

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6389122号
(P6389122)

(45) 発行日 平成30年9月12日(2018.9.12)

(24) 登録日 平成30年8月24日(2018.8.24)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A Y
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 A
請求項の数 20 (全 39 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2014-530245 (P2014-530245)	(73) 特許権者	514063825
(86) (22) 出願日	平成24年9月14日(2012.9.14)		ノグラ ファーマ リミテッド
(65) 公表番号	特表2014-531584 (P2014-531584A)		アイルランド国 2, ダブリン, サー
(43) 公表日	平成26年11月27日(2014.11.27)		ジョン ロジャーソンズ キー 33
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/068146	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02013/037970		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成25年3月21日(2013.3.21)	(74) 代理人	100113413
審査請求日	平成27年9月8日(2015.9.8)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	11425234.9	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成23年9月15日(2011.9.15)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100181641
(31) 優先権主張番号	61/576,556		弁理士 石川 大輔
(32) 優先日	平成23年12月16日(2011.12.16)	(74) 代理人	230113332
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁護士 山本 健策
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗SMAD7治療に対する応答性をモニターするための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1種の細胞集団の量における調節を、少なくとも1種の抗SMAD7治療での処置に対する、炎症性腸疾患 (IBD) を有する被験体の応答性の指標として使用する方法であって、前記方法は、

前記被験体から得られた少なくとも1つのサンプルにおいて、CCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A+ T細胞からなる群より選択される少なくとも1種の細胞集団の量を決定する工程、を包含し、

ここで、前記少なくとも1種の細胞集団の既知のコントロールレベルと比較した前記少なくとも1種の細胞集団の量における調節は、前記抗SMAD7治療に対する、IBDを有する前記被験体の応答性を示す、方法。

【請求項2】

前記少なくとも1種の細胞集団の量における調節が、以下：

CCR9+ FoxP3+ T細胞の量における増大は、前記被験体が前記抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9+ IFN- + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9 + IL17A + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

FoxP3 + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

IFN - + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；および

IL17A + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す、

のうちの2つまたはそれより多くを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

少なくとも1種の細胞集団の量における調節を、少なくとも1種の抗SMA D 7治療での処置に対する、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の応答性の指標として使用する方法であって、前記方法は、

前記被験体から得られた少なくとも1つのサンプルにおいて、CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞およびIL17A + T細胞からなる群より選択される少なくとも1種の細胞集団の量を決定する工程、を包含し、

ここで、前記少なくとも1種の細胞集団の量における調節は、以下：

CCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9 + IFN - + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9 + IL17A + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

FoxP3 + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

IFN - + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；および

IL17A + T細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗SMA D 7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す、

のうちの1つまたはそれより多くを含み、

ここで、前記少なくとも1種の細胞集団の量における調節は、前記少なくとも1種の細胞集団の既知のコントロールレベルと比較したものである、方法。

【請求項4】

インビトロで行われる、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記被験体は、前記少なくとも1つのサンプルが得られるときに、少なくとも1種の抗SMA D 7治療を受けている最中である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記炎症性腸疾患（IBD）は、クローン病（CD）および/もしくは潰瘍性大腸炎（UC）である、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

CCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大、CCR9 + IFN - + T細胞の量における減少、CCR9 + IL17A + T細胞の量における減少、FoxP3 + T細胞の量における減少、IFN - + T細胞の量における減少またはIL17A + T細胞の量における減少のうちの少なくとも1つは、前記被験体が寛解に入る可能性があることを示す、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記少なくとも1つのサンプルは、血液サンプルもしくは組織サンプルである、請求項

10

20

30

40

50

1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記組織サンプルは、前記被験体の胃・腸管に由来する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記少なくとも1種の細胞集団の量は、フローサイトメトリーによって、免疫組織化学によって、および/もしくはRNA/DNA分析によって決定される、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

フローサイトメトリーおよび/もしくは免疫組織化学は、抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN-抗体および抗IL17A抗体からなる群より選択される抗体を使用して行われる、請求項10に記載の方法。

10

【請求項12】

前記コントロールレベルは、少なくとも1種の抗SMAD7治療の投与の前に前記被験体から得られるか、または少なくとも1種の抗SMAD7治療の投与の直後に得られる少なくとも1種の細胞集団のベースラインレベルである、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記少なくとも1種の抗SMAD7治療は、抗SMAD7アンチセンス治療である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記抗SMAD7アンチセンス治療は、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号9からなる群より選択される抗SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項13に記載の方法。

20

【請求項15】

少なくとも1種の抗SMAD7治療での処置に対する、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の応答性を予測および/もしくはモニターすること、少なくとも1種の抗SMAD7治療での処置に対する、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の適切性を決定すること、被験体が抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、もしくは応答性であることを決定すること、そして/あるいは被験体が抗SMAD7治療の後に寛解に入る可能性があるか否かを決定することのためのキットであって、CCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A+ T細胞からなる群から選択される少なくとも1種の細胞集団を同定するための、抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN-抗体および抗IL17A抗体からなる群から選択される少なくとも2種の抗体、またはタンパク質細胞マーカーをコードするRNAの発現を検出するための試薬を含むキット。

30

【請求項16】

FACS技術を使用して細胞を同定し、選別し、計数するための緩衝液、試薬、および詳細な指示書のうちの少なくとも1つをさらに含む、請求項15に記載のキット。

【請求項17】

前記少なくとも2つの抗体は、CCR9タンパク質に対する一次抗体、FoxP3タンパク質に対する一次抗体、IFN-に対する一次抗体、IL17Aに対する一次抗体、およびレポーター酵素に対して結合体化される二次抗体であり、そして前記キットは、免疫組織化学を使用して細胞集団を同定するための少なくとも緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む、請求項15に記載のキット。

40

【請求項18】

CCR9タンパク質に対する捕捉抗体、FoxP3タンパク質に対する検出抗体、IFN-に対する検出抗体、IL17Aに対する検出抗体および/もしくはレポーター酵素に結合体化される二次抗体を含み；そしてELISA技術を使用して細胞集団を同定するための緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む、請求項17に記載

50

のキット。

【請求項 19】

少なくとも1種の抗SMA D7治療での処置に対する、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の応答性を予測および/もしくはモニターすること、少なくとも1種の抗SMA D7治療での処置に対する、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の適切性を決定すること、被験体が抗SMA D7治療に対して応答する可能性があるか、もしくは応答性であることを決定すること、そして/あるいは被験体が抗SMA D7治療の後に寛解に入る可能性があるか否かを決定することのための、CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞およびIL17A + T細胞から選択される少なくとも1種の細胞集団を同定する方法における使用のための組成物であって、前記組成物は、抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN - 抗体および/または抗IL17A抗体のうちの少なくとも2種を含む、組成物。

10

【請求項 20】

前記少なくとも1つのサンプルが、前記被験体から得られた末梢血サンプルである、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

参考文献への相互参照

20

この出願は、2011年9月15日に提出された欧州出願第11425234.9号の利益および2011年12月16日に提出された米国出願第61/576,556号（これらの完全な開示は、全ての目的のために、参考としてこの出願に援用される。）の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

（背景）

炎症性腸疾患（IBD）は、米国において約100万人の患者が罹患している胃・腸管の慢性炎症性障害である。IBDの2つの最も一般的な形態は、クローン病（CD）および潰瘍性大腸炎（UC）である。CDは、胃・腸管全体に影響を及ぼし得るが、それは、回腸（ileum）（小腸の遠位もしくは下部）および大腸に主に影響を与える。UCは、結腸および直腸に主に影響を与える。CDおよびUC両方のための現在の処置は、アミノサリチレート（例えば、5-アミノサリチル酸、スルファサラジンおよびメサラミン）、抗生物質（例えば、シプロフロキサシンおよびメトロニダゾール）、コルチコステロイド（例えば、ブデソニドもしくはプレドニゾン）、免疫抑制剤（例えば、アザチオプリンもしくはメトトレキサート）および腫瘍壊死因子（TNF）アンタゴニスト（例えば、インフリキシマブ（レミケード（登録商標）））を含む。これら治療に対する患者の応答は、疾患の重篤度に伴って変動し、活動性の炎症および寛解のサイクルにわたって変動し得る。さらに、IBDのための現在の治療のうちの多くは、望ましくない副作用と関連する。

30

40

【0003】

CDおよびUCの病因は未知であるが、その両方が、腸粘膜の炎症性疾患と考えられる。近年の研究から、TGF - 1は、腸粘膜炎症を制御し得る強力な免疫調節因子として作用することが実証された。TGF - 1は、2つのサブユニット、TGF - 1 R1およびTGF - 1 R2を含むヘテロダイマー膜貫通セリン/スレオニンキナーゼレセプターを結合する。リガンド結合の際に、上記TGF - 1 R1レセプターは、構成的に活性化されたTGF - 1 R2レセプターによってリン酸化され、シグナルは、SMA Dファミリーに属するタンパク質によって核へと伝達される。活性化されたTGF - 1 R1は、SMA D2およびSMA D3タンパク質を直接リン酸化し、それらは次いで、SMA D4と相互作用する。SMA D2 / SMA D3 / SMA D4の複合体は、核へと転位し

50

、特定の遺伝子の転写を調節する。

【0004】

さらなる研究から、別のSMA Dタンパク質であるSMA D7はまた、炎症において役割を果たすことが示された。SMA D7(細胞内タンパク質)は、TGF-1R1へのSMA D2/SMA D3の結合に干渉し、これらタンパク質のリン酸化および活性化を妨げることが示された。さらに、SMA D7タンパク質の増大した発現は、TGF-1媒介性シグナル伝達の阻害と関連する。IBD患者の粘膜サンプルは、高レベルのSMA D7およびリン酸化SMA D3の減少したレベルによって特徴付けられ、このことは、TGF-1媒介性シグナル伝達がこれら患者において損なわれていることを示す。

【0005】

近年の研究は、IBDに罹患している患者を処置するための標的として、SMA D7に焦点を当ててきた。このような治療は、抗SMA D7アンチセンス治療を含む。よって、抗SMA D7治療での処置に应答する可能性がある(もしくは可能性が低い)患者を同定するために使用され得る推定バイオマーカーに基づく方法が、必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(要旨)

本発明は、炎症性腸疾患(IBD)(例えば、クローン病もしくは潰瘍性大腸炎)に罹患している被験体(例えば、ヒト患者)の生物学的(例えば、血液もしくは組織)サンプル中の特定のT細胞集団の調節(例えば、増大したCCR9+FoxP3+T細胞、減少したCCR9+IFN-陽性(IFN-+)T細胞、減少したCCR9+IL17A+T細胞、減少したFoxP3+T細胞、減少したIFN-+T細胞および/もしくは減少したIL17A+T細胞)が、抗SMA D7治療での処置に対する感受性と相関するという発見に一部基づく。

【0007】

IBD患者が抗SMA D7治療での処置に应答する可能性があるか否かを、処置の開始前もしくは開始直後に予測し得ることは有利であるということが認識される。本明細書に記載されるとおりの細胞集団の調節は、IBDを有する被験体の、抗SMA D7治療での処置の効力を予測する。有利なことには、本発明の方法は、有効な治療を選択するにあたって医師を最終的に補助し、患者の疾患状態における改善、良好なメディカルケアおよび患者全体のコストの減少をもたらす。

【0008】

よって、第1の局面において、本発明は、炎症性腸疾患(IBD)を有する被験体の、少なくとも1種の抗SMA D7治療での処置に対する应答性を決定するための方法を提供し、上記方法は、

上記被験体から得られた少なくとも1つのサンプルにおいて、CCR9+FoxP3+T細胞、CCR9+IFN-+T細胞、CCR9+IL17A+T細胞、FoxP3+T細胞、IFN-+T細胞およびIL17A+T細胞からなる群より選択される少なくとも1種の細胞集団の量を決定する工程、

を包含し、ここで上記少なくとも1種の細胞集団の既知のコントロールレベルと比較して上記少なくとも1つのサンプル中の上記細胞集団CCR9+FoxP3+T細胞の増大した量、および/または細胞集団CCR9+IFN-+T細胞、CCR9+IL17A+T細胞、FoxP3+T細胞、IFN-+T細胞およびIL17A+T細胞のうちの少なくとも1種の減少した量は、上記抗SMA D7治療に対する、上記IBDを有する被験体の应答性を予測する。

【0009】

「被験体の应答性を決定すること」は、IBDを有する被験体の、少なくとも1種の抗SMA D7治療での処置に対する有効性もしくは应答性を予測もしくはモニターすることを含むことは、認識されるべきである。

10

20

30

40

50

【0010】

適切なことには、上記サンプルは、生物学的サンプルである。

【0011】

本発明の方法の好ましい実施形態において、以下のうちの2種以上の調節の同定は、上記被験体の、上記治療への応答性を決定することを補助し得る：

CCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大は、上記被験体が上記抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9 + IFN- + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9 + IL17A + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

FoxP3 + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

IFN- + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；および

IL17A + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMAD7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す。

【0012】

第1の好ましい実施形態において、上記細胞集団は、CCR9 + FoxP3 + T細胞である。第2の好ましい実施形態において、上記細胞集団は、CCR9 + IFN- + T細胞である。第3の好ましい実施形態において、上記細胞集団は、CCR9 + IL17A + T細胞である。第4の好ましい実施形態において、上記好ましい細胞集団は、FoxP3 + T細胞である。第5の好ましい実施形態において、上記細胞集団は、IFN- + T細胞である。第6の好ましい実施形態において、上記細胞集団は、IL17A + T細胞である。他の好ましい細胞集団は、FoxP3 + CD103 + T細胞、CD103 + T細胞もしくはインテグリン 4 7 + T細胞のうちのいずれかである。

【0013】

適切なことには、本発明の方法は、インビボで行われ得る。

【0014】

好ましくは、本発明の方法において、上記量を決定する工程は、IBDに罹患している被験体からサンプルを得る工程の前にあり得る。上記サンプルは、採血するか、または組織生検を行うことによって採取され得る。

【0015】

適切なことには、上記被験体は、上記少なくとも1つのサンプルが上記被験体から得られるときに、少なくとも1種の抗SMAD7治療を受けている最中であり得る。

【0016】

好ましくは、本発明の方法において、CCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大、CCR9 + IFN- + T細胞の量における減少、CCR9 + IL17A + T細胞の量における減少、FoxP3 + T細胞の量における減少、IFN- + T細胞の量における減少、もしくはIL17A + T細胞の量における減少の同定は、上記被験体が、寛解に入る可能性があることを示す。

【0017】

適切なことには、少なくとも1種の細胞集団の量は、当業者に公知の試薬/方法を使用して、フローサイトメトリーによって、免疫組織化学(例えば、ELISA)によって、および/もしくはRNA/DNA分析によって、決定され得る。

【0018】

上記フローサイトメトリーおよび/もしくは上記免疫組織化学は、抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN-抗体および抗IL17A抗体からなる群より選択される抗体を使用して行われ得ることが認識される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

