

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-545437  
(P2008-545437A)

(43) 公表日 平成20年12月18日(2008.12.18)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 84 頁)

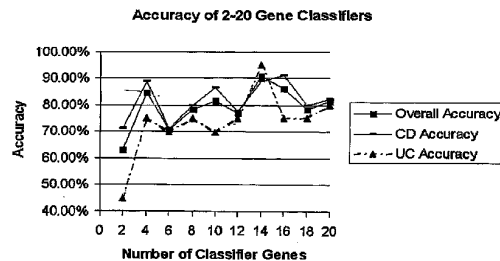
(21) 出願番号	特願2008-515865 (P2008-515865)	(71) 出願人	591011502 ワイス W y e t h アメリカ合衆国07940-0874ニュー ージャージー州 マディソン、ファイブ・ ジラルダ・ファームズ
(86) (22) 出願日	平成18年6月6日(2006.6.6)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(85) 翻訳文提出日	平成20年2月5日(2008.2.5)	(74) 代理人	100095360 弁理士 片山 英二
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/022102	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(87) 国際公開番号	W02006/133287	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(87) 国際公開日	平成18年12月14日(2006.12.14)		
(31) 優先権主張番号	60/687, 331		
(32) 優先日	平成17年6月6日(2005.6.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/692, 295		
(32) 優先日	平成17年6月20日(2005.6.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患についての末梢血単核細胞の発現プロフィール

(57) 【要約】

本発明は、炎症性腸疾患を診断するために用いることができる、および場合によっては、クローン病を有する患者から単離されたP B M Cと潰瘍性大腸炎を有する患者から単離されたP B M Cとを識別することができる、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの同定に関する。さらに、本発明は、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの活性を調節することができる調節剤についての、ハイスループットスクリーニング法を含む、スクリーニング法に関する。炎症性腸疾患、例えばクローン病および潰瘍性大腸炎の診断方法、予後予測方法、治療的介入方法および予防方法のための、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤を含む、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの組成物を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者において炎症性腸疾患を診断する方法であって、

a . 患者からサンプルを単離する工程 ; および

b . 少なくとも 1 つの P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの正常発現または異常発現を前記サンプルにおいて検出する工程 ;

を含み、少なくとも 1 つの P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの異常発現が、前記患者が炎症性腸疾患に罹患している場合があることを示す方法。

## 【請求項 2】

前記サンプルが、末梢血単核細胞の採取物である、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記検出工程が、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイを用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記検出工程が、免疫アッセイを用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記検出工程が、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、定量ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記検出工程が、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルの発現を検出する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが、少なくとも 1 つの共通バイオマーカーを含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが、少なくとも 1 つの I 群バイオマーカーを含む、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが P A I - 2 を含む、請求項 9 に記載のパネル。

30

## 【請求項 11】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが、少なくとも 1 つの C D バイオマーカーを含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが、少なくとも 1 つの I I 群バイオマーカーを含む、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが、A L O X 1 2 を含む、請求項 11 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが、P T G D S を含む、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが、リボカリン 2 を含む、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルが、少なくとも 1 つの U C バイオマーカーを含む、請求項 7 に記載の方法。

50

## 【請求項 17】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカのパネルが、少なくとも 1 つの I I 群バイオマーカを含む、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカのパネルが、I g H G 3 を含む、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカのパネルが、少なくとも 1 つの C D v U C バイオマーカを含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカのパネルが、少なくとも 1 つの I V 群バイオマーカを含む、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカのパネルが、少なくとも 1 つの分類バイオマーカを含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 22】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカのパネルが、少なくとも 1 つの V 群バイオマーカを含む、請求項 21 に記載の方法。

## 【請求項 23】

前記 P B M C および I B D に関連するバイオマーカのパネルが、I 群バイオマーカセット、I I 群バイオマーカセット、I I I 群バイオマーカセット、I V 群バイオマーカセットおよび V 群バイオマーカセットから成る群より選択されるバイオマーカセットを含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 24】

患者において潰瘍性大腸炎を診断する方法であって、  
 a . 前記患者からサンプルを単離する工程；および  
 b . 少なくとも 1 つの潰瘍性大腸炎関連バイオマーカの正常発現または異常発現を前記サンプルにおいて検出する工程  
 を含み、少なくとも 1 つの潰瘍性大腸炎関連バイオマーカの異常発現が、前記患者が潰瘍性大腸炎に罹患している場合があることを示す方法。

## 【請求項 25】

前記サンプルが、末梢血単核細胞の採取物である、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記少なくとも 1 つの潰瘍性大腸炎関連バイオマーカが、I I I 群バイオマーカとして類別される P B M C および I B D に関連するバイオマーカから成る群より選択される、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記少なくとも 1 つの潰瘍性大腸炎関連バイオマーカが、I g H G 3 を含む、請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記検出工程が、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイを用いて行われる、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記検出工程が、免疫アッセイを用いて行われる、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記検出工程が、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われる、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、定量ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 32】

10

20

30

40

50

前記検出工程が、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルの発現を検出する、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 3 3】

患者においてクローン病を診断する方法であって、

a . 患者からサンプルを単離する工程 ; および

b . 少なくとも 1 つのクローン病関連バイオマーカーの正常発現または異常発現を前記サンプルにおいて検出する工程

を含み、少なくとも 1 つのクローン病関連バイオマーカーの異常発現が、前記患者がクローン病に罹患している場合があることを示す方法。

【請求項 3 4】

前記サンプルが、末梢血単核細胞の採取物である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記少なくとも 1 つのクローン病関連バイオマーカーが、I I 群バイオマーカーとして類別される P B M C および I B D に関連するバイオマーカーから成る群より選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記検出工程が、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイを用いて行われる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記検出工程が、免疫アッセイを用いて行われる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記検出工程が、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、定量ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記検出工程が、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルの発現を検出する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 4 1】

患者において潰瘍性大腸炎の診断とクローン病の診断を識別する方法であって、

a . 患者からサンプルを単離する工程 ; および

b . 少なくとも 1 つの分類バイオマーカーの正常発現または異常発現を前記サンプルにおいて検出する工程

を含み、

クローン病を有する患者の識別に関連した少なくとも 1 つの分類バイオマーカーの異常発現が、前記患者がクローン病に罹患している場合があることを示す、または

潰瘍性大腸炎を有する患者の識別に関連した少なくとも 1 つの分類バイオマーカーの異常発現が、前記患者が潰瘍性大腸炎に罹患している場合があることを示す方法。

【請求項 4 2】

前記サンプルが、末梢血単核細胞の採取物である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記少なくとも 1 つの分類バイオマーカーが、V 群バイオマーカーとして類別される分類バイオマーカーから成る群より選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記検出工程が、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイを用いて行われる、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記検出工程が、免疫アッセイを用いて行われる、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記検出工程が、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われる、請求項 4 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 47】

前記ポリメラーゼ連鎖反応が、定量ポリメラーゼ連鎖反応である、請求項 46 に記載の方法。

## 【請求項 48】

前記検出工程が、分類バイオマーカーのパネルの正常発現または異常発現を前記サンプルにおいて検出することを含み、前記分類バイオマーカーのパネルが、免疫グロブリン重鎖定常領域 1、免疫グロブリン 定常領域、ヒト 28S リボソーム RNA 5' 領域、タンパク質チロシンホスファターゼ受容体タイプ C 会合タンパク質、グランザイム K、mutL 相同体 3、リポカリン 2、CXCL5、血清欠乏性応答ホスファチジルセリン結合タンパク質、H3 ヒストンファミリーメンバー K、インテグリン 3 (血小板糖タンパク II Ia、抗原 CD 61)、および H2B ヒストンファミリーメンバー Q バイオマーカーを含む、請求項 41 に記載の方法。

10

## 【請求項 49】

前記検出工程が、分類バイオマーカーのパネルの正常発現または異常発現を前記サンプルにおいて検出することを含み、前記分類バイオマーカーのパネルが、免疫グロブリン重鎖定常領域 1、免疫グロブリン 定常領域、ヒト 28S リボソーム RNA 5' 領域、タンパク質チロシンホスファターゼ受容体タイプ C 会合タンパク質、グランザイム K、mutL 相同体 3、リポカリン 2、CXCL5、血清欠乏性応答ホスファチジルセリン結合タンパク質、H3 ヒストンファミリーメンバー K、インテグリン 3 (血小板糖タンパク II Ia、抗原 CD 61)、および H2B ヒストンファミリーメンバー Q バイオマーカーから成る群より選択される少なくとも 2 つの分類バイオマーカーを含む、請求項 41 に記載の方法。

20

## 【請求項 50】

前記検出工程が、分類バイオマーカーのパネルの正常発現または異常発現を前記サンプルにおいて検出することを含み、前記分類バイオマーカーのパネルが、免疫グロブリン重鎖定常領域 1、免疫グロブリン 定常領域、ヒト 28S リボソーム RNA 5' 領域、タンパク質チロシンホスファターゼ受容体タイプ C 会合タンパク質、グランザイム K、mutL 相同体 3、リポカリン 2、CXCL5、血清欠乏性応答ホスファチジルセリン結合タンパク質、H3 ヒストンファミリーメンバー K、インテグリン 3 (血小板糖タンパク II Ia、抗原 CD 61)、および H2B ヒストンファミリーメンバー Q バイオマーカーから成る群より選択される少なくとも 8 つの分類バイオマーカーを含む、請求項 41 に記載の方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2005年6月6日出願の米国特許仮出願第60/687,331号および2005年6月20日出願の米国特許仮出願第60/692,295号からの優先権の恩恵を主張する。前記両出願の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

(発明の背景)

40

(発明の分野)

本発明は、炎症性腸疾患を有する患者から単離された末梢血単核細胞(PBMC)の発現プロファイルの分析、ならびに2つのタイプの炎症性腸疾患、すなわちクローン病および潰瘍性大腸炎のうちの一方向に罹患している患者間で識別が可能なPBMC転写遺伝子サインの同定に関する。

## 【背景技術】

## 【0003】

(関連する背景技術)

潰瘍性大腸炎(UC)およびクローン病(CD)は、幾つかの人口統計学および臨床的な特性を共有する2つの一般的な慢性および再発性の炎症性腸疾患(IBD)である。

50

しかし、UCおよびCDは、組織損傷の点で重要な相違を呈し、これは、これら2つの疾患についての異なる病因病理学プロセスを示唆している。一般的に、IBDについて提案されている1つの病因は、正常な腸管腔常在菌に対する粘膜免疫系の不適切な活性化である(Podolsky (2002) N. Engl. J. Med. 347:417-29)。Th1型応答に関連した経壁性肉芽腫性炎症プロセスがCDの特徴であり、これに対してUCにおける炎症は、粘膜に限定される傾向があり、そしてTh2型応答に関連していると思われる多数の免疫グロブリン分泌性形質細胞を含む(Podolsky, 上記)。両疾患は、環境的要因と遺伝的要因の組み合わせにより疾患に対する個体の感受性が決定され得る複合疾患である(Bouma and Strober (2003) Nat. Rev. Immunol. 3:521-33)。

#### 【0004】

オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いてRNAレベルで包括的発現プロファイルを定量する能力が、CD患者およびUC患者から得られた外科的に切除された胃腸組織内に存在する転写サインの調査に、最近、適用された(Lawrance et al. (2001) Hum. Mol. Genet. 10:445-56; Warner and Dieckgraefe (2002) Inflamm. Bowel. Dis. 8:140-57も参照)。これらの研究により、IBDにおいて一般的に改変される炎症応答に關与する遺伝子が同定された。加えて、これらの研究は、UC患者およびCD患者から得られた胃腸組織トランスクリプトームが、まったく異なることを証明し、UC組織とCD組織を識別すると思われる遺伝子セットを同定した。

#### 【0005】

外科的切除または生検からの胃腸組織とは異なり、末梢血は、UCとCDとを識別するために用いることができる細胞のはるかに入手しやすい組織供給源である。循環末梢血単核細胞(PBMC)は、感染および疾患の徴候について身体を広範囲に監視することができる。従って、PBMCは、疾患の状態または重症度のマーカーとして疾患誘導遺伝子発現を評価するための代用組織としての役割を果たすことができる(全般的な概要については、Rockett et al. (2004) Toxicol. Appl. Pharmacol. 194:189-99参照)。Maasおよび共同研究者らは、自己免疫疾患、例えば慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、I型糖尿病および多発性硬化症の患者に共通のPBMCプロファイルを同定した(Maas et al. (2002) J Immunol. 169:5-9)。Twineおよび共同研究者らは、非自己免疫疾患に関連して、腎細胞癌(RCC)患者から得たPBMCが、健常なボランティアのものとは異なる疾患関連トランスクリプトームを示すことを証明した(Twine et al. (2003) Cancer Res. 63:6069-75)。Mannickおよび共同研究者らは、7例のCD患者および5例のUC患者からのPBMCの発現プロファイルと2400個の遺伝子のcDNAマイクロアレイを最近調査し、これらの疾患間で差次的に発現すると思われる幾つかの遺伝子を記載している(Mannick et al. (2004) Clin. Immunol 112:247-57)。他の遺伝子が、クローン病患者の末梢血単核細胞においてmRNAレベルで調節されたと以前に報告されている(Gijsbers et al. (2004) Eur. J. Immunol. 34:1992-2000; Hori et al. (2002) J. Gastroenterol. Hepatol. 17:1070-77; Gonsky et al. (1998) J. Immunol. 160:4914-22)。

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

末梢性炎症成分は、両方の形態のIBDに關与するという説が出ているが、健常な患者および組織学的に検証されCDまたはUCいずれかの形態でのIBDであると診断された患者からの循環PBMCの転写遺伝子プロファイルが、疾患間の識別を可能にする遺伝子分類子(classifier)を開発する上で首尾よく用いられたことはまだない。今までのところ、IBDを診断するおよび/またはCDとUCとを区別するPBMC関連トランスクリプトームの能力は、当該分野において知られていない。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

本発明は、CDおよびUCを有する患者のPBMCにおける遺伝子発現パターンが、P

10

20

30

40

50

B M Cにおける遺伝子発現プロファイルのみに基づいてそれらを分類できる程度まで異なるかどうかを判定することにより、ならびにI B Dを有する患者と健常な被験者（および場合によってはC Dを有する患者とU Cを有する患者）とを識別するために用いることができるP B M CおよびI B Dの関連転写遺伝子発現パターンを提供することにより、この問題を解決する。従って、炎症性腸疾患ならびに/または異なる形態のI B D（すなわち、C DおよびU C）の診断、予後予測、および/またはモニタリングを、患者からの末梢血単核細胞の転写プロファイリングを含む本発明の比較的侵襲性の低い方法によって補助することができる。

#### 【0008】

（発明の要旨）

1つの態様において、本発明は、多数のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの同定および類別に基づく（これらのバイオマーカーは、例えば、表1～4に列挙されたP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーであって、これらは、1）実質的にI B Dではない被験者（例えば健常な被験者）のP B M Cと比較して、炎症性腸疾患を有する患者のP B M Cにおいて、2）実質的にI B Dではない被験者（例えば健常な被験者）のP B M Cと比較して、クローン病を有する患者のP B M Cにおいて、3）実質的にI B Dではない被験者（例えば健常な被験者）のP B M Cと比較して、潰瘍性大腸炎を有する患者のP B M Cにおいて、および4）潰瘍性大腸炎を有する患者と比較して、クローン病を有する患者のP B M C）において、それぞれ差次的に発現する）。本発明によって提供され、表1～4に列挙されているP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、I群、I I群、I I I群およびI V群にもそれぞれ類別され、この類別は以下に基づいている。それらのバイオマーカーを最適に使用して、以下の1）～3）の進行を診断、予測、またはモニタリングすることができるか否か（1）クローン病または潰瘍性大腸炎のいずれかの形態のI B Dを有する患者（I群バイオマーカー；本明細書において「共通バイオマーカー」のセットともいわれる）；2）クローン病を有する患者（I I群バイオマーカー；本明細書において「C Dバイオマーカー」のセットともいわれる）；もしくは3）潰瘍性大腸炎を有する患者（I I I群バイオマーカー；本明細書において「U Cバイオマーカー」のセットともいわれる））、および/またはそれらを最適に使用してI B Dを有する患者がクローン病または潰瘍性大腸炎を有するかどうかを識別することができるか否か（I V群；本明細書において「C D v U Cバイオマーカー」ともいわれる）。加えて、表5に列挙されており、V群バイオマーカー（本明細書では「分類バイオマーカー」のセットとも呼ばれる）として類別されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを用いて、クローン病を有する患者と潰瘍性大腸炎を有する患者とを識別することもできる。そしてまた、これらのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、I B D疾患経路の構成要素でもあり得、それ故、炎症性腸疾患、すなわちクローン病または潰瘍性大腸炎の処置のための新規治療ターゲットとしての役割を果たすことができる。

#### 【0009】

従って、本発明は、炎症性腸疾患、クローン病および/または潰瘍性大腸炎のための（I群、I I群、I I I群、I V群および/またはV群のバイオマーカーとして類別することができる）P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーとしての、ポリヌクレオチド、それらがコードしているポリペプチド、およびそれらのフラグメント、相同体およびアイソフォームに関する。本発明は、本発明のP B M CおよびI B Dのバイオマーカーに対する抗体、本発明のバイオマーカーを含むアレイ、ならびに/または本発明のバイオマーカーを必要とするアッセイ（例えば、マイクロアレイアッセイ、Q - P C Rアッセイ、核酸レポーターアッセイ（nucleic reporter assay）など）の使用にも関する。加えて、本発明は、炎症性腸疾患、クローン病および/または潰瘍性大腸炎の存在またはリスクを示すためのこれらのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの発現プロファイルの使用に関する。炎症性腸疾患、クローン病および/または潰瘍性大腸炎に関して、これらのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、発現レベルの違いを、不良な予後予測または好適な予後予測と関連させるためにも有用である。このP B M CおよびI B

10

20

30

40

50

Dに関連するバイオマーカーは、IBDに対する処置または治療の有効性の評価にも有用となる場合がある。IBD（例えばクローン病、潰瘍性大腸炎など）に対する処置に関して、本発明のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーは、IBDを改善することができる試験化合物をスクリーニングするためにも有用であり得、および/またはそれら自体治療薬としても有用となる場合がある。

#### 【0010】

1つの態様において、本発明は、それらの量または活性を示す発現レベルが、炎症性腸疾患（例えばクローン病または潰瘍性大腸炎）の存在と相関しているPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを提供する。本発明のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーは、ポリヌクレオチド（例えば、DNA、cDNA、mRNA）、そのようなポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドのフラグメント、相同体およびアイソフォームであり得る。ある一定の実施形態において、本発明の方法は、PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む転写ポリヌクレオチドまたはその一部分の存在を検出することによって行われる。あるいは、PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子またはRNA種に対応する（すなわち、それらによりコードされている）タンパク質の存在を検出することによって、検出を行うことができる。これらの方法は、タンパク質レベルで行うこともできる。すなわち、PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーのタンパク質のタンパク質発現レベルを、診断、予後予測および/もしくはモニタリングを目的として、または試験化合物をスクリーニングするために、または治療薬として、評価することができる。

10

20

#### 【0011】

一部の実施形態では、1つより多くのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含むパネルが本発明の方法において使用される。1つの実施形態において、本発明は、複数のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含むパネルを提供する。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも2つのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも3つのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも4つのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも5つのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも6つのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも7つのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも8つのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも9つのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも10個のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも11個のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも12個のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを含む。他の実施形態において、バイオマーカーパネルは、共通バイオマーカー、CDバイオマーカー、UCバイオマーカー、CDvUCバイオマーカー、および/または分類バイオマーカーを含む。I群バイオマーカー、II群バイオマーカー、III群バイオマーカー、IV群バイオマーカーおよび/またはV群バイオマーカーから選択されるバイオマーカーを含むバイオマーカーパネルも提供する。本発明のパネルが、任意の数および任意の組み合わせの、本発明のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカー、特に本発明のV群バイオマーカーを含むことができることは、当業者には理解されるであろう。従って、本発明の他の非限定的実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11または少なくとも12の分類バイオマ-

30

40

50

カー、例えばV群の分類バイオマーカ―を含む。例えば、本発明の非限定的パネルは、免疫グロブリン重鎖定常領域 1 (immunoglobulin heavy constant gammer 1) および免疫グロブリン 定常領域 (immunoglobulin kappa constant) バイオマーカ―を含むことがある。本発明の別の非限定的パネルは、ヒト 28S リボソーム RNA 5' 領域、タンパク質チロシンホスファターゼ受容体タイプC 会合タンパク質、H3 ヒストンファミリーメンバーK、インテグリン 3 (血小板糖タンパク I I I a、抗原 CD 61)、および H2 B ヒストンファミリーメンバーQ バイオマーカ―を含むことがある。本発明の別の非限定的パネルは、免疫グロブリン重鎖定常領域 1、グランザイムK、mut L 相同体3、リポカリン2、CXCL5、血清欠乏性応答 (serum deprivation response) ホスファチジルセリン結合タンパク質、および H3 ヒストンファミリーメンバーK バイオマーカ―を含むことがある。1つの実施形態において、本発明のパネルは、(a) 患者が、(1) クロ―ン病もしくは潰瘍性大腸炎いずれかの形態のIBD、(2) クロ―ン病、および/または(3) 潰瘍性大腸炎を有するかどうかの判定に関して、ならびに/あるいは(b) IBDを有する患者が、クロ―ン病または潰瘍性大腸炎を有するのかの識別に関して、少なくとも70%の精度(より好ましくは、少なくとも80%の精度、最も好ましくは、少なくとも90%の精度)を提供する。本発明の別の態様において、本発明の1つより多くのPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―の発現レベルは、(例えば、処置および/または疾患の診断、その予後の判定、その経過のモニタリングなどのための)情報が望まれる特定の被験者サンプルにおいて、判定される。

10

20

**【0012】**

ある一定の実施形態において、少なくとも1つのPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―の発現の相対レベルの比較は、炎症性腸疾患、クロ―ン病および/または潰瘍性大腸炎の重症度の指標となり、ならびにそのような比較により、診断、予後予測およびモニタリングの分析が可能となる。例えば、IBD(および/またはUCもしくはCDいずれか)についての様々な疾患の進行状態のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―の発現プロフィールの比較は、これらのいずれかの疾患の急発または症状発現の予測期間を含む、長期予後予測のための方法を提供する。別の例では、特定の薬物が、特定の患者における長期的予後を改善するように作用するかどうかを含めて、特定の処置レジメンの評価方法を、評価することができる。

30

**【0013】**

PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―は、処置または治療薬のターゲットとしても有用であり得る。従って、メカニズムについては限定しないが、本発明の一部の方法は、本発明のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―の発現の調節により、実質的にIBDではない被験者(例えば健康な被験者)から単離されたPBM Cレベルと同様のまたは実質的に同様のレベルでそれらが発現する場合、炎症性腸疾患を改善することができるという原理に基づく。個々のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―またはそのようなバイオマーカ―のパネルについてのこれらの差次的な発現パターンの知見により、特定の発現パターンを調節する目的で、試験化合物をスクリーニングすることができる。例えば、不良な予後の発現プロフィールをより良好な予後または改善された予後の発現プロフィールに変える化合物をスクリーニングすることができる。

40

**【0014】**

これらの実施形態に関して、一部のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―は、治療レジメンに反応して活性または発現が調節されたと判定されるバイオマーカ―を含むことができる。あるいは、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―の活性または発現の調節を、炎症性腸疾患、クロ―ン病および/または潰瘍性大腸炎の診断または予後予測と関連させることができる。加えて、本発明の調節剤、例えば、少なくとも1つのPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカ―の調節剤(例えば、PBM CおよびIBDに関連するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、関連するPBM CおよびIBDに関連するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド(例えば、阻害性ポリヌクレオチド、阻害性ポリペプチド(例えば、抗バイオマーカ―抗体)、小分子など)を治

50

療薬として投与することができる。本発明の別の実施形態において、本発明の調節剤は、本発明の1つまたはそれ以上の他の治療組成物と併用することができる。このような化合物の医薬組成物への調合は、下で説明する。このような治療用調節剤の投与は、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの異常発現を調節することができる。従って、炎症性腸疾患、クローン病および/または潰瘍性大腸炎を改善または抑制するために用いることができる。本発明の別の実施形態において、本発明の1つまたはそれ以上の調節剤または他の治療組成物は、1つまたはそれ以上の他の公知の治療薬または組成物と併用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

(発明の詳細な説明)

胃腸組織生検材料の発現プロフィール分析により、2つの炎症性腸疾患、すなわちクローン病(CD)または潰瘍性大腸炎(UC)を識別するために用いることができる胃腸関連トランスクリプトームの存在が同定されたが、胃腸組織生検材料が必要とされることが、このような診断法を魅力のないものになっている。胃腸組織生検材料に比べて、末梢血中の細胞、特に循環末梢血単核細胞(P B M C)は、はるかに入手しやすい。P B M Cは、感染および疾患の徴候について身体を広範囲に監視することができ、ならびにI B Dは、明らかに炎症プロセスを伴うので、P B M Cは、I B Dの状態または重症度を判定するために有用であり得る組織関連および疾患関連のトランスクリプトームを評価するための胃腸組織の代用物としての役割を果たすことができる。

【0016】

本発明は、患者が炎症性腸疾患に罹患しているかどうかを判定するための、P B M Cの少なくとも1つの「転写遺伝子サイン」(本明細書では「遺伝子サイン」、「発現サイン」、「トランスクリプトーム」、「プロフィール」または「遺伝子プロフィール」とも呼ばれる)、すなわちP B M C関連転写遺伝子サイン、すなわちP B M Cの発現プロフィールの利用に関する。本発明は、I B Dを有する患者が、クローン病または潰瘍性大腸炎に罹患しているかを任意に判定するためのP B M C関連トランスクリプトームの使用にも関する。本発明は、P B M C関連およびI B D関連のトランスクリプトーム、例えばクローン病関連および/または潰瘍性大腸炎関連のトランスクリプトームの所見に基づく。詳細には、本発明は、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの同定に基づき、これらのバイオマーカーは、I B D、クローン病および/または潰瘍性大腸炎の診断、予後予測、モニタリングおよび/または処置におけるそれらの有用性に基づき5つの群(I群、II群、III群、IV群およびV群)に類別することができる。

【0017】

本明細書で用いられる場合、用語「バイオマーカー」、「遺伝子分類子」または「P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカー」などは、実質的にI B Dではない被験者(例えば、健常な被験者)と比較して、炎症性腸疾患(すなわち、クローン病および/または潰瘍性大腸炎)を有する被験者の末梢血単核細胞において量の点で実質的に調節(すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレート)されるポリヌクレオチド(例えば、遺伝子、転写産物、ESTなど)またはポリペプチド分子を含む。ある一定の実施形態において、本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、I群バイオマーカー(「共通バイオマーカー」とも呼ばれる)、II群バイオマーカー(「クローン病関連バイオマーカー」、「CD関連バイオマーカー」、「CD特異的バイオマーカー」または「CDバイオマーカー」とも呼ばれる)、III群バイオマーカー(「潰瘍性大腸炎関連バイオマーカー」、「UC関連バイオマーカー」、「UC特異的バイオマーカー」または「UCバイオマーカー」とも呼ばれる)、IV群バイオマーカー(「CD v UCバイオマーカー」とも呼ばれる)およびV群バイオマーカー(「分類バイオマーカー」とも呼ばれる)のポリヌクレオチド、それらに対応する遺伝子産物、ならびにそれらのフラグメント、相同体およびアイソフォームを含む。

【0018】

10

20

30

40

50

本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、実質的にI B Dではない被験者のP B M Cと比較してC Dを有する患者のP B M Cにおいて、および/または実質的にI B Dではない被験者のP B M Cと比較してU Cを有する患者のP B M Cにおいて、実質的に調節(すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレート)されるポリヌクレオチド、その対応する遺伝子産物、ならびにそれらのフラグメント、相同体およびアイソフォームであり得る。1つの実施形態において、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、I群共通バイオマーカーとして類別されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを含む。

【0019】

本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、クローン病関連バイオマーカーも含む。本明細書で用いられる場合、「クローン病関連バイオマーカー」または「C Dバイオマーカー」は、実質的にI B Dではない被験者のP B M Cと比較してクローン病を有する患者の末梢血単核細胞において量の点で実質的に調節(すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレート)されるポリヌクレオチド、その対応する遺伝子産物、ならびにそれらのフラグメント、相同体およびアイソフォームを含む。加えて、C Dバイオマーカーは、実質的にI B Dではない被験者のP B M Cの場合と比較して潰瘍性大腸炎を有する患者の末梢血単核細胞では実質的に調節されない。ある一定の実施形態において、本発明のクローン病関連バイオマーカーは、I I群バイオマーカーとして類別されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを含み、そのサブセットがI V群およびV群のバイオマーカーのリストの中に類別されることもある。

10

20

【0020】

本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、潰瘍性大腸炎関連バイオマーカーも含む。本明細書で用いられる場合、用語「潰瘍性大腸炎関連バイオマーカー」または「U Cバイオマーカー」は、実質的にI B Dではない被験者のP B M Cと比較して潰瘍性大腸炎を有する患者の末梢血単核細胞において量の点で実質的に調節(すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレート)されるポリヌクレオチド、その対応する産物、ならびにそれらのフラグメント、相同体およびアイソフォームを含む。加えて、U Cバイオマーカーは、実質的にI B Dではない被験者のP B M Cと比較してクローン病を有する患者の末梢血単核細胞では量の点で実質的に調節されない。ある一定の実施形態において、本発明の潰瘍性大腸炎関連バイオマーカーは、I I I群バイオマーカーとして類別されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを含み、そのサブセットがI V群およびV群のバイオマーカーのリストの中に類別されることもある。

