の後で著明に高いことを示す。JAK-STAT1/2 I型IFNモデルは、JAK-STAT1/2活性レベルが、IFN-による処置の後で上昇することを正確に予測する。

40

【0088】

図13は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネ

50

ットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す。データセットであるGSE14386では、末梢血単核細胞(PBMC)は、多発性硬化症(MS)の診断を示唆する、いわゆる「単発性脱髄性症候群(CIS)」を伴う患者に由来し、IFN-1(I型IFN)(1000U/ml)の非存在下(群1)又は存在下(群2)において、プレートに固定化された抗CD3(1μg/ml)及び抗CD28(5μg/ml)mAb(BD Biosciences)により、24時間にわたり刺激した。略図では、結びつけられたドットは、処置の前(グラフの左側)及び処置の後(グラフの右側)における、CISを伴う、14例の患者のSTAT1/2活性値を表す。結果は、処置後において、14例の患者全てについて、STAT1/2活性が、有意に高いことを示す。JAK-STAT1/2 I型IFNモデルは、JAK-STAT1/2活性レベルが、IFN-1(I型IFN)を伴うインキュベーションの後で上昇することを正確に予測する。

10

【0089】

図14は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す。データセットであるGSE11327において、樹状細胞(DC)を、IFN(I型IFN)の存在下で、Toll様受容体(TLR)4により、6時間にわたり成熟させた。DCのRNAを、成熟の6、12、24、又は48時間後に単離した(群1;4つのバーは、時間における4つの逐次点:6、12、24、48時間後を表す)。略図では、垂直軸は、活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路及び不活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経のそれぞれに対応する、TFエレメントが「存在する」オッズ及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示し、ここで、水平軸を上回る値は、TFエレメントが「存在する」/活性であるオッズが大きいことに対応し、水平軸を下回る値は、TFエレメントが「存在しない」/不活性であるオッズが、「存在する」/活性であるオッズより大きいことを指し示す。JAK-STAT1/2 II型IFNモデルは、DC内の、高度なJAK-STAT活性レベル(群1)及び非刺激対照群における不活性STAT1/2(群2)を正確に予測する。

20

【0090】

図15は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す。データセットであるGSE58096において、THP1-SP110b細胞を、IFN(I型IFN)により処理した。略図では、垂直軸は、活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路及び不活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経のそれぞれに対応する、TFエレメントが「存在する」オッズ及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示し、ここで、水平軸を上回る値は、TFエレメントが「存在する」/活性であるオッズが大きいことに対応し、水平軸を下回る値は、TFエレメントが「存在しない」/不活性であるオッズが、「存在する」/活性であるオッズより大きいことを指し示す。JAK-STAT1/2 II型IFNモデルは、IFN(I型IFN)により、2日間にわたり処理された細胞(群2)、Dox+IFNにより、2日間にわたり処理された細胞(群3)、IFNにより、4日間にわたり処理された細胞(群4)、及びDox+IFNにより、4日間にわたり処理された細胞(群5)における、非処理対照群(群1)と比較した、高JAK-STATの活性レベルを正確に予測する。

30

40

【0091】

図16は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベジアンネットワークモデルによる、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す。末梢血単核細胞を、100U/mlのIFNの存在下又は非存在下、10%のウシ胎仔血清及び10ng/mlのM-CSFが補充されたRPMI 1640中で、24

50

時間にわたり培養した（データセット：G S E 1 1 8 6 4）。略図では、垂直軸は、活性の J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路及び不活性の J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経のそれぞれに対応する、T F エlementが「存在する」オッズ及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示し、ここで、水平軸を上回る値は、T F エlementが「存在する」/活性であるオッズが大きいことに対応し、水平軸を下回る値は、T F エlementが「存在しない」/不活性であるオッズが、「存在する」/活性であるオッズより大きいことを指し示す。J A K - S T A T 1 / 2 I I 型 I F N モデルは、J A K - S T A T 1 / 2 が、新鮮な血中単球内（群 1）及び M - C S F 下で培養された細胞内（群 2）で不活性であるのに対し、I F N で刺激された細胞が、高 J A K - S T A T 1 / 2 活性レベルを示す（群 3）ことを正確に予測する。

10

【 0 0 9 2 】

標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト（23の標的遺伝子のリスト）を使用してトレーニングされた、例示的なベイジアンネットワークモデルについての、さらなるバリデーション結果を、図 1 7 及び図 1 8 に示す。ここで、J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路の活性予測結果における差違について探索するために、J A K - S T A T 1 / 2 I 型 I F N モデル及び J A K - S T A T 1 / 2 I I 型 I F N モデルを、同じデータセットへと適用した。

【 0 0 9 3 】

図 1 7 は、表 1 による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト（23の標的遺伝子のリスト）を使用してトレーニングされた、例示的な I 型 I F N ベイジアンネットワークモデルによる、J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す。I 型 I F N について較正された J A K - S T A T 1 / 2 ベイジアンネットワークモデルを、5つの群が、同じ試料を表す、図 1 5 の場合と同じデータセットである G S E 5 8 0 9 6 へと適用した。略図では、垂直軸は、活性の J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路及び不活性の J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経のそれぞれに対応する、T F エlementが「存在する」オッズ及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示し、ここで、水平軸を上回る値は、T F エlementが「存在する」/活性であるオッズが大きいことに対応し、水平軸を下回る値は、T F エlementが「存在しない」/不活性であるオッズが、「存在する」/活性であるオッズより大きいことを指し示す。J A K - S T A T 1 / 2 I 型 I F N モデルは、I F N により誘導される J A K - S T A T 1 / 2 活性の活性レベルを、I I 型 I F N について較正された J A K - S T A T 1 / 2 モデルと比較して、低活性レベルで予測した。図 1 5 における、J A K - S T A T 1 / 2 I I 型 I F N モデルによる予測結果では、I F N により処理された 4 群を、活性であると考えたのに対し、J A K - S T A T 1 / 2 I 型 I F N モデルでは、I F N により、4 日間にわたり処理された細胞である、1つの群（群 4）だけを、活性であると考える一方、I F N により、2日間にわたり処理された細胞（群 2）、D o x + I F N により、2日間にわたり処理された細胞（群 3）、及び D o x + I F N により、4日間にわたり処理された細胞（群 5）については、J A K - S T A T 1 / 2 I 型 I F N モデルに基づき、J A K - S T A T 1 / 2 が不活性であると考える。図 1 5 における、J A K - S T A T 1 / 2 I I 型 I F N モデルによる結果は、群 2 ~ 5 について、図 1 7 における、J A K - S T A T 1 / 2 I 型 I F N モデルによるより高い活性レベルを示すため、これは、I 型 I F N により誘導された細胞モデル及び I I 型 I F N により誘導された細胞モデルのそれぞれについて、個別に較正された J A K - S T A T 1 / 2 モデルが、I 型 I F N 及び I I 型 I F N のそれぞれにより誘導される S T A T 1 / 2 活性を識別しうることを実証する、良好な例である。