あるいは、細胞の量を決定する工程は、CCR9、FoxP3、IFN- およびIL17Aからなる群より選択される少なくとも1種のマーカーをコードするRNAの量を測定することによって行われ得る。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、上記コントロールは、コントロールレベルを意味し、これは、少なくとも1種の抗SMAD7治療の投与の前に上記患者（IBDを有する）のサンプルから得られた、または少なくとも1種の抗SMAD7治療の投与直後に得られた上記少なくとも1種の細胞集団の量のベースラインレベルである。投与直後によって、第1日目/処置が始められる同日に関して意味される。

10

【 0 0 2 1 】

関連局面において、本明細書で開示されるのは、抗SMAD7治療での処置を受けている最中である、IBDに罹患している被験体をモニターして、上記被験体が上記治療に应答性であるか否かを決定する、そして/または治療が継続されるべきか否かを決定するための方法である。上記方法は、以下を包含する：(a) IBDを有し、かつ抗SMAD7治療を受けている最中である被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN- + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A + T細胞のうちの少なくとも1種の量を決定する工程；ならびに(b) 上記サンプル中の量と、CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN- + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A + T細胞のうちの少なくとも1種のコントロールレベルとを、それぞれ比較する工程。被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大がある場合、または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN- + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A + T細胞のうちの少なくとも1種の量における減少がある場合、治療に应答性（例えば、感受性）および/もしくは抗SMAD7治療での処置に应答し続ける可能性があると同定され得る。あるいは、被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量における減少がある場合、または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN- + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A + T細胞のうちの少なくとも1種の量における増加がある場合、処置に非应答性（例えば、耐性）および/もしくは抗SMAD7治療での処置に应答し続ける可能性が低いと同定され得る。

20

30

【 0 0 2 2 】

別の局面において、本明細書で開示されるのは、抗SMAD7治療（例えば、抗SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチド）での処置に应答する可能性があるか、または应答性である、IBDに罹患した被験体を同定するための方法である。上記方法は、以下を包含する：(a) IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN- + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A + T細胞のうちの少なくとも1種の量を決定する工程；ならびに(b) 上記サンプル中の量と、CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN- + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A + T細胞のうちの少なくとも1種のコントロールレベルとを、それぞれ比較する工程。被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大がある場合、または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN- + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A +

40

50

T細胞のうちの少なくとも1種の量における減少がある場合、抗SMA D7治療での処置に应答する可能性があるか、または应答性(例えば、感受性)であると同定され得る。あるいは、被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量における減少がある場合、または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞およびIL17A + T細胞のうちの少なくとも1種の量における増大がある場合、抗SMA D7治療での処置に应答する可能性が低いか、または非应答性(例えば、耐性)であると同定され得る。

【0023】

10

言い換えると、炎症性腸疾患(IBD)に罹患している被験体の、少なくとも1種の抗SMA D7治療に対する应答性を決定するための方法が提供され、上記方法は、

(a) IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量を決定する工程；

(b) 上記サンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量と、CCR9 + FoxP3 + 細胞のコントロールレベルとを比較する工程、

を包含し、ここでCCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に应答する可能性があるか、または应答性であることを示す；そして/あるいは

(a) IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞の量を決定する工程；

20

(b) 上記サンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞の量と、CCR9 + IFN - + 細胞のコントロールレベルとを比較する工程、

を包含し、ここでCCR9 + IFN - + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に対して应答する可能性があるか、または应答性であることを示す；そして/あるいは

(a) IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IL17A + T細胞の量を決定する工程；

(b) 上記サンプル中のCCR9 + IL17A + T細胞の量と、CCR9 + IL17A + 細胞のコントロールレベルとを比較する工程、

30

を包含し、ここでCCR9 + IL17A + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に対して应答する可能性があるか、または应答性であることを示す；そして/あるいは

(a) IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のFoxP3 + T細胞の量を決定する工程；

(b) 上記サンプル中のFoxP3 + T細胞の量と、FoxP3 + T細胞のコントロールレベルとを比較する工程、

を包含し、ここでFoxP3 + T細胞の量における減少は、上記被験体が抗SMA D7治療に対して应答する可能性があるか、または应答性であることを示す；そして/あるいは

40

(a) IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のIFN - + T細胞の量を決定する工程；

(b) 上記サンプル中のIFN - + T細胞の量と、IFN - + 細胞のコントロールレベルとを比較する工程、

を包含し、ここでIFN - + T細胞の量における減少は、上記被験体が、抗SMA D7治療に対して应答する可能性があるか、または应答性であることを示す；そして/あるいは

(a) IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のIL17A + T細胞の量を決定する工程；

(b) 上記サンプル中のIL17A + T細胞の量と、IL17A + 細胞のコントロー

50

ルレベルとを比較する工程、

を包含し、ここで I L 1 7 A + T 細胞の量における減少は、上記被験体が抗 S M A D 7 治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す。

【 0 0 2 4 】

関連局面において、ヒトもしくは動物の身体に対して実施される診断法における使用のための、 C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞、 C C R 9 + I F N - + T 細胞、 C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞、 F o x P 3 + T 細胞、 I F N - + T 細胞および I L 1 7 A + T 細胞、ならびに F o x P 3 + C D 1 0 3 + T 細胞、 C D 1 0 3 + T 細胞およびインテグリン 4 7 + T 細胞のうちの少なくとも 1 種のための細胞マーカーに対する少なくとも 1 種の抗体が提供される。

10

【 0 0 2 5 】

適切なことには、上記診断法を使用して、炎症性腸疾患 (I B D) を有する被験体の、少なくとも 1 種の抗 S M A D 7 治療での処置に対する応答性を予測もしくはモニターし得る、または炎症性腸疾患 (I B D) を有する被験体の、少なくとも 1 種の抗 S M A D 7 治療での処置に対する適切性を決定し得る、上記被験体が上記抗 S M A D 7 治療に応答する可能性があるかもしくは応答性であることを決定し得る、そして / または上記被験体が寛解に入る可能性があるか否かを決定し得る。

【 0 0 2 6 】

関連実施形態において、細胞集団を同定するための抗 C C R 9 抗体、抗 F o x P 3 抗体、抗 I F N - 抗体および / もしくは抗 I L 1 7 A 抗体、または C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞、 C C R 9 + I F N - + T 細胞、 C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞、 F o x P 3 + T 細胞、 I F N - + T 細胞および I L 1 7 A + T 細胞のうちの少なくとも 1 種に対するタンパク質細胞マーカーをコードする R N A の発現を検出するための試薬のうちの少なくとも 1 種を含むキットが提供される。

20

【 0 0 2 7 】

適切なことには、上記キットは、 F A C S 技術を使用して細胞を同定し、選別し、計数するための緩衝液、試薬、および詳細な指示書のうちの少なくとも 1 つをさらに含む。

【 0 0 2 8 】

望ましくは、本発明のキットにおいて、上記抗体は、 C C R 9 タンパク質に対する一次抗体、 F o x P 3 タンパク質に対する一次抗体、およびレポーター酵素に結合体化される二次抗体であり、上記キットは、 I H C 技術を使用して細胞集団を同定するための少なくとも緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む。

30

【 0 0 2 9 】

適切なことには、本発明のキットにおいて、 C C R 9 タンパク質に対する捕捉抗体、 F o x P 3 タンパク質に対する検出抗体、および / またはレポーター酵素に結合体化される二次抗体が含まれ ; そして E L I S A 技術を使用して細胞集団を同定するための緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む。

【 0 0 3 0 】

開示される方法、使用およびキットが、抗 S M A D 7 治療の処置を、このような治療に応答する可能性があるかもしくは応答性である被験体に対して個別化する (p e r s o n a l i z e) ために使用され得ることは、本明細書で企図される。

40

【 0 0 3 1 】

開示される方法、使用およびキットが、被験体が I B D に罹患してから後に寛解に入る可能性があるか否かを決定するために使用され得ることもまた、本明細書で企図される。例えば、被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中の C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞の量における増大がある場合に、ならびに / または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中の C C R 9 + I F N - + T 細胞、 C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞、 C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞、 F o x P 3 + T 細胞、 I F N - + T 細胞および / もしくは I L 1 7 A + T 細胞の量における減少がある場合に、寛解に入る可能性があると同定され得る。

50

【0032】

上述のように、上記被験体から得られたサンプルは、血液サンプル（例えば、単離された末梢血単核細胞サンプル）であり得る。あるいは、上記被験体から得られたサンプルは、組織サンプルであり得る。例えば、組織サンプルは、上記被験体の胃・腸管に（例えば、上記被験体の小腸に）由来し得る。

【0033】

上記コントロールもしくはコントロールレベルサンプルは、抗SMA D7治療での処置の前に、上記被験体から得られたサンプル（例えば、血液サンプルもしくは組織サンプル）を含み得る。上記コントロールサンプルは、処置前に存在し、処置に対する上記被験体の応答をモニターするために使用され得る本発明の少なくとも1種の細胞集団の量のベースラインレベルを提供する。コントロールもしくはコントロールレベルサンプルは、上記抗SMA D7治療が最初に施された同じ日（例えば、処置レジメンの1日目）に、上記被験体から得られ得る。他の実施形態において、コントロールもしくはコントロールレベルサンプルは、抗SMA D7治療の開始の少なくとも1日前（例えば、処置レジメンの0日目）に被験体から得られ得る。

【0034】

特定の実施形態において、サンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞のうち少なくとも1種の量は、フローサイトメトリーによって決定される。他の実施形態において、上記決定は、免疫組織化学によって、もしくはELISAアッセイによって行われる。FACS、免疫組織化学、およびELISAアッセイは、抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN - 抗体、および抗IL17A抗体のうち少なくとも1種からなる群より選択される抗体を使用して行われ得る。別の実施形態において、細胞集団の量は、CCR9、FoxP3、IFN - 、およびIL17Aからなる群より選択される少なくとも1種のマーカーをコードするRNAの量を測定することによって決定される。特定の実施形態において、上記抗SMA D7治療は、抗SMA D7アンチセンスオリゴヌクレオチドである。上記抗SMA D7アンチセンスオリゴヌクレオチド治療は、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号9からなる群より選択される抗SMA D7アンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。例示の実施形態において、上記SMA D7アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号6を含む。

【0035】

本発明の前述の局面および実施形態は、以下の図面、詳細な説明および特許請求の範囲を参照することによって、より完全に理解され得る。

例えば、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

少なくとも1種の抗SMA D7治療での処置に対する、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の応答性を決定するための方法であって、上記方法は、

上記被験体から得られた少なくとも1つのサンプルにおいて、CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞およびIL17A + T細胞からなる群より選択される少なくとも1種の細胞集団の量を決定する工程、
を包含し、

ここで、上記少なくとも1種の細胞集団の既知のコントロールレベルと比較して上記少なくとも1つのサンプル中の上記細胞集団CCR9 + FoxP3 + T細胞の増大した量、および/もしくは上記細胞集団CCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞およびIL17A + T細胞のうち少なくとも1つの減少した量は、上記抗SMA D7治療に対する、IBDを有する上記被験体の応答性を予測する、
方法。

10

20

30

40

50

(項目2)

以下：

CCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9 + IFN - + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9 + IL17A + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

FoxP3 + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

IFN - + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

IL17A + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMA D7治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す、

のうちの2つまたはそれより多くの調節を同定して、上記被験体の応答性を決定することを補助する、項目1に記載の方法。

(項目3)

インビトロで行われる、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

上記被験体は、上記少なくとも1つの生物学的サンプルが得られるときに、少なくとも1種の抗SMA D7治療を受けている最中である、項目1～3のいずれか1項に記載の方法。

(項目5)

上記炎症性腸疾患(IBD)は、クローン病(CD)および/もしくは潰瘍性大腸炎(UC)である、前述の項目のいずれか1項に記載の方法。

(項目6)

CCR9 + FoxP3 + T細胞の量における増大、CCR9 + IFN - + T細胞の量における減少、CCR9 + IL17A + T細胞の量における減少、FoxP3 + T細胞の量における減少、IFN - + T細胞の量における減少またはIL17A + T細胞の量における減少のうちの少なくとも1つは、上記被験体が寛解に入る可能性があることを示す、項目1～5のいずれか1項に記載の方法。

(項目7)

上記少なくとも1つのサンプルは、血液サンプルもしくは組織サンプルである、項目1～6のいずれか1項に記載の方法。

(項目8)

上記組織サンプルは、上記被験体の胃・腸管に由来する、項目7に記載の方法。

(項目9)

上記少なくとも1種の細胞集団の量は、フローサイトメトリーによって、免疫組織化学によって、および/もしくはRNA/DNA分析によって決定される、項目1～8のいずれか1項に記載の方法。

(項目10)

フローサイトメトリーおよび/もしくは免疫組織化学は、抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN - 抗体および抗IL17A抗体からなる群より選択される抗体を使用して行われる、項目9に記載の方法。

(項目11)

上記コントロールレベルは、少なくとも1種の抗SMA D7治療の投与の前に上記患者から得られるか、または少なくとも1種の抗SMA D7治療の投与の直後に得られる少なくとも1種の細胞集団のベースラインレベルである、項目1～10のいずれか1項に記載の方法。

(項目12)

10

20

30

40

50

上記少なくとも1種の抗S M A D 7治療は、抗S M A D 7アンチセンス治療である、項目11に記載の方法。

(項目13)

上記抗S M A D 7アンチセンス治療は、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号9からなる群より選択される抗S M A D 7アンチセンスオリゴヌクレオチドである、項目12に記載の方法。

(項目14)

細胞集団を同定するための抗C C R 9抗体、抗F o x P 3抗体、抗I F N - 抗体および/もしくは抗I L 1 7 A抗体のうちの少なくとも2種、またはC C R 9 + F o x P 3 + T細胞、C C R 9 + I F N - + T細胞、C C R 9 + I L 1 7 A + T細胞、F o x P 3 + T細胞、I F N - + T細胞およびI L 1 7 A + T細胞のうちの少なくとも1種に対するタンパク質細胞マーカーをコードするR N Aの発現を検出するための試薬を含むキット。

10

(項目15)

F A C S技術を使用して細胞を同定し、選別し、計数するための緩衝液、試薬、および詳細な指示書のうちの少なくとも1つをさらに含む、項目14に記載のキット。

(項目16)

上記抗体は、C C R 9タンパク質に対する一次抗体、F o x P 3タンパク質に対する一次抗体、およびレポーター酵素に対して結合体化される二次抗体であり、そして上記キットは、免疫組織化学を使用して細胞集団を同定するための少なくとも緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む、項目14に記載のキット。

20

(項目17)

C C R 9タンパク質に対する捕捉抗体、F o x P 3タンパク質に対する検出抗体、および/もしくはレポーター酵素に結合体化される二次抗体を含み；そしてE L I S A技術を使用して細胞集団を同定するための緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む、項目16に記載のキット。

(項目18)

ヒトもしくは動物の身体で実施される診断法において使用するための、C C R 9 + F o x P 3 + T細胞、C C R 9 + I F N - + T細胞、C C R 9 + I L 1 7 A + T細胞、F o x P 3 + T細胞、I F N - + T細胞およびI L 1 7 A + T細胞のうちの少なくとも1種のための細胞マーカーに対する少なくとも1種の抗体。

30

(項目19)