30

【0021】

本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、C D v U Cバイオマーカーを含む。本明細書で用いられる場合、用語「C D v U Cバイオマーカー」は、実質的にI B Dではない被験者のP B M Cと比較して潰瘍性大腸炎またはクローン病いずれかを有する患者の末梢血単核細胞において量の点で実質的に調節(すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレート)され、且つ、クローン病を有する患者から単離された末梢血単核細胞と潰瘍性大腸炎を有する患者から単離された末梢血単核細胞とを識別することができる、ポリヌクレオチド、その対応する遺伝子産物、ならびにそれらのフラグメント、相同体およびアイソフォームを含む。例えば、一方の炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎を有する被験者におけるC D v U Cバイオマーカーが、他方の炎症性腸疾患、例えばクローン病を有する被験者におけるその発現と比較して、実質的に調節されることがある。あるいは、一方の炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎を有する被験者におけるC D v U Cバイオマーカーが、他方の炎症性腸疾患、例えばクローン病を有する被験者と比較して、反対方向に調節されることがある。ある一定の実施形態において、これらの識別C D v U Cバイオマーカーは、I V群のバイオマーカーを含み、そのサブセットが、V群バイオマーカーのリストの中に類別されることもある。

40

【0022】

本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、類別バイオマーカーのセ

50

ットであるCDvUCバイオマーカのより小さいセットに類別することができる。本明細書で用いられる場合、「分類バイオマーカのセット」は、クローン病を有する患者と潰瘍性大腸炎を有する患者とを識別するために使用することができる、ポリヌクレオチド、それらの対応する遺伝子産物、ならびにそれらのフラグメント、相同体およびアイソフォームのセットを含む。ある一定の実施形態において、分類バイオマーカのセットは、V群バイオマーカとして類別されるセットである。

【0023】

好ましくは、本発明のために、本発明の実質的に調節される、すなわちアップレギュレートまたはダウンレギュレートされるPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカの発現レベルは、それぞれ、異常な量で増加または減少し、その発現レベルは異常であり、例えば、健常な被験者からのPBMCにおける同じPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカについての標準偏差から外れている。最も好ましくは、実質的に調節されるPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカは、健常な被験者を基準にして、少なくとも1.5倍、2倍、3倍もしくは4倍またはそれ以上の異常な変化でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる。

10

【0024】

UniGeneアクセッション番号、I群、II群、III群、IV群およびV群のバイオマーカとして含まれるPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカの名称、ならびにそれらの調節の方向（すなわち、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーション）を下の表1、表2、表3、表4および表5にそれぞれ列挙する。

20

【表 1 - 1】

表 1. I群のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカー: 共通バイオマーカー						
アクセッション	名称	両方における方向	差倍率 CD vs. 正常	CD vs. 正常 ANCOVA p-値	差倍率 UC vs. 正常	UC vs. 正常 ANCOVA p-値
Hs.75716	セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤、クレードB(オボアルブミン)、メンバー2、PAI 2	↑	6.93	6.84E-12	3.35	3.87E-05
Hs.154654	シトクロムP450、サブファミリー1(ジオキシン誘導性)、ポリペプチド1	↑	3.31	6.49E-10	2.37	2.81E-05
Hs.79516	脳に豊富に存在する膜結合型シグナルタンパク質1	↑	1.94	6.81E-09	2.13	2.61E-09
Hs.177781	未知	↑	1.88	6.34E-08	1.92	3.99E-07
Hs.104624	アクアポリン9	↑	1.88	9.92E-06	2.02	9.06E-06
Hs.20084	レチノイドX受容体、 $\alpha$	↑	1.80	1.33E-06	1.68	9.18E-05
Hs.2161	補体成分5受容体1 (C5aリガンド)	↑	1.74	2.65E-05	1.81	5.05E-05
Hs.865	RAP1A、RAS癌遺伝子ファミリーのメンバー	↑	1.64	5.95E-10	1.53	1.01E-06
Hs.177486	アミロイド $\beta$ (A $\beta$ ) 前駆タンパク質(プロテアーゼネキシン-II、アルツハイマー病)	↑	1.63	6.11E-10	1.60	4.81E-08
Hs.198282	リン脂質 ス克蘭ブラーゼ1	↑	1.60	3.90E-05	1.76	1.09E-05
Hs.288555	ELK3、ETS-Dメインタンパク質(SRF補助タンパク質2)	↑	1.59	4.25E-10	1.51	2.75E-07
Hs.101695	NCKアダプタータンパク質2	↑	1.57	2.72E-14	1.51	1.08E-10
Hs.198282	リン脂質 ス克蘭ブラーゼ1	↑	1.56	1.02E-05	1.55	7.12E-05
Hs.285313	コアプロモーター要素結合タンパク質	↓	2.78	8.63E-05	5.65	9.23E-09
Hs.151411	KIAA0916タンパク質	↓	2.47	7.92E-05	3.21	6.01E-06
Hs.20072	ミオシン調節鎖相互作用性タンパク質	↓	2.45	3.21E-07	2.47	2.73E-06
Hs.81248	CUG三塩基反復、RNA結合タンパク質1	↓	2.44	8.74E-08	2.52	4.84E-07
Hs.211610	CUG三塩基反復、RNA結合タンパク質2	↓	2.27	5.40E-06	2.62	1.77E-06
Hs.86896	プロモドメイン含有3	↓	2.24	1.22E-06	2.26	8.83E-06

10

20

30

40

【表 1 - 2】

表1. I群のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカー: 共通バイオマーカー						
アクセシオン	名称	両方における方向	差倍率 CD vs. 正常	CD vs. 正常 ANCOVA p-値	差倍率 UC vs. 正常	UC vs. 正常 ANCOVA p-値
Hs.100555	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His)ボックスポリペプチド18 (Myc-調節型)	↓	2.24	3.89E-05	2.48	3.11E-05
Hs.143601	仮説タンパク質 hCLA-イン	↓	2.20	1.20E-07	2.16	2.42E-06
Hs.149436	キネシンファミリーメンバー5B	↓	2.15	2.66E-05	2.56	4.15E-06
Hs.239483	未知	↓	2.10	2.47E-09	2.42	2.47E-10
Hs.78909	ジンクフィンガータンパク質36, C3H型様2	↓	2.03	1.46E-07	2.06	1.18E-06
Hs.85273	網膜芽腫 結合タンパク質6	↓	2.01	6.23E-05	2.56	1.64E-06
Hs.219614	F-ボックスおよびロイシクリッチ反復タンパク質11	↓	1.95	9.04E-07	2.41	1.11E-08
Hs.153834	pumilio相同体1 (Drosophila)	↓	1.92	6.49E-08	1.92	8.29E-07
Hs.18827	円柱腫(ターバン腫症候群)	↓	1.91	7.70E-06	2.13	2.93E-06
Hs.127287	KIAA0794タンパク質	↓	1.83	3.31E-05	1.95	4.07E-05
Hs.73090	B細胞2におけるκ型軽鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子 (p49/p100)	↓	1.81	3.63E-06	1.77	4.93E-05
Hs.373557	THC211630遺伝子を含む部分転写産物	↓	1.81	3.43E-05	2.18	1.32E-06
Hs.75243	プロモドメイン含有2	↓	1.76	1.11E-06	1.86	1.65E-06
Hs.118174	テトラトリコペプチド反復ドメイン3	↓	1.76	4.63E-05	2.35	6.54E-08
Hs.37096	ジンクフィンガータンパク質145 (Kruppel様; 前骨髄球性白血病において発現する)	↓	1.74	8.38E-07	1.91	2.96E-07
Hs.3530	FUS相互作用性タンパク質(セリン-アルギニンリッチ)1	↓	1.72	2.20E-05	1.89	7.47E-06
Hs.83484	Meis1	↓	1.70	2.26E-06	1.78	3.70E-06
Hs.294014	未知	↓	1.68	5.43E-06	1.81	2.84E-06
Hs.183418/ 214291/355 896	細胞分裂周期2様1 (PITSLREタンパク質)、細胞分裂周期2様2	↓	1.64	1.42E-05	1.88	9.80E-07
Hs.77256	zeste相同体2のエンハンサー (Drosophila)	↓	1.63	7.72E-06	1.71	8.73E-06
Hs.278426	PDGFA会合タンパク質1	↓	1.60	6.59E-07	1.57	1.61E-05

10

20

30

40

【表 1 - 3】

アクセッション	名称	両方における方向	差倍率 CD vs. 正常	CD vs. 正常 ANCOVA p-値	差倍率 UC vs. 正常	UC vs. 正常 ANCOVA p-値
Hs.10351	KIAA0308タンパク質	↓	1.60	8.99E-06	1.78	1.10E-06
Hs.18368	SRリッチタンパク質	↓	1.57	1.30E-05	1.83	2.43E-07
Hs.2173	フコシルトランスフェラーゼ4( $\alpha$ (1,3)フコシルトランスフェラーゼ、骨髄特異的)	↓	1.54	4.08E-05	1.70	6.69E-06
Hs.152601	UDP-グルコースセラミド グルコシルトランスフェラーゼ	↓	1.54	3.35E-05	1.73	2.72E-06
Hs.243901	未知	↓	1.51	8.84E-05	1.68	1.29E-05

10

<sup>1</sup>これらのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーは、異常発現を有し、例えば、健常な患者と比較して、CDを有する患者とUCを有する患者の両方のPBMCにおいて実質的にアップレギュレート( )またはダウンレギュレート( )される。

【表 2 - 1】

表2:II群のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカー;CDバイオマーカー					
アクセッション	名称	CDにおける方向	CD vs. 正常 差倍率	CD vs. 正常 p-値	(p≤0.0001) で有意
Hs.72933	血小板因子4 変異体1	↑	2.48	1.91E-05	
Hs.83381	グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)、 $\gamma$ 11	↑	2.30	4.02E-09	
Hs.119257	ems1 配列(哺乳動物腫瘍および扁平上皮癌関連(p80/85 scr 基質))	↑	2.28	1.53E-08	
Hs.87149	インテグリン、 $\beta$ 3(血小板糖タンパクIIIa、抗原CD61)	↑	2.22	6.10E-06	
Hs.90061	プロゲステロン受容体膜成分1	↑	2.18	1.61E-07	
Hs.155097	炭酸脱水酵素II	↑	2.17	2.37E-06	
Hs.81564	血小板因子4(ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド4)	↑	2.14	4.03E-09	
Hs.90786	ATP結合カセット、サブファミリーC (CFTR/MRP)、メンバー3	↑	2.12	4.00E-05	
Hs.279843	mutL 相同体 3 (E. coli)	↑	2.12	1.26E-08	
Hs.88474	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ1(プロスタグランジンG/Hシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ)	↑	2.06	4.95E-06	
Hs.75106	クラスチン(補体溶解阻害剤、SP-40, 40, 硫酸化糖タンパク2、アポリポタンパクJ)	↑	2.00	7.02E-06	
Hs.249216	H2B ヒストンファミリー、メンバーJ	↑	1.98	9.64E-08	
Hs.41267	染色体21 オープンリーディングフレーム 7	↑	1.97	1.39E-06	
Hs.326035	初期増殖応答1	↑	1.95	6.86E-05	
Hs.271473	癌腫においてアップレギュレートされた上皮タンパク質、膜会合タンパク質17	↑	1.87	2.30E-06	
Hs.84171	骨髄増殖性白血病ウイルス癌遺伝子	↑	1.84	1.14E-06	
Hs.77890	グラニル酸シンクラーゼ1、可溶性、 $\beta$ 3	↑	1.82	1.17E-06	
Hs.1395	初期増殖応答2 (Krox-20 相同体, Drosophila)	↑	1.79	5.01E-05	
Hs.204238	リボカリン2(癌遺伝子24p3)	↑	1.79	5.19E-05	
Hs.88474	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ1(プロスタグランジンG/Hシンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ)	↑	1.76	3.21E-07	
Hs.26530	血清欠乏性応答(ホスファチジルセリン結合タンパク質)	↑	1.69	8.41E-07	
Hs.193700	コンセンサスは gb:AL110164.1 を含む	↑	1.67	1.12E-06	
Hs.2164	プロ血小板塩基性タンパク質(ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド7)	↑	1.66	1.18E-06	
Hs.8302	4, 5の1 LIMドメイン2	↑	1.66	3.70E-05	
Hs.64016	Sタンパク( $\alpha$ )	↑	1.62	7.63E-06	
Hs.87149	インテグリン、 $\beta$ 3	↑	1.61	3.55E-05	

10

20

30

40

【表 2 - 2】

表2:II群のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカー;CDバイオマーカー					
アクセッション	名称	CDにおける方向	CD vs. 正常 差倍率	CD vs. 正常 p- 値	(p≤0.0001) で有意
	(血小板糖タンパクIIIa, 抗原CD61)				
Hs.114360	トランスフォーミング増殖因子β 刺激タンパク質 TSC-22	↑	1.59	1.10E-06	
Hs.149846	インテグリン, β5	↑	1.58	1.60E-05	
Hs.6721	モノグリセリドリパーゼ	↑	1.56	1.57E-05	
Hs.77899	トロポミオシン1 (α)	↑	1.56	4.16E-05	
Hs.114231	C型レクチン様受容体-2	↑	1.56	3.31E-06	
Hs.7917	マウス低酸素誘発遺伝子1のオルソログと思われる	↑	1.55	1.79E-06	
Hs.261023	仮説タンパク質 FLJ20958	↑	1.53	1.25E-06	
Hs.22116	CDC14細胞分裂周期14相同体B (S. cerevisiae)	↑	1.51	4.87E-05	
Hs.433622	フォリスチン様1	↑	1.51	7.19E-05	
Hs.183125	キラー細胞レクチン様受容体 サブファミリーF, メンバー1	↓	2.57	4.03E-07	
Hs.334837	ウィリアムズ・ビューレン (Williams Beuren) 症候群染色体領域20C, ウィリアムズ・ビューレン症候群 臨界領域タンパク質20コピーB	↓	2.21	7.94E-06	
Hs.8272	プロスタグランジンD2シンターゼ 21kDa (脳)	↓	2.17	6.12E-08	
Hs.64746	クロライド細胞内チャネル3	↓	2.07	2.17E-05	
Hs.8272	プロスタグランジンD2シンターゼ 21Da (脳)	↓	2.06	4.36E-07	
Hs.334837	ウィリアムズ・ビューレン症候群 染色体領域20A, BおよびC	↓	1.94	4.80E-05	
Hs.406306	ウィリアムズ・ビューレン症候群 染色体領域20A, BおよびC	↓	1.88	4.85E-05	
Hs.3066	グランザイムK(セリンプロテアーゼ, グランザイム3;トリプターゼII)	↓	1.87	6.01E-05	
Hs.381613	アダプター関連タンパク質複合体1, γ2サブユニット	↓	1.85	1.06E-05	
Hs.355888	ホスホリパーゼC, β2	↓	1.83	7.22E-06	
Hs.88411	天然細胞傷害誘発性受容体3	↓	1.82	1.22E-05	
Hs.406306	ウィリアムズ・ビューレン症候群 染色体領域20A, BおよびC	↓	1.80	3.32E-05	
Hs.194669	zeste相同体1のエンハンサー (Drosophila)	↓	1.80	5.58E-05	
Hs.99491	RASグアニル放出性タンパク質2(カルシウムおよびDAG調節型)	↓	1.77	5.81E-07	
Hs.349256	対合した免疫グロブリン様受容体β	↓	1.73	9.12E-05	
Hs.13377	アブヒドロラーゼ(abhydrolase)ドメイン含有3	↓	1.70	5.09E-05	好中球
Hs.274	巨核球会合チロシンキナーゼ	↓	1.68	3.10E-06	単球/リンパ球
Hs.323817	DKFZP547E1010 タンパク質	↓	1.66	2.68E-06	
Hs.8272	プロスタグランジンD2シンターゼ21kDa (脳)	↓	1.64	7.56E-06	
Hs.288126	spondin 2, 細胞外基質タンパク質	↓	1.64	6.34E-06	

10

20

30

40

【表 2 - 3】

アクセッション	名称	CDにおける方向	CD vs. 正常 差倍率	CD vs. 正常 p-値	( $p \leq 0.0001$ ) で有意
Hs.8182	仮説タンパク質MGC17528、シナス核発現遺伝子1	↓	1.63	1.44E-07	
Hs.31834	コンセンサスは、gb:A1052536を含む	↓	1.63	2.88E-05	
Hs.234569	鎖鎖(TCR) 会合プロテインキナーゼ 70kDa	↓	1.61	3.24E-05	単球/リンパ球
Hs.167988	神経細胞接着分子1	↓	1.61	2.19E-05	
Hs.75196	HLA-B 会合転写産物8	↓	1.61	6.42E-05	
Hs.180948	KIAA0570 遺伝子産物	↓	1.60	4.03E-05	
Hs.356684	仮説タンパク質 DKFZp762C186	↓	1.58	3.27E-06	好酸球および好中球
Hs.29288	エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ	↓	1.55	1.69E-05	
Hs.313844	コンセンサスは、gb:AWO6920を含む	↓	1.55	8.69E-05	
Hs.100293	O結合N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)トランスフェラーゼ(UDP-N-アセチルグルコサミン:ポリペプチド-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ)	↓	1.53	1.41E-05	
未知	コンセンサスは、gb:NM_024957.1を含む	↓	1.52	6.06E-07	
Hs.170160	RAB2、メンバー-RAS癌遺伝子ファミリー様	↓	1.52	2.47E-06	好中球

10

20

<sup>2</sup>これらのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーは、異常発現を有し、例えば、健常な患者と比較してCDを有する患者のPBMCにおいてのみ実質的にアップレギュレート( )またはダウンレギュレート( )される(すなわち、UCを有する患者のPBMCにおいてはされない)。

【表 3】

表3: III群のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカー; UCバイオマーカー					
アクセッション	名称	UCにおける方向	UC vs. 正常 差倍率	UC vs. 正常 p-値	(p<0.0001) で有意
Hs.300697	免疫グロブリン重鎖定常領域 $\gamma$ 3(G3 mマーカー)	↑	4.65	2.70E-12	
N/A	コンセンサスは、gb:X51887(免疫グロブリン $\kappa$ orphon)を含む	↑	2.75	7.83E-05	
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	↑	2.63	2.05E-06	
Hs.76325	免疫グロブリンJポリペプチド; 免疫グロブリン $\alpha$ および $\mu$ ポリペプチドのリンカータンパク質	↑	2.48	4.70E-06	
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	↑	2.46	4.66E-08	
Hs.102950	Coatmerタンパク質複合体、サブユニット $\gamma$ 、免疫グロブリン $\lambda$ 連結領域3	↑	2.32	3.12E-06	
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	↑	2.21	5.90E-10	
Hs.102950	Coatmerタンパク質複合体、サブユニット $\gamma$ 、免疫グロブリン $\lambda$ 連結領域3	↑	2.19	3.33E-07	
N/a	コンセンサスは、gb:AJ408433(免疫グロブリン $\kappa$ 鎖 可変領域についての部分IGKV 遺伝子)	↑	2.16	1.92E-05	
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	↑	2.16	7.59E-07	
Hs.102950	Coatmerタンパク質複合体、サブユニット $\gamma$ 、免疫グロブリン $\lambda$ 連結領域3	↑	2.10	4.74E-06	
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	↑	2.05	1.99E-06	
Hs.381417	コンセンサスは、gb:AF103529. 1(免疫グロブリン $\kappa$ 軽鎖可変領域)を含む	↑	1.97	3.63E-06	
Hs.348935	免疫グロブリン $\lambda$ 様ポリペプチド1	↑	1.89	1.65E-06	
Hs.405944	免疫グロブリン $\lambda$ 遺伝子座	↑	1.83	2.53E-05	
Hs.102950	Coatmerタンパク質複合体、サブユニット $\gamma$ 、免疫グロブリン $\lambda$ 連結領域3	↑	1.82	1.55E-05	
Hs.405944	免疫グロブリン $\lambda$ 遺伝子座	↑	1.75	7.51E-06	
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	↑	1.71	1.12E-07	
Hs.381418	コンセンサスは、gb:AF103530. 1(免疫グロブリン $\kappa$ 軽鎖可変領域)を含む	↑	1.70	3.11E-07	
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常	↑	1.59	4.25E-06	
Hs.102950	Coatmerタンパク質複合体、サブユニット $\gamma$ 、免疫グロブリン $\lambda$ 連結領域3	↑	1.50	2.91E-05	
Hs.107213	フォーミン結合タンパク質3	↓	1.75	4.27E-05	

<sup>3</sup> これらのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーは、異常発現を有し、例えば、健常な患者と比較してUCを有する患者のPBMCにおいてのみ実質的にアップレギュレート( )またはダウンレギュレート( )される(すなわち、CDを有する患者のPBMCにおいてはされない)。

10

20

30

40

【表 4 - 1】

表4. IV群のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカー;CDvUCバイオマーカー				
アクセッション	名称	(以下に)特異的	差倍率	ANCOVA p- 値
Hs.90061	プロゲステロン受容体膜成分1	クローン病	2.08	2.55E-07
Hs.279843	mutL 相同体 3 (E. coli)	クローン病	2.00	2.75E-08
Hs.88474	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシターゼ1 (プロスタグランジンG/Hシターゼおよびシクロオキシゲナーゼ)	クローン病	1.93	1.18E-05
Hs.73769	葉酸受容体1 (成熟)	クローン病	1.93	6.82E-11
Hs.89714	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド5	クローン病	1.85	3.71E-05
Hs.83381	グアニヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)、 $\gamma 11$	クローン病	1.79	8.04E-06
Hs.2359	二重特異性ホスファターゼ4	クローン病	1.76	5.30E-05
Hs.204238	リポカリン2(癌遺伝子24p3)	クローン病	1.75	4.35E-05
Hs.81564	血小板因子4(ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド4)	クローン病	1.74	4.38E-06
Hs.119257	ems1 配列(哺乳動物腫瘍および扁平上皮癌関連(p80/85 src基質))	クローン病	1.70	8.21E-05
Hs.26530	血清欠乏性応答(ホスファチジルセリン結合タンパク質)	クローン病	1.66	5.34E-07
Hs.303023	チューブリン、 $\beta 1$	クローン病	1.65	8.39E-05
Hs.23581	レプチン受容体遺伝子関連タンパク質	クローン病	1.61	7.52E-05
Hs.249216	H2Bヒストンファミリー、メンバーJ	クローン病	1.61	6.91E-05
Hs.77439	プロテインキナーゼ、cAMP依存性、調節性、II型、 $\beta$	クローン病	1.59	4.09E-05
Hs.2178	H2Bヒストンファミリー、メンバーQ	クローン病	1.57	8.85E-06
Hs.114231	C型レクチン様受容体-2	クローン病	1.57	8.79E-07
Hs.12813	DKFZP434J214 タンパク質	クローン病	1.52	1.21E-05
Hs.2164	プロ血小板塩基性タンパク質(ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド7) クローン病	クローン病	1.51	2.90E-05
Hs.300697	免疫グロブリン重鎖定常領域 $\gamma 3$ (G3mマーカー)	UC	3.87	9.28E-13
Hs.153261	免疫グロブリン重鎖定常領域 $\mu$	UC	2.60	2.72E-05
n/a	免疫グロブリン $\kappa$ orphonとコンセンサスである未知EST	UC	2.42	5.66E-05
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	2.30	1.78E-06
n/a	28SリボソームRNA5' 領域	UC	2.11	2.95E-07
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	2.08	2.88E-08
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	2.04	3.52E-07
Hs.183125	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーF、メンバー1	UC	2.02	5.45E-05
Hs.411106	パーフォリン1	UC	1.98	7.07E-05
Hs.153261	免疫グロブリン重鎖定常領域 $\mu$	UC	1.93	3.78E-05
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	1.88	2.19E-06
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	1.87	8.32E-09
Hs.102950	coatmerタンパク質複合体、サブユニット $\gamma$ 、免疫グロブリン $\lambda$ 連結領域3	UC	1.74	5.47E-05

10

20

30

40

【表 4 - 2】

アクセッション	名称	(以下に) 特異的	差倍率	ANCOVA p-値
Hs.102950	coatamerタンパク質複合体、サブユニット $\gamma$ 、免疫グロブリン $\lambda$ 連結領域3	UC	1.74	2.10E-05
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	1.72	2.57E-07
Hs.355888	ホスホリパーゼC、 $\beta$ 2	UC	1.72	2.24E-05
Hs.8272	プロスタグランジンD2シンターゼ 21kDa(脳)	UC	1.71	5.41E-05
Hs.25338	プロテアーゼ、セリン、23	UC	1.68	7.72E-05
Hs.381417	免疫グロブリン $\kappa$ 軽鎖可変領域とコンセンサスである未知EST	UC	1.67	3.86E-05
Hs.75596	インターロイキン2受容体、 $\beta$	UC	1.65	7.19E-05
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	1.64	2.48E-06
Hs.102950	coatamerタンパク質複合体、サブユニット $\gamma$ 、免疫グロブリン $\lambda$ 連結領域3	UC	1.64	4.13E-05
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	1.63	4.95E-06
Hs.406565	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	UC	1.61	3.75E-08
Hs.380156	NK-受容体、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2ドメイン、長い細胞質テイル、3	UC	1.60	3.16E-08
Hs.405944	免疫グロブリン $\lambda$ 遺伝子座	UC	1.59	1.55E-05
Hs.348935	免疫グロブリン $\lambda$ 様ポリペプチド1	UC	1.58	4.69E-05
Hs.84	インターロイキン2受容体、 $\gamma$ (重症複合免疫不全)	UC	1.53	7.84E-05
Hs.193128	C. elegans smu-1 の相同体	UC	1.52	5.16E-05
Hs.238944	仮説タンパク質 FLJ10631	UC	1.52	3.72E-05

10

20

【表 5】

表5: V群のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカー; 分類バイオマーカー

分類子 遺伝子	クラス	名称	Unigene ID
1	クローン病	リポカリン2(癌遺伝子24p3)	Hs.204238
2	クローン病	mutL 相同体 3 (E. coli)	Hs.279843
3	クローン病	血清欠乏性応答(ホスファチジルセリン結合タンパク質)	Hs.26530
4	クローン病	H2Bヒストンファミリー、メンバーQ	Hs.2178
5	クローン病	H3ヒストンファミリー、メンバーK	Hs.70937
6	クローン病	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド5	Hs.89714
7	クローン病	インテグリン、 $\beta$ 3(血小板糖タンパクIIIa、抗原CD61)	Hs.87149
8	UC	本明細書では免疫グロブリン重鎖定常領域 $\gamma$ 1とも呼ぶ、免疫グロブリン重鎖定常領域 $\gamma$ 3(G3mマーカー; IgHg3)	Hs.300697
9	UC	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	Hs.406565
10	UC	M27830ヒト28SリボソームRNA遺伝子5'領域	n/a
11	UC	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体タイプ、C会合タンパク質	Hs.155975
12	UC	グランザイムK(セリンプロテアーゼ、グランザイム3;トリプターゼII)	Hs.3066
13	UC	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	Hs.406565
14	UC	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域	Hs.406565

30

40

## 【0025】

(PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの供給源)

本発明のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、本PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーを発現する被験者の任意の組織または細胞から単離することができる。好ましい非限定的実施形態において、前記組織は、血液(または、例えば、血清、血漿、血液細胞)、リンパ節、唾液、胃または腸からのものである。本PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーのうちの1つま

50

たはそれ以上を含有する組織サンプル、それら自体が、本発明の方法において有用であり、当業者は、そのようなサンプルを慣用的に入手、保管および/または保存することができる方法を認識しよう。しかし、血液、特にP B M Cが、好ましい供給源として役立つ、そこからの本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの発現が、I B D、すなわちC DまたはU Cの診断、予後予測および/または進行のモニタリングのための本提示方法で評価されることは、当業者には明らかであろう。

**【0026】**

(単離されたP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーポリヌクレオチド)

本発明は、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーとしての単離されたポリヌクレオチドおよびポリペプチドを提供する。本発明の好ましいヌクレオチド配列としては、ゲノムの、c D N A、m R N A、s i R N A、および化学合成されたヌクレオチド配列が挙げられる。

10

**【0027】**

本発明の具体例としてのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを表1~5に列挙する。本発明は、表1~5に列挙されているP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド配列を包含する。本発明のポリヌクレオチド配列は、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、もしくはそれらの相補配列、ならびに/または表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの実質的な生物活性を保持するポリペプチド(すなわち、活性フラグメント)をコードしているポリヌクレオチドも包含する。本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも21個の連続したヌクレオチドを含む、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド配列の連続部分も含む。

20

**【0028】**

さらに、本発明は、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリペプチドを包含する。本発明のポリペプチドは、少なくとも7個の連続するアミノ酸を含む、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリペプチドの連続部分も含む。本発明の好ましい実施形態は、選択されたポリペプチドの実質的な生物活性を保持する、表1~5に列挙したもの中から選択されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの任意のポリペプチドの任意の連続部分を含む。

30

**【0029】**

さらに、本発明は、周知の遺伝子コード縮重のみに起因して、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド配列とは異なる、従って、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーによってコードされているものと同じタンパク質をコードしている、ポリヌクレオチド分子を包含する。