20

30

40

【 0 0 9 4 】

図 1 8 は、表 1 による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト（23の標的遺伝子のリスト）を使用してトレーニングされた、例示的な I 型 I F N ベイジアンネットワークモデルによる、J A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路活性の予測を示す。I 型 I F N について較正された J A K - S T A T 1 / 2 ベイジアンネットワークモデ

50

ルを、3つの群が、同じ試料を表す、図16の場合と同じデータセットであるGSE11864へと適用した。略図では、垂直軸は、活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路及び不活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経のそれぞれに対応する、TFエレメントが「存在する」オッズ及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示し、ここで、水平軸を上回る値は、TFエレメントが「存在する」/活性であるオッズが大きいことに対応し、水平軸を下回る値は、TFエレメントが「存在しない」/不活性であるオッズが、「存在する」/活性であるオッズより大きいことを指し示す。JAK-STAT1/2 I型IFNモデルは、群3における試料中で、群1及び2と比較して高度の活性を明らかに示すが、図16による、群3における試料についての活性スコアの、I型モデルと、II型モデルとの間の比較は、後者のモデルについて、高活性スコアを明らかにすることから、群3による試料が、II型IFNによる、JAK-STAT1/2の活性化に対応することが指し示される。

10

【0095】

表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)、及び表2による、9つの標的遺伝子についてのショートリストを使用してトレーニングされた、例示的なベイジアンネットワークモデルについての、さらなるパリテーション結果を、図19及び図20に示す。ここで、JAK-STAT1/2 I型IFNモデル及びJAK-STAT1/2 II型IFNモデルの両方のために、表1の、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を、表2の、9つの標的遺伝子についてのショートリストと、同じデータセットについて比較する。

20

【0096】

図19は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデル、及び表2による、9つの標的遺伝子についてのショートリストを使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルのそれぞれの間の相関を示す。略図では、水平軸は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルにより予測される、活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路及び不活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路のそれぞれに対応する、TFエレメントが「存在する」オッズ(\log_2 スケールにおける)及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示す。垂直軸は、表2による、9つの標的遺伝子についてのショートリスト(データセットであるGSE15743、GSE37750、GSE14386)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルにより予測される、同じ情報を指し示す。2つのモデルは、 2.2×10^{-16} のp値、及び0.988の相関係数により、有意に相関する。

30

【0097】

図20は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベイジアンネットワークモデル、及び表2による、9つの標的遺伝子についてのショートリストを使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベイジアンネットワークモデルのそれぞれの間の相関を示す。略図では、水平軸は、表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なII型IFNベイジアンネットワークモデルにより予測される、活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路及び不活性のJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路のそれぞれに対応する、TFエレメントが「存在する」オッズ(\log_2 スケールにおける)及び「存在しない」オッズのそれぞれを指し示す。垂直軸は、表2による、9つの標的遺伝子についてのショートリスト(データセットであるGSE58096、GSE11327、GSE11864)を使用してトレーニングされた、例示的なI型IFNベイジアンネットワークモデルにより予測される、同じ情報を指し示す。2つのモデル

40

50

は、 2.2×10^{-16} の p 値、及び 0.992 の相関係数により、有意に相関する。

【0098】

表1による、標的遺伝子についての、証拠をキュレートしたリスト(23の標的遺伝子のリスト)を使用してトレーニングされた、例示的なベイジアンネットワークモデルについての、さらなるバリデーション結果を、図21に示す。略図は、転移性黒色腫を伴う患者を、MAGE-A3免疫療法(6回又はこれを超える回数の免疫療法剤の投与)で処置し、レスポンドー及び非レスポンドーを同定した、臨床研究の結果を示す。研究に組み入れた65例の試料のうち、9例の試料は、査定不能(NE)であり、22例の試料は、レスポンドー(R)であり、34例の試料は、非レスポンドー(NR)であった。略図では、各ボックスは、各群(NR、R、NR)についての、STAT1/2経路活性スコアの分布を表す。分布は、レスポンドー(R)の群が、非レスポンドー(NR)と比較して、有意に高いSTAT1/2経路スコアを有することを示す。査定不能(NE)であった群は、なお低度のSTAT1/2経路スコアを有する。

10

【0099】

較正された数学的モデル、例えば、例示的なベイジアンネットワークモデルを、マイクロアレイ又はRNAシーケンシングに由来する、入力されたmRNAデータに適用する代わりに、臨床適用では、例えば、qPCRを使用して、標的遺伝子のmRNAレベルを決定する、統合型プラットフォーム上で、試料測定を実施するための、専用アッセイを開発することが有益である。次いで、開示された標的遺伝子のRNA/DNA配列を使用して、どのプライマー及びプローブを、このようなプラットフォーム上で選択するのかを決定する。

20

【0100】

このような専用アッセイのバリデーションは、マイクロアレイベースの数学的モデルを、基準モデルとして使用し、開発されたアッセイが、バリデーション試料のセットに対して、同様な結果をもたらすのかどうかを検証することにより行うことができる。専用アッセイに次いで、このバリデーションもまた、RNAシーケンシングデータを、入力された測定値として使用する、同様な数学的モデルを構築し、較正するために行うことができる。

【0101】

較正された数学的モデル、例えば、例示的なベイジアンネットワークモデルを使用する、マイクロアレイ/RNAシーケンシングベースの探索に基づき、特異的な細胞シグナル伝達経路活性を、最もよく指し示すことが見出された、標的遺伝子のセット、例えば、表1及び表2は、対象の試料及び/又はコンピュータ上で実施される、マルチプレックス定量的PCRアッセイに移行し、発現測定値を解釈し、かつ/若しくはJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測することができる。細胞シグナル伝達経路活性についての、このような試験(例えば、セントラルサービ斯拉ボにおける、FDAの承認若しくはCLIAの認証を受けた試験、又は探索使用だけのための、検査室により開発された試験)を開発するためには、規制機関による承認を得るのに、臨床試験における臨床場でのバリデーションを必要とする、標準化された試験キットの開発が要求される。

30

【0102】

本発明は、デジタル処理デバイスにより実施される、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための、コンピュータにより実施される方法であって、コンピュータにより実施される方法は、推測することが、対象の試料中で測定される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ又はこれを超える標的遺伝子の発現レベルに基づく、コンピュータにより実施される方法に関する。本発明は、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための装置であって、装置は、方法を実施するように構成されたデジタルプロセッサを含む装置、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するための非一時的記憶媒体であって、非一時的記憶媒体は、方法を実施するための、デジタル処理デバイスにより実行可能な命令を保存する非一時的記憶媒体、及び対象におけるJAK-STAT