上記診断法は、少なくとも1種の抗S M A D 7治療での処置に対する、炎症性腸疾患(I B D)を有する被験体の応答性を予測もしくはモニターすること、または少なくとも1種の抗S M A D 7治療での処置に対する、炎症性腸疾患(I B D)を有する被験体の適切性を決定すること、上記被験体が上記抗S M A D 7治療に対して応答する可能性があるか、もしくは応答性であることを決定すること、そして/あるいは上記被験体が寛解に入る可能性があるか否かを決定することである、項目18に規定される使用のための少なくとも1種の抗体。

(項目20)

添付の説明、例および図面に言及して本明細書上部に実質的に記載されるとおりの方法、キットもしくは使用。

40

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1A】図1(A)は、S M A D 7の核酸配列(配列番号1)を提供し、(B)は、S M A D 7のアミノ酸配列(配列番号2)を提供する。

【図1B】図1(A)は、S M A D 7の核酸配列(配列番号1)を提供し、(B)は、S M A D 7のアミノ酸配列(配列番号2)を提供する。

【図2】図2は、出願人のスクリーニング結果およびコホートへの登録患者の分割を示すフローチャートである。

50

【図3】図3は、治験に登録した患者に関する人口統計学的特徴および臨床的特徴を示す。

【図4】図4は、有害事象の異なるタイプ、上記治験の間のそれらの頻度、およびGED0301とのそれらの関連を図示する。

【図5】図5(AおよびB)は、SMAD7がクローン病に罹患している被験体のヒト腸腺およびパイエル板において発現されることを示す免疫組織化学分析の写真である。Bにおいて、矢印は、核および細胞質におけるSMAD7発現を示す。パネルA, 100×倍率; パネルB, 200×倍率。

【図6】図6は、(A)CCR9+ 集団もしくは(B)IFN-γ+ 集団内のIFN-γもしくはIL-17A細胞のパーセントに対する、刺激しないまま(Unst)か、またはSmad7センス(センス)もしくはGED0301(AS)オリゴヌクレオチドで処置したCD患者から単離されたPBMCの効果を示す。

10

【図7】図7は、ベースライン、ならびに臨床試験の8日目および28日目の種々のマーカーに関して試験陽性であるT細胞の割合を示す。

【図8】図8は、0日後、8日後、28日後および84日後の(A)IFN-γ+, (B)IFN-γ+ CCR9+, (C)IL-17A+, (D)CCR9+ IL-17A+, (E)FoxP3+, および(F)FoxP3+ CCR9+ T細胞のパーセンテージを示すグラフを示す。

【図9】図9は、各コホートに関して上記治験のベースライン、8日目および28日目における平均CDAI値、ならびに患者群全体に関して各時点での平均CDAI値を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0037】

(詳細な説明)

被験体が抗SMAD7治療での処置に応答性(例えば、感受性もしくは耐性)であるか否かを決定するための方法が、開示される。上記方法は、IBD(例えば、クローン病もしくは潰瘍性大腸炎)に罹患している被験体の血液サンプル中の特定のT細胞集団(例えば、増大したCCR9+ FoxP3+ T細胞、減少したCCR9+ IFN-γ陽性(IFN-γ+) T細胞、減少したCCR9+ IL17A+ T細胞、減少したFoxP3+ T細胞、減少したIFN-γ+ T細胞および/もしくは減少したIL17A+ T細胞)の調節が、抗SMAD7治療での処置に対する感受性と相関するという発見

30

【0038】

本明細書に記載される場合、IBDに罹患している、抗SMAD7治療での処置を受けているかもしくは受けた被験体の1種以上のT細胞集団は、上記被験体が上記治療に応答性であるか否かを決定するために、および/または治療が継続されるべきか否かを決定するために、モニターされる。一局面において、上記方法は、(a)IBDを有し、抗SMAD7治療を受けている最中である被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-γ+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-γ+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量を決定する工程;ならびに(b)上記サンプル中の量と、CCR9+ FoxP3+

40

+ T細胞、CCR9+ IFN-γ+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-γ+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞のコントロールレベルとを、それぞれ比較する工程を包含する。被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞の量において増大がある場合に、そして/または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ IFN-γ+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-γ+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量における減少がある場合に、治療に対して応答性(例えば、感受性)および/または抗SMAD7治療での処置に対して応答し続ける可能性があると同定される。

50

【 0 0 3 9 】

あるいは、被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量において減少がある場合に、または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞の量における増大がある場合に、処置に対して非応答性（例えば、耐性）および/または抗SMAD7治療での処置に対して応答し続ける可能性が低いと同定され得る。

【 0 0 4 0 】

別の局面において、IBDに罹患している被験体の1種以上のT細胞集団は、上記被験体が抗SMAD7治療での処置に応答する可能性があるか否かを同定するためにモニターされる。上記方法は、(a) IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞の量を決定する工程；ならびに(b)上記サンプル中の量と、CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞のコントロールレベルとを、それぞれ比較する工程、を包含する。被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量において増大がある場合、および/または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞の量において減少がある場合に、抗SMAD7治療での処置に応答する可能性があるか、または応答性（例えば、感受性）であると同定され得る。

【 0 0 4 1 】

あるいは、被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量において減少がある場合、ならびに/または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞の量において増大がある場合に、抗SMAD7治療での処置に応答する可能性が低いか、または非応答性（例えば、耐性）であると同定され得る。

【 0 0 4 2 】

特定の実施形態において、FoxP3 + CD103 + T細胞、CD103 + T細胞および/もしくはインテグリン 4 7 + T細胞の量はまた、測定され得る。治療に応答性である被験体は、処置前レベルと比較して、治療の間にこれら細胞集団の一貫した量を示す。

【 0 0 4 3 】

他の実施形態において、開示される方法は、被験体が、IBDに罹患した後に寛解に入る可能性があるか否かを決定するために使用され得る。例えば、被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量において増大がある場合、ならびに/または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞の量において減少がある場合に、寛解に入る可能性があると同定され得る。

【 0 0 4 4 】

便宜的に、本明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲における特定の用語は、この節に集められる。

10

20

30

40

50

【0045】

本明細書で使用される場合、「CCR9」(CDw199、GPR-9-6、GPR28、C-CCKR-9、Gプロテイン共役レセプター28としても公知のケモカイン(C-Cモチーフ)レセプター9)は、Entrez GeneID No. 10803によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によってコードされるヒトタンパク質を意味する。

【0046】

本明細書で使用される場合、「FoxP3」(JM2、AIID、DIETER、IPEX、MGC141961、MGC141963、PIDX、XPIDとしても公知のフォークヘッドボックス(forkhead box)P3)は、Entrez GeneID No. 50943によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によってコードされるヒトタンパク質を意味する。

10

【0047】

本明細書で使用される場合、「IFN- γ 」もしくは「IFN- γ 」(IFNG、IFG、IFIとしても公知のインターフェロン γ)は、Entrez GeneID No. 3458によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によってコードされるヒトタンパク質を意味する。

【0048】

本明細書で使用される場合、「IL17A」(CTLA8、IL-17、IL-17A、IL17、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原8；細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質8；細胞傷害性Tリンパ球関連セリンエステラーゼ8としても公知のインターロイキン17A)は、Entrez GeneID No. 3605によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によってコードされるヒトタンパク質を意味する。

20

【0049】

本明細書で使用される場合、「CD103」(インテグリン α 4 β 7；粘膜リンパ球抗原1，ペプチド；HUMINAE、インテグリン α 4 β 7-IEL；インテグリン α 4 β 7-E；HML-1抗原；およびMGC141996としても公知のCD103抗原)は、Entrez GeneID No. 3682によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によってコードされるヒトタンパク質を意味する。

【0050】

本明細書で使用される場合、「 α 4 β 7」(腸ホーミングレセプターサブユニットおよびITGB7としても公知のインテグリン α 4 β 7)は、Entrez GeneID No. 3695によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によってコードされるヒト遺伝子を意味する。

30

【0051】

本明細書で使用される場合、「SMAD7」(CRCS3、FLJ16482、MADH7、MADH8、MAD(mothers against decapentaplegic, Drosophila)ホモログ7、MADホモログ8、SMAD、mothers against DPP homolog 7, mothers against DPP homolog 8としても公知)は、Entrez GeneID No. 4092によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によって同定されるヒトタンパク質を意味する。

40

【0052】

本明細書で使用される場合、「クローン病活性指数」もしくは「CDAI」とは、Bestら、Gastroenterology, 70:439-44(1976)によって記載されるように、CDに罹患した患者の進行を評価するために使用される測定値もしくは指数をいう。CDAIスコア150以下は、一般に、不活性な疾患と関連し、より高いスコアより良好な予後を示す。150より高い値は、一般に、活性な疾患と関連し、450より高い値は、極めて重篤な疾患と関連する。CDAIスコアは、どのくらい良好に、患者が治療に应答しつつあるかを決定するために使用され得、寛解にある患者を同

50

定するために使用され得る。特定の実施形態において、ベンチマーク臨床応答は、上記被験体がCDAIスコアにおける少なくとも100ポイントの減少を示すことを意味する。臨床試験において、CDAIスコア 150以下は、一般に、寛解と関連する。

【0053】

本明細書で使用される場合、「潰瘍性大腸炎疾患活性指数」もしくは「UCDAI」とは、Sutherland et al., Gastroenterology, 92:1894-98 (1987)によって記載されるように、UCに罹患している患者の進行を評価するために使用される測定値もしくは指数をいう。上記UCDAIは、排便頻度、直腸出血、結腸内層の外見、および疾患活性の医師の等級付けを含む、UCの症状についての一連の限定因子(qualifier)である。これら限定因子の各々は、0から3までの数値を与えられ、3は、最高の疾患活性である。臨床試験において、寛解は、しばしば、UCDAIスコア 1以下と規定され、改善は、治験の開始時のスコアから3点以上の減少である。UCDAIは、どの程度十分に患者が治療に応答しつつあるか否かを決定するために、臨床試験において使用され得、寛解にある患者を同定するために使用され得る。UC患者における疾患重篤度を測定するための他の一般に使用される指数としては、Truelove and Witts Index、St. Mark's Index、Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI)、Lichtiger Index、Ulcerative Colitis Symptom Score (UCSS)、およびMayo Clinic Scoreが挙げられる。

【0054】

本明細書で使用される場合、処置に「応答する」もしくは「応答しつつある」とは、クローン病を有する被験体が、(a) CDAIスコアにおける減少、例えば、20点、30点、40点、50点、60点、70点、80点、90点、100点以上のCDAIスコアにおける減少；(b) 150未満のCDAIスコア；および/または(c) 寛解の誘導を示すことを意味する。UCを有する被験体に関して、処置に「応答する」もしくは「応答しつつある」とは、上記被験体が(a) UCDAIスコアにおける減少、例えば、1点、2点以上のUCDAIスコアの減少；(b) 1以下のUCDAIスコア；および/または(c) 寛解の誘導を示すことを意味する。

【0055】

抗SMAD7治療

抗SMAD7治療は、SMAD7に対する標的化された治療(例えば、抗SMAD7アンチセンス治療およびSMAD7に対する抗体)を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的タンパク質(例えば、SMAD7)をコードするメッセンジャーRNA(mRNA)に対して相補的な短い合成オリゴヌクレオチド配列である。アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、遍在性触媒酵素(例えば、DNA/RNAハイブリッド鎖を分解し、従って、タンパク質翻訳を妨げるRNase H)の活性化をもたらし得る二本鎖ハイブリッドを生成するmRNAにハイブリダイズする。

【0056】

特定の実施形態において、抗SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトSMAD7 mRNAの(例えば、配列番号1の)部位403、233、294、295、296、298、299、および/もしくは533(すなわち、それぞれ、ヌクレオチド403、233、294、295、296、298、299、533)を標的とし得る。

【0057】

特定の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下の抗SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチド 5'-GTCGCCCTTCTCCCGCAGC-3'(配列番号3)に由来し得る。

【0058】

SMAD7を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CpG対におけるシトシン残基が、5'-メチルシトシン(略称: Me-dC)によって置換される混合骨格を含

10

20

30

40

50

み得ることが本明細書で企図される。メチルホスホネート結合はまた、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端および/もしくは3'末端に配置され得る(略称: MeP)。

【0059】

SMA D7を標的とする例示的アンチセンスオリゴヌクレオチド治療としては、以下が挙げられる:

5' - G T X Y C C C C T T C T C C C X Y C A G - 3' (配列番号4) (ここでXは、シトシンおよび5'-メチルシトシンもしくは2'-O-メチルシトシンヌクレオチドからなる群より選択される窒素塩基を含むヌクレオチドであり、Yは、グアニンおよび5'-メチルグアニンもしくは2'-O-メチルグアニンヌクレオチドからなる群より選択される窒素塩基を含むヌクレオチドであるが、ただし、ヌクレオチドXもしくはYのうちの少なくとも一方は、メチル化窒素塩基を含む);

5' - G T X G C C C C T T C T C C C X G C A G - 3' (配列番号5) (ここでXは、5'-メチル 2'-デオキシシチジン 5'-モノホスフェートである);

5' - G T X G C C C C T T C T C C C X G C A G C - 3' (配列番号6) (ここでXは、5'-メチル 2'-デオキシシチジン 5'-モノホスフェートである);

5' - Z T X G C C C C T T C T C C C X G C A Z - 3' (配列番号7) (ここでXは、5'-メチル 2'-デオキシシチジン 5'-モノホスフェートであり、Zは、2'-デオキシグアノシン メチルホスホネートである);

5' - Z T X G C C C C T T C T C C C X G C A Z - 3' (配列番号8) (ここでXは、5'-メチル 2'-デオキシシチジン 5'-モノホスフェートであり、Zは、2'-デオキシグアノシン メチルホスホネートである);

5' - G T X G C C C C T T C T C C C X G C A G - 3' (配列番号9) (ここでXは、5'-メチル 2'-デオキシシチジン 5'-モノホスフェートである(例えば、米国特許第7,807,818号および同第6,159,697号(これらは、本明細書に参考として援用される)を参照のこと))。

【0060】

例示的实施形態において、上記抗SMA D7アンチセンス治療は、薬学的に受容可能なキャリア中に処方され得、IBDに罹患している被験体に経口投与され得る。

【0061】

血液サンプル

被験体由来の血液サンプルは、当該分野で周知の技術を使用して得られ得る。血液サンプルは、末梢血単核細胞(PMBC)もしくはRBC除去全血を含み得る。PMBCは、異なる密度勾配(例えば、Ficol1密度勾配)遠心分離手順を使用して、全血サンプルから単離され得る。例えば、全血(例えば、抗凝固剤処理した(anticoagulated)全血)は、分離媒体の上に重層され、遠心分離にかけられる。遠心分離工程の最後に、以下の層は、頂部から底部まで視覚的に観察される: 血漿/血小板、PMBC、分離媒体および赤血球/顆粒球。上記PMBC層は、集められ得、夾雑物を除去するために洗浄され得る。