**【0030】**

本発明に包含されるポリヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーとして使用して、本開示ポリヌクレオチドをコードしているものと同じまたは同様の配列を有する核酸を同定および単離することができる。核酸を同定および単離するためのハイブリダイゼーション法としては、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)、サザンハイブリダイゼーション、インサイチューハイブリダイゼーションおよびノーザンハイブリダイゼーションが挙げられ、そのような方法は、当業者には周知である。

40

**【0031】**

ストリンジェンシーが異なる条件下でハイブリダイゼーション反応を行うことができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーとしては、任意の2つの核酸分子が互いにハイブリダイズすることの困難さが挙げられる。本発明は、低ストリンジェントな条件、より好ましくはストリンジェントな条件、および最も好ましくは高ストリンジェントな条件下で、本明細書に記載のポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドも包含する。ストリンジェンシー条件の例を下の表6に示す：高ストリンジェントな条件は、例えば条件A~Fと少なくとも同様にストリンジェントである条件で

50

あり；ストリンジेंटな条件は、例えば条件 G ~ L と少なくとも同様にストリンジेंटであり；および低ストリンジेंटな条件は、例えば条件 M ~ R と少なくとも同様にストリンジेंटである。

【表 6】

表6. ストリンジエンシー条件

ストリンジエンシー条件	ポリヌクレオチドハイブリッド	ハイブリッド長 (bp) <sup>1</sup>	ハイブリダイズする温度および緩衝液 <sup>2</sup>	洗浄温度および緩衝液 <sup>2</sup>
A	DNA:DNA	> 50	65°C; 1xSSC または 42°C; 1xSSC, 50% ホルムアミド	65°C; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	<50	T <sub>B</sub> *; 1xSSC	T <sub>B</sub> *; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67°C; 1xSSC または 45°C; 1xSSC, 50% ホルムアミド	67°C; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	<50	T <sub>D</sub> *; 1xSSC	T <sub>D</sub> *; 1xSSC
E	RNA:RNA	>50	70°C; 1xSSC または 50°C; 1xSSC, 50% ホルムアミド	70°C; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	<50	T <sub>F</sub> *; 1xSSC	T <sub>F</sub> *; 1xSSC
G	DNA:DNA	> 50	65°C; 4xSSC または 42°C; 4xSSC, 50% ホルムアミド	65°C; 1xSSC
H	DNA:DNA	<50	T <sub>H</sub> *; 4xSSC	T <sub>H</sub> *; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67°C; 4xSSC または 45°C; 4xSSC, 50% ホルムアミド	67°C; 1xSSC
J	DNA:RNA	<50	T <sub>J</sub> *; 4xSSC	T <sub>J</sub> *; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70°C; 4xSSC または 50°C; 4xSSC, 50% ホルムアミド	67°C; 1xSSC
L	RNA:RNA	<50	T <sub>L</sub> *; 2xSSC	T <sub>L</sub> *; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50°C; 4xSSC または 40°C; 6xSSC, 50% ホルムアミド	50°C; 2xSSC
N	DNA:DNA	<50	T <sub>N</sub> *; 6xSSC	T <sub>N</sub> *; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55°C; 4xSSC または 42°C; 6xSSC, 50% ホルムアミド	55°C; 2xSSC
P	DNA:RNA	<50	T <sub>P</sub> *; 6xSSC	T <sub>P</sub> *; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60°C; 4xSSC または 45°C; 6xSSC, 50% ホルムアミド	60°C; 2xSSC
R	RNA:RNA	<50	T <sub>R</sub> *; 4xSSC	T <sub>R</sub> *; 4xSSC

10

20

30

40

50

1：前記ハイブリッド長は、ハイブリダイズするポリヌクレオチドのハイブリダイズされる領域について予想した長さである。あるポリヌクレオチドを未知の配列のターゲットポリヌクレオチドにハイブリダイズさせる場合、そのハイブリッド長は、そのハイブリダイズするポリヌクレオチドの長さであると仮定する。既知配列のポリヌクレオチドをハイブリダイズする場合、そのハイブリッド長は、そのポリヌクレオチドの配列を整列させて、最適な配列相補性の領域を同定することによって、決定することができる。

2：ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液において、SSPE (1xSSPE は、0.15 M NaCl、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、および 1.25 mM EDTA, pH 7.4 である) を SSC (1xSSC は、0.15 M NaCl および 15 mM クエン酸ナトリウムである) の代わりに使用してもよい。洗浄は、ハイブリダイゼーション完了後に 15 分間行う。

T<sub>B</sub>\* ~ T<sub>R</sub>\*：長さが 50 塩基対未満であると予想されるハイブリッドに関して、ハイブリダイズする温度は、そのハイブリッドの融解温度 (T<sub>m</sub>) より 5 ~ 10 低くなければならず、この場合の T<sub>m</sub> は、次の方程式に従って決定する。長さが 18 塩基対未満のハイブリッドについては、T<sub>m</sub> ( ) = 2 (A 塩基 + T 塩基の #) + 4 (G 塩基 + C 塩基の #)。長さが 18 塩基対と 49 塩基対の間のハイブリッドについては、T<sub>m</sub> ( ) = 81.5 + 16.6 (log<sub>10</sub> Na<sup>+</sup>) + 0.41 (% G + C) - (600 / N) であり、式中、N は、そのハイブリッド中の塩基の数であり、Na<sup>+</sup> は、そのハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度 (1xSSC についての Na<sup>+</sup> = 0.165 M) である。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのためのストリンジエンシー条件の追加例は、参照により本明細書に組み込まれる、Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, chapters 9 and 11、および Current Protocols in Molecula

r Biology, 1995, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2, 10 and 6.3-6.4に提供されている。

【0032】

本発明のポリヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーとして使用して、相同ポリヌクレオチド、すなわち、本発明のポリペプチドおよび/または本開示ポリペプチドに相同なポリペプチドをコードしている配列を有する核酸を同定および単離することができる。これらの相同体は、本開示ポリヌクレオチドおよびポリペプチドとの有意な配列同一性を有するが、本開示ポリヌクレオチドおよびポリペプチドのものとは異なる種から、または同じ種の中から単離された、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドである。好ましくは、ポリヌクレオチド相同体は、本開示ポリヌクレオチドとの少なくとも60%の配列同一性（より好ましくは、少なくとも75%の同一性；最も好ましくは、少なくとも90%の同一性）を有し、これに対してポリペプチド相同体は、本開示ポリペプチドとの少なくとも30%の配列同一性（より好ましくは、少なくとも45%の同一性；最も好ましくは、少なくとも60%の同一性）を有する。好ましくは、本開示ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの相同体は、哺乳動物種から単離されたものであり、最も好ましくは、ヒトから単離されたものである。

10

【0033】

本発明のポリヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーとして使用して、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド配列の対立変異体をコードしている配列を有するDNAを同定および単離することができる。対立変異体は、表1~5に列挙した遺伝子によってコードされているポリペプチドと同一であるか、それらとの有意な類似性を有するポリペプチドをコードしている、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド配列の天然に存在する代替形態である。好ましくは、対立変異体は、本開示ポリヌクレオチドとの少なくとも90%の配列同一性（より好ましくは、少なくとも95%の同一性；最も好ましくは、少なくとも99%の同一性）を有する。

20

【0034】

従って、表1~5に列挙したポリヌクレオチド配列に加えて、本発明は、表1~5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの相同体および対立変異体も包含する。

30

【0035】

本発明のポリヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブおよびプライマーとして使用して、本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリペプチドを発現する細胞および組織ならびにそれらが発現する条件を同定することができる。

【0036】

加えて、本発明のポリヌクレオチドは、細胞または生物において本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーに対応する遺伝子の発現を変更する（すなわち、調節する（例えば、強化する、減少させる、または改変する））ために使用することもできる。これらの対応する遺伝子は、本発明のゲノムDNA配列であり、この配列が転写されて、本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリペプチドを採取するmRNAが産生させる。

40

【0037】

細胞または生物における本発明に包含されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの改変発現は、様々な阻害性ポリヌクレオチド、例えばアンチセンスポリヌクレオチド、本発明の遺伝子から転写されたmRNAに結合するおよび/またはそれを切断するリボザイム、遺伝子の調節領域をターゲティングする三重鎖形成性オリゴヌクレオチド、ならびにターゲットmRNAの配列特異的分解を生じさせる短い干渉性RNAの使用により、達成することができる（例えば、Galderisi et al. (1999) J. Cell. Physiol. 181: 251-57; Sioud (2001) Curr. Mol. Med 1:575-88; Knauert and Glazer (2001) Hum. Mol. Genet. 10:2243-51; Bass (2001) Nature 411 :428-29）。

50

## 【0038】

本発明の阻害性アンチセンスまたはリボザイムポリヌクレオチドは、本発明の遺伝子の全コーディング鎖に相補的である場合もあり、またはその一部だけに相補的である場合もある。あるいは、阻害性ポリヌクレオチドは、本発明の遺伝子のコーディング鎖の非コーディング領域に相補的である場合もある。本発明の阻害性ポリヌクレオチドは、当該分野では周知の手順を用いる化学合成および/または酵素ライゲーション反応を用いて構築することができる。化学合成ポリヌクレオチドのヌクレオチド結合は、ヌクレアーゼ媒介性の分解に耐えるそれらの能力を強化するように、ならびにそれらの配列特異性を増大させるように、改変することができる。このような結合改変としては、ホスホチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、ボラノホスフェート、モルホリノおよびペプチド核酸 (PNA) 結合が挙げられるが、これらに限定されない (Galderisi et al., *supra*; Heasman (2002) *Dev. Biol.* 243:209-14; Mickelfield (2001) *Curr. Med. Chem.* 8:1157-79)。あるいは、本発明のポリヌクレオチドをアンチセンス (すなわち、逆) 配向でサブクローニングした発現ベクターを使用して、アンチセンス分子を生物学的に産生させることができる。

10

## 【0039】

さらに別の実施形態において、本発明のアンチセンスポリヌクレオチド分子は、 $\alpha$ -アノマーポリヌクレオチド分子である。 $\beta$ -アノマーポリヌクレオチド分子は、通常のものであり、単位に反して、鎖が互いに平行に延びる相補的RNAを有する特異的2本鎖ハイブリッドを形成する。本アンチセンスポリヌクレオチド分子は、当該分野において公知である技法に従って、2'-O-メチルリボヌクレオチドまたはキメラRNA-DNA類似体も含むことができる。

20

## 【0040】

本発明に包含される阻害性三重鎖形成性オリゴヌクレオチド (TFO) は、高い特異性および親和性で2本鎖DNAの主要な溝に結合する (Knauert and Glazer, 上記)。本発明の遺伝子の発現は、それらの遺伝子の調節領域 (すなわち、プロモーターおよび/またはエンハンサー配列) に相補的なTFOをターゲティングしてそれらの遺伝子の転写を防止する三重らせん構造を形成することにより、阻害することができる。

## 【0041】

本発明の1つの実施形態において、本発明の阻害性ポリヌクレオチドは、短い干渉性RNA (siRNA) 分子である。これらのsiRNA分子は、ターゲットmRNAの配列特異的分解を生じさせる、短い (好ましくはヌクレオチド数19~25; 最も好ましくはヌクレオチド数19または21) の2本鎖RNA分子である。この分解は、RNA干渉 (RNAi) として知られている (例えば、Bass (2001) *Nature* 411:428-29)。当初、下等生物において同定されたRNAiは、哺乳動物細胞に有効に適用され、最近では、Fas mRNAにターゲティングされたsiRNA分子で処置したマウスにおいて劇症肝炎を予防することが証明された (Song et al. (2003) *Nature Med.* 9:347-51)。加えて、クモ膜下送達されたsiRNAが、ラットにおける2つのモデル (作動薬誘発性疼痛モデルおよび神経障害性疼痛モデル) において疼痛応答を遮断したと、最近報告された (Dorn et al. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(5):e49)。

30

40

## 【0042】

本発明のsiRNA分子は、2つの相補的1本鎖RNA分子を互いにアニーリングすること (一方がターゲットmRNAの一部と整合する) (Fire et al., 米国特許第6,506,559号) により、またはそれ自体が折り返して必要な2本鎖部分を生成する1本鎖ヘアピンRNA分子の使用 (Yu et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6047-52) により、生じさせることができる。siRNA分子は、化学的に合成することができる (Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-98) または1本鎖DNAテンプレートを使用するインビトロでの転写により生成することができる (Yu et al., 上記)。あるいは、siRNA分子は、センスおよびアンチセンスsiRNA配列を含有する発現ベクターを使用して、一時的に (Yu et al., 上記; Sui et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

50

USA 99:5515-20) または安定的に (Paddison et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 99:1443-48)、生物学的に産生させることができる。最近、さらに s i R N A にプロセッシングされるヘアピン R N A を発現するアデノウイルスベクターを使用して、効率的で配列特異的な様式での初代ヒト細胞におけるターゲット m R N A のレベルの低減が実証された (Arts et al. (2003) Genome Res. 13:2325-32)。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明のポリヌクレオチドにターゲッティングさせる s i R N A 分子は、当該分野において周知である基準 (例えば、Elbashir et al. (2001) EMBO J. 20:6877-88) に基づいて設計することができる。例えば、ターゲット m R N A のターゲットセグメントは、A A (好ましい)、T A、G A または C A で始まらなければならない; s i R N A 分子の G C 比は、45 ~ 55% でなければならない; s i R N A 分子は、3つの同じヌクレオチドを連続して含有してはならず; s i R N A 分子は、連続して7つの混合 G / C を含有してはならない; ならびにターゲットセグメントは、ターゲット m R N A の O R F 領域内に存在しなければならない、且つ、開始 A T G の少なくとも75 b p 後および停止コドンの少なくとも75 b p 前に存在しなければならない。通常の当業者は、前述の基準または他の公知の基準 (例えば、Reynolds et al. (2004) Nat. Biotechnol 22:326-30) を用いて、本発明のポリヌクレオチドにターゲッティングさせる s i R N A 分子を設計することができる。

#### 【 0 0 4 4 】

細胞または生物における本発明の P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの遺伝子の改変発現は、本発明のポリヌクレオチドがそのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物の産生によって達成することもできる。このようなトランスジェニック動物としては、本発明の遺伝子 (すなわち、トランス遺伝子) の多数のコピーを有する動物が挙げられる。組織特異的調節配列をトランス遺伝子に作動可能に連結させて、本発明のポリペプチドを特定の細胞または特定の発達段階に向けることができる。別の実施形態では、トランス遺伝子の調節発現を可能にする選択された系を含有するトランスジェニック非ヒト動物を産生させることができる。当該分野では公知のこのような系の一例は、バクテリオファージ P 1 の c r e / l o x P リコンビナーゼ系である。胚操作およびマイクロインジェクションによるトランスジェニック動物、特にマウスなどの動物の作製方法は、慣例的になっており、当該分野では周知である (例えば、Bockamp et al. (2002) Physiol. Genomics 11:115-32)。本発明の好ましい実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、少なくとも1つの P B M C および I B D に関連するバイオマーカーを含む。

#### 【 0 0 4 5 】

細胞または生物における本発明の遺伝子の改変発現は、本発明のポリヌクレオチドに対応する内在性遺伝子が外来性ポリヌクレオチド配列の挿入により破壊された動物 (すなわち、ノックアウト動物) の産生によって達成することもできる。前記内在性遺伝子のコーディング領域を破壊し、それによって非機能的タンパク質を生じさせることができる。あるいは、前記内在性遺伝子の上流調節領域を破壊するか異なる調節要素で置換し、その結果、依然として機能的なタンパク質の改変発現を生じさせることができる。ノックアウト動物を作製するための方法は、相同組換えを含み、当該分野において周知である (例えば、Wolfer et al. (2002) Trends Neurosci 25:336-40)。

#### 【 0 0 4 6 】

(単離された P B M C および I B D に関連するバイオマーカーポリペプチド)

本発明の幾つかの態様は、単離された P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのタンパク質、それらの生物活性部分、ならびに抗 P B M C および I B D に関連するバイオマーカー抗体を産生させる免疫原としての使用に適するポリペプチドフラグメントに関する。1つの実施形態では、標準的なタンパク質精製技術を用いて適切な精製計画により、細胞または組織源から天然の P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質を単離することができる。別の実施形態では、組換え D N A 法により P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質を産生させる。組換え発現の代替的方法として、標準的なペプチド合成技術を用いて P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの

10

20

30

40

50

タンパク質またはポリペプチドを化学合成することができる。

【0047】

表1～5に列挙したPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質は、表1～5に列挙したPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド配列を発現制御配列（例えば、pMT2およびpED発現ベクター）に動作可能に連結することによって、組換え産生させることができる。組換えタンパク質を発現させる一般的な方法は、当該分野では周知である。

【0048】

多数の細胞系が、本発明のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーポリペプチドの組換え発現に適する宿主細胞として作用することができる。哺乳動物宿主細胞系としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、293T細胞、A431細胞、3T3細胞、CV-1細胞、HeLa細胞、L細胞、BHK21細胞、HL-60細胞、U937細胞、HaK細胞、Jurkat細胞、正常2倍体細胞、ならびに一次組織および一次外植片のインビトロ培養から誘導された細胞株が挙げられる。

10

【0049】

あるいは、酵母などの下等真核生物、または原核生物において本発明のポリペプチドを組換え産生させることができる。適する可能性がある酵母株としては、サッカロミセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロミセス (*Kluyveromyces*) 株、およびカンジダ (*Candida*) 株が挙げられる。適する可能性がある細菌株としては、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) およびサルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) が挙げられる。本発明のポリペプチドが酵母または細菌において作られる場合、機能性を得るために、それらを、例えば適切な部位のリン酸化またはグルコシル化によって改変することが必要となる場合がある。このような共有結合は、周知の化学的方法または酵素的方法を用いて達成することができる。

20

【0050】

本発明の別の実施形態において、本発明のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーポリペプチドは、本発明のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーポリヌクレオチドを1つまたはそれ以上の昆虫発現ベクター（例えばバキュロウイルスベクター）の中の適切な制御配列に作動可能に連結させ、昆虫細胞発現系を利用することにより、組換え産生させることもできる。バキュロウイルス/Sf9発現系についての材料および方法は、キットの形で市販されている（例えば、MAXBAC（登録商標）キット、カリフォルニア州、カールスバッドのInvitrogen）。

30

【0051】

適切な宿主細胞における組換え発現後、周知の精製プロセス、例えばゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィーを用いて、本発明のポリペプチドを培養培地または細胞抽出物から精製することができる。精製としては、本発明のポリペプチドに結合することが判っている物質を用いる親和性クロマトグラフィーも挙げられる。これらの精製プロセスを用いて、天然源から本発明のポリペプチドを精製することもできる。

【0052】

あるいは、本発明のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーのポリペプチドは、同定、精製および/または検出を容易にする形態で組換え発現させることもできる。例えば、このポリペプチドは、マルトース結合タンパク質 (MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) またはチオレドキシン (RTX) などのタンパク質との融合体として発現させることができる。このような融合タンパク質の発現および精製のためのキットは、New England Biolabs (マサチューセッツ州、バーバリー)、Pharmacia (ニュージャージー州、ピスカタウェイ) およびInvitrogen (カリフォルニア州、カールスバッド) から、それぞれ、市販されている。本発明のポリペプチドを小さなエピトープでタグを付け、その後、そのエピトープに対する特異的抗体を用いて同定または精製することができる。好ましいエピトープは、FLAG

40

50

ピトーブであり、これは、Easetman Kodak (コネチカット州、ニューヘーベン) から市販されている。

【0053】

シグナル配列を用いて、分泌タンパク質または目的の他のタンパク質の分泌および単離を容易にすることができる。典型的に、シグナル配列は、1つまたはそれ以上の切断事象で分泌中に成熟タンパク質から一般的に切断される疎水性アミノ酸のコアを特徴とする。このようなシグナルペプチドは、それらが分泌経路を進むにつれて、それらの成熟タンパク質からシグナル配列を切断することができるプロセッシング部位を含有する。従って、本発明は、シグナル配列を有する前記ポリペプチドに関し、ならびにシグナル配列がタンパク質分解により切断されたポリペプチド(すなわち、切断産物)に関する。1つの実施形態において、シグナル配列をコードしているポリヌクレオチド配列を、発現ベクターにおいて目的のタンパク質(例えば、通常は分泌されないか、そうでない場合は単離が難しいタンパク質)に作動可能に連結させることができる。前記シグナル配列は、例えばその発現ベクターが形質転換される真核宿主から、タンパク質の分泌を命令し、その後、またはそれと同時に、シグナル配列が切断される。その後、そのタンパク質は、当該分野において認知されている方法によって細胞外媒体から容易に精製することができる。あるいは、前記シグナル配列は、精製を促進する配列を用いて、例えばGSTドメインで、目的のタンパク質に連結させることができる。

10

【0054】

表1~5に列挙したPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーポリペプチドならびにそれらの対立遺伝子の変異体および相同体に加えて、本発明は、表1~5に列挙したポリペプチドとは構造的に異なる(例えば、わずかに改変された配列を有する)が、本開示ポリペプチドと実質的に同じ生化学的特性を有する(例えば、機能的に必須でないアミノ酸残基のみが変化している)ポリペプチドも包含する。このような分子としては、変更、置換(substitution)、置き換え(replacement)、挿入または欠失を有する計画的に操作された変異体が挙げられるが、それらの限定されない。そのような変更、置換、置き換え、挿入または欠失のための技術およびキットは、当業者には周知である。

20

【0055】

本発明は、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質に対する作動薬としてまたは拮抗薬として機能する、本発明のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の変異体も包含する。ある一定の実施形態において、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の作動薬は、天然に存在する形態のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質と実質的に同じ生物活性もしくはそのサブセットを保持することができる、またはPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の活性を強化することができる。ある一定の実施形態において、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の拮抗薬は、例えば、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の活性を競合的に調節することによって、天然に存在する形態のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の活性のうちの一つまたはそれ以上を阻害することができる。従って、限定機能の変異体での処理により、特定の生物学的作用を惹起することができる。1つの実施形態において、天然に存在する形態のタンパク質の生物活性のサブセットを有する変異体での被験者の処置は、天然に存在する形態のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質での処置に比べて被験者における副作用が少ない。別の好ましい実施形態において、IBDの処置のために、目的の特定のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質のアップレギュレーションが必要とされるのか、ダウンレギュレーションが必要とされるのかに依存して、1つの薬剤が、本発明のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質に対する作動薬としての役割を果たすこともあり、または拮抗薬としての役割を果たすこともある。

30

40

【0056】

PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の変異体は、PBM Cおよ

50

び I B D に関連するバイオマーカータンパク質の突然変異誘発、例えば不連続性点突然変異またはトランケーションによって、産生させることができる。あるいは、P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質作動薬としてまたは P B M C 関連および I B D に関連するバイオマーカータンパク質拮抗薬として機能する P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質の変異体は、変異体、例えば P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質のトランケーション変異体のコンビナトリアルライブラリーを作動薬活性または拮抗薬活性についてスクリーニングすることによって、同定することができる。1つの実施形態において、P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質変異体の多彩なライブラリーが、ポリヌクレオチドレベルでのコンビナトリアル突然変異誘発によって産生され、多彩な遺伝子ライブラリーによってコードされる。ある一定の実施形態において、このようなタンパク質は、例えば本発明の治療用タンパク質として、使用することができる。例えば、可能性のある P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質配列の変性したセットが、個々のポリペプチドとして、あるいはその P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質配列セットを包含するそれより大きな融合タンパク質のセット（例えば、ファージディスプレイ用のもの）として発現できるように、遺伝子配列に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的にライゲーションすることによって、P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質変異体の多彩なライブラリーを産生させることができる。変性オリゴヌクレオチド配列から可能性のある P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質変異体のライブラリーを産生させるために用いることができる様々な方法がある。変性遺伝子配列の化学合成を自動 D N A 合成装置において行い、その後、その合成遺伝子を適切な発現ベクターにライゲートすることができる。遺伝子の変性セットの使用により、可能性のある P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質配列の所望のセットをコードしている配列のすべてを1つの混合物で得ることができる。変性オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野において公知である。

10

20

**【0057】**

本発明のポリペプチドは、公知の従来型化学合成によって産生させることもできる。本発明のポリペプチドの化学合成のための方法は、当業者には周知である。このような化学合成ポリペプチドは、天然の精製ポリペプチドと共通の生物学的特性を有することができる。従って、天然ペプチドの生物活性または免疫学的置換基として利用することができる。

30

**【0058】**

（P B M C および I B D に関連するバイオマーカーに対する抗体）

別の態様において、本発明は、本発明の P B M C および I B D に関連するバイオマーカーに対応するまたはそれらによってコードされているタンパク質に特異的な抗体に関する。好ましくは、前記抗体は、モノクローナル抗体であり、最も好ましくは、前記抗体は、下で説明するようなヒト化抗体である。

**【0059】**

本発明の P B M C および I B D に関連するバイオマーカーに対する抗体分子（抗バイオマーカー抗体）は、当業者には周知の方法によって産生させることができる。例えば、モノクローナル抗体は、公知の方法に従ってハイブリドーマを生じさせることによって、産生させることができる。このようにして形成されたハイブリドーマを、その後、標準的な方法、例えば酵素結合免疫吸着検査法（E L I S A）を用いてスクリーニングして、本発明のポリペプチドと特異的に結合する抗体を産生させる1つまたはそれ以上のハイブリドーマを同定することができる。本発明の完全長ポリペプチドを免疫原として使用してもよく、あるいは本ポリペプチドの抗原性ペプチドフラグメントを使用してもよい。本発明のポリペプチドの抗原性ペプチドは、少なくとも7つの連続するアミノ酸残基を含み、ならびにそのペプチドに対して産生された抗体がそのポリペプチドと特異的免疫複合体を形成するようなエピトープを包含する。好ましくは前記抗原性ペプチドは、少なくとも10のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15のアミノ酸残基、よりいっそう好ましくは少なくとも20のアミノ酸残基、および最も好ましくは少なくとも30のアミノ酸残基を

40

50

含む。

【0060】

モノクローナル抗体分泌性ハイブリドーマを調製するための代替的方法として、本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカに対するモノクローナル抗体は、本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカポリペプチドを伴う組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングして、それによって、そのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカに結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することにより、同定および単離することができる。抗体ディスプレイライブラリーの作製およびスクリーニングにおける使用に特に適している方法および試薬であるような、ファージディスプレイライブラリーを産生およびスクリーニングするための技術および市販キットは、当業者には周知である。

10

【0061】

ポリクローナル血清および抗体は、本発明のポリペプチドで適する被験者を免疫化することによって、産生させることができる。免疫された被験者における抗体力価を、標準的な技術により、例えば免疫化バイオマーカタンパク質を用いてE L I S Aで、経時的にモニターすることができる。所望の場合には、本発明のポリペプチドに対する抗体分子を、被験者または培地から単離し、プロテインAクロマトグラフィーなどの周知の技術によってさらに精製して、I g G画分を得ることができる。

20

【0062】

加えて、標準的な組換えD N A技術を用いて作製することができる、ヒト部分と非ヒト部分との両方を含む組換え抗バイオマーカ抗体（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体および1本鎖抗体）は、本発明の範囲内である。ヒト化抗体は、内在性免疫グロブリンの重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を発現することはできないが、ヒトの重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて、産生させることもできる。あるいは、誘導選択（guided selection）と呼ばれる技術を用いて、選択エピトープを認識するヒト化抗体を作製することができる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス抗体）を用いて、同エピトープを認識するヒト化抗体の選択を誘導する。

30

【0063】

キメラ免疫グロブリン鎖を含むキメラ抗体は、当該分野では公知の組換えD N A技術によって産生させることができる。例えば、マウス（または他の種）モノクローナル抗体分子のF c定常領域をコードしている遺伝子を制限酵素で消化して、そのマウスF cをコードしている領域を除去し、ヒトF c定常領域をコードしている遺伝子の等価部分を置換する（P C T / U S 8 6 / 0 2 2 6 9 ; E P 1 8 4 , 1 8 7 ; E P 1 7 1 , 4 9 6 ; E P 1 7 3 , 4 9 4 ; W O 8 6 / 0 1 5 3 3 ; 米国特許第4 , 8 1 6 , 5 6 7号 ; E P 1 2 5 , 0 2 3 ; Better et al. (1988) Science 240:1041-43 ; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:3439-43 ; Liu et al. (1987) J Immunol. 139:3521-26 ; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:214-18 ; Nishimura et al. (1987) Cane. Res. 47:999-1005 ; Wood et al. (1985) Nature 314:446-49 ; およびShaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-59 参照）。

40

【0064】

所望の場合、抗体または免疫グロブリン鎖を、当該分野では公知の方法によって、ヒト化することができる。ヒト化免疫グロブリン鎖を含むヒト化抗体は、抗原結合に直接関与しないF v可変領域の配列をヒトF v可変領域からの等価配列で置換することによって、産生させることができる。ヒト化抗体を産生させるための一般的な方法は、Morrison (1985) Science 229:1202-07 ; Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214-21 ; ならびに米国特許第5 , 5 8 5 , 0 8 9号、同第5 , 6 9 3 , 7 6 1号および同第5 , 6 9 3 , 7 6 2号によって提供されており、前記文献はすべて、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。それらの方法としては、重鎖または軽鎖の少なくとも一方からの免疫グロブリン