40

50

1 / 2 細胞シグナル伝達経路の活性を推測するためのコンピュータプログラムであって、コンピュータプログラムは、コンピュータプログラムが、デジタル処理デバイス上で実行される場合に、デジタル処理デバイスに、方法を実施させるためのプログラムコード手段を含むコンピュータプログラムにさらに関する。

【0103】

方法は、例えば、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の(異常な)活性の診断、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づく予後診断、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の推測された活性に基づく臨床試験における対象の登録、実施される後続の試験の選択、コンビオン診断試験の選択、臨床決定支援システムなどにおいて使用される。この点で、国際特許出願公開第WO2013/011479A2号(「標的遺伝子発現の確率モデル化を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)、国際特許出願公開第WO2014/102668A2号(「標的遺伝子発現の線形結合を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)、及びこれらの適用について、より詳細に記載する、Verhaegh W.ら、「Selection of personalized patient therapy through the use of knowledge-based computational models that identify tumor-driving signal transduction pathways」、Cancer Research、74巻、11号、2014年、2936~2945頁が参照される。

10

【0104】

[実施例4]

本発明を例示するためのさらなる情報

(1) 遺伝子発現のレベルの測定

本明細書に記載される方法を使用して、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測するのに、本明細書に記載される標的遺伝子の固有のセットから導出されるデータを、さらに活用する。

20

【0105】

抽出された試料中の遺伝子発現レベルを解析するための方法は、一般に知られている。例えば、方法など、ノーザンブロット法、PCR、nested PCR、定量的リアルタイムPCR(qPCR)、RNA-seq、又はマイクロアレイの使用は、いずれも、遺伝子発現レベルのデータを導出するのに使用することができる。本明細書では、標的遺伝子の遺伝子発現を解析するための、当技術分野で知られている全ての方法が想定される。

30

【0106】

PCRベースの方法を使用して、遺伝子の発現産物を決定する方法は、特に、有用である。PCRを使用して、遺伝子発現のレベルを定量するためには、各増幅サイクルの後に於ける、リアルタイムのPCR産物の蓄積を測定するのに、従来の定量的リアルタイムPCR(qPCR)を使用して、関心のある各PCR産物の量を推定することが典型的である。これは、典型的に、挿入色素、副溝結合色素、又は光の適用が、蛍光を発するように、レポーターを励起する、蛍光発生プローブなど、検出可能なレポーターを活用し、結果として得られる蛍光は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,713,297号において開示されているCCDカメラ又は光電子増倍検出システムなどの、CCDカメラ又は光電子増倍検出システムを使用して検出されることが典型的である。

40

【0107】

一部の実施形態では、定量的リアルタイムPCR(qPCR)アッセイにおいて、PCR産物の検出に使用されるプローブは、蛍光マーカを含みうる。多数の蛍光マーカが市販されている。例えば、Molecular Probes, Inc. (Eugene, Ore.)は、多種多様な蛍光色素を販売している。非限定例は、Cy5、Cy3、TAMRA、R6G、R110、ROX、JOE、FAM、Texas Red(商標)、及びOregon Green(商標)を含む。さらなる蛍光マーカは、qPCRアッセイにおける、従来の5'加水分解型プローブを伴う、IDT ZEN Double

50

- Quenched Probesを含みうる。これらのプローブは、例えば、3' TAMRA Quencher、3' Black Hole Quencher (BHQ、Biosearch Technologies)、又はインターナル型のZEN Quencher及び3' Iowa Black Fluorescent Quencher (IBFQ)を伴う5' FAM色素を含有しうる。

【0108】

当技術分野でよく知られている方法を使用して、本発明に従う、有用な蛍光色素を、オリゴヌクレオチドプライマーへと接合させることができる。例えば、蛍光標識を、オリゴヌクレオチドへと付加するための、一般的な方式は、色素のN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルを、標的上の反応性アミノ基と反応させることである。ヌクレオチドは、例えば、ヌクレオ塩基上の、アリルアミン基の組入れにより、反応性アミノ基を保有するように修飾することができる。アリルアミンを介する標識付けについては、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,476,928号及び同第5,958,691号において記載されている。ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、及びポリヌクレオチドを、蛍光標識付けする他の手段は、当業者によく知られている。

10

【0109】

他の蛍光発生手法は、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,436,134号及び同第5,658,751号において開示される通り、任意の遺伝子発現産物から増幅されたDNAと共に挿入されると、蛍光を発する、SYBR-green色素など、一般的な検出システムの使用を含む。

20

【0110】

標的遺伝子発現レベルを決定するための、別の有用な方法は、異なる整理学的条件の間の、遺伝子発現レベルの差違、又は発生時に、若しくは疾患進行の経過にわたり生じる変化を含む、トランスクリプトーム解析のために使用される、強力な解析ツールである、RNA-seqを含む。

【0111】

遺伝子発現レベルを決定するための、別の手法は、マイクロアレイ、例えば、当技術分野でよく知られている、RNAマイクロアレイ及びDNAマイクロアレイの使用を含む。マイクロアレイを使用して、多数の遺伝子の発現を、同時に定量することができる。

【0112】

(2) JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達の活性を決定するための、一般的ワークフロー

30

JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達の活性を、対象から単離された試料から推測するための工程を例示的に図解するフローチャートを、図3に示す。第1に、試料からmRNAを単離する(11)。第2に、当技術分野で知られている、遺伝子発現を測定するための方法を使用して、本明細書で記載される、少なくとも3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の固有のセットのmRNA発現レベルを測定する(12)。次に、3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の発現レベルを、JAK-STAT1/2TFエレメントの活性レベルと関連付ける、較正された数学的経路モデル(14)を使用して、JAK-STAT1/2転写因子(TF)エレメントの活性レベル(13)を決定する。最後に、対象の試料中の、JAK-STAT1/2TFエレメントの、決定された活性レベルに基づき、対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を推測する(15)。例えば、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路を、活性が、ある特定の閾値を上回れば、活性であると決定し、活性が、ある特定の閾値を下回れば、不活性であると類別することができる。

40

【0113】

(3) 較正された数学的経路モデル

本明細書で想定される通り、本明細書で記載される、3つ又はこれを超えるJAK-STAT1/2標的遺伝子の固有のセットの発現レベルは、本明細書でさらに記載される、較正された数学的経路モデルを使用して、JAK-STAT1/2TFエレメントの活

50

性レベルを決定するのに使用される。較正された数学的経路モデルは、3つ又はこれを超える J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子の発現レベルを、J A K - S T A T 1 / 2 T F エレメントの活性レベルへと関連付ける。