【0062】

試験サンプル

被験体由来の組織サンプル(例えば、被験体(例えば、CDもしくはUCに罹患している被験体)の小腸および/もしくは大腸から得られる組織サンプル)は、上記サンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量を測定するための、細胞供給源、RNA供給源、タンパク質供給源、もしくは免疫組織化学(IHC)の薄い切片の供給源として使用され得る。上記組織サンプルは、従来の生検機器および手順を使用することによって得られ得る。内視鏡生検、切除生検および切開生検は、胃腸組織サンプルを得るために、当業者によって使用され得る認識された医学的手順の例である。上記組織サンプルは、マーカー遺伝子(例えば、CCR9、FoxP3、IFN-、および/もしくはIL17A)発現レベルを測

10

20

30

40

50

定するか、またはフローサイトメトリー、IHC、もしくはELISAによって個々の細胞（例えば、CCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞発現）を可視化するために、十分な細胞、RNA、タンパク質、もしくは薄い切片を提供するために十分大きくなければならない。

【0063】

上記組織サンプルは、細胞選別、RNA抽出、タンパク質抽出、もしくは薄い切片の調製のために十分な任意の形態にあり得る。よって、上記組織サンプルは、新鮮であり得るか、適切な低温技術を介して保存され得るか、または非低温技術を介して保存され得る。臨床生検標本を取り扱うための標準プロセスは、上記組織サンプルをホルマリン中で固定し、次いで、パラフィン中に包埋することである。この形態にあるサンプルは、ホルマリン固定、パラフィン包埋（FFPE）組織として一般に公知である。その後の分析のための組織調製の適切な技術は、当業者に周知である。

10

【0064】

フローサイトメトリー

細胞集団は、フローサイトメトリー（例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）分析）によって、細胞表面マーカーに基づいて選別され得る。FACS分析によって細胞を選別し、計数するための方法は、十分に確立されており、当業者に公知である。例えば、Robinson「Current Protocols in Cytometry」John Wiley & Sons Inc., New Yorkを参照のこと。一般に、血液サンプルもしくは組織サンプルから得られる細胞は、単一細胞懸濁物で調製され得る。次いで、細胞は、蛍光タグ（例えば、上記同定されるべき細胞集団に存在する細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体）で標識される。上記蛍光は、直接的もしくは間接的であり得る。直接的蛍光に関しては、蛍光タグ（例えば、フルオレセイン、ローダミン、もしくは別の蛍光色素）は、一次抗体に共有結合される。間接的蛍光に関しては、上記細胞表面に存在するマーカーに結合する一次抗体は、蛍光タグで標識されない。上記一次抗体は、上記標的化された細胞集団の細胞表面に結合される。結合していない抗体は、洗浄工程によって除去される。上記一次抗体を結合する蛍光タグ化二次抗体が添加され、あらゆる結合していない抗体が、洗浄工程によって除去される。

20

【0065】

FACS分析は、生細胞もしくは固定細胞で行われ得る。FACS機器は、当業者に利用可能であり、FACSscan、FACSstar Plus、およびFACS caliber（Becton-Dickinson）が挙げられる。FACS分析ソフトウェアは、当業者に利用可能であり、FlowJo、CellQuest Pro（Becton-Dickinson）、およびWinMDI（フローサイトメトリー用のWindows（登録商標）マルチドキュメントインターフェース）が挙げられる。

30

【0066】

当業者は、FACS分析が、別個の細胞集団を同定し、計数し、選別するための単一の抗体もしくは複数の抗体で行われ得ることを認識する。例えば、単一抗体での細胞集団標識が検出され得、上記特定のマーカーを発現しない細胞から選別され得る（例えば、FoxP3+ T細胞集団は、FoxP3に特異的な抗体によって同定され得る；IFN- + T細胞集団は、IFN- に特異的な抗体によって同定され得る；そしてIL17A+ T細胞集団は、IL17Aに特異的な抗体によって同定され得る）。

40

【0067】

複数のレーザーおよび蛍光検出器を備えたFACS機器は、複数の抗体標識の使用を可能にし、標的細胞集団を正確に同定し得る。検出を達成するために、細胞は、複数の抗体（各々、異なる蛍光標識でタグ化される）で標識され得る。例えば、血液サンプルは、CCR9+ FoxP3+ T細胞集団の検出のために、APC標識マウス抗ヒトCCR9抗体およびPE標識抗ヒトFoxP3抗体で同時に標識され得る。別の実施形態において、組織サンプルは、CCR9+ IL17A+ T細胞集団の検出のために、APC標識

50

マウス抗ヒトCCR9抗体およびAlexa Fluor 647マウス抗ヒトIL17A抗体で標識され得る。

【0068】

FACS分析によってCCR9+ FoxP3+ T細胞集団、CCR9+ IFN-+ T細胞集団、および/もしくはCCR9+ IL17A+ T細胞集団を決定するために使用され得る例示的抗体としては、ヒトCCR9に対する蛍光標識抗体(例えば、アロフィコシアニン(APC)標識マウス抗ヒトCCR9抗体(R&D Systems, Catalog Numbers FAB179AおよびFAB1791A)、Alexa Fluor(登録商標)647マウス抗ヒトCCR9抗体(BD Pharmingen, カタログ番号557975)、フルオレセイン標識マウス抗ヒトCCR9抗体(R&D Systems, カタログ番号FAB179F)、およびフィコエリトリン(PE)標識マウス抗ヒトCCR9抗体(R&D Systems, カタログ番号FAB179P))が挙げられる。

10

【0069】

FACS分析によってFoxP3+ T細胞集団およびCCR9+ FoxP3+ T細胞集団を決定するために使用され得る例示的抗体としては、ヒトFoxP3に対する蛍光標識抗体(例えば、フィコエリトリン(PE)標識抗ヒトFoxP3抗体(Miltenyi Biotec, カタログ番号130-093-014)、アロフィコシアニン(APC)標識抗ヒトFoxP3抗体(Miltenyi Biotec, カタログ番号130-093-013)、Alexa Fluor(登録商標)647マウス抗ヒトFoxP3抗体(BD Pharmingen, カタログ番号560045)、Alexa Fluor(登録商標)488マウス抗ヒトFoxP3抗体(AbD Serotec, カタログ番号MCA2376A488)、およびFITC標識マウス抗ヒトFoxP3抗体(Abcam, カタログ番号ab93512))が挙げられる。

20

【0070】

FACS分析によってIFN-+ T細胞集団およびCCR9+ IFN-+ T細胞集団を決定するために使用され得る例示的抗体としては、ヒトIFN-に対する蛍光標識抗体(例えば、FITC標識マウス抗ヒトIFN-抗体(Abcam, カタログ番号ab47344)、フィコエリトリン(PE)標識マウス抗ヒトIFN-抗体(Abcam, カタログ番号ab47345、およびR&D Systems, カタログ番号IC285P)、およびフルオレセイン標識マウス抗ヒトIFN-抗体(R&D Systems, カタログ番号IC285F))が挙げられる。

30

【0071】

FACS分析によってIL17A+ T細胞集団およびCCR9+ IL17A+ T細胞集団を決定するために使用され得る例示的抗体としては、ヒトIL17Aに対する蛍光標識抗体(例えば、Alexa Fluor 647マウス抗ヒトIL17A抗体(eBioscience, カタログ番号51-7179-42)、フィコエリトリン(PE)標識マウス抗ヒトIL17A抗体(R&D Systems, カタログ番号IC3171P)、およびアロフィコシアニン(APC)標識マウス抗ヒトIL17A抗体(R&D Systems, カタログ番号IC3171A))が挙げられる。

40

【0072】

FACS分析によってCD103+ T細胞集団およびFoxP3+ CD103+ T細胞集団を決定するために使用され得る例示的抗体としては、ヒトCD103に対する蛍光標識抗体(例えば、フィコエリトリン標識マウス抗ヒトインテグリン Eモノクローナル抗体(Abcam, カタログ番号ab33267)およびFITC標識マウス抗ヒトCD103モノクローナル抗体(AbD Serotec, カタログ番号MCA1416FT))が挙げられる。

【0073】

FACS分析によって47+ T細胞集団を決定するために使用され得る例示的抗体としては、ヒト47に対する蛍光標識抗体(BD Biosciencesから入

50

手可能である)が挙げられる。

【0074】

別の実施形態において、細胞集団の量は、フローサイトメトリーによって上記細胞を選別し、次いで、上記選別された細胞集団に由来するCCR9、FoxP3、IFN-、およびIL17Aからなる群より選択される少なくとも1種のマーカーをコードするRNAの量を測定する工程によって決定される。RNA単離および定量的ための方法は、当該分野で周知である。

【0075】

免疫組織化学

別個の細胞集団はまた、免疫組織化学(IHC)によって決定され得る。具体的には、所定の細胞集団中のCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の数は、IHCによって決定され得る(例えば、可視化され得る)。例えば、IHCによるCCR9+ FoxP3+ T細胞集団のアッセイは、例えば、CCR9タンパク質に対する少なくとも1種の抗体、例えば、少なくとも1種の抗CCR9抗体、およびFoxP3抗体に対する少なくとも1種の抗体、例えば、少なくとも1種の抗FoxP3抗体を必要とする。例示的实施形態において、上記抗CCR9抗体および抗FoxP3+ 抗体は、異なる標識(例えば、異なる蛍光標識)で標識される。特定の実施形態において、上記抗CCR9抗体および上記抗FoxP3抗体は、異なる抗体(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)であり、従って、標識された、例えば、蛍光二次抗体によって差次的検出のために提供する。

【0076】

IHC研究に関して、例えば、パラフィン包埋ホルマリン固定組織サンプルは、切片、例えば、5ミクロン切片へとスライスされ得る。代表的には、上記組織切片は、上記組織材料を集めて保存する最初のプロセスにおいて固定されたタンパク質の抗原性構造を回復するような方法において、最初に処理される。次いで、スライドは、上記検出抗体による非特異的結合を妨げるためにブロックされる。次いで、例えば、CCR9、FoxP3、IFN-、および/もしくはIL17Aタンパク質の存在は、上記抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN- 抗体、および/もしくは抗IL17A抗体の、それぞれのタンパク質への結合によって検出される。上記検出(一次)抗体は、蛍光標識に、直接的にもしくは間接的にのいずれかで(例えば、上記検出(一次)抗体を特異的に認識する二次抗体もしくはポリマーを介して)連結される。代表的には、上記組織切片は、洗浄され、工程間に非特異的タンパク質(例えば、ウシ血清アルブミン)でブロックされる。上記サンプルは、ヘマトキシリンおよび/もしくはエオシンで対比染色され得る。

【0077】

IHCに適した抗CCR9抗体は、市販されている(例えば、Enzo Life Sciencesのヤギ抗ヒトCCR9ポリクローナル抗体(カタログ番号ALX-210-847-C200)、GenWay Biotechのウサギ抗ヒトCCR9ポリクローナル抗体(カタログ番号18-461-10269-0.05 ml)、Novus BiologicalsのCCR9抗体(カタログ番号NBP1-44201)、およびR&D Systemsのマウス抗ヒトCCR9モノクローナル抗体(カタログ番号MAB179))。

【0078】

IHCに適した抗FoxP3抗体は、市販されている(例えば、Abbiotecのウサギ抗FoxP3ポリクローナル抗体(カタログ番号250655)、Abgentのヤギ抗ヒトFoxP3ポリクローナル抗体(カタログ番号AF1438a)、LifeSpan Biosciencesのマウス抗ヒトFoxP3モノクローナル抗体(カタログ番号LS-C51576-40)、およびMBL Internationalのマウス抗ヒトFoxP3モノクローナル抗体(カタログ番号M120-3))。

【0079】

10

20

30

40

50

IHCに適した抗IFN-抗体は、市販されている（例えば、Abbiotecのウサギ抗IFN-ポリクローナル抗体（カタログ番号250707）、BioLegendのマウス抗ヒトIFN-モノクローナル抗体（カタログ番号506512）、R&D Systemsのヤギ抗ヒトIFN-モノクローナル抗体（カタログ番号AF-285-NA）、およびCell Sciencesのウサギ抗ヒトIFN-ポリクローナル抗体（カタログ番号CP2008））。

【0080】

IHCに適した抗IL17A抗体は、市販されている（例えば、Proteintech Groupのウサギ抗ヒトIL17Aポリクローナル抗体（カタログ番号13082-1-AP）およびR&D Systemsのヤギ抗ヒトIL17ポリクローナル抗体（カタログ番号AF-317-NA））。

10

【0081】

IHCに適した抗CD103抗体は、市販されている（例えば、Abcamのマウス抗ヒトインテグリン Eモノクローナル抗体（カタログ番号ab33266）およびAbD Serotecのマウス抗ヒトCD103モノクローナル抗体（カタログ番号P38570））。

【0082】

抗インテグリン 47抗体は、BD Biosciencesから市販されている。

【0083】

細胞ベースの酵素結合イムノソルベントアッセイ

20

いくつかの実施形態において、細胞集団は、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）によって同定され得る。具体的には、所定の細胞集団中のCCR9+FoxP3+T細胞、CCR9+IFN-+T細胞、CCR9+IL17A+T細胞、FoxP3+T細胞、IFN-+T細胞および/もしくはIL17A+T細胞は、例えば、細胞ベースのELISAによって決定され得る。例えば、CCR9+FoxP3+細胞集団をELISAによってアッセイすることには、CCR9タンパク質の対する少なくとも1種の抗体（例えば、少なくとも1種の抗CCR9抗体）、FoxP3タンパク質に対する少なくとも1種の抗体（例えば、少なくとも1種の抗FoxP3抗体）、および/もしくは少なくとも1種の二次抗体（例えば、少なくとも1種の標識二次抗体）が必要とされる。例示的实施形態において、上記抗CCR9抗体および上記抗FoxP3抗体は、いずれも標識されていないか、または異なる標識（例えば、異なる蛍光標識）で標識されている。特定の実施形態において、上記抗CCR9抗体および上記抗FoxP3抗体は、異なる抗体（例えば、マウス、ラット、ウサギなど）であり、従って、標識された（例えば、蛍光もしくは酵素結合）二次抗体による差次的検出を提供する。

30

【0084】

ELISA（例えば、細胞ベースのELISA）を行うには、少なくとも1種の捕捉抗体、少なくとも1種の検出抗体、および/または少なくとも1種の酵素結合もしくは蛍光標識の二次抗体が必要とされる。例えば、CCR9+FoxP3+細胞集団を上記細胞ベースのELISAによってアッセイするには、ポリクローナル抗CCR9抗体が上記捕捉抗体として必要とされ得る。上記ポリクローナル抗CCR9抗体は、固体支持体（例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレート）上に固定化される。次いで、血液サンプルもしくは組織サンプルから得られた細胞が添加され、上記結合した抗体と複合体化させられる。結合していない細胞は洗浄で除去される。検出抗体（例えば、モノクローナル抗FoxP3抗体）が添加され、上記細胞へと結合させられる。上記検出抗体は、酵素に、直接的にもしくは間接的にのいずれかで、例えば、上記検出抗体を特異的に認識する二次抗体を介して結合されている。代表的には、各工程の間に、上記プレートと結合した細胞とは、洗浄緩衝液（例えば、穏和な界面活性剤溶液）で洗浄される。代表的なELISAプロトコルはまた、1回以上のブロッキング工程を含み、それは、上記プレートへのタンパク質試薬の所望でない非特異的結合をブロックするために非特異的に結合するタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン）の使用を包含する。最終洗浄工程の後に、上記プレー