50

Fv可変領域のすべてまたは一部をコードしている核酸配列の単離、操作および発現が挙げられる。このような核酸の供給源は、当業者には周知であり、例えば、所定のターゲットに対する抗体を産生するハイブリドーマから得ることができる。その後、ヒト化抗体をコードしている組換えDNAまたはそのフラグメントを適切な発現ベクターにクローニングすることができる。

#### 【0065】

ヒト化抗体またはCDRグラフト抗体分子または免疫グロブリンは、CDRグラフトまたはCDR置換（ここで、免疫グロブリン鎖の1つ、2つまたはすべてのCDRを置換することができる）によって産生させることができる。例えば、米国特許第5,225,539号；Jones et al. (1986) Nature 321:522-25；Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534-36；およびBeidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-60参照。前記文献はすべて、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第5,225,539号には、本発明のヒト化抗体を調製するために用いることができるCDRグラフト化法が記載されている（GB 2188638Aも参照）。特定のヒト抗体のCDRのすべてを非ヒトCDRの少なくとも一部分で置換することができ、またはCDRの一部のみを非ヒトCDRで置換することができる。所定の抗原へヒト化抗体が結合するのに必要なCDRの数を置き換えることのみが必要とされる。

#### 【0066】

例えば、その抗体の他の部分（例えば定常領域）を欠失、付加また置換することによって改変されているモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体も、本発明の範囲内である。例えば、抗体は、以下のように改変することができる：（i）定常領域を欠失させる；（ii）その定常領域を、別の定常領域、例えば、その抗体の半減期、安定性もしくは親和性を増加させる意味をもつ定常領域、または別の種もしくは抗体クラスからの定常領域で、置換する；ならびに/あるいは（iii）その定常領域内の1つまたはそれ以上のアミノ酸を改変する、例えば、数ある中でも、グリコシル化部位の数、エフェクター細胞機能、Fc受容体（FcR）結合、補体結合を改変する。

#### 【0067】

抗体定常領域を改変するための方法は、当該分野において公知である。機能が改変された（例えば、エフェクターリガンド、例えば、細胞上のFcR、または補体のC1成分に対する親和性が改変された）抗体は、その抗体の定常部分にある少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基で置換することによって、産生させることができる（例えば、EP 388,151 A1、米国特許第5,624,821号および同第5,648,260号参照；前記特許はすべて、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる）。類似のタイプの改変をマウス免疫グロブリンまたは他の種からの免疫グロブリンに適用することもできる。例えば、指定の残基をその側鎖に適切な機能性を有する残基で置換することにより、または荷電官能基、例えばグルタメートもしくはアスパルテート、または芳香族非極性残基、例えばフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンもしくはアラニンを導入することにより、FcR（例えば、FcガンマR1）に対するまたはC1q結合に対する抗体（例えば、ヒトIgGなどのIgG）のFc領域の親和性を改変することができる（例えば、米国特許第5,624,821号参照）。

#### 【0068】

加えて、本発明のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーに対するヒト抗体は、抗原によるチャレンジに应答して、その動物の内在性抗体ではなく完全ヒト抗体を産生させるように改変されているトランスジェニック非ヒト動物を用いて、産生させることができる。例えば、PCT公開WO 94/02602参照。非ヒト宿主における重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードしている内在性遺伝子は無能力化されており、ヒトの重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードしている活性遺伝子座をその宿主ゲノムに挿入する。そのヒト遺伝子は、例えば必要なヒトDNAセグメントを含有する酵母人工染色体を使用して、導入することができる。その後、改変の全補足因子（complement）より少ない補足因子を有する中間トランスジェニック動物を交雑させるこ

10

20

30

40

50

とにより、所望のすべての改変をもたらす動物が後代として得られる。このような非ヒト動物の1つの実施形態はマウスであり、PCT公開WO 96/33735およびWO 96/34096に開示されているようにXENOMOUSE™と呼ばれている。この動物は、完全ヒト免疫グロブリンを分泌するB細胞を産生する。これらの抗体は、目的の免疫原で免疫化した後に動物から直接得ることができ（例えば、ポリクローナル抗体の作製物）、あるいは動物から採取した不死化B細胞から直接得ることができる（例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ）。加えて、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードしている遺伝子を回収し、発現させて、抗体を直接得ることができ、またはさらに改変して、例えば1本鎖Fv分子などの抗体の類似体を得ることができる。

#### 【0069】

本発明の抗体の結合能力は、次の方法によって測定することができる：Biacore分析、酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）、X線結晶学、配列分析およびスキニング突然変異誘発、ならびに当該分野において公知である他の方法。

#### 【0070】

他のタンパク質結合分子を利用して、PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの活性を調節することもできる。このようなタンパク質結合分子としては、スモール・モジュラー・イムノファーマスーティカル（small modular immunopharmaceutical：SMIP™）薬（ワシントン州、シアトルのTrubion Pharmaceuticals）が挙げられる。SMIPは、抗原またはカウンター受容体などのような同種構造のための結合ドメインと、1つのシステイン残基を有するか、システイン残基を有さないヒンジ領域ポリペプチドと、免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインとから成る1本鎖ポリペプチドである（HYPERLINK "http://www.trubion.com" www.trubion.comも参照）。SMIPならびにそれらの使用および用途は、例えば、米国特許公開出願第2003/0118592号、同第2003/0133939号、同第2004/0058445号、同第2005/0136049号、同第2005/0175614号、同第2005/0180970号、同第2005/0186216号、同第2005/0202012号、同第2005/0202023号、同第2005/0202028号、同第2005/0202534号および同第2005/0238646号、ならびにこれらの関連パテントファミリーメンバーに開示されており、前記は、すべて、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0071】

抗バイオマーカー抗体のフラグメントは、当該分野では周知の方法に従って、抗体の切断により作製することができる。例えば、ペプシンなどの酵素で抗体を処理することにより、免疫学的に活性なF(ab')フラグメントおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを作製することができる。

#### 【0072】

本発明の抗バイオマーカー抗体は、上清、細胞溶解産物中の、または細胞表面上のPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーのポリペプチドを単離、精製および/または検出するために有用である。本発明に開示する抗体を診断において使用して、臨床検査手順の一部としてPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーのタンパク質のレベルをモニターすること、または治療用モジュレーターを、その抗バイオマーカー抗体の抗原を含む細胞もしくは組織にターゲティングすることができる。例えば、小分子を含む（しかし、これに限定されない）本発明の治療薬を抗バイオマーカー抗体に連結させて、その治療薬をPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーにターゲティングすることができる。

#### 【0073】

（PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの検出）

本発明は、PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの異常発現または活性レベルに直接または間接的に起因する、被験者におけるIBD（例えばクローン病または潰瘍性大腸炎）の診断、予後予測および進行のモニタリング方法を提供する。これらの方法は

10

20

30

40

50

、そのような P B M C および I B D に関連するバイオマーカの異常発現または活性レベルを検出することによるものであり、ヒト被験者におけるそのような方法の使用を含むが、これに限定されない。例えば、これらの方法は、例えば臨床の場で適切に使用することができる、本明細書に記載するような P B M C および I B D に関連するバイオマーカのポリヌクレオチドおよびそれらのフラグメント、P B M C および I B D に関連するバイオマーカのポリペプチドおよびその誘導体、P B M C および I B D に関連するバイオマーカに対する抗体、ならびに P B M C および I B D に関連するバイオマーカのポリヌクレオチドおよび / またはポリペプチドのモジュレーターを含む群のうちの少なくとも 1 つを含む、包装済み診断用キットを利用することによって、行うことができる。加えて、本明細書に記載するもの以外の周知の方法によって 1 つまたはそれ以上の P B M C および I B D に関連するバイオマーカの発現または活性レベルにおける変化を検出することもできることは、当業者には理解されるであろう。

10

**【 0 0 7 4 】**

本発明の診断、予後予測およびモニタリングアッセイは、生物サンプルにおける P B M C および I B D に関連するバイオマーカの遺伝子産物の検出および定量を含む。P B M C および I B D に関連するバイオマーカの遺伝子産物としては、P B M C および I B D に関連するバイオマーカの m R N A、c D N A およびゲノム D N A、ならびに P B M C および I B D に関連するバイオマーカのポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されず、このような遺伝子産物は、当業者には周知の方法を用いて測定することができる。

20

**【 0 0 7 5 】**

例えば、P B M C および I B D に関連するバイオマーカの m R N A は、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイ、例えばノーザンハイブリダイゼーション、インサイチュウハイブリダイゼーション、ドットプロットおよびスロットプロット、ならびにオリゴヌクレオチドアレイを用いて、直接検出および定量することができる。ハイブリダイゼーションに基づくアッセイは、プローブ核酸をターゲット核酸にハイブリダイズさせるアッセイを指す。一部の形式では、そのターゲット、プローブまたは両方を免疫化する。免疫化される核酸は、D N A であってもよく、R N A であってもよく、または他のオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドであってもよく、ならびに天然または非天然のヌクレオチド、ヌクレオチド類似体または骨格を包含し得る。本発明において使用するための核酸プローブ配列の選択方法は、P B M C および I B D に関連するバイオマーカの核酸配列に基づくものであり、当該分野では周知である。

30

**【 0 0 7 6 】**

あるいは、P B M C および I B D に関連するバイオマーカの m R N A を、検出および定量前に、増幅することができる。このような増幅に基づくアッセイは、当該分野において周知であり、それらには、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R )、逆転写 - P C R ( R T - P C R )、P C R - 酵素結合免疫吸着検査法 ( P C R - E L I S A )、リガーゼ連鎖反応 ( L C R )、自己継続配列複製 ( self-sustained sequence replication )、転写増幅系、Q - レプリカーゼ、または任意の他のポリヌクレオチド増幅方法が挙げられる。当業者は、過度な実験を行うことなく、増幅された P B M C および I B D に関連するバイオマーカの遺伝子産物を産生および検出するためのプライマーおよびプローブを、表 1 ~ 5 に列挙した P B M C および I B D に関連するバイオマーカの核酸配列に基づき、容易に設計し、作製することができる。増幅された P B M C および I B D 関連遺伝子産物は、例えば、ゲル電気泳動法により；プローブ核酸へのハイブリダイゼーションにより；塩基配列決定法により；蛍光、リン光もしくは放射性シグナルの検出により；または様々な周知の方法のうちのいずれかにより、直接分析することができる。加えて、ターゲット核酸配列の増幅により生じるシグナルを増加させる方法は、当業者には公知である。P B M C および I B D に関連する遺伝子産物の定量が望まれる場合、いずれの増幅方法を用いるにせよ、当該分野では公知の様々な定量方法 ( 例えば、定量 P C R ( Q - P C R ) ; 本明細書では、「リアルタイム P C R」、「定量リアルタイム P C R」、「定量リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応」および「定量リアルタイム R T - P C R」などとも呼ばれる )

40

50

)を用いることができることは、当業者には理解されるであろう。

【0077】

本発明のPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーのポリペプチド(またはそれらのフラグメント)は、上で説明した抗バイオマーカー抗体を利用する様々な周知の免疫アッセイを用いて検出することができる。免疫アッセイは、PBM CおよびIB D関連ポリペプチド(またはそのフラグメント)に特異的に結合する抗体(例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、s c F v抗体、およびそれらのフラグメント)を利用するアッセイを指す。本発明の実施に適するこのような周知の免疫アッセイとしては、ELISA、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫沈降法、免疫蛍光法、蛍光活性化細胞分別法(FACS)およびウエスタンブロッティングが挙げられる。加えて、抗バイオマーカー抗体は、標準的な画像化技術によって被験者においてその存在および位置を検出することができる放射活性バイオマーカーで標識することができる。

10

【0078】

各々のPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを個々に考えてもよいが、分析の信頼性を増すために本発明の方法および組成物において使用するための2つまたはそれ以上のPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーの組み合わせを提供することは、本発明の範囲内である。1つの実施形態において、本発明は、本発明のPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーのパネル(例えばモデル)を提供する。1つのパネルは、2~5、5~15、15~35、35~50、50~100、または100より多くのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含んでもよいし、および/または本質的にそれらから構成されてもよい。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも2つのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも3つのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも4つのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも5つのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも6つのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも7つのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも8つのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも9つのPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも10のPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも11のPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。1つの実施形態において、本発明のパネルは、少なくとも12のPBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。

20

30

40

【0079】

別の実施形態において、PBM CおよびIB Dに関連するバイオマーカーのパネルは、任意の1つのパネルの中のバイオマーカーがある一定の特徴を共有するように選択される。例えば、第一パネルのバイオマーカーは、実質的にIB Dでない被験者からのPBM Cと比較して、炎症性腸疾患(すなわちクローン病または潰瘍性大腸炎)を有する患者からのPBM Cにおいて量または活性の点で少なくとも1.5倍の増加を各々示すことができる。あるいは、第二パネルのバイオマーカーは、第一パネルと比較して区別的な調節を各々示すことができる。同様に、バイオマーカーの異なるパネルは、異なる機能カテゴリー

50

(すなわち、タンパク質分解、シグナル伝達、転写など)もしくはサンプル(すなわち、血液、腎臓、脾臓、リンパ節、脳、腸、結腸、心臓、尿など)からのバイオマーカーで構成されている場合もあり、または炎症性腸疾患(すなわちクローン病もしくは潰瘍性大腸炎)の異なる段階を代表するように選択される場合もある。好ましい実施形態において、本発明のパネルは、血液および特にP B M Cからのバイオマーカーを含む。本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのパネルは、I群バイオマーカーとして類別されるバイオマーカー、I I群バイオマーカーとして類別されるバイオマーカー、I I I群バイオマーカーとして類別されるバイオマーカー、I V群バイオマーカーとして類別されるバイオマーカー、および/またはV群バイオマーカーとして類別されるバイオマーカーのパネルとして選択することによって作製することができる。I群、I I群、I I I群、I V群、および/またはV群に類別されたバイオマーカーからバイオマーカーを独立して選択することによって、パネルを作製することもできる。好ましい実施形態において、あるパネルは、V群バイオマーカーとして類別されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのセットを含む、および/またはそれらから本質的に構成される。本発明のパネルが、任意の数および任意の組み合わせの本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカー、特に、本発明のV群バイオマーカーを含むことができる、および/またはそれらから本質的に構成することができることも当業者には理解されるであろう。例えば、本発明の非限定的パネルは、免疫グロブリン重鎖定常領域 1ならびに免疫グロブリン 定常領域のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを含むことができる、および/またはそれらから本質的に構成することができる。本発明の別の非限定的パネルは、ヒト28SリボソームRNA 5'領域、タンパク質チロシンホスファターゼ受容体タイプC会合タンパク質、H3ヒストンファミリーメンバーK、インテグリン 3(血小板糖タンパク質II Ia、抗原CD61)およびH2BヒストンファミリーメンバーQのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを含むことができる、および/またはそれらから本質的に構成することができる。本発明の別の非限定的パネルは、免疫グロブリン重鎖定常領域 1、グランザイムK、mut L相同体3、リボカリン2、CXCL5、血清欠乏性応答ホスファチジルセリン結合タンパク質、およびH3ヒストンファミリーメンバーK P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを含むことができる、および/またはそれらから本質的に構成することができる。1つの実施形態において、本発明のパネルは、患者が、(1)クローン病もしくは潰瘍性大腸炎いずれかの形態のI B D、(2)クローン病、および/または(3)潰瘍性大腸炎を有するかどうかの判定に関して、ならびに/あるいはI B Dを有する患者が、クローン病または潰瘍性大腸炎を有するかの識別に関して、少なくとも70%の精度(より好ましくは、少なくとも80%の精度、最も好ましくは、少なくとも90%の精度)を提供する。

#### 【0080】

P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのパネルの提供に加えて、固体支持体に好都合にカップリングされるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのパネルを提供することも本発明の範囲内である。例えば、本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチドは、当該分野で周知の方法を用いて、アレイ(例えば、ハイブリダイゼーション分析用のバイオチップ)、樹脂(例えば、カラムクロマトグラフィー用のカラムに充填することができる樹脂)、またはマトリックス(例えば、ノーザンブロット分析用のニトロセルロースマトリックス)にカップリングさせることができる。このようなアレイの製造方法、ならびにこのようなアレイとコンピューター可読媒体(本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを含むもの)および/またはデータベース、例えば関係型データベースの使用を含む、このようなアレイの使用方法は、当該分野において周知である。

#### 【0081】

そのような支持体を提供することにより、そのパネル用に選択された各々のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのサンプル中での存在または活性について、個別的分析を検出することができる。例えば、アレイでは、当該分野では周知の方法を用いて、

10

20

30

40

50

P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのパネルの各メンバーに相補的なポリヌクレオチドをそのアレイの異なる既知の位置に個々に取り付けることができる。そのアレイを、例えば被験者からの血液サンプル（好ましくは、P B M C サンプル）から抽出されたポリヌクレオチドと、ハイブリダイズさせることができる。アレイ上の任意の位置でサンプル由来のポリヌクレオチドとそのアレイのハイブリダイゼーションを検出することができ、従って、そのサンプルにおける P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの存在または量を確かめることができる。従って、組織特異性のみならず、その組織における I B D バイオマーカーのパネルの発現レベルをも確かめることができる。好ましい実施形態では、バイオチップに基づくアレイが利用される。同様に、被験者からのタンパク質サンプルとハイブリダイズさせた異なるポリペプチドバイオマーカーに特異的な免疫化抗体を用いて、E L I S A 分析を行うことができる。

10

**【 0 0 8 2 】**

別の実施形態では、レポーター核酸を利用して、本発明の 1 つまたはそれ以上の P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの発現を検出する。このようなレポーター核酸は、末梢血単核細胞の発現プロファイルを変更する薬剤についてのハイスループットスクリーンに有用であり得る。このようなレポーターアッセイの構成および使用は、周知である。

**【 0 0 8 3 】**

例えば、本発明の P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの転写調節のためのレポーターの構築は、一般的には、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節配列、典型的にはプロモーターを必要とする。前記プロモーターは、様々な常用法によって得ることができる。例えば、ゲノムライブラリーをその核酸のコーディング領域から成る標識されたプローブとハイブリダイズさせて、プロモーター配列を含有するゲノムライブラリーのクローンを同定することができる。その単離されたクローンの塩基配列決定を行って、そのコーディング領域から上流の配列を同定することができる。別の方法は、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのポリヌクレオチドのコーディング領域の 5 ' 末端にアニーリングするプライマーを使用する増幅反応である。この増幅テンプレートは、例えば、アンカーバブルアダプター（anchor bubble adaptor）をライゲートした制限ゲノム核酸であり得る。

20

**【 0 0 8 4 】**

レポーターを構築するために、選択された P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのプロモーターを、例えばその選択された P B M C および I B D に関連するバイオマーカーポリヌクレオチドのリーディングフレームを利用することなく、レポーター核酸に動作可能に連結させることができる。その核酸構築物をトランスフェクションプロトコルによって組織培養細胞（例えば末梢血単核細胞）に形質転換させて、レポーター細胞を産生させる。

30

**【 0 0 8 5 】**

多くの周知のレポーター核酸を使用することができる。1 つの実施形態において、前記レポーター核酸は、緑色蛍光タンパク質である。第二の実施形態において、前記レポーターは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼである。他の実施形態において、前記レポーター核酸は、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ラクタマーゼ、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、または当該分野において公知の他のレポーター核酸である。前記レポーター核酸構築物は、エピソーム上に維持することもでき、または例えば標的化相同組換え（targeted homologous recombination）を用いることにより、染色体に挿入することもできる。このようなレポーター核酸の作製および使用方法は周知である。

40

**【 0 0 8 6 】**

（ I ~ V 群バイオマーカーによる分析 ）

本発明の P B M C および I B D に関連するバイオマーカーは、5 つの異なる群に類別することが可能であるが、各々の個々のバイオマーカーが本発明の P B M C および I B D に関連するバイオマーカーであることは、当業者には理解されるであろう。加えて、これら

50

のバイオマーカーが、特性付けのみを目的としてこのような群に類別されることは、当業者には理解されるであろう。例えば、I群のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーは、U Cを有する患者のP B M Cと共通の、C Dを有する患者のP B M Cにおいて差次的に発現するバイオマーカーであると判定された。従って、これらの共通バイオマーカーは、I B Dを処置するための試験化合物をスクリーニングするアッセイにおいて共に都合よく使用することができる、またはそのI B DがC Dの形態であるか、U Cの形態であるかにかかわらず、I B Dの診断、予後予測および/もしくはモニタリングに共に使用することができることを意味するように、共に類別される。I I群、I I I群、I V群および/またはV群のバイオマーカーとして類別されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーも、そのI B DがC Dの形態であるか、U Cの形態であるかにかかわらず、I B Dの診断、予後予測および/もしくはモニタリングのための試験化合物のスクリーニングに使用できることは、当業者には理解されるであろう。しかし、I I群バイオマーカー、すなわちC Dバイオマーカーのセットに含まれるバイオマーカーは、そのI B DがC Dの形態であるとき、I B Dの診断、予後予測および/またはモニタリングのための試験化合物のスクリーニング法に使用される最適なセットであり得ることに注目されよう。逆に、I I I群バイオマーカー、すなわち、U Cバイオマーカーのセットに含まれるバイオマーカーは、そのI B DがU Cの形態であるとき、I B Dの診断、予後予測および/またはモニタリングのための試験化合物のスクリーニング法に使用される最適なセットであり得る。また、I V群バイオマーカー、すなわち、C D v U Cバイオマーカーのセットに含まれるバイオマーカー、および特にV群バイオマーカー、すなわち、分類バイオマーカーのセットに含まれるバイオマーカーは、C Dを有する患者とU Cを有する患者を識別することが重要なとき、I B Dの診断、予後予測および/またはモニタリングのための試験化合物のスクリーニング法に使用される最適なセットであり得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 7 】

(スクリーニング)

I B Dの診断、予後予測および進行のモニタリング方法に加えて、本発明のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの活性を調節することができる、従って、I B D、すなわちクローン病または潰瘍性大腸炎の症状を抑制または緩和することができる可能性がある薬物を同定する、またはそのような薬剤のためのリード化合物を同定するスクリーニングアッセイにおいて使用することができる。ハイスループットスクリーニング方法をはじめとするこのようなスクリーニングアッセイは、当該分野において周知である。例えば、I B Dを有すると診断された被験者もしくはI B Dを有する可能性がある被験者からのサンプル、または(天然もしくは組換え、いずれかの)P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーを含有するサンプルを、複数の試験化合物(例えば、小有機分子、生物製剤)のうちの1つと接触させることができ、そしてそれらの処理サンプルの各々におけるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの発現または活性のレベルを、未処理サンプルにおけるまたは異なる試験化合物と接触させたサンプルにおけるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの発現または活性のレベルと比較して、以下を決定することができる:試験化合物のいずれかが、1)少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの実質的に低減された発現もしくは活性のレベルを提供する(それによって、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの活性の阻害剤を示す)かどうか、または2)少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの実質的に上昇した発現もしくは活性のレベル(それによって、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの活性を増大させる因子を示す)かどうかを判定することができる。好ましい実施形態において、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの活性を調節することができる試験化合物の同定は、B I A C O R E (登録商標)(スウェーデン、ウプサラのB i a c o r e I n t e r n a t i o n a l A B)またはB R E T (生物発光共鳴エネルギー移動)およびF R E T (蛍光共鳴エネルギー移動)アッセイ、ならびにE L I S Aおよび細胞ペー

スのアッセイによって提供されるような、ハイスループットスクリーニングアッセイを用いて行うことができる。

【0088】

加えて、本発明は、結合パートナーへのPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの結合を調節することができる試験化合物をスクリーニングする方法にさらに関し、この方法は、試験化合物とPBM CおよびIBDに関連するタンパク質と結合パートナーとを併せ、その結合パートナーとPBM CおよびIBDに関連するタンパク質の結合が発生するかどうか、およびそのような結合が試験化合物によりどの程度正に調節されるか、または負に調節されるかを判定することによって行われる。

【0089】

上で述べたように、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの活性を調節することができる因子は、様々な天然由来または合成の化合物、生体分子、タンパク質、ペプチド、オリゴペプチド、多糖類、ヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのうちのいずれであってもよい。前記試験化合物は、例えば、小分子または生物製剤であり得る。下で論じるように、試験化合物は、当該分野では周知の様々なライブラリーから得ることができる。

【0090】

本発明の試験化合物は、天然および/または合成の化合物の系統的ライブラリーをはじめとする任意の利用可能な供給源から得ることができる。生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー（ペプチドの機能性を有する分子であるが、酵素分解に対して耐性であり、しかもなお生物活性を維持している新規非ペプチド骨格を有する分子のライブラリー；例えば、Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37:2678-85参照）；空間的にアドレス可能な平行な固相または液相のライブラリー（spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries）；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「ワンビーズ、ワンコンパウンド（one-bead, one-compound）」ライブラリー法；および親和性クロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法をはじめとする、当該分野では公知のコンビナトリアルライブラリー法における非常に多数のアプローチのうちのいずれによっても、試験化合物を得ることができる。前記生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは小分子ライブラリーに適用することができる（一般的に、例えば、Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12 (3):145-67参照）。

【0091】

（炎症性腸疾患の診断、予後予測および進行のモニタリング方法）

「診断の」または「診断」は、病理学的状態の存在または不在の同定を意味する。診断方法は、被験者（ヒトまたは非ヒト哺乳動物）からの生体サンプルにおけるPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子産物（例えば、mRNA、cDNAまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む））の試験量を決定すること、およびその試験量とそのPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子産物の正常な量または範囲（すなわち、IBDに罹患していないことが判っている個体からの量または範囲）とを比較することによって、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの実質的に調節された（すなわち、異常な）発現を検出することを含む。

【0092】

1つの実施形態では、2つのサンプルにおいてPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーのレベルを比較し、そしてその試験サンプルにおける1つまたはそれ以上のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの異常発現はIBDを示す。他の実施形態では、2つ、3つ、4つまたはそれ以上のバイオマーカーの異常発現が、IBDの重症症例を示す。別の実施形態では、1つまたはそれ以上のバイオマーカーの異常発現が、IBDの可能性を示し、2つ、3つ、4つまたはそれ以上のバイオマーカーの異常発現が、IBDの可能性の増加を示す。別の態様において、本発明は、その量および活性がIBDの異

10

20

30

40

50

なる症状発現または重症度またはタイプと相関するバイオマーカーを提供する。例えば、示したように、表5におけるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの異常発現は、クローン病または潰瘍性大腸炎の診断と相関する場合がある。その後の発現レベルをその疾患の様々な段階の異なる発現プロフィールとさらに比較して、被験者がマッチしたプロフィールを有するかどうかを確認することができる。1つの特定の診断方法によってI B Dの最終的診断が得られない場合もあるが、その方法が、診断を助けるポジティブな効能を提供するならば、それで十分である。

#### 【0093】

本発明は、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの異常発現または活性レベルを検出することによるI B Dの予後予測方法も提供する。「予後（予測）の」または「予後予測」は、病理学的状態の起こりえる発現および/または重症度の予測を意味する。予後予測方法は、被験者からの生体サンプルにおける少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの遺伝子産物の試験量を決定すること、およびその試験量とそのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカー遺伝子産物についての予後予測量または範囲（すなわち、様々な重症度のI B Dを有する個体からの量または範囲）とを比較することを含む。試験サンプルにおけるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの遺伝子産物の様々な量は、I B D、クローン病および/または潰瘍性大腸炎についてのある一定の予後と一致する。特定の予後予測レベルでのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの遺伝子産物の量の検出により、被験者についての予後予測が得られる。本発明の1つの実施形態において、I B D（または特定の形態のI B D）に関連して、1つまたはそれ以上のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの実質的にアップレギュレートされた発現または活性は、一般的に、異常な増加と相関する。本発明の別の実施形態において、I B D（または特定の形態のI B D）に関連して、1つまたはそれ以上のP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの実質的にダウンレギュレートされた発現または活性は、一般的に、異常な減少と相関する。

#### 【0094】

加えて、本明細書に記載する予後予測アッセイは、異常なP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの発現または活性に関連したI B Dを処置または予防するための薬剤（例えば、作動薬、拮抗薬、ペプチド模倣体、タンパク質、ペプチド、ポリヌクレオチド、小分子または他の薬物候補）を被験者に投与することができるかどうかを判定するために用いることができる。従って、P A I - 2などの、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの正常レベル（例えば、実質的にI B Dではない組織と同様のレベルまたは実質的に同様のレベル）への調節により、I B Dを改善することができる。

#### 【0095】

胃腸病学分野に関連して、予後予測アッセイを工夫して、そのような疾患のための処置を受けている被験者が長期生存または疾患進行について見通しが不良であるかどうかを判定することができる。好ましい実施形態において、予後は、診断後直ぐに、すなわち数日以内に判定することができる。発症から急性疾患まで、I B Dまたは特定の形態のI B D（例えばクローン病もしくは潰瘍性大腸炎）の異なる段階の発現プロフィールを確立することにより、特定の発現プロフィールを予後不良の可能性の増加と相関する発現パターンが明らかになり得る。その後、その予後予測を利用して、慢性I B Dを防ぎ、長期生存および健康の可能性を向上させるようなより積極的な処置プログラムを考案することができる。

#### 【0096】

本発明の好ましい実施形態において、本開示分子および方法を生体サンプルに対して用いて、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの遺伝子において、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの異常発現を生じさせることがよく知られている1つまたはそれ以上の遺伝子改変の存在を検出する。このような検出を利用して、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節された発現または活性に起因するI B Dの重症度の判定またはI B Dの可能性の予後予測を行うことができる。さらなる特定の実施形