【 0 1 1 4 】

本明細書で想定される通り、較正された数学的経路モデルは、数学的経路モデルの適用に基づく。例えば、較正された数学的経路モデルは、確率モデル、例えば、ベイジアンネットワークモデル、又は線形モデル若しくは疑似線形モデルに基づきうる。

【 0 1 1 5 】

ある実施形態では、較正された数学的経路モデルは、J A K - S T A T 1 / 2 T F エレメントと、3つ又はこれを超える J A K - S T A T 1 / 2 標的遺伝子の発現レベルとを関連付ける、条件付き確率関係を組み込む確率モデルである。ある実施形態では、確率モデルは、ベイジアンネットワークモデルである。

10

【 0 1 1 6 】

代替的实施形態では、較正された数学的経路モデルは、線形モデルの場合もあり、疑似線形モデルの場合もある。ある実施形態では、線形モデル又は疑似線形モデルは、本明細書でさらに記載される、線形結合モデル又は疑似線形結合モデルである。

【 0 1 1 7 】

較正された数学的経路モデルを作出するための工程を、図4を例示的に図解するためのフローチャートに示す。最初のステップとして、mRNA発現レベルのトレーニングデータを、収集し、正規化する。データは、例えば、当技術分野で知られている、マイクロアレイプローブセットの強度(101)、リアルタイムPCRのCq値(102)、RNAseqの生リード(103)、又は代替的測定モダリティー(104)を使用して収集することができる。次いで、発現レベルの生データを、各方法に応じて、それぞれ、正規化アルゴリズム、例えば、フローズンロバストマルチアリー解析(fRMA)又はMAS5.0を使用する正規化(111)、基準遺伝子の平均Cqに照らした正規化(112)、リードの、マッピングされたリード100万当たりの転写物1キロベース当たりのリード/フラグメント量(RPKM/FPKM)への正規化(113)、又は基準遺伝子/タンパク質に照らした正規化(114)を使用する正規化により正規化することができる。この正規化手順は、各方法に応じて、それぞれ、正規化されたプローブセットの強度(121)、正規化されたCq値(122)、正規化されたRPKM/FPKM(123)、又は正規化された測定値(124)をもたらす、これらは、トレーニング試料中の標的遺伝子発現レベルを指し示す。

20

30

【 0 1 1 8 】

トレーニングデータを正規化したら、1つ又は複数のトレーニング試料ID(131)を得、これらの特異的試料のトレーニングデータを、遺伝子発現を決定するための方法のうちの一つから得る(132)。トレーニング試料からの、最終的な遺伝子発現結果を、トレーニングデータ(133)として出力する。多様なトレーニング試料に由来するデータ(例えば、閾値、例えば、確率的ネットワーク又はベイジアンネットワークの場合のCPT、例えば、線形モデル又は疑似線形モデルの場合の重みなどを含む)の全てを組み込んで、モデルを較正する(144)。加えて、経路の標的遺伝子及び測定ノード(141)を使用して、例えば、図2に記載されるモデル構造を作出する(142)。次いで、結果として得られる、経路のモデル構造(143)を、トレーニングデータ(133)と共に組み込んで、モデルを較正するが(144)、ここで、標的遺伝子の遺伝子発現レベルは、転写因子エレメントの活性を示す。トレーニング試料中の、TFエレメントの決定の結果として、較正された経路モデル(145)を作出し、これにより、トレーニング試料中の標的遺伝子発現レベルに基づき、その後検討される関心のある試料、例えば、がんを伴う対象に由来する試料のJ A K - S T A T 1 / 2 細胞シグナル伝達経路活性に割り当てる。

40

【 0 1 1 9 】

(4) TFエレメントの決定

50

TFエレメントの活性レベルを決定するための工程を例示的に図解するフローチャートを、図5に示す。対象から抽出された試料に由来する発現レベルのデータ(被験データ)(163)を、校正された数学的経路モデル(145)へと入力する。数学的経路モデルは、確率モデル、例えば、ベイジアンネットワークモデル、線形モデル、又は疑似線形モデルである。

【0120】

数学的経路モデルは、JAK-STAT1/2 TFエレメントと、対象の試料中で測定される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ若しくはこれを超える標的遺伝子の発現レベルとを関連付ける条件付き確率に基づく確率モデル、例えば、ベイジアンネットワークモデルであるか、又は対象の試料中で測定される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の3つ若しくはこれを超える標的遺伝子の発現レベルの1つ若しくは複数の線形結合に基づく。特に、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性の決定は、その内容が、それらの全体において本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第WO2013/011479A2号(「標的遺伝子発現の確率モデル化を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)において開示される通りに実施される。略述すると、データを、ベイジアンネットワーク(BN)推測エンジン判定(例えば、BNTツールボックス)へと入力する(154)。これは、BN内の全てのノードの、計算された周辺BN確率についての値のセット(155)をもたらす。これらの確率から、転写因子(TF)ノードの確率を決定し(156)、TFエレメントの活性レベル(157)を確立する。

【0121】

代替的に、数学的モデルは、線形モデルである。例えば、線形モデルは、その内容が、それらの全体において本明細書に組み込まれる、国際特許出願公開第WO2014/102668A2号(「標的遺伝子発現の線形結合を使用する、細胞シグナル伝達経路活性の評価」)において記載される通りに使用されうる。標的遺伝子発現の数学的モデル化を使用して、細胞シグナル伝達経路活性を計算/決定することに関する、さらなる詳細はまた、Verhaegh W.ら、「Selection of personalized patient therapy through the use of knowledge-based computational models that identify tumor-driving signal transduction pathways」、Cancer Research、74巻、11号、2014年、2936~2945頁においても見出されうる。略述すると、データを、計算された重み付け線形結合スコア(w/c)へと入力する(151)。これは、計算された重み付け線形結合スコアのための値のセット(152)をもたらす。これらの重み付け線形結合スコアから、転写因子(TF)ノードの重み付け線形結合スコアを決定し(153)、TFエレメントの活性レベル(157)を確立する。

【0122】

(5) 離散可観測のための手順

対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を、離散可観測として推測するための工程を、図6を例示的に図解するためのフローチャートに示す。まず、被験試料を抽出し、被験試料ID(161)を与える。次に、mRNAの発現レベルについての被験データを収集し、正規化する(162)。被験データは、図5で、トレーニング試料について論じたのと同じ方法を使用して、マイクロアレイプローブセットの強度(101)、リアルタイムPCRのCq値(102)、RNAseqの生リード(103)、又は代替的測定モダリティ(104)を使用して収集することができる。次いで、発現レベルの生データを、各方法に応じて、それぞれ、アルゴリズム、例えば、fRMA又はMAS5.0を使用する正規化(111)、基準遺伝子の平均Cqに照らした正規化(112)、リードの、RPKM/FPKMへの正規化(113)、及び基準遺伝子/タンパク質に照らした正規化(114)を使用する正規化により正規化することができる。この正規化手順は、各方法に応じて、それぞれ、正規化されたプローブセットの強度(1