40

50

トは、目に見えるシグナルを生成するために適切な酵素基質の添加によって発色させられ、上記シグナルは、上記サンプル中のCCR9 + FoxP3 + 細胞の量を示す。上記基質は、例えば、色素形成基質もしくは蛍光原基質であり得る。

【0085】

ELISA法、試薬および装置は、当該分野で周知であり、市販されている。

【0086】

ELISAに適した多くの抗CCR9抗体は、市販されている（例えば、Abcamの抗CCR9ポリクローナル抗体（カタログ番号ab38567）、Enzo Life Sciencesのヤギ抗ヒトCCR9ポリクローナル抗体（カタログ番号ALX-210-847-C200）、およびNovus Biologicalsのウサギ抗ヒトCCR9ポリクローナル抗体（カタログ番号H00010803-D01P））。

10

【0087】

ELISAに適した多くの抗FoxP3抗体は、市販されている（例えば、Abbiotecのウサギ抗FoxP3ポリクローナル抗体（カタログ番号250655）、Abgentのヤギ抗ヒトFoxP3ポリクローナル抗体（カタログ番号AF1438a）、およびLifeSpan Biosciencesのマウス抗ヒトFoxP3モノクローナル抗体（カタログ番号LS-C82119-100））。

【0088】

ELISAに適した多くの抗IFN- γ 抗体は、市販されている（例えば、Abbiotecのウサギ抗IFN- γ ポリクローナル抗体（カタログ番号250707）、BioLegendのマウス抗ヒトIFN- γ モノクローナル抗体（カタログ番号507502）、およびCell Sciencesのウサギ抗ヒトIFN- γ ポリクローナル抗体（カタログ番号CP2008））。

20

【0089】

ELISAに適した抗IL17A抗体は、市販されている（例えば、ProteinTech Groupのウサギ抗ヒトIL17Aポリクローナル抗体（カタログ番号13082-1-AP）、およびR&D Systemsのヤギ抗ヒトIL17モノクローナル抗体（カタログ番号MAB317））。

【0090】

ELISAに適した抗CD103抗体は、市販されている（例えば、Novus Biologicalsのウサギ抗ヒトインテグリンE抗体（カタログ番号36520002））。

30

【0091】

抗インテグリン α 4 β 7抗体は、BD Biosciencesから市販されている。

【0092】

別の実施形態において、細胞集団の量は、フローサイトメトリーによって上記細胞を選別し、次いで、上記選別された細胞集団に由来するCCR9、FoxP3、IFN- γ 、およびIL17Aからなる群より選択される少なくとも1種のマーカーをコードするRNAの量を測定することによって決定される。RNA単離および定量的方法は、当該分野で周知である。

40

【0093】

コントロールサンプル

コントロールサンプルは、抗SMAD7治療での処置の前に上記被験体から得られたサンプル（例えば、血液サンプルもしくは組織サンプル）を含み得る。上記コントロールサンプルは、被験体の処置への進捗をモニターするためのベースラインを提供する。コントロールサンプルは、上記抗SMAD7治療が最初に施されるその日に（例えば、処置レジメンの1日目に）、上記被験体から得られ得る。他の実施形態において、コントロールサンプルは、抗SMAD7治療を開始する1日前に（例えば、処置レジメンの0日目に）被験体から得られ得る。あるいは、コントロールサンプルは、抗SMAD7治療を開始する2日前、3日前、4日前、5日前、6日前、7日前またはそれより前に、被験体から得ら

50

れ得る。例えば、特定の細胞サンプルのアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションは、治療（例えば、抗SMA D7治療）への被験体の応答をモニターするために、処置前に（例えば、コントロールサンプル）、処置の間に、および/もしくは処置後に、測定され得る。

【0094】

いくつかの実施形態において、コントロールレベルは、被験体における特定の細胞集団の長期間のモニタリングに基づいて、上記被験体について確立され得る。このような場合に、被験体が抗SMA D7治療による複数回の処置を受け得ることが企図される。複数回の処置後に検出される特定の細胞集団の量は、上記被験体が治療に応答したか否か、および/もしくはさらなる抗SMA D7治療での処置に応答する可能性があるか否かを決定するために、上記被験体の以前のコントロールレベルと比較され得る。他の実施形態において、被験体のコントロールレベルもしくはベースラインレベルは、時間をわたって得られた（例えば、数週間、数ヶ月もしくは数年の過程にわたって得られた）複数のベースラインサンプルから決定された特定の細胞集団の平均測定値に基づいて確立され得る。よって、本明細書で開示されるとおりに行われる任意の試験もしくはアッセイは、以前のもしくは確立されたコントロールレベルと比較され得、例えば、上記被験体が1回より多くの抗SMA D7治療での処置を受けている場合、比較のために新たなコントロールサンプルを上記被験体から得ることは必須ではないかもしれない。

【0095】

データ解釈

抗SMA D7治療での処置への被験体の応答性は、処置前に上記被験体から得られたコントロールサンプルに関して解釈され得る。被験体は、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量において増大があるか、または上記コントロールサンプルと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN - + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞の量において減少がある場合、抗SMA D7治療での処置に対して感受性（例えば、応答性もしくは応答する可能性がある）と同定され得る。上記サンプルは、処置に対する感受性を決定するために、治療開始後8日目もしくはこれ以降に得られ得る。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、28日間、56日間、および/もしくは84日間、ならびに/またはこれ以降に得られ得る。他の実施形態において、上記サンプルは、処置に対する感受性をモニターするために、治療開始後8日目の後、例えば、1週間、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、および/もしくは1年間で以降に得られ得る。

【0096】

あるいは、被験体は、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + FoxP3 + T細胞の量において減少があるか、または上記コントロールサンプルと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9 + IFN - + T細胞および/もしくはCCR9 + IL17A + T細胞の量において増大がある場合、抗SMA D7治療での処置に耐性（例えば、非応答性もしくは応答する可能性が低い）と同定され得る。上記サンプルは、処置への耐性を決定するために、治療の開始後8日目もしくはこれ以降に得られ得る。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、最初の処置後28日間、56日間、84日間もしくはこれ以降に得られ得る。他の実施形態において、上記サンプルは、処置への感受性をモニターするために、治療開始後8日目の後、例えば、1週間、2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、および/もしくは1年以降に得られ得る。

【0097】

試験キット

本発明は、本明細書で開示される方法を行うために特定の成分を含む試験キットを包含する。試験キットは、開示されるアッセイを行うにあたって便宜性、速度および再現性を高め得る。例えば、例示的FACSベースの試験キットは、細胞を同定し、選別し、計数するための抗体（例えば、抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN - 抗体および

10

20

30

40

50

ノもしくは抗 I L 1 7 A 抗体) を含み得る。他の実施形態において、上記試験キットは、抗体のみならず、F A C S 技術を使用して細胞を同定し、選別し、計数するための緩衝液、試薬および詳細な指示書をも含む。いくつかの実施形態において、上記キットは、上記細胞およびノもしくは組織サンプルを除いて、試験プロトコルおよび上記試験に必要なとされる全ての消耗品成分を含む。

【 0 0 9 8 】

例示的な I H C ベースの試験キットは、I H C によって細胞集団を決定するための材料を含み得る。I H C キットは、例えば、C C R 9 タンパク質に対する一次抗体(例えば、マウス抗ヒト C C R 9 抗体)および、F o x P 3 タンパク質に対する一次抗体(例えば、マウス抗ヒト F o x P 3 抗体)、およびレポーター酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)に結合体化される二次抗体を含み得る。他の実施形態において、上記試験キットは、抗体のみならず、I H C 技術を使用して細胞集団を同定するための緩衝液、試薬および詳細な指示書をも含む得る。

10

【 0 0 9 9 】

例示的な E L I S A ベースの試験キットは、E L I S A によって細胞集団を決定するための材料を含み得る。細胞ベースの E L I S A キットは、例えば、C C R 9 タンパク質に対する捕捉抗体(例えば、ウサギ抗ヒト C C R 9 ポリクローナル抗体)および F o x P 3 タンパク質に対する検出抗体(例えば、マウス抗ヒト F o x P 3 モノクローナル抗体)、ならびにノまたはレポーター酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ)に結合体化される二次抗体を含み得る。他の実施形態において、上記試験キットは、抗体のみならず、E L I S A 技術を使用して細胞集団を同定するための緩衝液、試薬および詳細な指示書をも含む。

20

【 実施例 】

【 0 1 0 0 】

本発明は、以下の実施例によってさらに例示される。実施例は、例示目的で提供されるに過ぎず、本発明の範囲もしくは内容を限定するとは如何様にも解釈されるべきではない。

【 0 1 0 1 】

実施例 1 : C D 患者における抗 S M A D 7 アンチセンス処置の安全性および効力を評価するための第 I 相臨床試験

30

活発な C D を有する 1 5 名の患者を、C D を処置するための抗 S M A D 7 アンチセンス治療の安全性および効力を評価するために、第 I 相臨床試験に登録した。患者を、2 1 名の志願者の群から最初にスクリーニングし、登録者(enroll ee)を 3 つの等しいサイズのコホートのうちの 1 つに割り当てた(図 2)。登録患者の中で人口統計学的特徴および臨床的特徴において有意差はなかった。しかし、コホート 1 の患者は、他の 2 つのコホートの患者と比較して、より長い疾患継続期間を有し、コホート 1 およびコホート 2 の患者は、コホート 3 の患者と比較して、より頻繁に腸切除を受けていた(図 3)。上記患者は、G E D - 0 3 0 1 (S m a d 7 アンチセンスオリゴヌクレオチド(G T X G C C C C T T C T C C C X G C A G C (ここで X は、5 - メチル - 2 ' - デオキシシチジン 5 ' モノホスフェート(5 - M e - d C)である(配列番号 6))の 4 0 m g / 日(N = 5 ; コホート I) ; 8 0 m g / 日(N = 5 ; コホート 2) ; もしくは 1 6 0 m g / 日(N = 5 ; コホート 3) を 7 日間にわたって受けた。

40

【 0 1 0 2 】

以下の基準全てを満たす患者は、含まれる資格があった： 1 .) 任意の研究関連手順の前に上記患者が自署し、日付を入れた、書面によるインフォームド・コンセント； 2 .) 1 8 ~ 4 5 歳の男性患者もしくは女性患者； 3 .) 妊娠の可能性のない女性患者；スクリーニング時に妊娠試験陰性であり、研究の間に有効な避妊方法を使用している妊娠の可能性のある女性患者； 4 .) スクリーニングの通院時に活発な C D を有する患者(登録前の少なくとも 1 週間にわたって > 2 2 0 かつ 4 0 0 の C D A I スコアと定義される)； 5 .) 回腸末端部およびノもしくは右結腸に限定された C D ; 6 .) 登録前の 9 0 日間で

50

抗TNF- α 、他の生物製剤、免疫抑制剤（例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン、メトトレキサート）での処置なし；7.)ステロイド耐性もしくはステロイド依存性を有する患者；ならびに8.)研究手順および制限を理解しかつ従う能力があること。

【0103】

以下の基準のうちのいずれかを満たす場合、上記研究から被験体を排除した：1.)妊婦中もしくは授乳中の女性；2.)胃および/もしくは近位小腸に影響を及ぼすCDを有する患者または横行結腸および/もしくは左結腸に限局された病変を有する患者；3.)免疫調節剤および生物製剤（例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、インフリキシマブ、アダリムマブ、ナタリズマブ）の、最初の投与前90日間での使用；4.)局所合併症（例えば、膿瘍、狭窄およびフィステル）、異形成および悪性疾患、ならびに腸外発現の存在；5.)CD狭窄に関して、以前の内視鏡バルーン拡張、狭窄形成術もしくは外科的切除；6.)直腸結腸切除術を受けた患者；7.)以下の試験変化のうちのいずれか：APTT > 1.5 正常値上限 (Upper Limit of Normality) (ULN)；血小板数 100,000/mm³；血清クレアチニン > 1.5 ULN；総ビリルビン > 1.5 ULN (ジルベール症候群を除く)；ASTおよびALT > 1.5 ULN；補正QT間隔 > 450 m秒 (男性に関して)および > 470 m秒 (女性に関して)；8.)重大な、重篤なもしくは不安定な (急性のもしくは進行性の) 身体疾患もしくは精神疾患の現在もしくは関連のある以前の病歴 (処置を必要とし得る (例えば、腎臓もしくは肝臓の障害) か、または上記被験体が上記研究を完全に終える可能性をなくする感染症、悪性疾患、医学的障害、あるいは上記研究医薬適用もしくは手順から過度のリスクをもたらす任意の状態を含む)；9.)喫煙するか、もしくはそうでなければ煙草製品を消費する患者；10.)昨年内にアルコールもしくは他の物質の濫用の病歴；11.)不十分な信頼性を潜在的に示す (例えば、精神状態が悪い) 患者；12.)オリゴヌクレオチドもしくは上記研究生成物における任意の成分に対する既知の過敏反応；13.)無作為化前に過去12ヶ月以内に、別の調査中の薬剤を使用したか、または臨床試験に参加した患者。

【0104】

GED-0301の安全性を、以下を考慮することによって毎日評価した：身体検査、体重 (Kg)、生命徴候 (収縮期血圧および拡張期血圧、心拍数、呼吸数、体温)、ECG (12誘導)、AEおよびSAEの収集。血液サンプルを、以下についてチェックした：ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均血球容積 (mean cell volume)、赤血球数、総白血球数および白血球分画、MCH、血小板数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、クレアチニン、BUN、グルコース、尿酸、タンパク質、ビリルビン、アルカリホスファターゼ、CPK、AST、ALT、 γ -GT、Na、K、コレステロールおよびトリグリセリド、補体活性化 (Bb、C5aおよびC3aをモニターすることによる)。尿検査 (pH、ケトン、白血球、タンパク質、グルコース、細胞細菌学試験 (cytobacteriological examination)) もまた行った。

【0105】

生命徴候における一貫した実験異常も変化も、上記研究の間にかいなる患者においても示されなかった。補体因子の血清レベルにおける有意な増大は示されなかった。3つのコホートにおけるサンプル全ては、11.2 ng/ml GED0301の結果を与えたコホート1の1名の患者の1サンプル (患者5、7日目、6時間)を除いて、定量の下限を下回る値を得た。

【0106】

重度の有害事象は記録されなかった。25の有害事象 (AE) が11名の患者において記録され、最も共通する事象は、軽度と報告された (図4)。研究者らは、AEを14 (56%) 症例において処置に関連しないと評価した。これら14のAEのうちの11は、実験異常を含め、薬物投与前に8名の患者において記録された。AEは、12症例 (48%) において上記研究薬物に関連する可能性はなく、おそらく1症例 (4%) において上