10

20

30

40

50

態では、1つまたはそれ以上の遺伝子改変は、IBDに対する被験者の予後予測または感受性と相関する。サンプルからのPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子における遺伝子改変は、塩基配列決定反応、電気泳動移動度アッセイおよびオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションをはじめとする（しかし、これらに限定されない）当該分野において周知の方法によって同定することができる。

【0097】

本発明は、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの発現または活性をモニターすることによる、IBD、クローン病および/または潰瘍性大腸炎の進行または経過のモニタリング方法も提供する。本モニタリング方法は、被験者から1回目および2回目に採取した生体サンプルにおけるPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子産物の試験量を決定すること、およびそれらの量を比較することを含む。1回目と2回目の間のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの量の変化は、IBDの経過の変化を示す。このようなモニタリングアッセイは、（例えば、臨床試験中の）患者における特定の治療的介入の有効性の評価、すなわち、本明細書において提供する治療薬に対応するPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節の評価にも有用である。

10

【0098】

本発明のアッセイ方法が、これらの方法の多数の用途に対して、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子産物の相対値で十分であるため、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子産物の絶対値の測定を必ずしも必要としないことは、理解されるであろう。PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子産物の量または存在度に加えて、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの遺伝子の変異もしくは異常遺伝子産物またはそれらの発現パターン（例えば、突然変異転写産物、トランケート型ポリペプチド）を正常な遺伝子産物および発現パターンとの比較により同定できることも理解されるであろう。

20

【0099】

（処置方法）

本発明は、IBD、クローン病および/または潰瘍性大腸炎のリスクを有する、それらに罹患しやすい、またはそれらを有すると診断を受けた被験者を処置するための予防的および治療的、両方の方法を提供する。異常なPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの発現または活性が原因または一因となるIBDのリスクを有する、そのようなIBDに罹患しやすい、またはそのようなIBDを有すると診断を受けた被験者は、例えば、本明細書に記載するような診断もしくは予後予測アッセイのいずれか、またはそれらの組み合わせによって、同定することができる。1つの態様において、本発明は、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の発現または活性を調節する、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーのタンパク質または薬剤を被験者に投与することによって、異常なPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの発現または活性に関連したIBDを被験者において予防するための予防的方法を提供する。予防薬の投与は、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカータンパク質の差次的な発現を特徴とする症状の発現前に、IBDが予防されるか、あるいはその進行が遅延されるように行うことができる。本発明の別の態様は、治療を目的としてPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの発現または活性のレベルを調節する治療的方法に関する。従って、1つの具体例としての実施形態において、本発明のこの調節方法は、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの発現レベルまたは1つもしくはそれ以上の活性を調節する薬剤と細胞（例えば、PBM C）を接触させることを含む。

30

40

【0100】

PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの発現または活性レベルを調節する薬剤、すなわち、少なくとも1つのPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節剤は、本明細書に記載するような薬剤、例えば、PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド（関連PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーのポリヌクレオチド（例えば、阻害性ポリヌクレオチド）を含む）、PBM CおよびIBDに

50

関連するバイオマーカーのタンパク質、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのタンパク質の天然に存在するターゲット分子（例えば、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのタンパク質基質）、抗バイオマーカー抗体、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの作動薬、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの拮抗薬、または他の小分子であり得る。適切な薬剤は、本明細書に記載するスクリーニングアッセイに基づいて決定することができる。

#### 【0101】

これらの調節法は、（例えば、その薬剤と共にP B M C を培養することにより）インビトロで行ってもよいし、あるいは（例えば、被験者にその調節剤を投与することにより）インビボで行ってもよい。1つの実施形態において、本方法は、実質的に低減されたまたは異常なP B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質の発現または活性を補正するための治療として、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーのタンパク質もしくはポリヌクレオチド分子、またはP B M C および I B D 関連作動薬を投与することを含む。P B M C および I B D に関連するバイオマーカータンパク質が実質的にダウンレギュレートされている状況、ならびに/またはP B M C および I B D に関連するバイオマーカーの活性増大が、有益な効果を有する可能性が高い状況では、P B M C および I B D に関連するバイオマーカー活性の刺激またはアップレギュレーションが望ましい。

10

#### 【0102】

別の実施形態において、本方法は、実質的に増加したまたは異常なP B M C および I B D に関連するバイオマーカーの発現または活性を補正するための治療として、阻害性ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの投与を含む。P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの発現もしくは活性が実質的にアップレギュレートされている状況、ならびに/またはP B M C および I B D に関連するバイオマーカーの活性低減が、有益な効果を有する可能性が高い状況では、P B M C および I B D に関連するバイオマーカー活性の阻害またはダウンレギュレーションが望ましい。

20

#### 【0103】

少なくとも1つのP B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節剤を投与するかどうかを判定する際に考慮すべき幾つかの薬理ゲノム学的アプローチは、当業者には周知であり、そのようなアプローチとしては、ゲノムワイド関連解析（genome-wide association）、候補遺伝子アプローチ、および遺伝子発現プロファイリングが挙げられる。本発明の医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように調合される（例えば、経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または可食性担体を含む）。投与経路の他の非限定的な例としては、非経口（例えば、静脈内、皮下、筋肉内）、経口（例えば、吸入）、直腸内、経皮（局所）、および経粘膜投与が挙げられる。意図される経路各々に適合する医薬組成物は、当該分野では周知である。

30

#### 【0104】

少なくとも1つのP B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節剤は、薬学的に許容される担体と併用すると、医薬組成物として使用することができる。このような組成物は、少なくとも1つのP B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節剤および担体に加えて、様々な希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定剤、可溶化剤、および当該分野では周知の他の材料を含有することができる。用語「薬学的に許容される」は、活性成分の生物活性の有効性に干渉しない非毒性材料を意味する。前記担体の特徴は、投与経路に依存することになる。

40

#### 【0105】

本発明の医薬組成物は、サイトカイン、リンフォカイン、または他の造血因子、例えばM - C S F、G M - C S F、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 14、I L - 15、G - C S F、幹細胞因子、およびエリスロポエチンも含有することができる。本医薬組成物は、抗サイトカイン抗体、血栓溶解因子もしくは抗血栓性因子、例えばプラスミノゲンアクチベーターおよび第V I I I 因子、ならびに/または他の抗炎症薬も

50

含むことがある。このような追加の因子および/または薬剤を本医薬組成物に含めて、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカの調節剤との相乗効果を生じさせることができ、またはその調節剤によって引き起こされる副作用を最少限にとどめることができる。加えて、本発明の組成物は、(本発明の少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカの調節剤に加えて) I B Dを処置するために使用されている公知の薬剤(例えば、スルファサラジン、5 - A S A、ステロイドなど)も含むことができる。逆に、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカに対する調節剤を、特定のサイトカイン、リンフォカイン、他の造血因子、血栓溶解因子もしくは抗血栓性因子、または抗炎症薬の調合物に含めて、そのサイトカイン、リンフォカイン、他の造血因子、血栓溶解因子もしくは抗血栓性因子、または抗炎症薬の副作用を最少限にとどめることができる。

10

**【0106】**

本発明の医薬組成物は、リポソームの形態であることができ、ここで、他の薬学的に許容される担体に加えて、水溶液中にミセル、不溶性単層、液晶またはラメラ層(lamellar layer)として凝集形態で存在する脂質などの両親媒性薬剤と、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカの調節剤とを併せる。リポソーム調合物に適する脂質としては、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが挙げられるが、これらに限定されない。このようなリポソーム調合物の調製は、当業者には周知である。

20

**【0107】**

本明細書で用いられる場合、用語「治療有効量」は、有意義な患者への利点(例えば、I B Dに関連した状態の症状の改善、そのような病態の治癒またはそのような病態の治癒の速度の増加など)を示すために十分である、本医薬組成物または方法の各活性成分の総量を意味する。単独で投与する個々の活性成分に適用される場合、この用語は、その成分のみを指す。併用物に適用される場合、この用語は、併用で、逐次的に投与するにせよ、または同時に投与するにせよ、結果として治療効果を生じさせる活性成分の合計量を指す。

**【0108】**

本発明の処置または使用の方法を実施する際、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカの調節剤の治療有効量を被験者(例えば哺乳動物(例えば、ヒト))に投与する。調節剤は、単独で、あるいは他の療法(例えばサイトカイン、リンフォカインもしくは他の造血因子、または抗炎症薬)を利用する治療との併用で、本発明の方法に従って投与することができる。1つまたはそれ以上の薬剤と共投与する場合、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカの調節剤は、他の薬剤(単数もしくは複数)と同時に投与してもよく、逐次的に投与してもよい。逐次的に投与する場合、その担当医が、例えば、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカの調節剤を、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカの他の調節剤との併用で、または他の薬剤との併用で投与する、適切な順序を決定することとなる。

30

**【0109】**

1つの実施形態では、本発明の少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカの調節剤(例えばその医薬組成物)は、併用療法で投与される。すなわち、免疫および/または炎症性の疾患などの病理学的状態または疾患の処置に有用である他の薬剤(例えば治療薬)と併用される。この文脈において、用語「併用で」は、その薬剤を、同時にまたは逐次的に、実質的に同時期に与えることを意味する。逐次的に与える場合、好ましくは、第二の化合物の投与の開始時、2つの化合物のうちの第一の化合物は、依然として有効濃度で処置部位または被験者において検出することができる。

40

**【0110】**

(併用療法)

併用療法は、例えば、少なくとも1つの追加の治療薬と、共に調合されるおよび/また

50

は共投与されるP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤を含むことができる。追加の薬剤としては、下でさらに詳細に説明するような、少なくとも1つのサイトカイン阻害剤、増殖因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症薬、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞傷害剤または細胞増殖抑制剤を挙げることができる。このような併用療法は、治療薬のより低い用量での投与を有利に利用ことができ、それ故、様々な単独療法に関連する毒性または合併症の可能性を回避することができる。さらに、本明細書に開示する治療薬は、I B D傷害経路とは異なる経路に対して作用し、従って、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの少なくとも1つの調節剤の効果を強化するならばに/または相乗作用を示すと予想される。

#### 【0111】

P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤と併用される治療薬は、炎症反応において異なる段階で干渉する薬剤であってもよい。1つの実施形態では、本明細書に記載するP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの少なくとも1つの調節剤は、少なくとも1つのサイトカインおよび/または増殖因子拮抗薬と、共に調合することもできるし、および/または共投与することもできる。前記サイトカインおよび/または増殖因子拮抗薬としては、可溶性受容体、ペプチド阻害剤、小分子、リガンド融合体、抗体(サイトカインもしくは増殖因子またはそれらの受容体または他の表面細胞分子に結合するもの)、ならびに「抗炎症性サイトカイン」およびその作動薬を挙げることができる。

#### 【0112】

本明細書に記載するP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤と併用することができる薬剤の非限定的な例としては、少なくとも1つのインターロイキン(例えば、I L - 1、I L - 2、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 12、I L - 13、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I L - 21およびI L - 22); サイトカイン(例えば、T N F、L T、E M A P - I IおよびG M - C S F); または増殖因子(例えば、F G FおよびP D G F)の拮抗薬が挙げられるが、これらに限定されない。前記薬剤としては、インターロイキン、サイトカインおよび増殖因子についての少なくとも1つの受容体の拮抗薬も挙げられるが、これらに限定されない。P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤は、細胞表面分子、例えば、C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、C D 20(例えば、C D 20阻害剤 リツキシマブ(R I T U X A N(登録商標))、C D 25、C D 28、C D 30、C D 40、C D 45、C D 69、C D 80(B 7 . 1)、C D 86(B 7 . 2)、C D 90もしくはそれらのリガンド(C D 154(g p 39もしくはC D 40L)を含む)、またはL F A - 1 / I C A M - 1およびV L A - 4 / V C A M - 1(Yusuf-Makagiansar et al. (2002) Med. Res. Rev. 22:146-67)の阻害剤(例えば抗体)と併用することもできる。本明細書に記載するP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤と併用することができる他の化合物としては、I L - 1、I L - 12、T N F、I L - 15、I L - 17、I L - 18、I L - 21およびI L - 22についての受容体の拮抗薬を挙げることができる。

#### 【0113】

P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤を用いる併用療法において有用な薬剤の例としては、I L - 12拮抗薬(例えば、I L - 12に結合する抗体(例えば、W O 00 / 56772参照)); I L - 12受容体阻害薬(例えば、I L - 12受容体に対する抗体); ならびに可溶性I L - 12受容体およびそのフラグメントが挙げられる。I L - 15拮抗薬の例としては、I L - 15またはその受容体に対する抗体、I L - 15受容体の可溶性フラグメント、およびI L - 15結合タンパク質が挙げられる。I L - 18拮抗薬の例としては、I L - 18に対する抗体、I L - 18受容体の可溶性フラグメント、およびL I - 18結合タンパク質(I L - 18 B P、Mallat et al. (2001) Cir c. Res. 89:E41-45)が挙げられる。I L - 1拮抗薬の例としては、インターロイキン - 1 - 変換酵素(I C E)阻害剤(例えば、V x 740)、I L - 1拮抗薬(例えば、I L - 1 R A(アナキンラ(K I N E R E T<sup>TM</sup>), Amgen)、s I L - 1 R I I(I m m u n e x)、および抗I L - 1受容体抗体が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0114】

TNF拮抗薬の例としては、TNF（例えば、ヒトTNF）に対する抗体、例えば、D2E7（ヒト抗TNF抗体、米国特許第6,258,562号、HUMIRA™, Abbott Labs）；CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356（ヒト化抗TNF抗体、Celltech/Pharmacia）；cA2（キメラ抗TNF抗体、REMICADE™, Centocor）；および抗TNF抗体フラグメント（例えば、CPD870）が挙げられる。他の例としては、可溶性TNF受容体（例えば、ヒトp55またはp75）フラグメントおよび誘導体、例えばp55kD TNFR-IgG（55kD TNF受容体-IgG融合タンパク質、LENERCEPT™）および75kD TNFR-IgG（75kD TNF受容体-IgG融合タンパク質、ENBRELT™（エタネルセプト - Immunex））が挙げられる。例えば、van der Poll et al. (1997) Blood. 89:3727-34；Mori et al. (1996) J. Immunol. 157:3178-82参照。さらなる例としては、酵素拮抗薬（例えば、TNF変換酵素阻害剤（TACE）、例えば -スルホニルヒドロキサム酸誘導体（WO 01/55112）またはN-ヒドロキシホルムアミド阻害剤（GW 3333、-005または-022, GlaxoSmithKline）およびTNF-bp/s-TNFR（可溶性TNF結合タンパク質、例えば、Lantz et al. (1991) J. Clin. Invest. 88:2026-31；Kapadia et al. (1995) Amer. J. Physiol. Heart Circ. Phys. 268:H517-25参照）が挙げられる。TNF拮抗薬は、可溶性TNF受容体（例えば、ヒトp55またはp75）フラグメントおよび誘導体、例えば75kD TNFR-IgG；ならびにTNF変換酵素（TACE）阻害剤である場合もある。

10

20

## 【0115】

他の実施形態において、本明細書に記載するPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節剤は、次のものうちの少なくとも1つとの併用で投与することができる：IL-13拮抗薬、例えば可溶性IL-13受容体および/または抗IL-13抗体；ならびにIL-2拮抗薬、例えばIL-2融合タンパク質（例えば、Seragenによって製造されているDAB 486-IL2および/またはDAB389-IL-2、例えば、Sewell et al. (1993) Arthritis Rheum. 36:1223-33参照）および抗IL-2R抗体（例えば、抗Tac-Hヒト化抗体、Protein Design Labs、Junghans et al. (1990) Cancer Res. 50:1495-502参照）。別の併用としては、非枯渇性（nondepleting）抗CD4阻害剤、例えばIDEC-CE9.1/SB 210396（抗CD4抗体、GraxoSmithKline）との併用でのPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節剤が挙げられる。さらに他の併用としては、PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節剤とCD80（B7.1）およびCD86（B7.2）の共刺激性経路拮抗薬（例えば、抗体、可溶性受容体または拮抗性リガンド）；P-セレクチン糖タンパクリガンド（PSGL）およびPSGL-1阻害剤（例えば、PSGLおよび/またはPSGL-1に対する抗体ならびに小分子阻害剤）；T細胞およびB細胞の枯渇物質（例えば、抗CD4抗体または抗CD22抗体）、ならびに抗炎症性サイトカインおよびそれらの作動薬（例えば、抗体）が挙げられる。抗炎症性サイトカインとしては、IL-4（例えば、Schering-Plough Biopharma）；IL-10（例えば、SCH52000、組換えIL-10、Schering-Plough Biopharma）；IL-11；IL-13；およびTGF またはその拮抗薬（例えば、作動薬抗体）を挙げることができる。

30

40

## 【0116】

他の実施形態において、PBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの少なくとも1つの調節剤は、少なくとも1つの抗炎症薬、免疫抑制剤、代謝阻害剤および酵素阻害剤と共に調合する、および/またはそれらと共投与することができる。本明細書に記載するPBMCおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節剤と併用することができる薬物または阻害剤の非限定的な例としては、以下のものの少なくとも1つが挙げられるが、これらに限定されない：非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）（アスピリン、サルサレート

50

、ジフルニサル、イブプロフェン、ケトプロフェン、ナブメトン、ピロキシカム、ナプロキセン、ジクロフェナク、インドメタシン、スリンダク、トルメチン、エトドラク、ケトロラク、オキサプロジン、テニダブ (tenidap)、メロキシカム、ピロキシカム、アセクロフェナク (aceclofenac)、トルメチン、チアプロフェン酸、ニメスリドなどを含むが、これらに限定されない)；スルファサラジン；コルチコステロイド (例えば、プレドニゾロン)；サイトカイン抑制性抗炎症薬 (CSAID)；ヌクレオチド生合成の阻害剤 (例えば、プリン生合成の阻害剤 (例えば、メトトレキセートなどの葉酸拮抗薬))；およびピリミジン生合成の阻害剤、例えば、ジヒドロオロテートデヒドロゲナーゼ (DHODH) 阻害剤、例えばレフルノミド (例えば、Kraan et al. (2004) Ann. Rheum. Dis. 63: 1056-61参照)。少なくとも1つのPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節剤と併用するための治療薬としては、1つまたはそれ以上のNSAID、CSAID、DHODH阻害剤 (例えば、レフルノミド)、および葉酸拮抗薬 (例えば、メトトレキセート)を挙げることができる。

10

## 【0117】

PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節剤と併用することができる追加の薬剤の例としては、以下のものの少なくとも1つが挙げられる：コルチコステロイド (経口用、吸入用および局所注射)；免疫抑制剤 (例えば、シクロスポリンおよびタクロリムス (FK-506))；mTOR阻害剤 (例えば、シロリムス (ラパマイシン) またはラパマイシンの類似体および/または誘導体、例えばエステルラパマイシン誘導体、例えばCCI-779 (例えば、Elit (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1249-53；Hu  
ang et al. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:295-304参照))；前炎症性サイト  
カイン、例えばTNF およびIL-1のシグナリングに干渉する薬剤 (例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤)；TPL-2、Mk-2およびNF  
b阻害剤；COX-2阻害剤 (例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブなど、およびそれらの変異体)；ホスホジエステラーゼ阻害剤 (例えば、Rolipram)；ホ  
スホリパーゼ阻害剤 (例えば、細胞質ゾルホスホリパーゼ2 (cPLA2)の阻害剤、例  
えばトリフルオロメチルケトン類似体 (米国特許第6,350,892号))；血管内皮  
細胞増殖因子 (VEGF)の阻害剤；VEGF受容体の阻害剤；血管形成の阻害剤；RA  
GEおよび可溶性RAGE；エストロゲン受容体 (ERB) 作動薬、ERB-NF b  
拮抗薬；インターフェロン- (例えば、IFN-1 およびIFN-1b)；コパ  
キソン (copaxone)；およびコルチコステロイド。

20

30

## 【0118】

PBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの1つまたはそれ以上の調節剤と併用することができる他の有用な治療薬としては、以下が挙げられる：ブデノシド (budesonide)；上皮増殖因子；アミノサリチル酸塩；6-メルカプトプリン；アザチオプリン；メ  
トロニダゾール；リポキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン (olsalazine)；  
バルサラジド (balsalazide)；抗酸化物質；トロンボキサン阻害剤；増殖因子；エラス  
ターゼ阻害剤；ピリジニル-イミダゾール化合物；プレドニゾロンのグルクロニド-複合  
プロドラッグまたはデキストラン-複合プロドラッグ；デキサメタゾンまたはブデソニド  
；ICAM-1アンチセンスホスホリチオエートオリゴデオキシヌクレオチド (ISIS  
2302；ISIS Pharmaceuticals, Inc.)；可溶性補体受容  
体1 (TP10；T Cell Sciences, Inc.)；徐放性メサラジン；血  
小板活性化因子 (PAF)の拮抗薬；シプロフロキサシン；リグノカイン (lignocaine)  
；シクロスポリンA；ヒドロキシクロロキン (PLAQUENIL™)；ミノサイクリン  
(MINOCIN™)；およびアナキンラ (KINERET™)。

40

## 【0119】

本発明のPBM CおよびIBDに関連するバイオマーカーの調節剤との併用で投与するための特定の治療薬の選択は、主として、その特定の被験者、所望のターゲットおよび選択される治療期間などの因子に依存することになる。このような決定は、十分に当業者の技術および知識の範囲内である。

50

## 【0120】

P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節剤と併用することができる治療薬の追加の例としては、以下のものの1つ以上が挙げられる：6 -メルカプトプリン（6 - M P ）；アザチオプリン；スルファサラジン；メサラジン；オルサラジン（olsalazine）；クロロキン、ヒドロキシクロロキン（P L A Q U E N I L（登録商標））；ペニシラミン；アウロチオマレート（aurothiornalate）（筋肉内用および経口用）；アザチオプリン；コルヒチン； - 2 - アドレノレセプター作動薬（サルブタモール、テルブタリン、サルメテロール）；キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）；クロモグリケート（cromoglycate）；ネドクロミル；ケトチフェン；イプラトロピウムおよびオキシトロピウム；ミクロフェノーレートモフェチル（mycophenolate mofetil）；アデノシン作動薬；抗血栓症薬；補体阻害剤；ならびにアドレナリン作動薬。

10

## 【0121】

1つの実施形態において、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節剤は、免疫応答の調節に關与する他のターゲットに対する1つまたはそれ以上の抗体と併用することができる。本発明のP B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節剤と併用することができる、免疫応答を処置または予防するための薬剤の非限定的な例としては、次のものが挙げられる：C D 2 5（インターロイキン - 2 受容体 - a）、C D 1 1 a（L F A - 1）、C D 5 4（I C A M - 1）、C D 4、C D 4 5、C D 2 8、C T L A 4、I C O S L、I C O S、C D 8 0（B 7 . 1）および/またはC D 8 6（B 7 . 2）をはじめとする（しかし、これらに限定されない）他の細胞表面分子に対する抗体。さらに別の実施形態において、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節剤は、1つまたはそれ以上の一般的な免疫抑制剤（例えばシクロスポリンAまたはF K 5 0 6）と併用される。別の実施形態において、P B M C および I B D に関連するバイオマーカーの調節剤は、C T L A 4 作動薬（例えば、C T L A 4 I g - アバタセプト（O R E N C I A（登録商標）））と併用される。

20

## 【0122】

本発明の医薬組成物は、その意図された投与経路に適合するように調合される。投与を遂行するための方法は、当業者には公知である。局所投与もしくは経口投与することができるまたは粘膜を越えて透過することができる組成物も得ることができる。本発明の方法を実施するために本医薬組成物において使用される本発明のモジュレーターの投与は、従来の様々な経路（例えば、経口摂取、吸入、皮膚、皮下、静脈内注射、直腸内浣腸、坐剤の挿入など）で行うことができる。

30

## 【0123】

皮内または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、一般的に、次の成分のうちの1つまたはそれ以上を含む：滅菌希釈液、例えば、注射用蒸留水、食塩溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化物質、例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、例えば、アセテート、シトレートまたはホスフェート；および張度を調整するための薬剤、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロース。p Hは、酸または塩基（例えば塩酸または水酸化ナトリウム）で調整することができる。このような調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラスもしくはプラスチック製の複数回分用バイアルに封入することができる。

40

## 【0124】

注射に適する医薬組成物としては、滅菌性の水溶液または分散液、および滅菌注射用の溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与に適する担体としては、生理食塩水、静菌水、C R E M A P H O R E <sup>TM</sup> E L（ニュージャージー州、ピスカタウェイのB A S F）またはリン酸緩衝食塩液（P B S）が挙げられる。すべての場合において、その組成物は、滅菌性でなければならず、且つ、容易に注射できる程度に流動性でなければならない。上記組成物は、製造および保管条件下で安定でなければならず、且つ

50

、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。この担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）および適するこれらの混合物を含有する、溶媒または分散媒体であり得る。その適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散液の場合には必要な粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤（例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸およびチメロサルなど）によって達成することができる。多くの場合、等張剤、例えば、糖、ポリアルコール（例えばマンニトール、ソルビトール）および塩化ナトリウムを組成物に含めると好適なものとなるであろう。注射用組成物の持続吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることによって、もたらすことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0125】

少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤の治療有効量を経口投与するとき、その結合剤は、錠剤、カプセル、粉末、溶液またはエリキシルの形態であろう。錠剤の形態で投与するとき、本発明の医薬組成物は、固体担体、例えばゼラチンまたはアジュバントを追加として含有することがある。錠剤、カプセルおよび粉末は、約5～95%の結合剤、好ましくは約25～90%の結合剤を含有する。液体形態で投与するときには、液体担体、例えば、水、石油、動物起源または植物起源の油、例えば（その集団における落花生アレルギーの頻度を念頭においてだが）落花生油、鉱物油、大豆油もしくはゴマ油、または合成油が、添加されることがある。液体形態の本医薬組成物は、生理食塩溶液、デキストロースもしくは他の糖類溶液、またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールをさらに含有することができる。液体形態で投与するとき、本医薬組成物は、約0.5～90重量%の結合剤、好ましくは約1～50重量%の結合剤を含有する。

#### 【0126】

少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤の治療有効量が、静脈内、皮膚または皮下注射により投与されるとき、その調節剤は、発熱物質を含まない非経口での許容される水溶液の形態であろう。pH、等張性、安定性などを顧慮する、このような非経口的に許容されるタンパク質溶液の調製は、当業者の技術の範囲内である。静脈内、皮膚または皮下注射のために好ましい医薬組成物は、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤に加えて、等張性ビヒクル、例えば塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、デキストロース注射液、デキストロース-塩化ナトリウム注射液、乳酸化リンガー注射液、または当該分野において公知であるような他のビヒクルを含有していなければならない。本発明の医薬組成物は、安定剤、保存薬、緩衝剤、抗酸化物質、または当業者には公知の他の添加剤も含有することがある。

#### 【0127】

本発明の医薬組成物中の少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤の量は、処置される状態の性質および重症度、ならびにその患者が受けた以前の処置の性質に依存することになる。最終的には、担当医が、各々の個々の患者を処置する、少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤の量を、決定することとなる。最初、担当医は、低い用量の少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤を投与し、患者の反応を観察することとなる。その患者について最適な治療効果が得られるまで、それより多い用量のその少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤を投与することができ、そして一般的にはそれが得られた時点で投薬量をさらに増加させない。本発明の方法を実施するために使用される様々な医薬組成物は、体重1kg当たり約0.1μgから約100mgを含有すべきであると考えられる。

#### 【0128】

本発明の医薬組成物を使用する静脈内(i.v.)療法の継続期間は、処置される疾患

の重症度、ならびに各々の個々の患者の状態および可能性のある特異体質性応答に依存して変わることになる。この少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤の各適用継続期間は、12～24時間の範囲内の継続的i . v .投与、または何らかの他の適切な期間であり得ると考えられる。本発明の医薬組成物を使用する皮下的(s . c .)、坐剤などの治療法も考えられる。これらの治療薬は、1日1回、週1回、またはより好ましくは2週間に1回(biweekly)、または月1回投与することができる。この少なくとも1つのP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの調節剤が、小分子である場合、それらの治療薬は、1日1回、1日2回、1日3回などで投与することができる。最終的には、担当医が、本発明の医薬組成物を使用する治療、または小分子での治療の適切な継続期間およびその治療薬投与のタイミングを決めることとなる。

10

**【0129】**

(キット)

本発明は、炎症性腸疾患を有する被験者における長期生存または快適な生活についての予後を判定するためのキットも提供し、このキットは、本発明のバイオマーカーの発現を評価するための試薬を含む。診断およびモニタリング用のキットも考えられる。好ましくは、前記試薬は、1つまたはそれ以上の抗バイオマーカー抗体またはそのフラグメントを含むことができ、この抗体またはそのフラグメントは、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーに対応するタンパク質と特異的に結合する。場合により、このキットは、ポリヌクレオチドプローブを含むことができ、このプローブは、表1～5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーに対応する転写ポリヌクレオチドと特異的に結合する。このキットは、例えばG E N E C H I P (登録商標)などのバイオチップ上にアレイとして配列することができる、P B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーのパネルを含むこともできる。

20

**【0130】**

本発明は、被験者における炎症性腸疾患の阻害についての複数の化合物各々の適性を評価するためのキットをさらに提供する。このようなキットは、検査すべき多数の化合物、および表1～5に列挙したP B M CおよびI B Dに関連するバイオマーカーの発現を評価するための試薬(すなわち、対応するタンパク質に特異的な抗体、または対応するポリヌクレオチドに特異的なプローブもしくはプライマー)を含む。