21)、正規化されたCq値(122)、正規化されたRPKM/FPKM(123)、又は正規化された測定値(124)をもたらす。

【0123】

被験データを正規化したら、結果として得られる被験データ(163)を、較正された数学的経路モデル(145)に基づく閾値化ステップ(164)において解析する結果として、閾値化された被験データ(165)をもたらす。1つの非限定的な例では、離散可観測量を使用すると、ある特定の閾値を上回るあらゆる発現には、例えば、1の値を与え、閾値を下回る値には、0の値を与えるか、又は、代替的实施形態では、本明細書に記載される閾値を上回る確率質量を、閾値化された値として使用する。較正された数学的経路モデルに基づくと、この値は、TFエレメントの活性レベル(157)を表し、次いで、これをを使用して、細胞シグナル伝達経路の活性を計算する(171)。最終的な出力は、対象における、細胞シグナル伝達経路の活性(172)をもたらす。

10

【0124】

(6) 連続可観測量のための手順

対象におけるJAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性を、連続可観測量として推測するための工程を、図7を例示的に図解するためのフローチャートに示す。まず、被験試料を抽出し、被験試料ID(161)を与える。次に、mRNAの発現レベルについての被験データを収集し、正規化する(162)。被験データは、図5で、トレーニング試料について論じたのと同じ方法を使用して、マイクロアレイプローブセットの強度(101)、リアルタイムPCRのCq値(102)、RNAseqの生リード(103)、又は代替的測定モダリティ(104)を使用して収集することができる。次いで、発現レベルの生データを、各方法に応じて、それぞれ、アルゴリズム、例えば、fRMA(111)、基準遺伝子の平均Cqに照らした正規化(112)、リードの、RPKM/FPKMへの正規化(113)、又は基準遺伝子/タンパク質に照らした正規化(114)を使用する正規化により正規化することができる。この正規化手順は、各方法に応じて、それぞれ、正規化されたプローブセットの強度(121)、正規化されたCq値(122)、正規化されたRPKM/FPKM(123)、又は正規化された測定値(124)をもたらす。

20

【0125】

被験データを正規化したら、結果として得られる被験データ(163)を、較正された数学的経路モデル(145)により解析する。1つの非限定的な例として、連続可観測量を使用すると、本明細書で、さらに詳細に記載される通り、シグモイド関数を使用して、発現レベルを、0~1の間の値へと転換する。本明細書に記載されるTFエレメントの決定を使用して、被験データを、較正された数学的経路モデルと組み合わせて解釈すると、結果として得られる値は、TFエレメントの活性レベル(157)を表し、次いで、これをを使用して、細胞シグナル伝達経路の活性(171)を計算する。最終的な出力は、対象における、細胞シグナル伝達経路の活性(172)をもたらす。

30

【0126】

(7) 標的遺伝子発現レベルの決定手順

標的遺伝子発現レベルを、対象から抽出された試料から導出するための工程を、例示的に図解するフローチャートを、図8に示す。例示的な実施形態では、試料を、検査室で受領し、登録する。試料は、例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料(181)又は新鮮凍結(FF)試料(180)を含みうる。FF試料は、直接溶解させることができる(183)。FFPE試料については、プロテイナーゼK添加時における、加熱インキュベーションステップにより、パラフィンを除去することができる(182)。次いで、細胞を溶解させ(183)、これにより、細胞膜及び核膜を破壊し、これにより、核酸(NA)を、さらなる加工のために利用可能とする。核酸を、例えば、ビーズ又はフィルターでありうる固相へと結合させる(184)。次いで、核酸を、洗浄緩衝液で洗浄して、溶解の後で存在する、全ての細胞破砕物を除去する(185)。次いで、清浄な核酸を、溶離緩衝液により、固相から引き離す(186)。DNAを、DNアーゼ処理に

40

50

より除去して、RNAだけが、試料中に存在することを確保する(187)。次いで、核酸試料を、RT-qPCR試料ミックス中で、直接使用することができる(188)。RT-qPCR試料ミックスは、RNA試料、cDNAを、RNA試料から調製するRT酵素、及びcDNAを増幅するPCR酵素、酵素の機能を確認する緩衝液を含有し、潜在的に、一定の濃縮物容量を設定するための分子グレードの水を含有しうる。次いで、試料ミックスを、乾燥RT-qPCRアッセイを含有する、マルチウェルプレート(すなわち、96ウェル又は384ウェルプレート)へと添加することができる(189)。次いで、指定されたプロトコールに従い、PCRマシン内で、RT-qPCRを作動させることができる(190)。例PCRプロトコールは、i)50で、30分間；ii)95で、5分間；iii)95で、15秒間；iv)60で、45秒間；v)ステップii及びivを反復する50サイクルを含む。次いで、生データに対して、二次導関数法を使用することにより、Cq値を決定する(191)。解析のために、Cq値をエクスポートする(192)。

【0127】

(8) JAK-STAT1/2に媒介される疾患及び障害、並びに処置の方法

本明細書で想定される通り、本発明の方法及び装置を活用して、対象、例えば、疾患若しくは障害を有することが疑われるか、又はこれを有する対象における、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性について評価することができ、ここで、JAK-STAT1/2シグナル伝達経路の状態は、疾患の存在又は進行の、全体的又は部分的な証拠となる。ある実施形態では、本明細書では、対象を処置する方法であって、処置する方法は、本明細書に記載される方法を使用して、対象から抽出された試料から導出される、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性状態に関する情報を受信するステップと、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路の活性に関する情報が、活性のJAK-STAT1/2シグナル伝達経路を示す場合、対象へと、JAK-STAT1/2阻害剤を投与するステップとを含む、処置する方法が提示される。特定の実施形態では、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路活性の指数は、JAK-STAT1/2細胞シグナル伝達経路が活性であるオッズについての、10:1、5:1、4:1、2:1、1:1、1:2、1:4、1:5、1:10のカットオフ値に設定される。