10

20

30

40

50

記研究薬物と関連するとみなされた。これは、上記研究薬物の投与の間に血清トリグリセリド計数の増大であった。処置によって生じたAEにおいて明らかな用量 - 応答関係はなかった。コホート2の1名の患者は、84日目に上記疾患の軽度再発があったが、コホート3の別の患者は、異常な疼痛および嘔吐の2つの重篤なエピソードを経験し、これらは、ステロイドでの毎日の処置を必要とした。80mg/日で処置した1名の患者は、1日目に高い拡張時血圧を、84日目に、GED0301投与後数分間、T波反転（胸部誘導において）を経験した。循環器専門医による注意深い検査の後、これらAEの両方を、最近数ヶ月間にわたって患者が受けたブデソニド処置に続発的であるとみなされた。アレルギー性鼻炎のエピソードは、31日目に、アレルギー性疾患の病歴を有する1名の患者において記録された。このAEは、抗ヒスタミン化合物の1回の投与直後に解決した。

10

【0107】

独立安全委員会（と毒物学、薬剤監視および臨床炎症性腸疾患における専門家）が、安全性パラメーターをモニターしかつ評価するために指名された。1日目および7日目に、血液サンプルをまた、薬物動態分析のために、および末梢血単核細胞（PBMC）単離のために、投与後0時間、2時間、6時間、12時間および24時間で採取した。処置の効力を、異なる時点（例えば、8日目、28日目、60日目、および90日目）で、寛解基準（CDAI < 150）を満たしたかもしくはCDAIスコアにおけるベースラインから70点以上の減少として規定される臨床応答を達成した患者の数を評価することによって確立した。

【0108】

20

実施例2：SMAD7は、ヒト腸腺およびパイエル板において発現される

腸サンプルは、慢性的に活発な疾患のために外科的切除を受けており、医学的処置に十分に応答しない4名のCD患者から利用可能であった。これらサンプルを、免疫組織化学によるSMAD7の分析のために使用した。

【0109】

CDを有する患者の組織切片を切り出し、脱パラフィン化し、キシレンおよびエタノールを通して脱水した。抗原回復の目的で、上記スライドを、0.01M クエン酸緩衝液（pH6）中に10分間にわたってマイクロ波オープン中でインキュベートした。内因性ペルオキシダーゼをブロックするために、上記スライドを、次に、2% H₂O₂中で20分間にわたって室温でインキュベートした。マウス抗ヒトSMAD7抗体でのインキュベーションを、室温において1時間にわたって行った。Tris緩衝化食塩水中ですすいだ後、スライドを、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化したウサギ抗マウス抗体とともに30分間にわたって室温でインキュベートした。免疫反応性細胞を、基質としてジアミノベンジジンを添加することによって可視化し、ヘマトキシリンで軽く対比染色した。陰性コントロールとして、組織切片を、一次SMAD7抗体の代わりに、精製した正常ウサギ抗血清を使用して処理した。

30

【0110】

これら研究から、SMAD7は、ヒト腸腺およびパイエル板において発現されることが示された（図5）。この観察は、配列番号6を有するSMAD7のダウンレギュレーションもしくはノックダウンが、TGF- β 1がこれら構造において作用することを可能にし得、従って、炎症性サイトカイン（例えば、IFN- γ ）を発現するT細胞の割合を減少させ、調節性T細胞（これは、本明細書でTregといわれる）のパーセンテージを高めることを示唆する。

40

【0111】

実施例3：抗SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチド処理は、培養T細胞における炎症性サイトカインの発現を調節する

培養CCR9陽性細胞における炎症性サイトカインの発現に対するGED0301の効果进行调查した。CCR9陽性細胞に対するGED0301曝露の効果を決定的ために、PBMC（治験に登録されなかった活発なステロイド依存性CD患者5名から単離した）を、ペニシリン（100U/ml）およびストレプトマイシン（100U/ml）を補充

50

したX vivo無血清培養培地(Lonza, Verviers, Belgium)中で再懸濁し、Smad7アンチセンス(GED0301)もしくはセンスオリゴヌクレオチド(2 µg/ml)の存在下もしくは非存在下で、48時間にわたって培養した。Smad7アンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチドの両方を、Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)と合わせて、培養細胞の効率的トランスフェクションを促進した。細胞を染色し、各処理条件下で、CCR9+ 集団もしくは7+ 集団内のIFN-γもしくはIL17Aのいずれかを発現するT細胞のパーセンテージを決定するために、CCR9、IFN-γ、およびIL17Aに対して指向される抗体を使用して、フローサイトメトリーによって分析した。

【0112】

上記の培養PBMCに由来するCCR9+ 集団および7+ 集団中のIFN-γおよびIL17Aの発現を、GED0301が、CCR9+ 細胞における炎症性サイトカインの発現を直接阻害するか否かを決定するために分析した。CD4+ PBMCの、GED0301(Smad7アンチセンス)での処理は、IFN-γ発現およびIL-17A発現CCR9+ 細胞(図6A)のパーセンテージを有意に減少させたが、サイトカイン発現7+ 細胞の割合は、変化しないままであった(図6B)。例えば、IFN-γを発現するCCR9+ 細胞のパーセンテージは、非処理細胞において78.9 ± 7.3; センス鎖で処理した細胞において78.3 ± 7.3; およびGED0301で処理した細胞において54 ± 7.2であった。同様に、IL-17Aを発現するCCR9+ 細胞のパーセンテージは、非処理細胞において77.4 ± 7.3; センス鎖で処理した細胞において74.3 ± 6.4; およびGED0301で処理した細胞において53.9 ± 5.7であった。対照的に、IFN-γを発現する未処理、センス処理およびGED0301処理の7+ 細胞のパーセンテージは、それぞれ、13.1 ± 1.2; 11.7 ± 0.7、および11 ± 0.8であった。IL-17Aを発現する未処理、センス処理およびGED0301処理の7+ 細胞のパーセンテージは、12.1 ± 1.5; 10.4 ± 1.2、および10.6 ± 1.1であった。従って、培養CCR9+ CD4+ PBMCの、GED0301への直接曝露から、炎症性サイトカインの減少した発現が生じる。

【0113】

実施例4: 抗SMAD7 アンチセンスオリゴヌクレオチド処理は、T細胞集団の発現を調節する

この実施例は、循環するCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-γ+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-γ+ T細胞、IL17A+ T細胞、FoxP3+ CD103+ T細胞およびインテグリン47+ T細胞の割合を調査する研究を記載する。なぜなら、これらTreg細胞集団の活性化状態は、腸の小胞およびパイエル板において起こる免疫応答を反映するからである。以下で記載される研究において、試験した各コホートに関して、T細胞集団を0日目に測定して、各患者のベースライン測定値を決定した。GED-0301を実施例1において上記のように7日間にわたって投与し、T細胞集団を再び、8日目、28日目に、およびいくつかの細胞集団については84日目に測定した。

【0114】

Tregの末梢プールの操作は、免疫媒介性疾患および移植の処置のための特定の焦点であった。以前の研究から、末梢血Tregの数は、抗TNF抗体によって増大され得ること、そして増大は、抗TNF治療に应答する患者でのみ見いだされることが示された。Tregに対する抗TNF治療の効果は、TGF-β1によって媒介され得る。

【0115】

SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果は、SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチド治療が、増強したTGF-β1活性の結果としてTregの数を正に調節するか否かを決定するために調節した。SMAD7アンチセンス治療の効果はまた、このような処置が循環するFoxP3+ Tregの数の変化をもたらすか否か、およびこの効果がエフェクターTh1/Th17細胞のパーセンテージにおける変化と関連するか

10

20

30

40

50

否かを決定するために研究した。

【0116】

さらに、CCR9+ T細胞は、クローン病を有する患者の末梢循環において富化され、粘膜T細胞特徴（活性化表現型、CD2活性化への応答性、および炎症性（例えば、IFN- γ ）および調節性（例えば、IL10）サイトカインの両方を作製する能力を含む）を有する。SMAD7アンチセンス治療の効果もまた、このような処置が、循環CCR9+ T細胞の数の変化をもたらすか否かを決定するために研究した。

【0117】

PBMC単離およびフローサイトメトリー分析のために、血液サンプル（10mg）をヘパリン含有チューブの中に集め、RPMI 1640で希釈し（1:1）、Ficoll-1-*Paque*を使用して密度勾配遠心分離によって分離した。この目的で、チューブを1800rpmにおいて30分間にわたって遠心分離にかけ、得られたPBMCを集め、RPMI 1640中で2回洗浄した。

【0118】

PBMCを、10% 不活性化FBS、ペニシリン（100U/ml）、およびストレプトマイシン（100mg/ml）を補充したRPMI 1640中に再懸濁した。細胞を、以下の抗体を使用してフローサイトメトリーによって表現型を特徴付けた：APC標識抗ヒトCCR9およびPE標識抗ヒトFoxp3。全ての抗体を、1:50最終希釈において使用した。

【0119】

PBMCをまた、96ウェルU底培養ディッシュ中に播種し、ホルボール12-ミリステート13-アセテート（PMA, 10ng/ml）、イオノマイシン（1mg/ml）、およびプレフェルジンA（10mg/ml）で刺激した。5時間後、細胞を、上記の抗体を使用してCCR9発現について、ならびにIFN- γ およびIL-17Aに関しては以下の抗体を使用して染色した：FITC抗ヒトIFN- γ 抗体、Alexa Fluor 647抗ヒトIL-17A抗体、およびPE抗ヒトIL17A抗体。全ての抗体を、1:50最終希釈において使用した。適切なアイソタイプを合わせたコントロールを、上記実験の全てに含めた。上記FITC抗ヒトIFN- γ 抗体をBeckton Dickinsonから得、本明細書で使用した他の抗体全てを、EBiosciencesから得た。

【0120】

値を、メジアンおよび群間の差異として表し、マンホイットニーU検定を使用して比較した。統計的有意性（ $p < 0.05$ ）を、ウィルコクソンの符号付き順位和検定（Wilcoxon matched pairs test）を使用して決定した。

【0121】

炎症性リンパ球/拮抗作用リンパ球（counter-regulatory lymphocyte）の割合に対するGED0301処理の効果を調査した。GED0301処理は、治験の8日目および28日目にモニターした場合、循環するCD3+、CD4+、CD8+、CD25+、CD161+、CD62L+、 α 4 β 7+、もしくはCCR9+ T細胞のパーセンテージを有意に変化させなかった（図7）。同様に、GED0301処理後にインターロイキン（IL）-17A+ T細胞、IL-10+ T細胞、Foxp3+ T細胞、インターフェロン（IFN）- γ 発現およびIL-17A発現の α 4 β 7+ T細胞、またはFoxp3発現CD103+ T細胞の割合において有意な変化は全く観察されなかった。

【0122】

表Iおよび表Iaは、コホート1（7日間にわたって40mgのGED-0301/日を受けた）の結果を示す。表Iは、0日目、8日目、28日目の総細胞集団における所定のT細胞集団のパーセンテージを示す。表Iaは、0日目、8日目、28日目および84日目の総細胞集団におけるCCR9+ Foxp3+ T細胞、Foxp3+ T細胞およびCD103+ Foxp3+ T細胞のパーセンテージを示す。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 3 】

表 I I は、コホート 2 (8 0 m g の G E D - 0 3 0 1 / 日 を 7 日 間 に わ た っ て 受 け た) の 結 果 を 示 す。表 I I は、0 日 目、8 日 目、お よ び 2 8 日 目 の 総 細 胞 集 団 に お け る 所 定 の T 細 胞 集 団 の パ ー セ ン テ ー ジ を 示 す。表 I I a は、0 日 目、8 日 目、2 8 日 目 お よ び 8 4 日 目 の 総 細 胞 集 団 に お け る C C R 9 + F o x P 3 + T 細 胞、F o x P 3 + T 細 胞 お よ び C D 1 0 3 + F o x P 3 + T 細 胞 の パ ー セ ン テ ー ジ を 示 す。

【 0 1 2 4 】

表 I I I は、コホート 3 (1 6 0 m g の G E D - 0 3 0 1 / 日 を 7 日 間 に わ た っ て 受 け た) の 結 果 を 示 す。表 I I I は、0 日 目、8 日 目、お よ び 2 8 日 目 の 総 細 胞 集 団 に お け る 所 定 の T 細 胞 集 団 の パ ー セ ン テ ー ジ を 示 す。表 I I I a は、0 日 目、8 日 目、2 8 日 目 お よ び 8 4 日 目 の 総 細 胞 集 団 に お け る C C R 9 + F o x P 3 + T 細 胞、F o x P 3 + T 細 胞 お よ び C D 1 0 3 + F o x P 3 + T 細 胞 の パ ー セ ン テ ー ジ を 示 す。

10

【 0 1 2 5 】

表 I V は、コホート 1 ~ 3 の 全 て の 患 者 の 合 わ せ た 結 果 を 示 す。表 I V は、0 日 目、8 日 目、お よ び 2 8 日 目 の 総 細 胞 集 団 に お け る 所 定 の T 細 胞 集 団 の パ ー セ ン テ ー ジ を 示 す。表 I V a は、0 日 目、8 日 目、2 8 日 目 お よ び 8 4 日 目 の 総 細 胞 集 団 に お け る C C R 9 + F o x P 3 + T 細 胞、F o x P 3 + T 細 胞 お よ び C D 1 0 3 + F o x P 3 + T 細 胞 の パ ー セ ン テ ー ジ を 示 す。

【 0 1 2 6 】

表 I

細胞集団	0 日目			8 日目			28 日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
CCR9+IFN-g+	1.5%	3.25%	0.70%	0.3%	1.6%	0.13%	0.80%	0.85%	0.40%
CCR9+IL-17A+	0.28%	2.8%	0.02%	0.44%	2.7%	0.05%	0.15%	0.90%	0.00%
CCR9+FoxP3+	0.07%	0.20%	0.01%	0.25%	0.70%	0.02%	0.18%	0.21%	0.10%
IFN-g+	14.5%	22.99%	6.29%	7.97%	13.82%	3.5%	11.00%	27.00%	4.95%
IL-17A+	1.4%	2.50%	0.4%	1.2%	2.80%	0.64%	1.02%	4.70%	0.30%
FoxP3+	0.80%	2.20%	0.19%	0.90%	2.50%	0.21%	1.50%	3.20%	0.20%
FoxP3+ CD103+	0.18%	4.60%	0.03%	0.30%	0.40%	0.07%	0.28%	0.80%	0.10%
インテグリン α4β7+	2.70%	2.90%	2.30%	1.35%	2.40%	0.51%	0.99%	2.60%	0.73%

表 Ia

細胞集団	0 日目			8 日目			28 日目			84 日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
CCR9+	0.07%	0.20%	0.01%	0.25%	0.70%	0.02%	0.18%	0.21%	0.10%	0.46%	2.50%	0.01%
FoxP3+	0.80%	2.20%	0.19%	0.90%	2.50%	0.21%	1.50%	3.20%	0.20%	1.06%	2.8%	0.05%
FoxP3+	0.18%	4.60%	0.03%	0.30%	0.40%	0.07%	0.28%	0.80%	0.10%	0.28%	1.2%	0.05%