30

**【0131】**

標準的な技法による、本発明の上で説明した組成物および方法に対する修飾は、当業者には容易に理解されるであろう。それらは、本発明に包含されるものとする。

**【0132】**

後続の実施例により本発明をさらに説明するが、これらの実施例は、限定的なものと解釈されるべきではない。本出願全体を通して、引用されているすべての参考文献、特許および特許出願の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

**【0133】**

(実施例)

後続の実施例は、本発明の理解を促すために記載するものであり、如何なる点においても本発明の範囲を限定することは意図されておらず、本発明の範囲に対する限定と解釈されるべきではない。本実施例は、健常なボランティアおよび炎症性腸疾患に罹患している患者からの末梢血単核細胞の単離などの従来の方法についての詳細な説明は含まない。そのような方法は、当業者には周知である。

40

**【実施例1】****【0134】**

材料および方法

実施例1.1:患者情報および臨床評価

薬理ゲノム学的分析用の血液サンプルは、北米および欧州の治療実施医療機関(clinical site)において、合計42例の明らかに健常な人、59例のC D患者および26例のU C患者から採取した。各治療実施医療機関の施設内審査委員会(Institutional Review

50

Board) または倫理委員会 (Ethics Committee) がこの試験を承認し、各患者からインフォームドコンセントを得る前には如何なる処置も行わなかった。

【0135】

本試験における個々の人口統計学的特徴の比較を表7に提示する。

【表7】

表7: 正常な無病の人(C)およびクローン病(CD)または潰瘍性大腸炎(UC)の形態のIBDを有する被験者についての人口統計学的特徴

タイプ	CD	UC	C	C v IBD p値	CD v UC p値
サンプル数	59	26	42		
年齢(平均)	41.3	46.7	44.1	0.96 <sup>1</sup>	0.055 <sup>1</sup>
性別	男性21例 女性38例	男性8例 女性18例	男性24例 女性18例	0.014 <sup>2</sup>	0.66 <sup>2</sup>
人種	白人51例 黒人7例 ヒスパニック1例	白人22例 黒人3例 ヒスパニック1例	白人40例 アジア人1例 インディアン1例	0.09 <sup>3</sup>	0.82 <sup>3</sup>

10

1: 両側 t 検定と ANOVA 誤差推定に基づく t 統計量とを用いて計算した p 値。

20

2: 群間の男性の女性に対する度数を比較する、尤度比カイ二乗検定を用いて計算した p 値。

3: 群間の白人の非白人に対する度数を比較する、尤度比カイ二乗検定を用いて計算した p 値。

【0136】

健常被験者 (男性 24 例、女性 18 例) は、主として白人であり、年齢は 25 ~ 60 歳の範囲内であった。CD 患者 (男性 21 例、女性 38 例) は、主として白人であり、年齢は 20 ~ 65 歳の範囲内であり、220 から 400 の間の範囲内のクローン病活性指数スコア (CDAI) を有し、ならびに 25 の腹部疼痛評点および / または 25 の下痢評点を有した。少なくとも 6 ヶ月間の CD の診断を放射線試験、内視鏡検査と組織検査、または外科的病態によって確認した。クローン病の診断を有する患者は、その診断が生検により確認された場合、組み入れた。UC 患者 (男性 8 例、女性 18 例) は、主として白人であり、年齢は 25 ~ 73 歳の範囲内であり、軽度から中等度 (1 または 2 のスコア) の範囲内の Physicians' Global Assessment of Mayo Ulcerative Colitis Scoring System (MUCSS) からのスコアを有した。標準的な臨床基準に加えて、内視鏡検査と生検により左側 UC の診断を得た。

30

【0137】

女性の男性に対する比率は、健常集団と IBD 集団の間に有意な差があったが、2つの IBD 集団の間での差はなかった。健常集団と IBD 集団の間にも、2つの IBD 集団の間にも、人種 (白人 対 非白人) および年齢の有意な差は無かった (すべて、 $p < 0.05$  レベル)。2つの IBD 集団の間での関連薬物の使用量の調査は、5 - ASA もあまり頻繁に使用されない他のいずれの薬も、この試験における比較を混乱させる関連薬物 (concomitant medication) とは報告されないことを示した。

40

【0138】

実施例 1. 2: 血液サンプリングおよび処理

上記治験実施医療機関において各人から血液 (8 mL) が Vacutainer cell preparation tube (CPT; ニュージャージー州、フランクリンレイクス of Becton Dickinson) に採取され、製造業者の推奨に従って PBM C 単離のために中央処理研究所 (central processing lab) に一晩かけて輸送された。本試験において分析したすべての PBM C は、採血後 24 時間以内に処理された。RNA 精製に先立ち、ABX Pent

50

ra 60 C+ Hematology Analyzer (カリフォルニア州、アーバイン)を使用して精製P BMCに関する完全細胞数のカウントを行って、好中球、リンパ球、単球、好酸球および好塩基球の絶対数ならびに割合を記録した。UC患者からの1つのP BMCのサンプルについては細胞数のカウントは行わず、従って、このプロフィールは、下で説明するANCOVA分析から除外した。この患者からの発現データは、予測モデルを開発および検査する際に組み入れた。RNeasy mini column protocol (カリフォルニア州、ヴァレンシアのQiagen)を用いて、全RNAをP BMCから精製した。

【0139】

実施例1.3:オリゴヌクレオチドアレイハイブリダイゼーションおよびデータ整理

Affymetrix protocol (カリフォルニア種、サンタクララのAffymetrix)に従って、全RNA (2 μg)をビオチン化cRNAに変換した。標識cRNA (10 μg)をフラグメント化し、以前に説明された (Twine et al., 上記)と  
10  
おりハイブリダイゼーションの準備をした。Affymetrix Technical Manualに記載されているとおりビオチン化cRNAをAffymetrix HG-U133A human GENECHIP (登録商標) arrayにハイブリダイズした。標準曲線として機能するように、ハイブリダイゼーション前に1:300,000 (3 ppm)から1:1000 (1000 ppm)の範囲内の11のビオチン化対照転写産物を各サンプルにスパイクした (Hill et al. (2001) Genome Biol. 2(12):research 0055.1-0055.13)。GENECHIP (登録商標) MAS 5.0ソフトウェアを用いて、  
20  
特異的ハイブリダイゼーション強度を評価し、各プローブセットについてのシグナル値をコンピューター計算し、不在/存在コールを作製した。その後、標準曲線を参照することにより、各プローブセットについてのシグナル値を、 $10^6$ 個の転写産物中に存在する転写産物の数を表す度数値に変換した (Hill et al., 上記)。各転写産物を評価し、それが次の2つの厳しくない基準を満たす場合、本試験に組み入れた:「存在」とコールされること、およびサンプル (健常、UCまたはCD)のうちの少なくとも1つにおける10 (10 ppm)またはそれ以上の度数値。7,908の配列が、これらのフィルタリング基準を満たし、それらを分析に使用した。

【0140】

実施例1.4:分散分析 (ANOVA) および共分散分析 (ANCOVA)

これらの疾患群間の平均発現の差について検査する際、P BMC細胞タイプ組成の差を  
30  
補正するために、共分散分析 (ANCOVA)法を用いた。応答測度として対数変換度数を用いて、各転写産物について独立したANCOVAを実行した。このANCOVAモデルは、疾患群、性別、好中球パーセント、単球パーセントおよび好酸球パーセントについての項を含んでいた。このANCOVAにおいて、各細胞タイプについて、その細胞タイプのパーセントと特定の遺伝子についての発現レベルの間に線形関係を描く傾きを予測し、t検定を行って、その傾きが0とは有意に異なるかどうかを判定した (ここで、0の傾きは、細胞タイプパーセントと発現レベルの間に線形関係が無いことを示す)。

【0141】

上記ANCOVAモデルに組み入れる細胞タイプの選択は、1)細胞タイプ間の相関度、2)各細胞タイプの分布に関する疾患タイプ間の相違度、および3)各細胞タイプにつ  
40  
いてのパーセントの大きさの考慮によって行った。ANCOVAにおける共変量は、互いに高度に相関してはならない。リンパ球のパーセントは、単球のパーセントおよび好中球のパーセントと強く逆相関しており、そのためこのANCOVAに組み入れなかった。

【0142】

治療群差および細胞タイプ回帰効果についての総合検査に加えて、細胞タイプパーセントの差を補正した疾患群平均の対比較を、両側t検定を用い、ANCOVA誤差項から導出されるt統計量を分母として行った。最後に、女性および男性の相対的分布にも疾患群間で有意な差があったため、性別をこのANCOVAに組み入れた。

【0143】

10

20

30

40

50

実行した多数の統計的検定を説明するために、上に記載した分析によって生じた生 p 値の補正は行わなかった。 = 0 . 0 0 0 1 の保存的有意性レベルと組み合わせた倍率変更フィルター ( 1 . 5 倍 ) を用いて、誤ったポジティブ判定の発生を減少させた。

#### 【 0 1 4 4 】

実施例 1 . 5 : マイクロアレイ発現データを用いる遺伝子の選択および監視によるクラス予測

先に説明されており ( Golub et al. (1999) Science 286:531-37 )、HYPERLINK "<http://www.broad.mit.edu/cancer/software/software.html>より入手できる Gene Cluster version 2 . 0 を使用して、遺伝子選択および監視によるクラス予測を行った。これらの分析では、ストリンジェントなデータ整理フィルター ( クローン病または UC のサンプルにおける少なくとも 5 0 % の存在コール、および 1 0 ppm より大きい度数を有するクローン病または UC のサンプルの少なくとも 5 0 % ) に合う 4 2 2 8 の転写産物のみを使用した。各群内のサンプルを、プロフィールのトレーニングセット ( 7 5 % ) または試験セット ( 2 5 % ) から成るデータセット ( データセット MB ) におけるメンバーシップに、無作為に選択した。遺伝子選択は、サンプルのトレーニングセットを使用して行い、そのトレーニングセットにおけるクラス割付けの最高総合精度を示した最も少ない遺伝子を有する分類子を、1 個抜き ( leave-one-out ) および 4 分割交差検定によって同定した。その後、その予測分類モデルを試験セットにおけるサンプルに関して評価し、その試験セットにおけるサンプルについてのクラス割付けの総合精度が報告された。

10

20

#### 【 0 1 4 5 】

遺伝子選択のために、トレーニングセットと試験セットの両方におけるすべての発現データを分析前に対数変換した。トレーニングデータセットにおいて、そのクラス推定量の中央値を用いた S 2 N 類似度尺度 ( similarity metric ) での ( 各クラスにおける特徴数が等しい ) 両側アプローチを用いて、漸増特徴 ( 転写産物データ ) 数を有するモデルを作った。CD 患者および UC 患者からの P B M C プロフィールをバイナリアプローチを用いて比較した。2 つの工程で 2 個と 2 0 0 個の間の遺伝子を有する予測遺伝子分類子を 1 個抜きおよび 4 分割交差検定によって評価して、最も正確なクラス割付けを生じさせる最小予測モデルを同定した。クラスのメンバーシップの予測は、重み付き多数決法 ( weighted voting ) アルゴリズムを用いて行った。

30

#### 【 0 1 4 6 】

実施例 1 . 6 : Ingenuity Pathway Analysis

Ingenuity Pathway Analysis ( IPA ) ツール ( カリフォルニア州、マウンテンビューの Ingenuity ) を用いて、ANCOVA 分析から得られた I B D 関連遺伝子、CD 特異的遺伝子および UC 特異的遺伝子に注釈をつけた。カノニカル経路および機能カテゴリーに関する注釈は、Gene - By - Gene View から、および / または Search IPKB ( Ingenuity Pathways Knowledge Base ) 特性を用いて、これらの遺伝子リストを検索した。

40

#### 【 0 1 4 7 】

実施例 1 . 7 : マイクロアレイの結果の定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 ( Q - PCR ) 確認

クローン病 ( CD ) を有する 5 9 例の患者および潰瘍性大腸炎 ( UC ) を有する 2 6 例の患者からの末梢血単核細胞 ( P B M C ) の RNA サンプルが入っている 2 つの 9 6 ウエルプレートで Q - PCR によって分析した。合計 4 5 ng の各 P B M C RNA サンプルを、サンプルの最初の順序を保つような方法で 9 6 ウエルプレートに移した。CD を有する 2 例の患者および UC を有する 1 例の患者からの P B M C RNA サンプルは、十分な RNA を含有していなかった。後に、これらの患者からのサンプルは、Q - PCR 分析から除外した。High Capacity cDNA Archive kit ( カリフォルニア州、サンディエゴの Applied Biosystems ) を使用して、各 RNA サンプルを 1 0 0 μ L の反応

50

溶液中で逆転写した。その反応溶液を25℃で10分間、その後、37℃で2時間インキュベートし、増幅まで-80℃で保管した。12の遺伝子分類子における遺伝子のGENBANKアクセッション番号(すなわち、上記表5において見出すことができるUniGene ID番号)に対応する、あらかじめ設計された遺伝子特異的TAQMAN(登録商標)プローブおよびプライマーセット(TAQMAN(登録商標)遺伝子発現アッセイ、Applied Biosystems)を使用して、分類バイオマーカーの相対的発現レベルを増幅し、その発現レベルを定量した。各RNAサンプルについて、4つのハウスキーパー遺伝子:(1) 2-ミクログロブリン(2M)、(2) -アクチン、(3) 18SリボソームRNA(18S)、および(4)グリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)も増幅し、定量した。目的の各転写産物について使用したTAQMAN(登録商標)プローブおよびプライマーのApplied Biosystems(ABI)IDを表8に示す。

【表8-1】

ABI ID	遺伝子名	記号	Unigene ID
Hs99999901_s1	18S rRNA	18S	
Hs00194353_m1	リポカリン2(癌遺伝子24p3)	LCN2	Hs.204238
Hs00271778_m1	mutL 相同体 3 (E. coli)	MLH3	Hs.279843
Hs00190538_m1	血清欠乏性応答(ホスファチジルセリン結合タンパク質)	SDPR	Hs.26530
Hs00269023_s1	ヒストン 2, H2be	HIST2H2BE	Hs.2178
Hs00740275_s1	ヒストン 1, H3h	HIST1H3H	Hs.70937

【表8-2】

ABI ID	遺伝子名	記号	Unigene ID
Hs00171085_m1	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド5	CXCL5	Hs.89714
Hs00173978_m1	インテグリン、β3(血小板糖タンパク質IIIa、抗原CD61)	ITGB3	Hs.87149
Hs00415042_m1	免疫グロブリンκ 定常領域	IGKC	Hs.406565
Hs00174778_m1	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体タイプ、C会合タンパク質	PTPRCAP	Hs.155979
Hs00157878_m1	グランザイムK(セリンプロテアーゼ、グランザイム3;トリプターゼII)	GZMK	Hs.3066
Hs00187842_m1	β-2-ミクログロブリン	B2M	
Hs99999903_m1	アクチン, β	ACTB	
Hs99999905_m1	グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	GAPDH	
Hs00413854_g1	免疫グロブリン重鎖定常領域γ1(G1mマーカー)	IGHG1	
Hs00203983_m1	ミトコンドリアのリボソームタンパク質	MRPS28	

【0148】

ABI 7900HT配列検出システム(カリフォルニア州、サンフランシスコのApplied Biosystems)を使用して、96ウェル fast block 光反応プレートにおいて25μLの反応量(1X TAQMAN(登録商標)Fast Universal Master Mix、1X TAQMAN(登録商標)遺伝子発現ア

ッセイ、および 2.25 ng の cDNA を含む) で、目的の各転写産物についての定量リアルタイム PCR を行った。DEPC 水のみを負の対照サンプル(テンプレート対照なし; NTC) およびヒトロイコパック(leukopack) RNA の正の対照サンプルを、各 96 ウエルプレートに、各遺伝子特異的 T A Q M A N (登録商標)プローブおよびプライマーセットのために含めた。Default ABI 7900HT fast block サイクル条件は、次の通りであった: 95 で 20 秒間、40 サイクルの 95 で 1 秒間、そして 60 で 20 秒間。このようにしてアッセイした分類バイオマーカ-を表 9 に列挙する。

【表 9 - 1】

IgHgl	免疫グロブリン重鎖定常領域 $\gamma 1$ (IgH $\gamma 3$ も)
IgKc	免疫グロブリン $\kappa$ 定常領域
28S	ヒト28SリボソームRNA5'領域
PTP, C-assoc	タンパク質チロシンホスファターゼ、受容体タイプ、C会合タンパク質

10

【表 9 - 2】

グランザイムK	グランザイムK(セリンプロテアーゼ、グランザイム3;トリプターゼII)
mutL 相同体 3	mutL 相同体 3 (E. coli)
リポカリン-2	リポカリン2(癌遺伝子24p3)
CXCL5	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド5
血清dep応答	血清欠乏性応答(ホスファチジルセリン結合タンパク質)
ヒストン3K	H3ヒストンファミリー、メンバーK
インテグリン $\beta - 3$	インテグリン、 $\beta 3$ (血小板糖タンパク質IIIa、抗原CD61)
ヒストン2BQ	H2Bヒストンファミリー、メンバーQ

20

30

## 【0149】

合格基準は、(1)目的の各プライマー対について、NTCサンプルにおいて増幅が検出できないこと、および(2)目的の各プライマー対について、ロイコパックRNA陽性の対照サンプルにおいて遺伝子特異的な増幅が検出できることであった。各増幅反応についてのサイクル閾値(Ct)を各分類バイオマーカ-および4つの各ハウスキーピング遺伝子について記録した。正規化するために、各PBMCSAMPLEにおけるターゲット遺伝子および4つの各ハウスキーピング遺伝子についてのサイクル閾値間の差(Ct)を計算し、適切な場合には、UCとCDの間の発現に関する平均変動倍率(average fold change)を次の式に従って計算した: 平均差倍率(average fold difference) =  $2^{(Ct_{UC} - Ct_{CD})}$  または  $2^{(Ct_{CD} - Ct_{UC})}$ 。

40

## 【0150】

実施例 1.8: Q-PCR発現値を用いる監視によるクラス予測

判別分析のパラメトリック(線形)、非パラメトリック  $k = 3$  最近接、および非パラメトリック  $k = 10$  最近接クラス割付け法を、(上の実施例 1.7において説明した)Q-PCRから得られるような4つのハウスキーピング遺伝子の各々で正規化された分類バイオマーカ-発現レベル(すなわち、サイクル閾値)のトレーニングセットおよび試験サブ

50

セットに各々分割される3つのデータセット(データセットMB(上の実施例1.5で説明したもの)と、トレーニングセットおよび試験サブセットへの同データの2つの択一的無作為割付け(データセット1およびデータセット2))の各々に適用した。3つすべてのデータセットにおいて、クローン病(CD)を有する57例の患者および潰瘍性大腸炎(UC)を有する25例の患者からのPBMCからのRNA発現レベルを分析した(43のCDサンプルに加えて19のUCサンプルをトレーニングに使用し、14のCDサンプルに加えて6のUCサンプルを試験に用いた)。同様に、 $p = 0.05$ または $p = 0.15$ に設定した有意性レベルでの完全モデル、逆方向、順方向および段階的ロジスティック解析法を、ハウスキーピング遺伝子18Sで正規化した分類バイオマーカー発現レベルの3つのデータセットに対して実行した。SAS(登録商標)8.2(ノースカロライナ州、ケアリー)およびSPOTEFIRE(登録商標)DECISIONSITE(商標)8.0(マサチューセッツ州、サマヴィル)ソフトウェアを用いて、この分類のトレーニングセットおよび試験セットの精度、感度、特異性、陽性適中率(PPV)および陰性適中率(NPV)を計算し、比較した。最後に、ハウスキーピング遺伝子18Sのサイクル閾値によって正規化した12の分類バイオマーカーについてのCtの線形判別分析を用いて作製した分類子の精度を、トレーニングセットおよび試験サブセット(トレーニングサブセットについては43のCDサンプルに加えて19のUCサンプル、および試験サブセットについては14のCDサンプルに加えて6のUCサンプルを各々含有)に無作為に割付けた12のデータセットについて同じCtロジスティック解析を用いて作製した分類子の精度と比較した。

10

20

## 【実施例2】

## 【0151】

実施例2.1: 健常な被験者、クローン病患者および潰瘍性大腸炎患者からの精製PBMCサンプルの細胞組成

この試験の発現プロファイリング部分の前に、3つすべての群(健常な被験者、CDを有する患者およびUCを有する患者)において、被験者からの精製PBMCペレットの細胞組成を測定し、その後、RNAを単離した。表10は、それらのPBMCサンプルにおける好塩基球、好酸球、リンパ球、単球および好酸球の割合を示すものである。

## 【表10】

表10: クローン病(CD)または潰瘍性大腸炎(UC)の形態のIBDを有する患者および正常な無病の個体(C)から採取したサンプル数、ならびにサンプル中の細胞タイプの平均パーセント(%)

30

タイプ	CD	UC	C	C vs. IBD p値 <sup>1</sup>	CD vs. UC p値 <sup>1</sup>
サンプル数	59	25	42		
好塩基球%	0.33	0.30	1.05	0.012	0.93
好酸球%	1.10	0.91	0.37	0.0003	0.37
リンパ球%	52.20	59.58	78.90	<0.0001	0.056
単球%	29.41	27.63	14.65	<0.0001	0.52
好中球%	14.96	10.58	5.00	<0.0001	0.035

40

1: ANOVA誤差推定値に基づくt統計量と両側t検定を用いて計算したp値

## 【0152】

健常な被験者からのPBMCとIBD患者からのPBMCを比較すると、PBMCサンプルの細胞組成には、有意な差があった( $p < 0.05$ )。好塩基球およびリンパ球の総割合は、IBDを有する患者からのPBMCにおいて有意に低かったが、好酸球、単球および好中球の割合は、IBD患者からのPBMCにおいて有意に上昇した。以前の研究は、進行癌患者の末梢血におけるそれらの活性化状態の変化と関係があると思われる沈降密度の変化の変化に起因する、同様の精製プロセスによる好中球の上昇について言及している(Schmielau and Finn (2001) Cancer Res. 61:4756-60)。全血の細胞組成には群間

50

での有意な差がない（データは示さない）ので、好酸球、単球および好中球における選択的上昇は、CPTに基づくPBMC単離プロセスによって捕捉される疾患関連活性化事象であり得る。

#### 【0153】

対照的に、好塩基球、好酸球および単球の比率は、CDPBMCSサンプルとUCPBMCサンプルの間で有意な差がなかった（ $p < 0.05$ ）。これら2つのIBD群を比較すると、好中球のみが有意に異なった（11%対15%、 $p = 0.035$ ）。

#### 【0154】

実施例2.2：健常対照と比較した全IBD患者からのPBMCにおける発現レベルの相違

細胞組成の相違と関係があるとは思われない疾患関連遺伝子を同定するために、PBMCサンプル間の細胞組成の変動を考慮に入れて、共分散分析（ANCOVA）を用いて差次的な発現転写産物を同定した。標準的発現レベルフィルターに通した7908の転写産物に対してANCOVAを実行し、好酸球、単球および好中球の割合を共変量として組み入れた。

#### 【0155】

組み入れる細胞タイプの選択は、ANCOVAにおける共変量が互いに高度に相関してはならないという事実により、一部、左右された。リンパ球パーセントは、単球パーセントおよび好中球パーセントと強く逆相関しており、この理由から、ANCOVAに組み入れなかった。各細胞タイプについて、細胞タイプのパーセントと個々の遺伝子についての発現レベルの間に線形関係を描く傾きを予測し、t検定を行って、その傾きが0とは有意に異なるかどうかを判定した（ここで、0の傾きは、細胞タイプパーセントと発現レベルの間に線形関係が無いことを示す）。最後に、女性および男性の相対的分布も疾患群間で有意な差があったため、性別をこのANCOVAに組み入れて、疾患状態に関係しているのではなく性別特異的であると思われる転写産物を同定した。

#### 【0156】

ANCOVA分析により、220の転写産物のレベルには、クローン病PBMCと健常PBMCの間に1.5倍より大きな差があり、ANCOVAに基づく一対比較では0.0001未満の未調整のp値を有し、ならびに上と同じ基準を用いて、120の転写産物のレベルは、UCPBMCと健常PBMCの間に有意な差があった。これら配列のうち45は、UCPBMCとCDPBMCの両方において差次的に発現し、これらの共通のPBMCおよびIBD関連転写産物は、健常レベルと比較して、両方の疾患において同じ方向に変化した（表1、上記）。

#### 【0157】

追加のフィルターを残りの遺伝子セットに適用して、一方の疾患状態においてのみ差次的に発現すると思われるPMBC転写産物を同定した。CDに関連した220の転写産物（1.5倍の変化、 $p < 0.0001$ ）のうち、合計67の配列は、UCPBMC対健常の比較において有意に改変されず（ $p > 0.05$ ）、従って、CD特異的であると思われる。その67のCD特異的PBMC配列、すなわち、CDバイオマーカーは、上の表2に提示されている。UCに関連した120の転写産物（1.5倍の変化、 $p < 0.0001$ ）のうち、合計22の配列は、CDPBMC対健常の比較において有意に改変されず（ $p > 0.05$ ）、従って、UC特異的であると思われる。その22のUC特異的PBMC配列、すなわち、UCバイオマーカーは、上の表3に提示されている。

#### 【0158】

有意な過表示（overrepresentation）の最も高い尤度を有するカノニカル遺伝子経路を各々の比較のために図1Aにまとめる。この分析において、プロスタグランジン代謝のカノニカルカテゴリーに関係する転写産物は、CD遺伝子サインにおいて有意に過表示されたが、アポトーシスおよびB細胞シグナリングのカノニカルカテゴリーに関係するタンパク質をコードしている転写産物は、UC遺伝子サインにおいて過表示されるように見えた。図1Bは、健常対照に比べてクローン病において差次的に発現した転写産物に包含され

10

20

30

40

50

る様々な機能カテゴリーをまとめたものである。CD P B M Cにおいてアップレギュレートされた主機能カテゴリーとしては、プロスタグランジン代謝に関与する酵素、転写調節因子および膜貫通型受容体（幾つかのインテグリンアイソフォームを含む）が挙げられる。最後に、図1Cは、UC P B M C遺伝子発現サインに特有である、免疫グロブリン定常領域の豊富な過表示をまとめたものである。

#### 【0159】

実施例2.3：クローン病および潰瘍性大腸炎を判別する遺伝子サインの同定

本試験における主目的は、CDおよびUCを有する患者のP B M Cにおける遺伝子発現パターンが、P B M Cにおける遺伝子発現プロファイルのみに基づいて分類することができる程度まで異なるかどうかを判定することであったので、2つの疾患間での遺伝子発現サインの直接比較を行った。CD P B M Cプロファイル対UC P B M CプロファイルのANCOVA比較により、CD患者のP B M CとUC患者のP B M Cの間に有意な差があるレベルで存在する49の転写産物を同定した（1.5倍の差、 $p < 0.0001$ ）。これらのCD v UCバイオマーカーは、上の表4に列挙されている。

10

#### 【0160】

CD P B M C遺伝子サインとUC P B M C遺伝子サインの直接比較で有意差を示したANCOVA結果に基づいて、監視によるクラス予測アプローチを用いて、疾患特異的分類が可能な情報提示配列（informative sequence）の小セットを同定した。IBD患者からのP B M Cサンプルを、44のCDプロファイルおよび20のUCプロファイルから成るトレーニングセットと15のCDプロファイルおよび6のUCプロファイルから成る試験セットに無作為に割付けた。遺伝子分類子のパネルの増加サイズについての相対的総合精度、CD分類の精度およびUC分類の精度を判定した（図2A）。図2Aに示されているように、2つの遺伝子分類子（すなわち、リポカリン2およびIgHg3）から成るパネルは、4分割交差検定によって評価したところ、64%の精度を示した（図2A）。トレーニングセットの4分割交差検定によって評価した（図2A）ところ、UC P B M CプロファイルとCD P B M Cプロファイルとを識別する最高総合精度（91%）を有する最小予測モデルは、14配列（12遺伝子）の分類子であった（表5、上記）。この14配列分類子は、1個抜き交差検定によって評価したところ、94%の総合精度を有した（データは示さない）。表5における遺伝子分類子は、信号対雑音比の高い順に列挙されている。すなわち、クローン病を有する患者においてアップレギュレートされる、表5に列挙されている分類バイオマーカーのうち、リポカリン2（分類子遺伝子番号1）が最も高い信号対雑音比を有し、インテグリン-3（分類子遺伝子番号7）が最も低い信号対雑音比を有し、ならびに潰瘍性大腸炎を有する患者においてアップレギュレートされる、表5に列挙されている分類バイオマーカーのうち、IgHg1（分類子遺伝子番号8）が最も高い信号対雑音比を有し、IgKc（分類子遺伝子番号14）が最も低い信号対雑音比を有した。分類子セットのサイズが増大しても、このレベルより上まで精度は上昇しなかった（図2A）。この12遺伝子分類子を用いて、試験セットに使わないクラスメンバーシップを14のCDプロファイルおよび6のUCプロファイルに割付けた（図2B）。この予測モデルを用いて、試験セットにおけるすべてのサンプルを臨床診断用として適正に分類した。この分類子を用いると、各群において0.2未満の信頼度スコアは1例のみであり、これは、これらのコールが、比較的高い信頼度で、重み付き多数決法アルゴリズムによってなされたことを示している。これらの結果は、P B M C発現プロファイルの利用をCDおよびUCの分子診断を助けるために適用できる可能性を明示している。