【0128】

JAK-STAT1/2経路は、例えば、胃食道接合部がん、肝細胞癌、肺癌、及び胃癌、並びにがん駆動経路としての活性JAK-STAT1/2シグナル伝達経路を有する、他のがん型及びがん亜型など、多様ながん型、炎症性腸疾患、関節リウマチ、乾癬、SLE、多発性硬化症などの免疫系媒介性疾患、並びに喘息、アテローム性動脈硬化、糖尿病などの炎症性疾患、うつ病及び統合失調症などの精神疾患、座瘡、子宮内膜症など、多数の疾患において役割を果たす。このような疾患に関して、組織内及び血液中の免疫細胞型における、JAK-STAT1/2経路活性プロファイルを測定することは、診断し、亜型分類し、免疫調節療法、とりわけ、免疫抑制療法、及びターゲティングされた免疫抑制療法への応答を予測し、かつ/又はこれをモニタリングし、免疫応答状態をモニタリングするのに有用であることが期待される。薬物に対する応答の予測を使用して、抗STAT1/2経路薬物を、患者へとマッチさせることができる。例えば、統合失調症(フェーズIVの臨床試験)、子癇前症(フェーズI)、高脂血症(フェーズI/II/III/IV)、肝硬変(フェーズII/III)、胃食道接合部がん(フェーズIV)、骨髄性白血病(フェーズI/II)、肺炎(フェーズ0)のための処置としての、抗STAT1薬であるプラバスタチン、関節リウマチ(フェーズI/II/III)、若年性特発性関節炎(フェーズI/II/III)、乾癬(フェーズI/II/III)、強直性脊椎炎(フェーズII)、乾性角結膜炎(フェーズII)、潰瘍性大腸炎(フェーズIII)の処置のためのトファシチニブ、肝細胞癌、肺癌、及び胃癌(フェーズI)、本態性血小板血症及び真性赤血球増加症後骨髄線維症(フェーズI)の処置のためのAZD、並びに頭頸部がんの処置のためのオリゴデオキシヌクレオチドデコイ(フェーズ0)である(また、Miklossy G.ら、「Therapeutic modulators

10

20

30

40

50

of STAT signaling for human diseases」、Nature Reviews Drug Discovery、12巻、8号、2013年8月、611～629頁も参照されたい)。

【0129】

本出願は、いくつかの好ましい実施形態について記載する。前出の詳細な記載を読み、理解すれば、他の研究者らは、改変及び変更に想到する。本出願は、それらが、付属の特許請求の範囲又はそれらの同等物の範囲内に収まる限りにおいて、全てのこのような改変及び変更を含むものとみなされる。

【0130】

開示される実施形態に対する、他の変動も、図面、本開示、及び付属の特許請求の範囲の検討から、当業者により理解され、特許請求された本発明の実施においてなされうる。

【0131】

特許請求の範囲では、「～を含むこと」という語は、他の要素又はステップを除外せず、単数形は、複数形を除外しない。

【0132】

単一のユニット又はデバイスは、特許請求の範囲において列挙された、いくつかの項目の機能を果たす。ある特定の手段が、互いに異なる従属請求項内に列挙されるという事実だけで、これらの手段の組合せを使用しても有利でありえないことが指し示されるわけではない。

【0133】

1つ又はいくつかのユニット又はデバイスにより実施される、危険性スコアの決定などの計算は、他の任意の数のユニット又はデバイスにより実施することができる。

【0134】

コンピュータプログラムは、光学記憶媒体又は半導体媒体など、適切な媒体上に保存/分配され、他のハードウェアと併せて、又はこの一部として供給されるが、また、インターネット又は他の有線若しくは無線の通信システムなど、他の形態でも供給される。

【0135】

[実施例5]

本出願において使用される配列表

配列表：

配列番号	遺伝子：
配列番号 1	B I D
配列番号 2	G N A Z
配列番号 3	I R F 1
配列番号 4	I R F 7
配列番号 5	I R F 8
配列番号 6	I R F 9
配列番号 7	L G A L S 1
配列番号 8	N C F 4
配列番号 9	N F A M 1
配列番号 10	O A S 1
配列番号 11	P D C D 1
配列番号 12	R A B 3 6
配列番号 13	R B X 1
配列番号 14	R F P L 3
配列番号 15	S A M M 5 0
配列番号 16	S M A R C B 1
配列番号 17	S S T R 3
配列番号 18	S T 1 3
配列番号 19	S T A T 1