表 II

細胞集団	0 日目			8 日目			28 日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
CCR9+IFN-g+	1.40%	14.00%	0.40%	1.00%	5.20%	0.50%	9.40%	20.00%	0.56%
CCR9+IL-17A+	0.80%	9.80%	0.28%	0.3%	5.20%	0.09%	1.21%	4.50%	0.40%
CCR9+FoxP3+	0.50%	0.60%	0.20%	0.40%	0.50%	0.20%	0.40%	0.50%	0.16%
IFN-g+	9.80%	20.90%	4.80%	5.70%	34.00%	1.70%	14.95%	34.00%	4.50%
IL-17A+	0.70%	5.80%	0.20%	0.19%	4.60%	0.00%	1.00%	4.60%	0.22%
FoxP3+	1.70%	2.30%	0.60%	1.10%	1.60%	0.80%	0.80%	1.60%	0.60%
FoxP3+ CD103+	0.20%	0.40%	0.12%	0.23%	0.34%	0.14%	0.34%	0.06%	0.07%
インテグリン α4β7+	2.40%	4.20%	0.92%	3.29%	7.00%	1.40%	3.38%	4.80%	1.10%

表 IIa

細胞集団	0日目			8日目			28日目			84日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
CCR9+ FoxP3+	0.50%	0.60%	0.20%	0.40%	0.50%	0.20%	0.40%	0.50%	0.16%	0.60%	5.00%	0.10%
FoxP3+	1.70%	2.30%	0.60%	1.10%	1.60%	0.80%	0.80%	1.60%	0.60%	1.80%	4.00%	0.15%
FoxP3+ CD103+	0.20%	0.40%	0.12%	0.23%	0.34%	0.14%	0.34%	0.06%	0.07%	0.20%	1.10%	0.10%

表 III

細胞集団	0日目			8日目			28日目			84日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
CCR9+IFN-g+	14.00%	35.00%	2.80%	8.00%	16.00%	0.40%	10.30%	31.00%	1.30%	1.30%	1.30%	1.30%
CCR9+IL-17A+	4.40%	7.80%	3.50%	4.00%	8.00%	0.30%	1.50%	280.00%	1.00%	1.50%	280.00%	1.00%
CCR9+FoxP3+	0.80%	1.20%	0.10%	1.30%	1.90%	0.70%	0.70%	1.50%	0.28%	0.70%	1.50%	0.28%
IFN-g+	10.80%	26.00%	3.60%	8.50%	15.00%	1.70%	13.00%	29.00%	3.40%	13.00%	29.00%	3.40%
IL-17A+	2.10%	3.60%	1.00%	1.20%	5.30%	1.10%	1.50%	5.60%	0.80%	1.50%	5.60%	0.80%
FoxP3+	2.80%	3.30%	1.70%	2.10%	4.60%	1.60%	1.50%	4.40%	0.80%	1.50%	4.40%	0.80%
FoxP3+ CD103+	0.80%	1.20%	0.20%	0.70%	1.80%	0.50%	0.70%	1.40%	0.24%	0.70%	1.40%	0.24%
インテグリン α4β7+	2.80%	6.30%	2.50%	1.10%	6.80%	0.60%	3.50%	5.20%	0.90%	3.50%	5.20%	0.90%

表 IIIa

細胞集団	0日目			8日目			28日目			84日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
CCR9+ FoxP3+	0.80%	1.20%	0.10%	1.30%	1.90%	0.70%	0.70%	1.5%	0.28%	0.40%	0.8%	0.12%
FoxP3+	2.80%	3.30%	1.70%	2.10%	4.60%	1.60%	1.50%	4.40%	0.80%	0.40%	8.49%	0.23%
FoxP3+ CD103+	0.80%	1.20%	0.20%	0.70%	1.80%	0.50%	0.70%	1.40%	0.24%	0.20%	1.40%	0.10%

【表 3】

表 IV

	0日目			8日目			28日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
細胞集団									
CCR9+IFN-g+	2.8%	35.00%	0.40%	1.0%	16.00%	0.13%	5.05%	31.00%	0.40%
CCR9+IL-17A+	2.8%	9.8%	0.02%	0.44%	8.00%	0.05%	1.00%	280.00%	0.00%
CCR9+FoxP3+	0.20%	1.20%	0.01%	0.50%	1.90%	0.02%	0.40%	4.00%	0.10%
IFN-g+	10.60%	26.00%	3.60%	7.2%	34.00%	1.70%	13.00%	34.00%	3.40%
IL-17A+	1.4%	5.80%	0.20%	1.10%	5.30%	0.00%	1.06%	5.60%	0.22%
FoxP3+	1.70%	3.30%	0.19%	1.23%	4.60%	0.21%	1.25%	4.40%	0.20%
FoxP3+ CD103+	0.20%	4.60%	0.03%	0.34%	1.80%	0.07%	0.34%	1.40%	0.07%
インテグリン α4β7+	2.70%	6.30%	0.92%	2.00%	7.00%	0.51%	2.60%	5.2%	0.073%

表 IVa

	0日目			8日目			28日目			84日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
細胞集団												
CCR9+	0.20%	1.20%	0.01%	0.50%	1.90%	0.02%	0.40%	4.00%	0.10%	0.46%	5.00%	0.01%
FoxP3+	1.70%	3.30%	0.19%	1.23%	4.60%	0.21%	1.25%	4.40%	0.20%	1.06%	8.49%	0.50%
FoxP3+	0.20%	4.60%	0.03%	0.34%	1.80%	0.07%	0.34%	1.40%	0.07%	0.20%	1.40%	0.02%
CD103+												

【0129】

上記の表の各々において示されるように、CCR9 + IFN-g + を発現する T 細胞集団の有意な減少は、8 日目に認められた（例えば、表 IV は、0 日目において 2.8% 発現および 8 日目において 1.0% 発現を示す；図 8 B を参照のこと）。

【0130】

CCR9 + IL17A + T 細胞集団の減少もまた、認められた（例えば、表 IV は

10

20

30

40

50

、0日目において2.8%発現および8日目において0.44%発現を示す；図8Dを参照のこと）。0日目からの有意な減少もまた、28日目にCCR9+ IL17A+ T細胞集団において認められた（例えば、表IVは、28日目において1.00%発現を示す；図8Dを参照のこと）。上記減少は、84日目においてなお存在した（メジアン発現1%；範囲0.08%~4.8%）。

【0131】

CCR9+ FoxP3+ T細胞集団における増大は、8日目から84日目において認められた（例えば、表IVは、0日目において0.2%発現および8日目において0.5%発現を示す；図8Fを参照のこと）。

【0132】

IFN- + T細胞集団における有意な減少は、8日目において認められた（例えば、表IVは、0日目において10.6%発現および8日目において7.2%発現を示す；図8Aを参照のこと）。

【0133】

IL17A+ T細胞集団の減少もまた、認められた（例えば、表IVは、0日目において1.4%発現および8日目において1.1%発現を示す；図8Cを参照のこと）。

【0134】

FoxP3+ T細胞集団における減少もまた、8日目に認められた（例えば、表IVは、0日目において1.7%発現および8日目において1.23%発現を示す；図8Eを参照のこと）。

【0135】

FoxP3+ CD103+ T細胞集団において変化なし（例えば、表IVは、0日目において0.2%発現および8日目において0.34%発現を示す）およびインテグリン₄₇ T細胞集団において変化なし（例えば、表IVは、0日目において2.7%発現および8日目において2%発現を示す）が認められた。

【0136】

表I~IVに示される結果から、CD患者におけるGED-0301でのSMAD7の阻害は、特定のT細胞集団の発現を調節することが示される。特に、本発明者らは、GED-0301処置後に8日目においてCCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞、およびIL17A+ T細胞集団のダウンレギュレーション、ならびにGED-0301処置後に8日目においてCCR9+ FoxP3+ T細胞集団のアップレギュレーションを認めた。CCR9+ IL17A+ T細胞集団はまた、GED-0301処置後に28日目においてダウンレギュレートされた（例えば、0日目と比較した場合）。表I~IVに示される結果から、CD患者におけるGED-0301でのSMAD7の阻害は、Th1サイトカインの合成を減少させ、調節性T細胞（Treg）媒介性免疫抑制に対するエフェクターT細胞の感受性を回復させることが示唆される。これは、TGF- β 1がTh1細胞応答の強力なインヒビター、ならびにTregの末梢分化および活性の重要なメディエーターであるという証明と一致する。

【0137】

CDAIスコアをまた、上記で考察した3つのコホートの各々における患者について測定した。ベースラインCDAIスコアを、0日目に測定し、処置の1日目、4日目、8日目、28日目、および84日目にも再び測定した。表V~VIIは、それぞれ、コホート1~3の各々についての代表的患者のCDAIスコアを提供する。

X. 下の表Vに示されるように、40mgのGED-0301を7日間にわたって受けたコホート1の患者は、モニタリング期間（84日目）全体を通じて維持された処置の4日目までにCDAIスコアにおける減少を示した。

【0138】

10

20

30

40

【表4】

表V

患者(コホート1)	ベースライン	1日目	4日目	8日目	28日目	84日目
患者1-01	289	278	154	42	119	89
患者1-02	253	257	181	86	93	154.4
患者1-03	221	204	138	89	45	35
患者1-04	302	294	203	41	18	81
患者1-05	306	331	275	163	144	167

【0139】

下の表V Iに示されるように、80mgのGED-0301を7日間にわたって受けたコホート2の患者は、モニタリング期間(84日目)全体を通じて維持された処置の4日目までにCDAIスコアにおける減少を示した。

【0140】

【表5】

表VI

患者(コホート2)	ベースライン	1日目	4日目	8日目	28日目	84日目
患者2-08	299	293	224	70	119.4	73
患者2-09	400	401	322.2	215	301	339
患者2-10	268	330	213	126	213.5	225
患者2-11	287	299.8	207	95.6	52	46
患者2-12	252	226	194	154	133	185

【0141】

下の表V I Iにおいて示されるように、160mgのGED-0301を7日間にわたって受けたコホート3の患者は、モニタリング期間(84日目)全体を通じて維持された処置の4日目までにCDAIスコアにおける減少を示した。

【0142】

【表6】

表VII

患者(コホート3)	ベースライン	1日目	4日目	8日目	28日目	84日目
患者3-15	230	210	168.6	44	31	145
患者3-16	260	217	133	53	71	94
患者3-17	292	279	219	113	88	184
患者3-18	290	280	242	95	71	118
患者3-19	257	240	155	37	49	134

【0143】

表V~V I Iにおける結果は、GED-0301での処置が、クローン病に罹患している患者のCDAIスコアを減少させることを示す。登録時に、全ての患者の中でのメジアン(CDAI)スコアは、287であった(221~400)(図9)。上記メジアンCDAIスコアは、コホート1の患者について289(範囲221~306)、コホート2の患者について287(範囲252~400)およびコホート3の患者について287(範囲221~400)であった。3つ全てのコホートにおいて、上記患者は処置に応答した(例えば、ベースラインCDAIスコアから70点以上の減少が、各患者について認められた)。その結果、8日目に、15名の患者全てが、CDAIスコアにおける減少を示し、コホート1~3の12/15名の患者が、寛解に入った(すなわち、CDAIスコア<150)(表V~V I I)。具体的には、コホート1の4/5名の患者、コホート2の3/5名の患者およびコホート3の5/5名の患者が、CDAIスコア<150を有した(表V~V I I)。28日目に、臨床応答は、15名の患者全てに

10

20

30

40

50

においても明らかであり（表V～VII）、ベースラインからのCDAIスコアの有意な減少があった（ $P < 0.0001$ ）。28日目における臨床的寛解は、13/15名の患者（86%）（コホート1の5/5名、コホート2の3/5名、およびコホート3の5/5名）において記録された（表V～VII）。84日目に、総CDAIスコアは、ベースラインにおいて測定されたものより有意に低く（表V～VII, $P < 0.0001$ ）、9/15名（60%）の患者は、なお寛解状態にあった。特に、これは、コホート1の3名の患者、コホート2の2名の患者、およびコホート3の4名の患者において認められた（表V～VII）。ベースラインから8日目、28日目および84日目までのCDAIスコアの有意な減少は、各コホートにおいて分析を行った場合にすら認められた（図9）。上記結果は、寛解の誘導および/または改善された転帰とT細胞亜集団との間に相関関係があることを示唆する。さらに、84日目に認められたCDAIスコアは、より早い時点から増大を示し（例えば、8日目および28日目）、このことは、84日目の特定のT細胞集団における対応する変動と一致した（例えば、CCR9+ FoxP3+ T細胞集団は、0日目から8日目まで増大したが、84日目には、T細胞のこの集団は、減少するようである）。

10

【0144】

援用の表示

本明細書で引用される特許文書および科学文献の各々の開示全体が、全ての目的で参考として援用される。

【0145】

20

等価物

本発明は、その本質的特徴から離れて、他の特定の形態において具現化され得る。前述の実施形態は、従って、本明細書に記載される発明に対する限定ではなく例示としてみなされるべきである。本発明の範囲は、前述の説明によってではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の意味および等価物の範囲の中に入る全ての変更は、特許請求の範囲内に包含されると解釈される。