20

30

40

#### 【0161】

実施例2.4：マイクロアレイ観察の定量リアルタイム逆トランスクリプターゼポリメラーゼ連鎖反応（Q-PCR）確認

マイクロアレイ分析から得た発現レベルのデータセットにおける最近接に基づくクラス割付けについての分類子セットの精度にもかかわらず、CD/UC分類子における転写産物の平均変動倍率は、比較的低かった。そのため、この試験では、定量リアルタイムPCR（Q-PCR）を行って、Affymetrixマイクロアレイ法によりCDサンプ

50

ルおよびUCサンプルについて観察された相対的発現を確認した。ターゲット遺伝子の正規化には4つの別のハウスキーピング遺伝子を用いた： 2 - ミクログロブリン ( 2 M )、 - アクチン、 GAPDHおよび18SリボソームRNA ( 18 S )。この試験では、 CDおよびUCの全てのRNAサンプルを、同じ逆転写カクテルおよび手順を用いてcDNAに変換した。マイクロアレイによって計算した平均変動倍率と 2 - ミクログロブリンを用いるリアルタイムPCRとの比較を図3に提示する。正規化群として4つのハウスキーピング遺伝子の各々を用いた12の分類遺伝子すべてについての相対的変動倍率は、極めて一致していた (表11)。

【表11】

表11: 正規化後の相対的変動倍率								
UCにおける上昇(CDとの比較)								
試験	正規化	IgHgl	IgKc	28S	PTP, C-assoc	グランザイムK		
Affy	基準化度数	3.87	2.30	2.11	1.43	1.35		
Q-PCR	β2M	3.11	2.04	1.32	1.47	1.85		
	β-アクチン	3.05	2.00	1.30	1.44	1.81		
	GAPDH	2.83	1.86	1.21	1.34	1.69		
	18S	2.68	1.98	1.31	1.40	1.86		
CDにおける上昇(UCとの比較)								
試験	正規化	mutL 3	リポカリン 2	CXCL5	血清 dep 応答	ヒストン 3K	インテグリンβ-3	ヒストン 2BQ
Affy	基準化度数	2.01	1.75	1.85	1.66	1.65	1.62	1.57
Q-PCR	β2M	1.93	1.84	2.28	1.49	1.32	1.49	1.27
	β-アクチン	1.97	1.88	2.33	1.52	1.35	1.52	1.29
	GAPDH	2.12	2.02	2.50	1.64	1.45	1.64	1.39
	18S	2.13	1.96	2.44	1.59	1.47	1.61	1.36

10

20

30

【0162】

当初はCD/UC判別器遺伝子(すなわち、分類バイオマーカー)として同定された12の転写産物についてのこれらの結果に基づき、28S rRNAフラグメントのみがマイクロアレイハイブリダイゼーションによって大幅に過大予測されたようであった。

【0163】

実施例2.5: Q-PCRによって得られた発現値を用いる正確なクラス予測

4つのハウスキーピング遺伝子(2M、-アクチン、GAPDHおよび18S)の各々で正規化した12の分類バイオマーカー(表5および8に列挙したもの)についてのCtの線形判別分析(LDA)を、トレーニングセットにおけるCDを有する患者から単離された43のPBMC RNAサンプルおよびUCを有する患者から単離された19のPBMC RNAサンプル、ならびに試験セットにおけるCDを有する患者から単離された14のPBMC RNAサンプルおよびUCを有する患者から単離された6のPBMC RNAサンプルから成る3つのデータセット(データセットMB、データセット1、データセット2)についての同じCtのk-NN判別分析と比較した。

40

【0164】

4つのハウスキーピング(2-ミクログロブリン(2M)、-アクチン、GAPDH、および18SリボソームRNA(18S))遺伝子の各々に正規化した分類バイオマーカーの発現レベルの3つのデータセット(データセットMB、データセット1、データセット2)についてのパラメトリック(線形)、非パラメトリックk=3最近接、または非パラメトリックk=10最近接判別分析法の分類性能に関する精度、感度、特異性、

50

PPVおよびNPV測度を表13に示す。

【表12-1】

表 13:							
ハウスキーピング 遺伝子	データ セット	方法	精度	感度	特異性	PPV	NPV
β2M	セットMB	パラメトリック	0.833	1.000	0.667	0.875	1.000
β2M	セットMB	K-NN k=3	0.762	0.857	0.667	0.857	0.667
β2M	セットMB	K-NN k=10	0.750	1.000	0.500	0.824	1.000
β-アクチン	セットMB	パラメトリック	0.833	1.000	0.667	0.875	1.000
β-アクチン	セットMB	K-NN k=3	0.798	0.929	0.667	0.867	0.800
β-アクチン	セットMB	K-NN k=10	0.750	1.000	0.500	0.824	1.000
GAPDH	セットMB	パラメトリック	0.750	1.000	0.500	0.824	1.000
GAPDH	セットMB	K-NN k=3	0.762	0.857	0.667	0.857	0.667
GAPDH	セットMB	K-NN k=10	0.750	1.000	0.500	0.824	1.000
18S	セットMB	パラメトリック	0.917	1.000	0.833	0.933	1.000
18S	セットMB	K-NN k=3	0.845	0.857	0.833	0.923	0.714
18S	セットMB	K-NN k=10	0.917	1.000	0.833	0.933	1.000
β2M	セット1	パラメトリック	0.964	0.929	1.000	1.000	0.857
β2M	セット1	K-NN k=3	0.821	0.643	1.000	1.000	0.545
β2M	セット1	K-NN k=10	0.798	0.929	0.667	0.867	0.800
β-アクチン	セット1	パラメトリック	0.964	0.929	1.000	1.000	0.857
β-アクチン	セット1	K-NN k=3	0.821	0.643	1.000	1.000	0.545
β-アクチン	セット1	K-NN k=10	0.845	0.857	0.833	0.923	0.714
GAPDH	セット1	パラメトリック	0.929	0.857	1.000	1.000	0.750
GAPDH	セット1	K-NN k=3	0.786	0.571	1.000	1.000	0.500
GAPDH	セット1	K-NN k=10	0.845	0.857	0.833	0.923	0.714
18S	セット1	パラメトリック	0.845	0.857	0.833	0.923	0.714
18S	セット1	K-NN k=3	0.810	0.786	0.833	0.917	0.625
18S	セット1	K-NN k=10	0.845	0.857	0.833	0.923	0.714
β2M	セット2	パラメトリック	0.774	0.714	0.833	0.909	0.556
β2M	セット2	K-NN k=3	0.738	0.643	0.667	0.818	0.444
β2M	セット2	K-NN k=10	0.881	0.929	0.833	0.929	0.833
β-アクチン	セット2	パラメトリック	0.774	0.714	0.833	0.909	0.556

10

20

30

【表12-2】

表 13:							
ハウスキーピング 遺伝子	データ セット	方法	精度	感度	特異性	PPV	NPV
β-アクチン	セット2	K-NN k=3	0.702	0.571	0.833	0.889	0.455
β-アクチン	セット2	K-NN k=10	0.762	0.857	0.667	0.857	0.667
GAPDH	セット2	パラメトリック	0.810	0.786	0.833	0.917	0.625
GAPDH	セット2	K-NN k=3	0.667	0.500	0.833	0.875	0.417
GAPDH	セット2	K-NN k=10	0.810	0.786	0.833	0.917	0.625
18S	セット2	パラメトリック	0.845	0.857	0.833	0.923	0.714
18S	セット2	K-NN k=3	0.810	0.786	0.833	0.917	0.625
18S	セット2	K-NN k=10	0.845	0.857	0.833	0.923	0.714

40

【0165】

この判別分類は、用いた方法にかかわらず、データセットMBに対して最も有効であった。これは、各方法の性能が、分析した各データセットに関連していることを示唆している(図13)。パラメトリック法とk=10の非パラメトリック最近接法の両方は同様に

50

有効であった、平均して、両方とも  $k = 3$  の非パラメータ最近接法より有効であった (表 13)。

【0166】

18Sで正規化した分類バイオマーカーは、上記3つのデータセット間で性能の系統的な差を示した。18Sは、他のハウスキーピング遺伝子よりある程度、機能が優れており；18Sで正規化した分類バイオマーカーの分析は、精度、感度および特異性に関して、より高い値およびより小さいばらつきを一貫して有した (表 13)。

【0167】

18Sは、試験した他のハウスキーピング遺伝子より機能が優れているように見えたので、その後、18Sのみで正規化した分類バイオマーカーの発現レベルのロジスティック解析を行った。完全モデルロジスティック解析法、逆方向ロジスティック解析法、順方向ロジスティック解析法およびロジスティック解析の段階的選択法の中からの選択は、分類にほとんど影響を与えなかった (データは示さない)。データセットMBおよびデータセット1に関して、完全モデル方法は、他の縮小モデルと同じまたはそれ以上に有効であった (データは示さない)。データセット2の場合、 $p = 0.05$  に設定した有意性レベルで順方向方法または段階的方法によって選択した、18Sで正規化した2つまたは3つの分類バイオマーカーを有するモデル (両方とも、MLH3およびI g K Cを含む) は、より良好なクラス予測を有した (データは示さない)。この所見は、非典型的発現レベルを有するバイオマーカーの大部分が、データセット2の試験セットに組み入れられており、一方、順方向または段階的選択からのモデルは、これらの異常発現バイオマーカーを含有しなかったという事実に起因していた。バイオマーカーの組み入れのこのばらつきは、完全モデルが最良に機能するロジスティック法でなかった理由、および12すべての限定子が組み入れられているモデルでの判別分析の結果として不良な分類が生じた理由の説明にもなり得る。ロジスティック解析のための異なる選択方法のこの精度、感度および特異性は、異なるロジスティック選択法が同様に機能したことを示している (データは示さない)。例えば、ある方法が、あるデータセットの試験セットよりトレーニングセットに関して良好な分類を示す場合、または逆の場合も同様に、他の3つすべての方法での結果が同じ特性を示した。

【0168】

次に、完全モデルを用いたロジスティック解析による分類を、パラメトリック法を用いた線形判別分析による分類と比較した。2つの方法の間でのデータセットの変動が観察されたが、両方の分析によりクラス予測が適切に行われた。データセットMB、データセット1およびデータセット2を用いたクラス分類は、0.833と0.917の間の精度、0.786と1.000の間の感度、および0.667と1.000の間の特異性という結果になった (表 14)。しかし、20のデータセットを比較したとき、2つの方法の間に差が出た (図 4)。完全モデルでのロジスティック解析は、交差検定でより有効であったが、判別分析は、試験セット分類でのほうが良好でなかった。

【表 13】

表 14

データセット	分析方法	感度	特異性	PPV	NPV	精度
MB	判別	0.786	1.000	1.000	0.667	0.893
MB	ロジスティック	1.000	0.667	0.875	1.000	0.833
セット1	判別	0.857	0.833	0.923	0.714	0.845
セット1	ロジスティック	1.000	0.833	0.933	1.000	0.917
セット2	判別	0.786	1.000	1.000	0.667	0.893
セット2	ロジスティック	0.857	0.833	0.923	0.714	0.845

【実施例 3】

【0169】

(考察)

この研究の焦点は、(1) CDおよびUCに関連したPBM Cにおける遺伝子発現パターンの共通性と特異性の両方を判定する、ならびに(2)疾患特異的発現サインが疾患の分子診断に寄与し得るかどうかを判定するという試みであった。健常な被験者についてのプロフィールと比較して、CD患者とUC患者の両方についてのプロフィールにおいて、数十の遺伝子が、差次的に発現するようである。これらの遺伝子の多くは、転写調節因子などの核タンパク質をコードし、大部分が、ダウンレギュレートされる。例としては、NF K B 2、RNA結合因子C U G B P 1およびC U G B P 2、C O P E B、およびE L K 3が挙げられる。UCおよびCDに共通の非調節炎症プロセス(disregulated inflammatory process)は、これらの転写調節因子の活性の調節の結果である場合がある。

#### 【0170】

両方の炎症性腸疾患において共通して上昇した最高発現遺伝子は、プロテアーゼ阻害剤S E R P I N B 2 ( P A I、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤、タイプI Iとも呼ばれる)であった。プラスミノゲンアクチベーターレベルの増加は、I B D患者の粘膜病変において報告されており(de Bruin et al. (1988) Thromb. Haemost. 60:262-66)、I B D患者の血漿においてP A I - 1増加が見られた。P A I - 1とは異なるが、P A I - 2は、u - P Aおよび、より低い程度ではあるが、t - T Aの両方に対する酵素特異性を共有し、慢性関節リウマチの滑液においてP A I - 2レベル上昇が報告されている(Krui thof et al. (1995) Blood 86:4007-24)。これらの所見は、フィブリン溶解性系および凝固系(単数および複数)の成分の変化が、血栓塞栓性合併症のリスク増加ならびに可能性としてI B D患者において見られる大腸炎および出血の一因となり得ることを示唆している(de Jong et al. (1989) Gut 30: 188-94)。I B DにおけるP A I - 2の役割は報告されていないが、本研究から、P B M C中のP A I - 2 R N Aレベルの上昇が疾患に関連していることが示唆される。

#### 【0171】

プロスタグランジン代謝酵素、ケモカインおよび転写レギュレーターをはじめとする転写産物の多数の機能クラスが、CD患者のP B M Cでは、特異的にアップレギュレートされるようである。CD特異的P B M C遺伝子プロフィールは、前炎症性遺伝子発現プロフィールを示し、これは、UC特異的P B M C遺伝子プロフィールでは顕性でなかった。プロスタグランジンおよびロイコトリエン代謝に関与する遺伝子(例えば、アラキドン酸12-リポキシゲナーゼ(A L O X 1 2)およびプロスタグランジンエンドペルオキシドシンターゼ1(P T G S 1、シクロオキシゲナーゼ1))は、CD患者からのP B M Cにおいて有意に増加したが、プロスタグランジンD2シンターゼ(P T G D S)は減少した。プロスタグランジン合成経路に対するこれらの作用は、アラキドン酸の選択プロスタグランジンへの変換を増加させると予想される。プロスタグランジン含有率は、I B D患者の病変において高い(Schmidt et al. (1996) Hepatogastroenterology 43:1508-12)が、極最近の証拠では、少なくとも1つのプロスタグランジン(P G E<sub>2</sub>)のレベルが、CD患者の単核細胞において実際には減少することを示唆している(Trebbles et al. (2004) Clin. Nutr. 23:647-55)。CD患者のP B M Cにおけるアラキドン酸代謝酵素をコードしている転写産物の相対的上昇が、この観察に機能的に関連しているかどうかは不明であるが、P G E<sub>2</sub>は、胃腸管から採取したTリンパ球からのサイトカインの放出の重要なモジュレーターとして文献に記載されている(Barrera et al. (1996) J. Cell. Physiol 166:130-37)。クローン病患者の循環P B M CにおけるP G代謝経路のアップレギュレーションは、この疾患において腸の粘膜固有層に入る細胞/腸の粘膜固有層から出る細胞の変化を示すことがある。

#### 【0172】

幾つかのケモカイン(C - X - Cリガンド4および7、血小板因子4変異体1)が、CDではアップレギュレートされた。全体的に見て、本CD P B M Cセットにおいてアップレギュレートされると同定された転写産物と、Mannickおよび共同研究者によって分析された7例のCD患者においてアップレギュレートされたと報告されたもの(Mannick et al., 上記)との間には、驚くべきことに、ほとんど重なりが無い。これが、ここ

10

20

30

40

50

で調査した患者数がより多いことに起因するのか、質問遺伝子数がより多いことに起因するのか、遺伝子命名法の違いに起因するのか、またはこれらの研究の間における他の何らかの混乱要因に起因するのかは、不明である。しかし、Mannickおよび共同研究者によって報告された、CDにおいて最も強くアップレギュレートされた転写産物は、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ 誘導性転写産物(Mannick et al., 上記)をコードしていた。ここでは、TSC-22、別のTGF- $\beta$ 誘導性転写産物も、CD P B M Cにおいてアップレギュレートされることが確認された。これらの観察は、TGF- $\beta$ シグナル伝達のアップレギュレーションが、CD P B M Cにおいて顕性であると思われることを示している。この経路における構成的上昇は、Smad依存性経路のダウンレギュレーションを生じさせ、それが、その後、免疫応答を停止させるTGF- $\beta$ の能力を阻害し、その結果としてCDの病原において原因的役割を果たすことがある(Mannick et al., 上記)。

10

## 【0173】

クローン病関連疾患サイン遺伝子プロフィールの一部は、血小板由来である可能性がある。最近では証拠として、血小板が慢性腸炎に關与し得ることを証明しており(Danese et al. (2004) Am. J. Gastroenterol. 99:938-45)、血小板は、本研究においてCD患者から単離されたP B M Cとともにより高い程度まで共精製された(データは示さない)。従って、CD関連遺伝子サインにおける血小板因子4および血小板因子4変異体1の検出は、単離されたP B M C中の共精製血小板のレベル上昇に起因し得る。しかし、血小板に關して報告された上位10の非ミトコンドリア性転写産物(Gnatenko et al. (2003) Blood 101:2285-93)のうちの他の転写産物は、転写産物の本CD関連リストには現れず、これは、これらの無核細胞のレベルが、これらの転写産物の唯一の原因ではないことを示唆している。以前に血小板と關連付けられたCD疾患サインにおける転写産物のすべてが、精製T細胞、B細胞および/または単球においても有意なレベルで発現する(データは示さない)。これは、血小板と以前に關連付けられた転写産物が、本研究で単離およびプロファイルした単核細胞から生じ得ることを示唆している。

20

## 【0174】

UC特異的遺伝子セットは、UC患者において觀察される活性IgG血漿細胞成分を思い出させる、免疫グロブリンコーディング配列の過発現によって特徴付けられた(Farrell et al. (2002) Lancet 359:331-40)。この所見は、UC粘膜における浸潤性リンパ球が粘膜起源ではなく末梢起源であることを証明したB細胞受容体遺伝子利用に關する研究(Dunn-Walters et al. (1999) Gut 44:382-86; Thoree et al. (2002) Gut 51:44-50)と一致する。IgG1抗体およびIgG4抗体はUCにおいて優勢であり、これに対してIgG2抗体は、CDにおいて増加する(Kett and Brandtzaeg (1987) Gut 28:1013-21)。IgG1タイプの罹患率が、最近、調査され、UCに特異的であること、ならびにUCにおいて粘膜菌のより大きなオプソニン作用および多形核白血球呼吸バーストのフィードフォワード維持を招くことが証明された(Furrie et al. (2004) Gut 53:91-98)。この研究においてUC P B M C中で最も有意に上昇した転写産物の1つは、免疫グロブリン重鎖定常領域3(IgHG3)との注釈が付いている。Affymetrixチップ上のこのIgHG3限定子に包含される領域は、免疫グロブリン重鎖定常領域1(G1mマーカー)に割当てられた幾つかの配列に実際に位置し(すなわち、BLASTにより、100%ヌクレオチド同一性を共有している)、ならびに炎症性UC胃腸上皮のマーカーとして同定されている(Warner and Dieckgraefe, 上記; Lawrance et al., 上記)。個々の患者の末梢血プロフィールにおけるIgHG3転写産物の発現レベルの分析は、それらのレベルがUCとCDとの区別的なバイオマーカーとしての機能を果たすことができることを明らかにした(データは示さない)。しかし、これらの結果は、UC患者における血清中のIgG1レベルが、CD患者におけるIgG1の血清中レベルに比べて有意に増加するという以前の觀察(Gouni-Berthold et al. (1999) Hepatogastroenterology 46:1720-23)とも一致する。

30

40

## 【0175】

50

炎症性腸疾患を有する患者の有意なサブセットは、現行の手順によって分類することができず、「非定型的IBD」の症例の構成要素となる(Winther et al. (1998) *Drugs Today (Barc)*. 34:935-42; Bentley et al. (2002) *J. Clin. Pathol* 55:955-60; Guindi and Riddell (2004) *J. Clin. Pathol.* 57:1233-44)。従って、本研究の主目的の1つは、UCおよびCDを有する患者のPBMCPロフィールが、これらの疾患の分類を可能にする程度まで異なるかどうかを判定することであった。クラス予測分析の結果は、PBMCPにおける遺伝子サインがUCサンプルおよびCDサンプルを正確に識別できることを示している。患者からのPBMCPの細胞組成は、まったく同様と思われるので、転写の差は、細胞組成に起因するものではない。

#### 【0176】

より大きな集団において予測的に確認が行われる可能性は高いが、本発明によって同定された疾患特異的パターンは、UCおよびCDの分子診断の基礎を提供することができ、ならびに非定型的IBDの罹患と分類された患者の診断に寄与し得る。CDおよびUCそれぞれの提案されたTh1特性およびTh2特性が、本研究における相違の主な原因である、および他のTh1およびTh2に基づく炎症性疾患が、CDおよびUCについて同定されたものと同様のサインを有することがあるという可能性は相当にある。それにもかかわらず、本明細書において同定したPBMCPロフィールは、IBDにおいて臨床的有用性を有すると思われる。なぜならば、多くの場合、識別困難であり、場合によっては識別不能であるこれらの密接に関連した疾患間の判別が、本遺伝子分類子によって可能になるためである。

#### 【0177】

本研究は、循環単球、T細胞およびB細胞における転写プロフィールが、IBDの状況下で生物の生理状態の高感度モニターの役割を果し得ることを示す。これらの細胞が、様々な組織を横断するとき、その微小環境に対する細胞反応の1つの要素は転写応答であり、そのような応答は、プロファイリングによって定量することができる。発現パターンは、疾患の病態生理に対する一次応答または二次応答の疾患メカニズムを反映し得る。PBMCPは、体中に輸送されるため、例えばIBDによる影響を受ける組織および系にもかわらず簡単に調査できない組織および系の利用しやすい代理モニターとしての役割を果すことができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0178】

【図1-1】CD関連、UC関連として同定された、およびUCとCDとで差次的に発現した、転写産物の機能的な注釈およびカテゴリーを示す図である。A)CD対正常のANCOVA比較(灰色棒)、UC対正常のANCOVA比較(黒棒)およびUC対CDのANCOVA比較(白棒)において過発現したカノニカル経路(x軸)を示す。これらのパネルでは、より有意な関連を強調するためにp値の負対数(y軸)をプロットする。問い合わせた経路(x軸)は、次のとおりである:(1)アミロイドプロセッシング、(2)アポトーシスシグナリング、(3)アルギニンおよびプロリン代謝、(4)B細胞受容体シグナリング(非免疫グロブリン)、(5)心臓-アドレナリン作動性シグナリング、(6)ケモカインシグナリング、(7)死滅受容体シグナリング、(8)ERK/MAPKシグナリング、(9)脂肪酸代謝、(10)細胞周期調節(G1/S)、(11)細胞周期調節(G2/M)、(12)Gタンパク質結合受容体シグナリング、(13)グルタメート代謝、(14)ヒスチジン代謝、(15)IGF-1シグナリング、(16)IL-2シグナリング、(17)IL-4シグナリング、(18)イノシトールリン酸代謝、(19)インスリン受容体シグナリング、(20)インテグリンシグナリング、(21)インターフェロンシグナリング、(22)JAK/STATシグナリング、(23)NF- $\kappa$ Bシグナリング、(24)窒素代謝、(25)p38MAPKシグナリング、(26)PI3K/AKTシグナリング、(27)PPARシグナリング、(28)プロスタグランジンおよびロイコトリエン代謝、(29)プリン代謝、(30)ピリミジン代謝、(31)デンプンおよびスクロース代謝、(32)T細胞受容体シグナリング、(3

10

20

30

40

50

3) トリプトファン代謝、(34) チロシン代謝、ならびに(35) VEGFシグナリング。B) Ingenuity 経路分析システム(カリフォルニア州、マウンテンビューのIngenuity)を用いて、PBMCにおけるCD特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものである。CD関連遺伝子についての選択した機能カテゴリーの各々における、転写産物の相対的な配分を円グラフで提示する。C) PBMCにおけるUC特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものであり、免疫グロブリンカテゴリー 対 非免疫グロブリンカテゴリーの中の転写産物の相対的分布を提示する。

【図1-2】CD関連、UC関連として同定された、およびUCとCDとで差次的に発現した、転写産物の機能的な注釈およびカテゴリーを示す図である。A) CD 対 正常のANCOVA比較(灰色棒)、UC 対 正常のANCOVA比較(黒棒)およびUC 対 CDのANCOVA比較(白棒)において過発現したカノニカル経路(x軸)を示す。これらのパネルでは、より有意な関連を強調するためにp値の負対数(y軸)をプロットする。問い合せた経路(x軸)は、次のとおりである：(1)アミロイドプロセッシング、(2)アポトーシスシグナリング、(3)アルギニンおよびプロリン代謝、(4)B細胞受容体シグナリング(非免疫グロブリン)、(5)心臓 - アドレナリン作動性シグナリング、(6)ケモカインシグナリング、(7)死滅受容体シグナリング、(8)ERK/MAPKシグナリング、(9)脂肪酸代謝、(10)細胞周期調節(G1/S)、(11)細胞周期調節(G2/M)、(12)Gタンパク質結合受容体シグナリング、(13)グルタメート代謝、(14)ヒスチジン代謝、(15)IGF-1シグナリング、(16)IL-2シグナリング、(17)IL-4シグナリング、(18)イノシトールリン酸代謝、(19)インスリン受容体シグナリング、(20)インテグリンシグナリング、(21)インターフェロンシグナリング、(22)JAK/STATシグナリング、(23)NF- $\kappa$ Bシグナリング、(24)窒素代謝、(25)p38 MAPKシグナリング、(26)PI3K/AKTシグナリング、(27)PPARシグナリング、(28)プロスタグランジンおよびロイコトリエン代謝、(29)プリン代謝、(30)ピリミジン代謝、(31)デンプンおよびスクロース代謝、(32)T細胞受容体シグナリング、(33)トリプトファン代謝、(34)チロシン代謝、ならびに(35)VEGFシグナリング。B) Ingenuity 経路分析システム(カリフォルニア州、マウンテンビューのIngenuity)を用いて、PBMCにおけるCD特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものである。CD関連遺伝子についての選択した機能カテゴリーの各々における、転写産物の相対的な配分を円グラフで提示する。C) PBMCにおけるUC特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものであり、免疫グロブリンカテゴリー 対 非免疫グロブリンカテゴリーの中の転写産物の相対的分布を提示する。

【図1-3】CD関連、UC関連として同定された、およびUCとCDとで差次的に発現した、転写産物の機能的な注釈およびカテゴリーを示す図である。A) CD 対 正常のANCOVA比較(灰色棒)、UC 対 正常のANCOVA比較(黒棒)およびUC 対 CDのANCOVA比較(白棒)において過発現したカノニカル経路(x軸)を示す。これらのパネルでは、より有意な関連を強調するためにp値の負対数(y軸)をプロットする。問い合せた経路(x軸)は、次のとおりである：(1)アミロイドプロセッシング、(2)アポトーシスシグナリング、(3)アルギニンおよびプロリン代謝、(4)B細胞受容体シグナリング(非免疫グロブリン)、(5)心臓 - アドレナリン作動性シグナリング、(6)ケモカインシグナリング、(7)死滅受容体シグナリング、(8)ERK/MAPKシグナリング、(9)脂肪酸代謝、(10)細胞周期調節(G1/S)、(11)細胞周期調節(G2/M)、(12)Gタンパク質結合受容体シグナリング、(13)グルタメート代謝、(14)ヒスチジン代謝、(15)IGF-1シグナリング、(16)IL-2シグナリング、(17)IL-4シグナリング、(18)イノシトールリン酸代謝、(19)インスリン受容体シグナリング、(20)インテグリンシグナリング、(21)インターフェロンシグナリング、(22)JAK/STATシグナリング、(23)NF- $\kappa$ Bシグナリング、(24)窒素代謝、(25)p38 MAPKシグナリング、(26)PI3K/AKTシグナリング、(27)PPARシグナリング、(28)プロ

10

20

30

40

50

スタグランジンおよびロイコトリエン代謝、(29)プリン代謝、(30)ピリミジン代謝、(31)デンプンおよびスクロース代謝、(32)T細胞受容体シグナリング、(33)トリプトファン代謝、(34)チロシン代謝、ならびに(35)VEGFシグナリング。B) Ingenuity 経路分析システム(カリフォルニア州、マウンテンビューのIngenuity)を用いて、PBMCにおけるCD特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものである。CD関連遺伝子についての選択した機能カテゴリーの各々における、転写産物の相対的な配分を円グラフで提示する。C) PBMCにおけるUC特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものであり、免疫グロブリンカテゴリー 対 非免疫グロブリンカテゴリーの中の転写産物の相対的分布を提示する。