10

20

30

40

50

配列番号 2 0 T R M T 1
配列番号 2 1 U F D 1 L
配列番号 2 2 U S P 1 8
配列番号 2 3 Z N R F 3

【 図 1 】

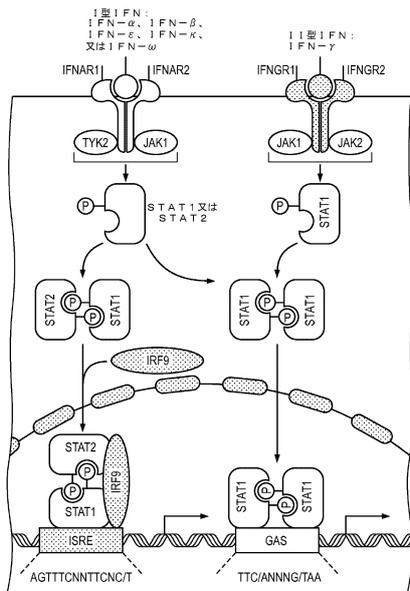


図 1

【 図 2 】

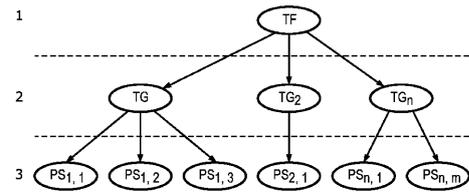


FIG. 2

【 図 3 】

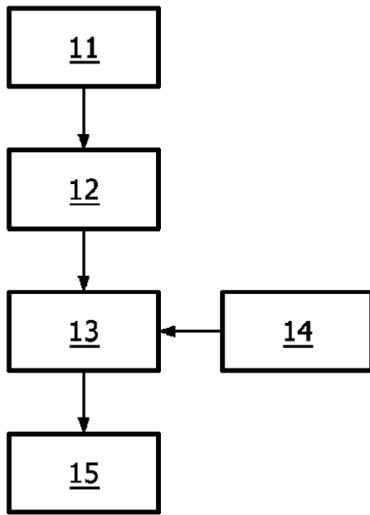


FIG. 3

【 図 4 】

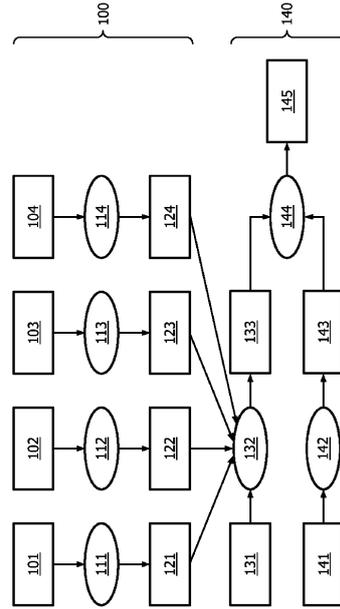


FIG. 4

【 図 5 】

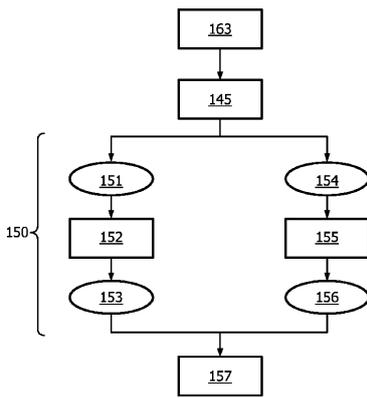


FIG. 5

【 図 6 】

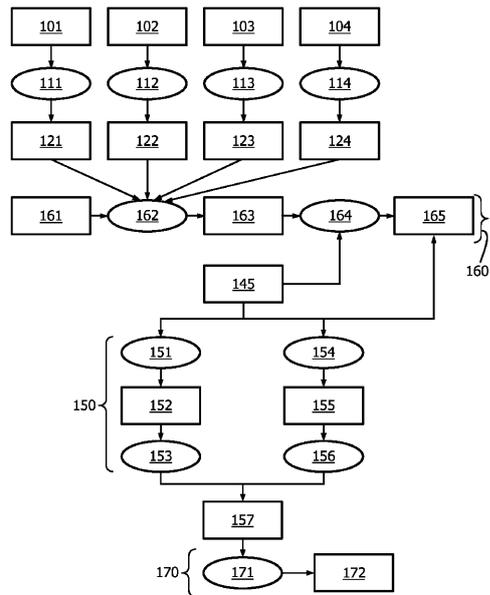


FIG. 6

【 7 】

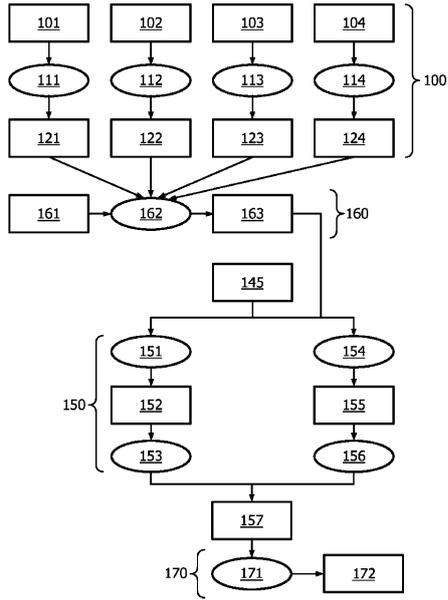


FIG. 7

【 8 】

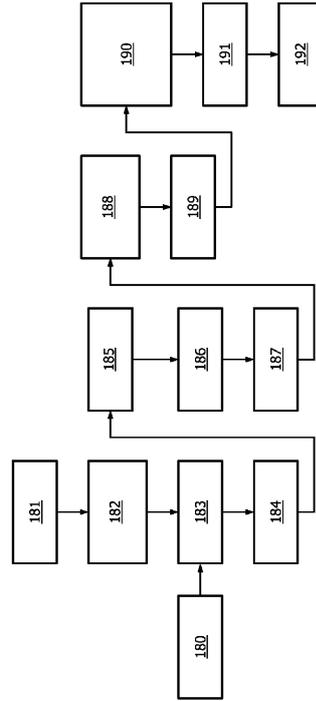


FIG. 8

【 9 】

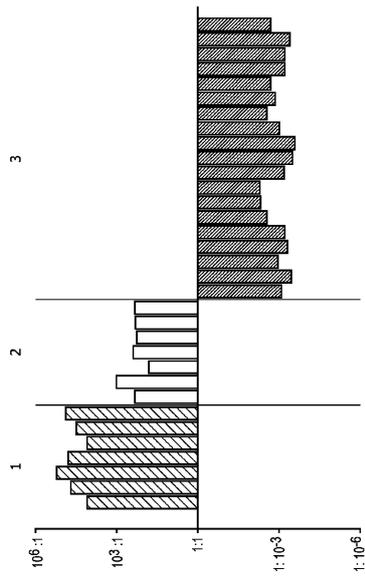


FIG. 9

【 10 】

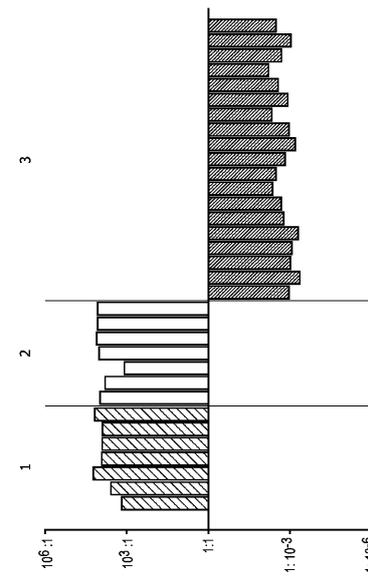


FIG. 10

【 1 1】

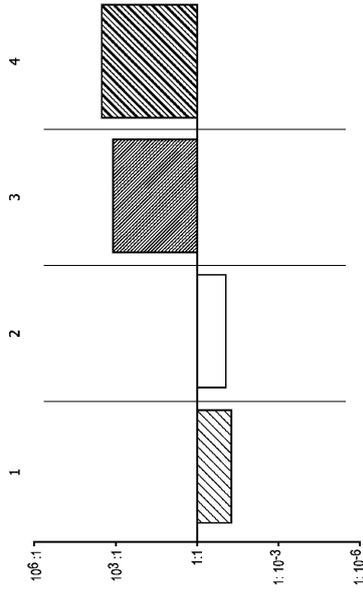


FIG. 11

【 1 2】

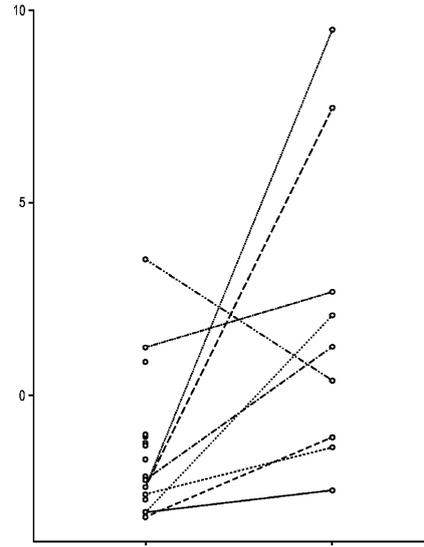


FIG. 12

【 1 3】

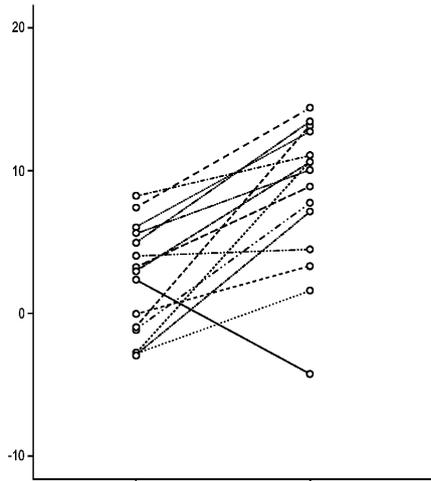


FIG. 13

【 1 4】

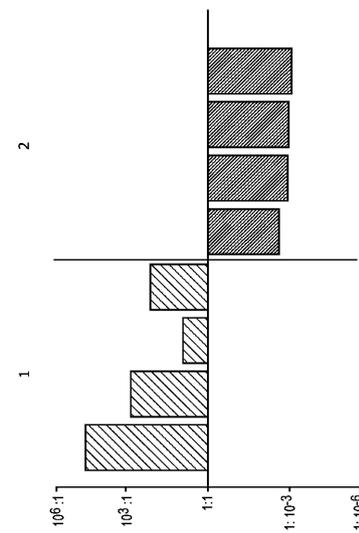


FIG. 14

【 15 】

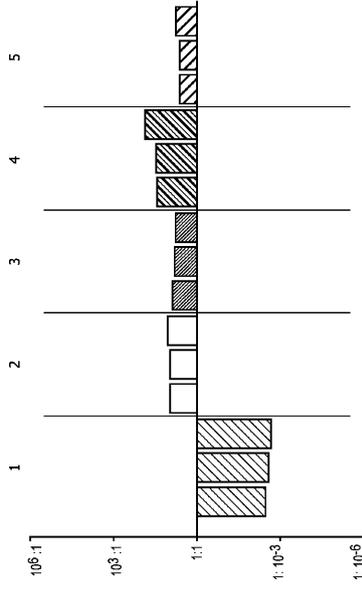


FIG. 15

【 16 】