【 図 1 A 】

1 ggcaagagcg gagagccgcg caggggcggg gcccgccggg gtagggcagc cggagccgag
61 gcccccgatc cccggggggg gcccccgggg ccccggcgcg gcccccggct cccggagact
121 ggccagagcc aaggagccgc cctggccggc ccccgccgctc tggccggggc cctcctgctg
181 cgtgctgctg cctggccgctg tggcccaact cggcgccgca cctctctcag gtagtggggg
241 gctcatgtcg ctccttagca gggcaacgac ttctctctcc gctcctcctg cccgcatgtt
301 caggaccaca cgatectggc tctctccggc tctctggagg agccctggcg cccggcggtg
361 ggagcagagc ggagggggcg ggggaggttg aggagggagc gactgcccgg gagaaggggg
421 ggagcagagc ggagggggcg ggggaggttg aggagggagc gactgcccgg gagaaggggg
481 ggcaagagcg gtaggaggtg ccaaaaggtc ccaacatccc caccggccag cccggggggc
541 cggcgccggc gggggggggg aggggagctc gaaggcgctc acgcaactcg tgctcaagaa
601 actgaagagc cggagcctgg agctgtgctc caggccggcg gactcccggg gggggagcgg
661 caccgctgct cctcctgctg cggcgccgct cggactgcaq cggggccggg gggggccgcy
721 cggcgccgag cctggcagc cggcctgctc caactgctc cccctcctg tggcaaaagt
781 gctcagctgg cgggactcga ggcactctcc ggaagtcag aggcctgctt gctgtgaact
841 ttaacggaga atcaaccocg agctgggtgt ctgcaacccc catacctta gccgactctg
901 ggaactagag tctccccccc cctcctactc cagataccgg atggatttcc taaaaccac
961 tgcagactgt ccagatgctg tgctctctcc cgtgaaaca gggggaagca attatctgct
1021 cccggggggg ctttcagatt cccaactctc tctggagcct ggggagcgt cacactgggt
1081 cgtgtggcca tactggggag agaagcagag agtggggagg cctactgtg tccaggagcc
1141 cctctgggat atctctctat actcaactca ggggaatggg ttttctcctg gacagctca
1201 ttcggacacg aagagtcagc ttgtgcaaa ggtggcgagc aaaaatggct ggggcatcca
1261 gctgagcggg gagggtgagt gtagtgggtg gtaacaaccg agcagttacc ccaatctctc
1321 caagtccgac acactggaca acccggaact caggagcctg ttggtacaca aggtgttccc
1381 cgtttctccc atcaagcctt tcgactcaga gaagcctgac agcctgagc gggccaaatg
1441 ccaagacttt atgcaagcag cgtgagcggg ctttaccctg cagatcagc ttgtgaaggg
1501 cttgggtcag tgctacaccc gccagttcat cagcagctgc cccgtcctgc tagagttct
1561 cttcaacagc cggtagccgc gtaggggggg gacagagcgt gactgagaca gggcaacact
1621 caaactactt tgctgctaat atttctctcc tgagtgcctg ctttcaatg aactctgtt
1681 gctgtttttt ttttggttgt ttgtgttttt tctctctccc gctcctgctt gctgtctgtt
1741 ttgtttgct cttgagaaa taqctatgga aagagattgt tggggtttt tctggaagaa
1801 ggagcagata tgatcggcag caacocctga taggaagagc ggaagcagaa atccaagcc
1861 caccacaacac agttagttaa gggggggcgt catcattcca cttgtcaaga gctgtgtgta
1921 gctgtagtgt ggggctgtgt gtagaacgct gtagaacgct gtagaacgct gtagaacgct
1981 gctctttgtt ttgtgtctct tatgtgtctc cccagcagag aggtttgag tcccaagcgg
2041 ttgtctctcc gccctctgga cagctcagc ggggagagag cagtaactgg gaaagctggc
2101 ggtgggggtc ccaagcagctg ccaagcagac ggcctctgct ccaagcagc aagccctctg
2161 cccctcctct cctcctcaaa ggaacagggc ctgctcaag gctctgagc agcgagcctg
2221 ctagtggcgc aaccagaacc aattattttc atcctgtgct tattctcttc cggcagagcc
2281 cngcaattgt agctatttcc tttttggcgc atctctcctc gactctcctc gagatggct
2341 tcccaagggg tggcgggga gcccctcac agtattgccc accaagtgc cctctccctc
2401 agcctctccc ctgactgccc ttgtgacatc aggtttttcc cggacttaya aacacagctc
2461 agcaactgct gctccatccc ttgtgttaa gctctgctat tagccaagca agcggggagt
2521 tccctggagc ggaactgctc agcagctccc tccctccaaa gaagattttg gctcgtcata
2581 acccaagata ccaactagc ctgacaacta actctctctt cattttctc acaactcaca
2641 cactgtatg ataactgac actgttctta gctcaatgag catgtttaga ctttaacata
2701 agctattttt ctaactacaa aggtttaaact gaacaagaga agcatlcca ttggaaattt
2761 agcaattgtg tgccttgaga gagaagagc tcttgaaaaa aaacctgaga tcttataag
2821 aaaaaaatg attttataat atattatcac atattatcac ttgtataat aagaacttt
2881 tataagcctc attattatg tattgtcaa ttgtataaa caagaaaaat aaagaaaaga
2941 tgcactttg ttaataata atgcaataa caaatgcccac attaaaaaag ataaacacaa
3001 gattgtgtt tttctctatg ggtgttatca cctagctgaa tgtttttcta aaggagttta
3061 ttttccata aacgattttt aaaaatgaca cttgaaaaaa aaaaaaaa a
(配列番号 1)

Fig. 1A

【 図 1 B 】

MFRTKRSALVRRLLWRSRAFPGGEDEEGAGGGGGGGELRGEATD
SRAHGAGGGGPRAGCCLGKAVRGAKGHHHPHPPAAGAGAAGGAFADLKALHHSVLLK
LKERQLELLLOAVESRGGTRTACLLLPRLDCLRGLGPGAPAGAPQAPPSPSYSLPLLCC
KVRWPDRLHSSSEVKRLCCCESEYKINPFLVCCNPHHLRSLCELESPPPYSRYPMDF
LKPITADCPDAVPSAETGGTNYLAPGGLSDSLLLEPGDRSHWCVVAYWEEKTRVGRLL
YCVQEPESLDIFYDLPGNGFCLGLNSDNKSLVQKVRSKIGCGIQLTRVEDGVWVYIN
RSSYPIFKSATLNDPDSRLLLVHKVFPFSGIKAFDYEKAYSLQRPNLDFHEFMQPPWTG
(配列番号 2)

Fig. 1B

【 図 2 】

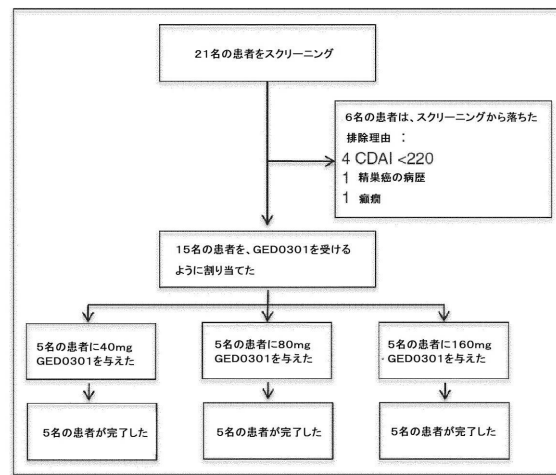


Fig. 2

【 図 3 】

Table with 5 columns: 40 mg, 80 mg, 160 mg, 全体. Rows include demographic data (gender, age), CD progression, and adverse events (inflammation, TNF inhibitors, etc.).

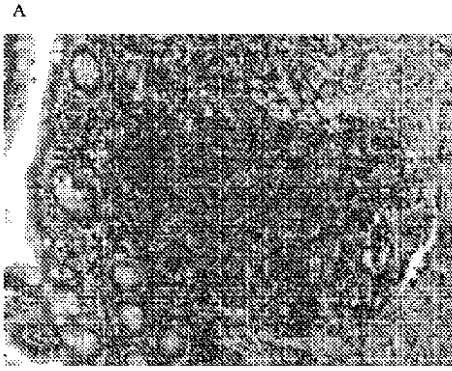
Fig. 3

【 図 4 】

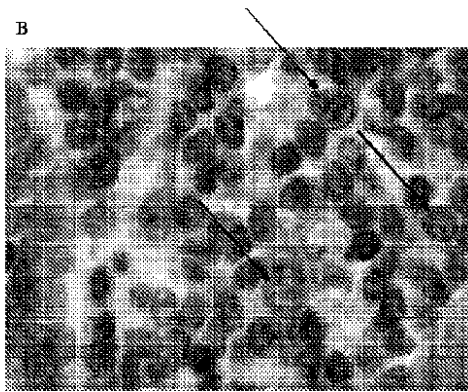
Table with 4 columns: コホート 1, コホート 2, コホート 3, 研究薬物との関連性. Rows list adverse events like CD relapse, pain, vomiting, etc., with associated grades and study-relatedness.

Fig. 4

【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 】

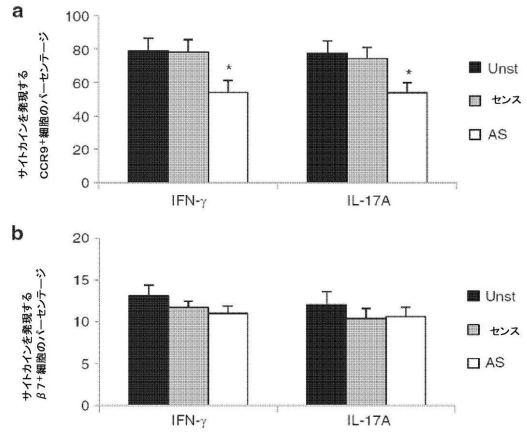


Fig. 6

【 図 7 】

	ベースライン	8日目	28日目
細胞			
CD3 ⁺	66.8% ± 12.5%	70.8% ± 12.5%	70.4% ± 10.3%
CD4 ⁺	44.8% ± 14.2%	50.4% ± 12.8%	50.7% ± 12.6%
CD8 ⁺	16.6% ± 6.6%	20.0% ± 6.2%	19.8% ± 5.4%
CD25 ⁺	44.2% ± 15.5%	39.2% ± 11.6%	39.4% ± 13.8%
CD161 ⁺	4.9% ± 2.8%	4.3% ± 2.7%	4.7% ± 4.6%
CD62L ⁺	50.3% ± 13.7%	54.9% ± 11.6%	54.9% ± 12.9%
CCR9 ⁺	2.9% ± 1.6%	3.8% ± 3.1%	3.6% ± 2.8%
α4β7 ⁺	3.0% ± 1.5%	2.7% ± 2.1%	2.4% ± 1.3%

Fig. 7

【 図 8 】

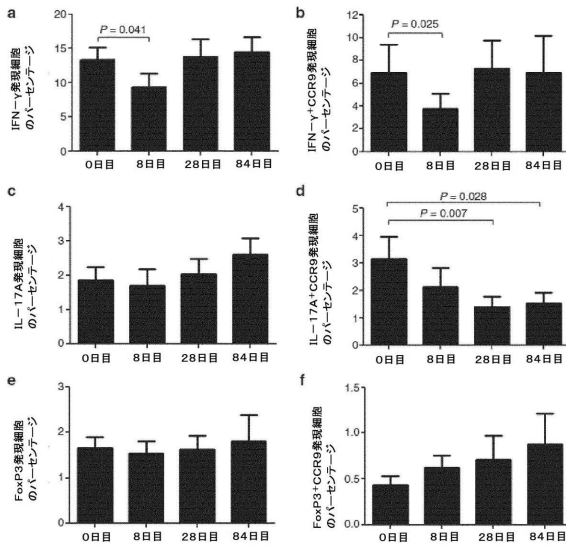


Fig. 8

【 図 9 】

	40 mg	80 mg	160 mg	全体
	N = 5	N = 5	N = 5	N = 15
	コホート 1	コホート 2	コホート 3	
CDAI				
ベースライン	289 (221-306)	287 (252-400)	287 (221-400)	287 (221-400)
8日目	86 (41-163)	126 (70-215)	53 (37-113)	89 (37-215)
28日目	93 (18-144)	133 (52-301)	71 (31-88)	88 (18-301)

Fig. 9

【配列表】

0006389122000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	P
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 K 48/00	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)		C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 1 2 M 1/34	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 M 1/34	F
		C 0 7 K 16/28	Z
		C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 モンテレオーネ, ジョヴァニ
 イタリア国 イ - 0 0 1 3 3 ローマ, ヴィア モントペッリエル 1
- (72)発明者 ヴィーティ, フランチェスカ
 イタリア国 イ - 2 0 0 9 9 セスト サン ジョヴァニ, ヴィア ベネデット クローチェ
 4 4
- (72)発明者 ベリンヴィーア, サルヴァトーレ
 イタリア国 イ - 3 3 1 7 0 ボルデノーネ, ヴィア ブルザフィエラ 1 2

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特表2010-531138(JP,A)
 特表2009-508089(JP,A)
 特開2010-051307(JP,A)
 米国特許出願公開第2009/0275496(US,A1)
 MONTELEONE GIOVANNI, MOLECULAR THERAPY, 米国, ACADEMIC PRESS, 2012年 4月 1日,
 V20 N4, P870-876
 MONTELEONE GIOVANNI, JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 米国, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, 2001年 8月 1日, V108 N4, P601-609
 BOIRIVANT MONICA, GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, 2006年12月22日, V131 N6, P1786-1798
 MONTELEONE GIOVANNI, TRENDS IN IMMUNOLOGY, 米国, ELSEVIER, 2004年10月 1日, V25 N10, P513-517
 FANTINI MASSIMO C, GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, 2009年 4月 1日, V136 N4, P1308-1316 1316.E1 - 1316.E3

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	监测对抗SMAD 7治疗的反应性的方法		
公开(公告)号	JP6389122B2	公开(公告)日	2018-09-12
申请号	JP2014530245	申请日	2012-09-14
申请(专利权)人(译)	Nogura制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Nogura制药有限公司		
[标]发明人	モンテレオーネジョヴァニ ヴィーティフランチェスカ ベリンヴィーアサルヴァトーレ		
发明人	モンテレオーネ, ジョヴァニ ヴィーティ, フランチェスカ ベリンヴィーア, サルヴァトーレ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/48 G01N33/536 G01N33/50 A61K31/7088 A61K48/00 A61P1/04 C12Q1/04 C12Q1/68 C12N15/09 C12M1/34 C07K16/28 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/5094 G01N33/56972 G01N2800/065 G01N2800/52 A61P1/04 G01N33/505 G01N33/6866 G01N33/6869 G01N33/6872 G01N33/68 G01N2333/54 G01N2333/7158		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y G01N33/543.597 G01N33/48.P G01N33/536.C G01N33/543.501.A G01N33/50.P A61K31/7088 A61K48/00 A61P1/04 C12Q1/04 C12Q1/68.A C12N15/00.A C12M1/34.A C12M1/34.F C12M1/34.Z C07K16/28 C12P21/08		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	2011425234 2011-09-15 EP 61/576556 2011-12-16 US		
其他公开文献	JP2014531584A JP2014531584A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于监测受试者是否对用抗SMAD7疗法治疗敏感或抗性的方法。该方法基于确定来自受试者的样品中CCR9 + FOXP3 + T细胞, CCR9 + IFN-γ+ T细胞, CCR9 + IL17A + T细胞, FOXP3 + T细胞, IFN-γ+ T细胞和/或IL17A + T细胞的量。T细胞群的测量可以通过流式细胞术, 免疫组织化学和/或ELISA来确定。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6389122号 (P6389122)
(45) 発行日 平成30年9月12日(2018.9.12)	(24) 登録日 平成30年8月24日(2018.8.24)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O I N 33/53 (2006.01)	G O I N 33/53	Z N A Y
G O I N 33/543 (2006.01)	G O I N 33/543	5 9 7
G O I N 33/48 (2006.01)	G O I N 33/48	P
G O I N 33/536 (2006.01)	G O I N 33/536	C
G O I N 33/50 (2006.01)	G O I N 33/543	5 0 1 A
	請求項の数 20	(全 39 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2014-530245 (P2014-530245)	(73) 特許権者 514063825	
(22) 出願日 平成24年9月14日(2012.9.14)	ノグラ ファーマ リミテッド	
(65) 公表番号 特願2014-531584 (P2014-531584A)	アイルランド国 2, タブリン, サー	
(43) 公表日 平成26年11月27日(2014.11.27)	ジョン ロジャーズソズ キー 33	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2012/088146	(74) 代理人 100078282	
(87) 国際公開日 W02013/037970	弁理士 山本 秀策	
(31) 優先権主張番号 11425234.9	(74) 代理人 100113413	
(32) 優先日 平成23年9月15日(2011.9.15)	弁理士 森下 夏樹	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人 100181674	
(31) 優先権主張番号 61/576,556	弁理士 飯田 貴敏	
(32) 優先日 平成23年12月16日(2011.12.16)	(74) 代理人 100181641	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	弁理士 石川 大輔	
	(74) 代理人 230113332	
	弁理士 山本 健作	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗SMAD 7治療に対する応答性をモニターするための方法