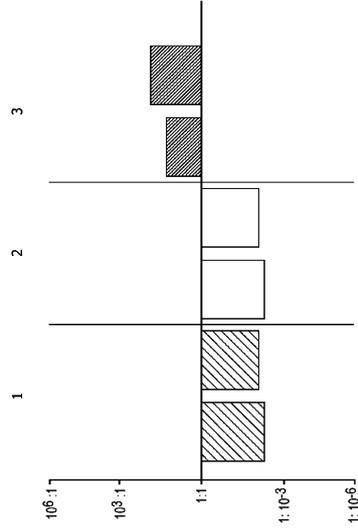


FIG. 16

【 17 】

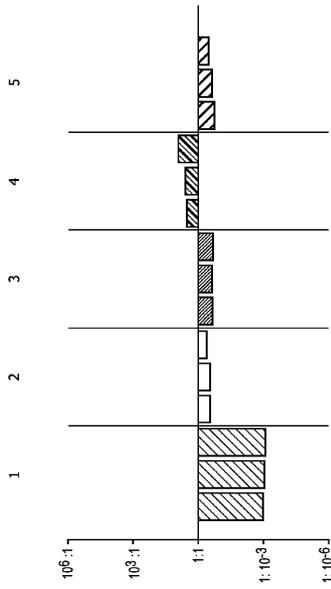


FIG. 17

【 18 】

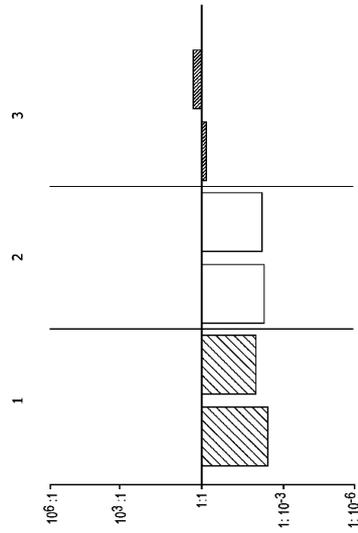


FIG. 18

【 図 19 】

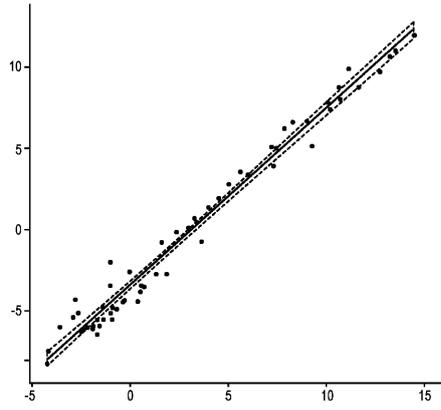


FIG. 19

【 図 20 】

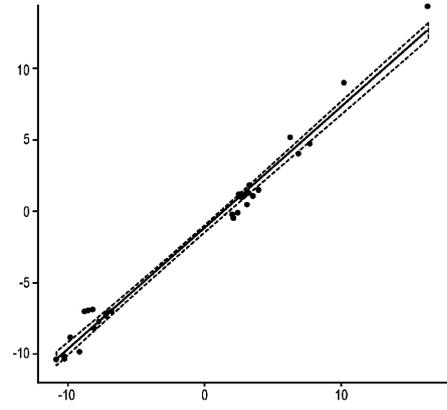


FIG. 20

【 図 21 】

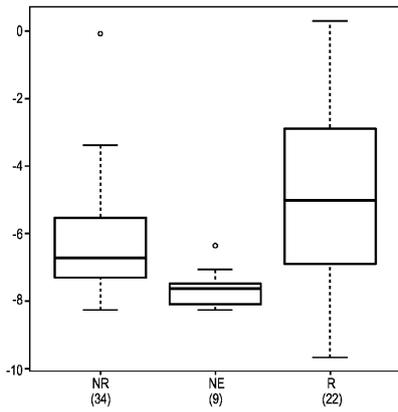


FIG. 21

【配列表】

0006931125000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 フェルハーフ ウィルヘルムス フランシスクス ヨハネス
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 5
- (72)発明者 ドウ メン
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 5
- (72)発明者 ファン デ ストルブ アニア
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 5
- (72)発明者 ヴェルター リック
オランダ国 5 6 5 6 アーエー アインドーフエン ハイ テック キャンパス 5

審査官 小金井 悟

- (56)参考文献 特表2014-520566(JP,A)
特表2016-509472(JP,A)
国際公開第2016/062891(WO,A1)
Nat. Rev. Immunol., 2005年 5月, Vol.5, No.5, pp.375-386
Cellular Signalling, 2010年, Vol.22, pp.97-105

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 3/00

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)