【図1-4】CD関連、UC関連として同定された、およびUCとCDとで差次的に発現した、転写産物の機能的な注釈およびカテゴリーを示す図である。A) CD 対 正常のANCOVA比較(灰色棒)、UC 対 正常のANCOVA比較(黒棒)およびUC 対 CDのANCOVA比較(白棒)において過発現したカノニカル経路(x軸)を示す。これらのパネルでは、より有意な関連を強調するためにp値の負対数(y軸)をプロットする。問い合せた経路(x軸)は、次のとおりである：(1)アミロイドプロセッシング、(2)アポトーシスシグナリング、(3)アルギニンおよびプロリン代謝、(4)B細胞受容体シグナリング(非免疫グロブリン)、(5)心臓 - アドレナリン作動性シグナリング、(6)ケモカインシグナリング、(7)死滅受容体シグナリング、(8)ERK/MAPKシグナリング、(9)脂肪酸代謝、(10)細胞周期調節(G1/S)、(11)細胞周期調節(G2/M)、(12)Gタンパク質結合受容体シグナリング、(13)グルタメート代謝、(14)ヒスチジン代謝、(15)IGF-1シグナリング、(16)IL-2シグナリング、(17)IL-4シグナリング、(18)イノシトールリン酸代謝、(19)インスリン受容体シグナリング、(20)インテグリンシグナリング、(21)インターフェロンシグナリング、(22)JAK/STATシグナリング、(23)NF- $\kappa$ Bシグナリング、(24)窒素代謝、(25)p38 MAPKシグナリング、(26)PI3K/AKTシグナリング、(27)PPARシグナリング、(28)プロスタグランジンおよびロイコトリエン代謝、(29)プリン代謝、(30)ピリミジン代謝、(31)デンプンおよびスクロース代謝、(32)T細胞受容体シグナリング、(33)トリプトファン代謝、(34)チロシン代謝、ならびに(35)VEGFシグナリング。B) Ingenuity 経路分析システム(カリフォルニア州、マウンテンビューのIngenuity)を用いて、PBMCにおけるCD特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものである。CD関連遺伝子についての選択した機能カテゴリーの各々における、転写産物の相対的な配分を円グラフで提示する。C) PBMCにおけるUC特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものであり、免疫グロブリンカテゴリー 対 非免疫グロブリンカテゴリーの中の転写産物の相対的分布を提示する。

【図1-5】CD関連、UC関連として同定された、およびUCとCDとで差次的に発現した、転写産物の機能的な注釈およびカテゴリーを示す図である。A) CD 対 正常のANCOVA比較(灰色棒)、UC 対 正常のANCOVA比較(黒棒)およびUC 対 CDのANCOVA比較(白棒)において過発現したカノニカル経路(x軸)を示す。これらのパネルでは、より有意な関連を強調するためにp値の負対数(y軸)をプロットする。問い合せた経路(x軸)は、次のとおりである：(1)アミロイドプロセッシング、(2)アポトーシスシグナリング、(3)アルギニンおよびプロリン代謝、(4)B細胞受容体シグナリング(非免疫グロブリン)、(5)心臓 - アドレナリン作動性シグナリング、(6)ケモカインシグナリング、(7)死滅受容体シグナリング、(8)ERK/MAPKシグナリング、(9)脂肪酸代謝、(10)細胞周期調節(G1/S)、(11)細胞周期調節(G2/M)、(12)Gタンパク質結合受容体シグナリング、(13)グルタメート代謝、(14)ヒスチジン代謝、(15)IGF-1シグナリング、(16)IL-2シグナリング、(17)IL-4シグナリング、(18)イノシトールリン酸代謝、(19)インスリン受容体シグナリング、(20)インテグリンシグナリング、(21)インターフェロンシグナリング、(22)JAK/STATシグナリング、(23)

10

20

30

40

50

N F - Bシグナリング、(24)窒素代謝、(25) p38 MAPKシグナリング、(26)PI3K/AKTシグナリング、(27)PPARシグナリング、(28)プロスタグランジンおよびロイコトリエン代謝、(29)プリン代謝、(30)ピリミジン代謝、(31)デンプンおよびスクロース代謝、(32)T細胞受容体シグナリング、(33)トリプトファン代謝、(34)チロシン代謝、ならびに(35)VEGFシグナリング。B) Ingenuity 経路分析システム(カリフォルニア州、マウンテンビューのIngenuity)を用いて、PBMCにおけるCD特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものである。CD関連遺伝子についての選択した機能カテゴリーの各々における、転写産物の相対的な配分を円グラフで提示する。C) PBMCにおけるUC特異的転写産物の機能的な注釈を加えたものであり、免疫グロブリンカテゴリー 対 非免疫グロブリンカテゴリーの中の転写産物の相対的分布を提示する。

【図2-1】PBMCプロフィールを用いるCDおよびUCの監視によるクラス予測を示す図である。A) 2~20個の遺伝子分類子(x軸)から成るパネルについての相対的総合精度(黒四角; y軸)、CD分類の精度(-横棒-; y軸)、およびUC分類の精度(黒三角; y軸)を示す。B) サンプルの試験セットにおける重み付き多数決法クラス割付け結果を示す。CDのために信頼度スコアを正の値として提示し、UCのためのクラス割付けの信頼度スコアは、負の値で提示する。マイクロアレイ分析によって得られたPBMCにおける発現パターンのみに基づき、クラス割付け総合精度は、試験セットでは100%であり、ここで、14例のクローン病患者のうち14例が、クローン病として正確に分類され、6例のUC患者のうち6例が、UCとして正確に分類された。PBMCプロフィールの実際の起源を示す(CD患者 = 最初の14本の白棒; UC患者 = 最後の6本の黒棒)。

【図2-2】PBMCプロフィールを用いるCDおよびUCの監視によるクラス予測を示す図である。A) 2~20個の遺伝子分類子(x軸)から成るパネルについての相対的総合精度(黒四角; y軸)、CD分類の精度(-横棒-; y軸)、およびUC分類の精度(黒三角; y軸)を示す。B) サンプルの試験セットにおける重み付き多数決法クラス割付け結果を示す。CDのために信頼度スコアを正の値として提示し、UCのためのクラス割付けの信頼度スコアは、負の値で提示する。マイクロアレイ分析によって得られたPBMCにおける発現パターンのみに基づき、クラス割付け総合精度は、試験セットでは100%であり、ここで、14例のクローン病患者のうち14例が、クローン病として正確に分類され、6例のUC患者のうち6例が、UCとして正確に分類された。PBMCプロフィールの実際の起源を示す(CD患者 = 最初の14本の白棒; UC患者 = 最後の6本の黒棒)。

【図3-1】CDおよびUCのサンプルセットにおける分類子転写産物レベルのリアルタイムPCRによる確認を示す図である。A) Affymetrix マイクロアレイハイブリダイゼーション(Affymetrix; 白い柱)または定量リアルタイムRT-PCR(TAQMAN(登録商標); 黒い柱)によって検出して、CDにおいてアップレギュレートされたときに検出された遺伝子分類子転写産物(x軸)の平均上昇倍率(y軸)を示す。B) Affymetrix マイクロアレイハイブリダイゼーション(Affymetrix; 白い柱)または定量リアルタイムRT-PCR(TAQMAN(登録商標); 黒い柱)によって検出されたUCにおいてアップレギュレートされたときに検出された遺伝子分類子転写産物(x軸)の平均上昇倍率(y軸)を示す。

【図3-2】CDおよびUCのサンプルセットにおける分類子転写産物レベルのリアルタイムPCRによる確認を示す図である。A) Affymetrix マイクロアレイハイブリダイゼーション(Affymetrix; 白い柱)または定量リアルタイムRT-PCR(TAQMAN(登録商標); 黒い柱)によって検出して、CDにおいてアップレギュレートされたときに検出された遺伝子分類子転写産物(x軸)の平均上昇倍率(y軸)を示す。B) Affymetrix マイクロアレイハイブリダイゼーション(Affymetrix; 白い柱)または定量リアルタイムRT-PCR(TAQMAN(登録商標); 黒い柱)によって検出されたUCにおいてアップレギュレートされたときに検出され

10

20

30

40

50

た遺伝子分類子転写産物（x軸）の平均上昇倍率（y軸）を示す。

【図4-1】Q-PCR分析からの転写プロファイルを用いるクローン病または潰瘍性大腸炎いずれかを有する患者の分類に関する判別分析とロジスティック解析の比較を示す図である。（A）20のトレーニングセットまたは（B）20の関連試験セットについてのロジスティック分析または判別分析の精度（y軸）を示す。

【図4-2】Q-PCR分析からの転写プロファイルを用いるクローン病または潰瘍性大腸炎いずれかを有する患者の分類に関する判別分析とロジスティック解析の比較を示す図である。（A）20のトレーニングセットまたは（B）20の関連試験セットについてのロジスティック分析または判別分析の精度（y軸）を示す。

【 図 1 - 1 】

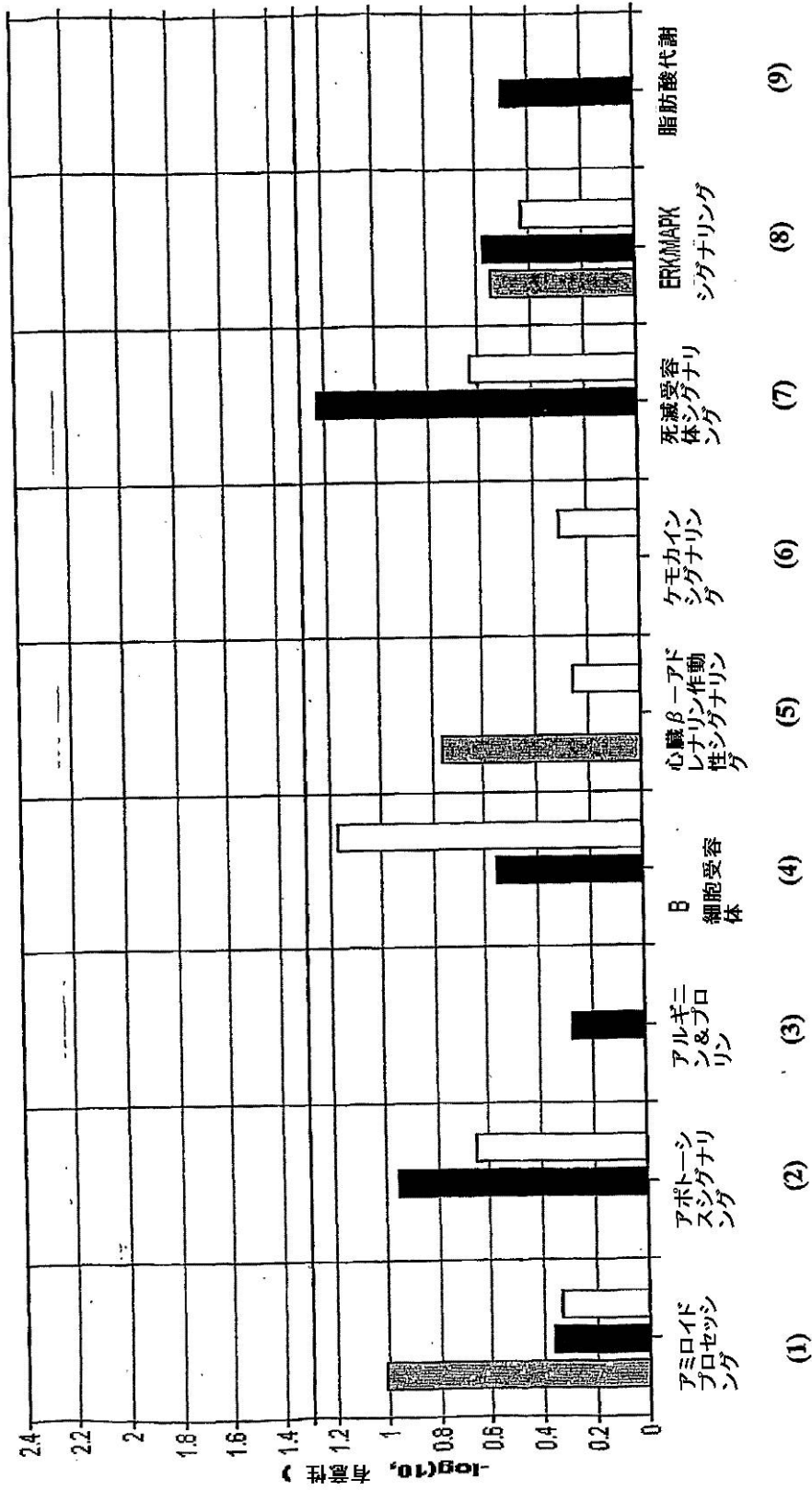


FIG. 1A

【 図 1 - 2 】

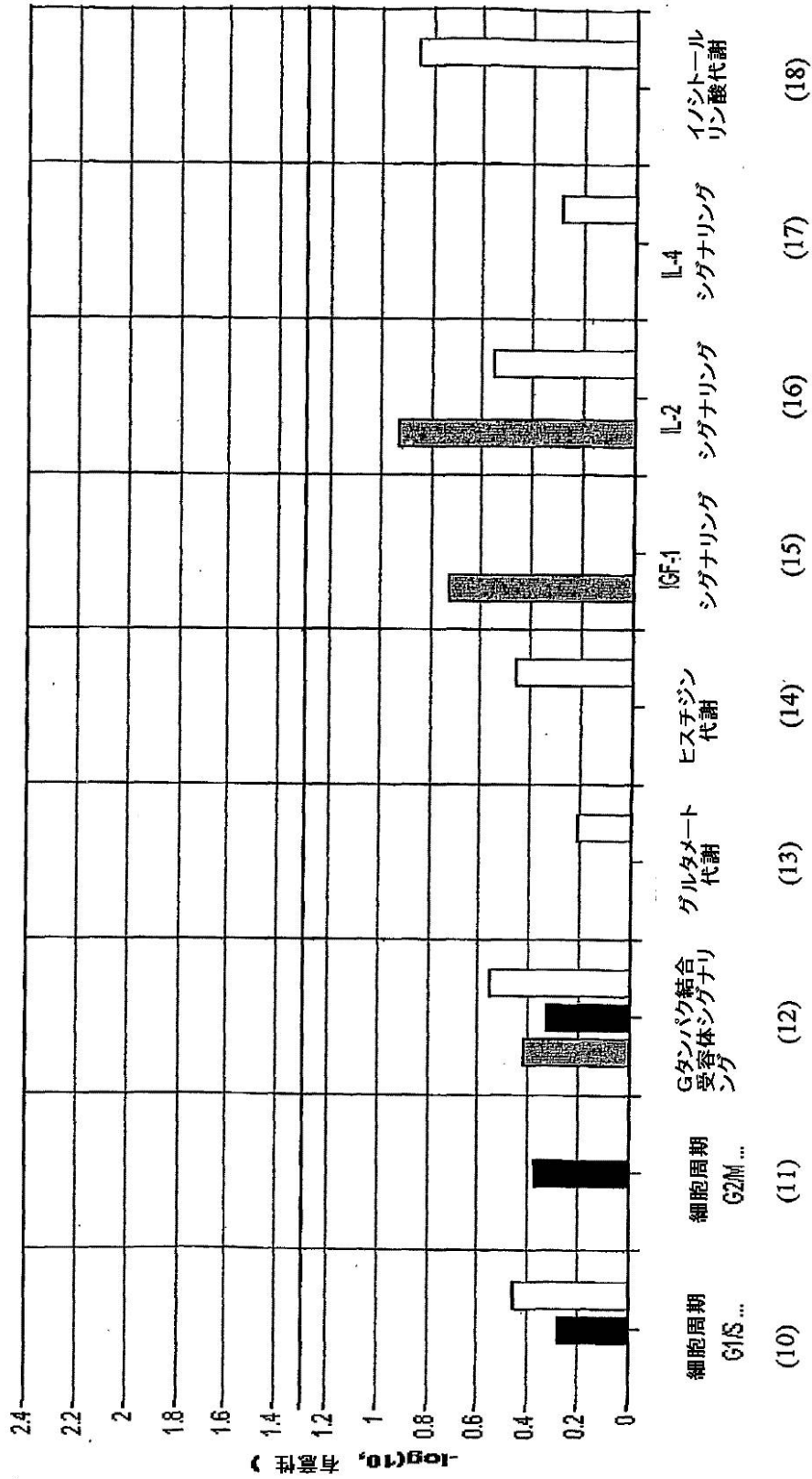


FIG. 1A (続き)

【 図 1 - 3 】

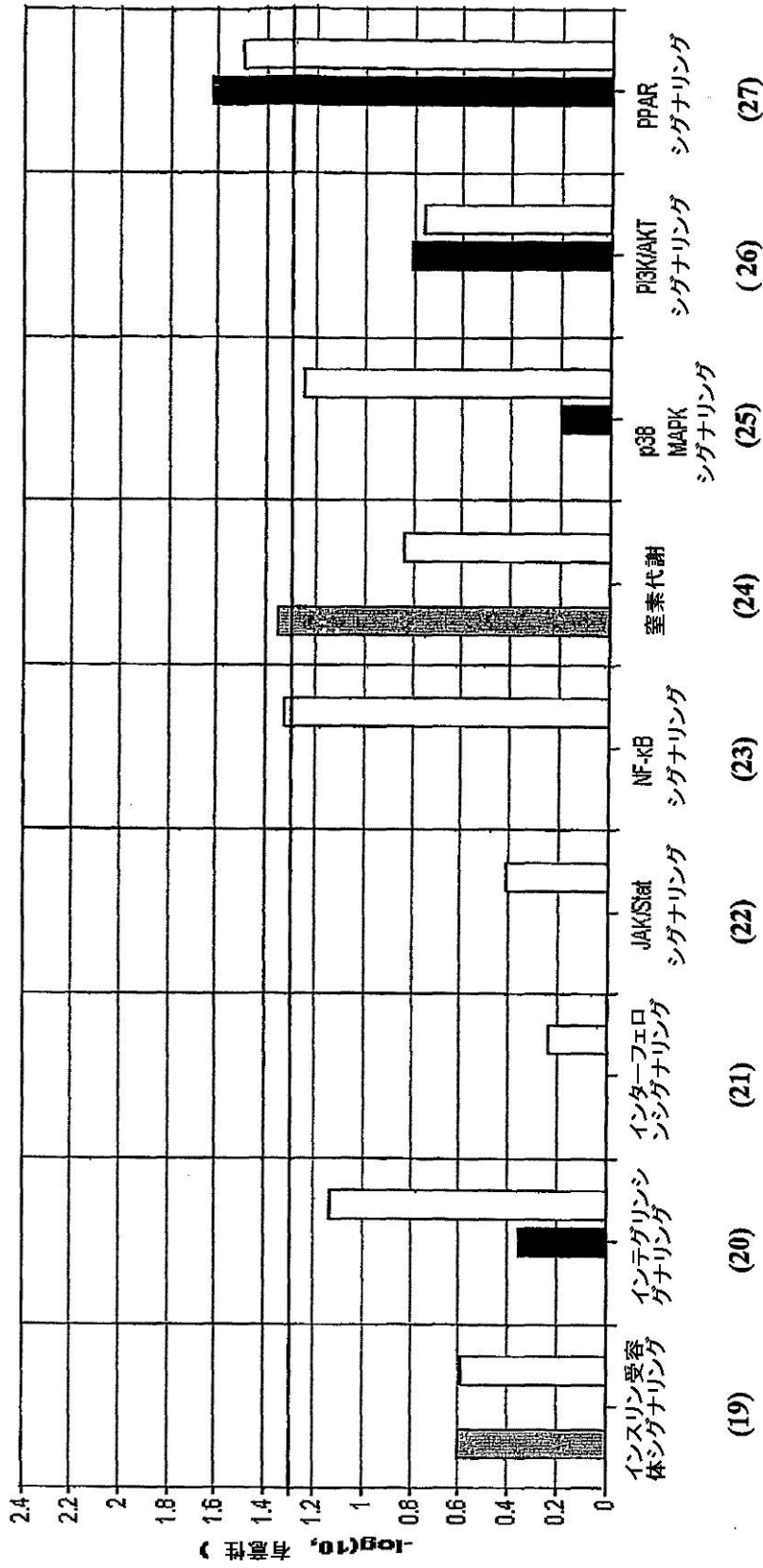


FIG. 1A (続き)

【 図 1 - 4 】

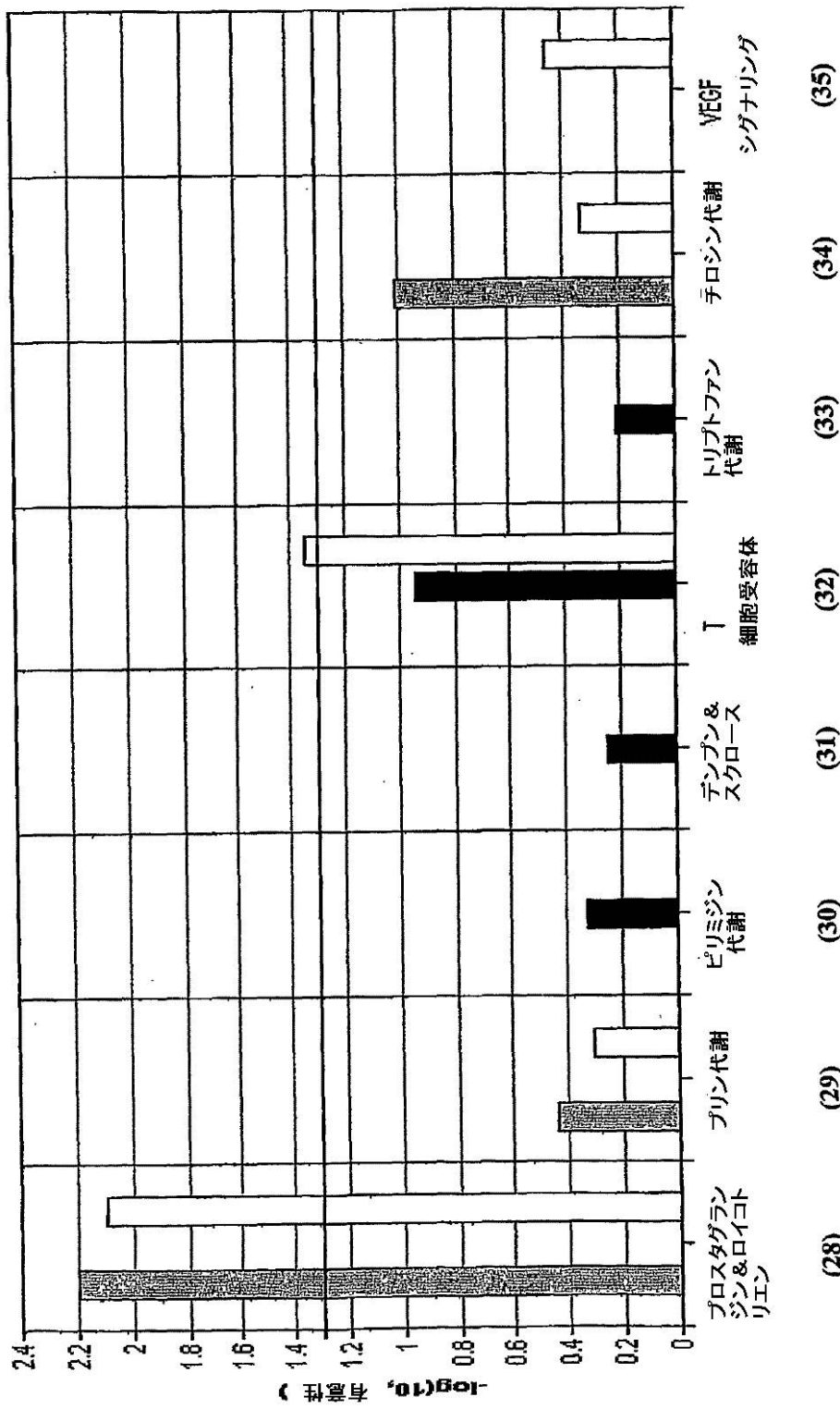


FIG. 1A (続き)

【 図 1 - 5 】

FIG. 1B

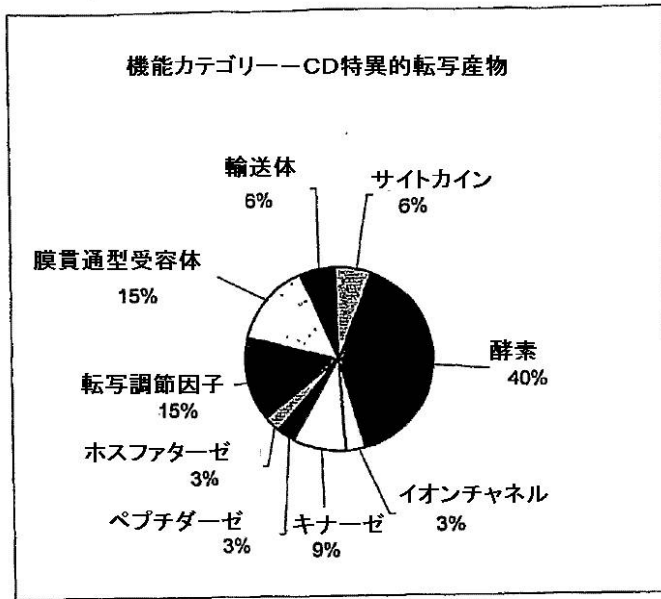
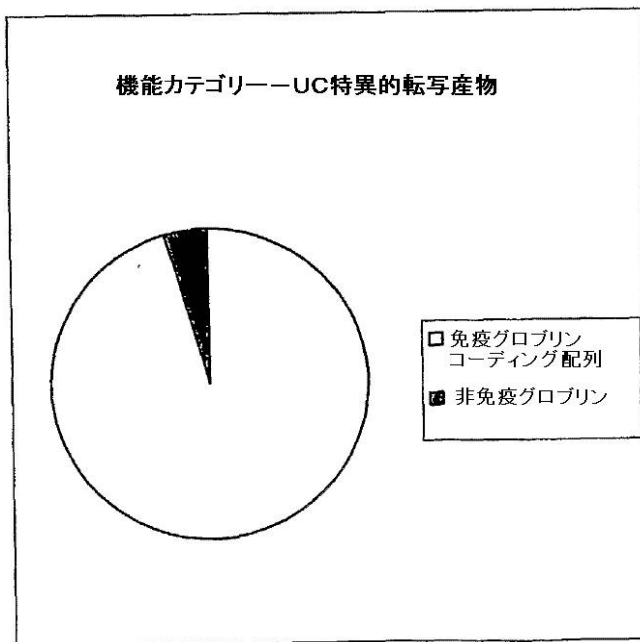


FIG. 1C



【 図 2 - 1 】

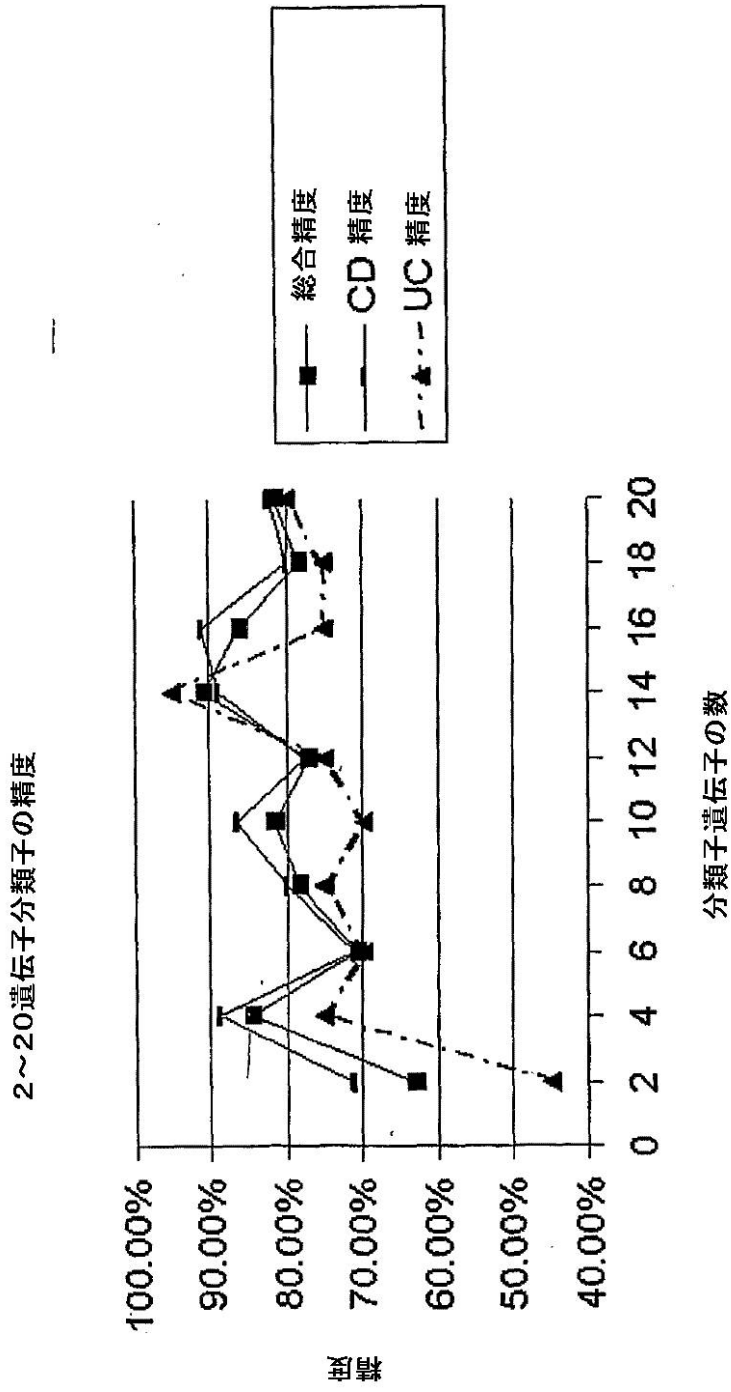
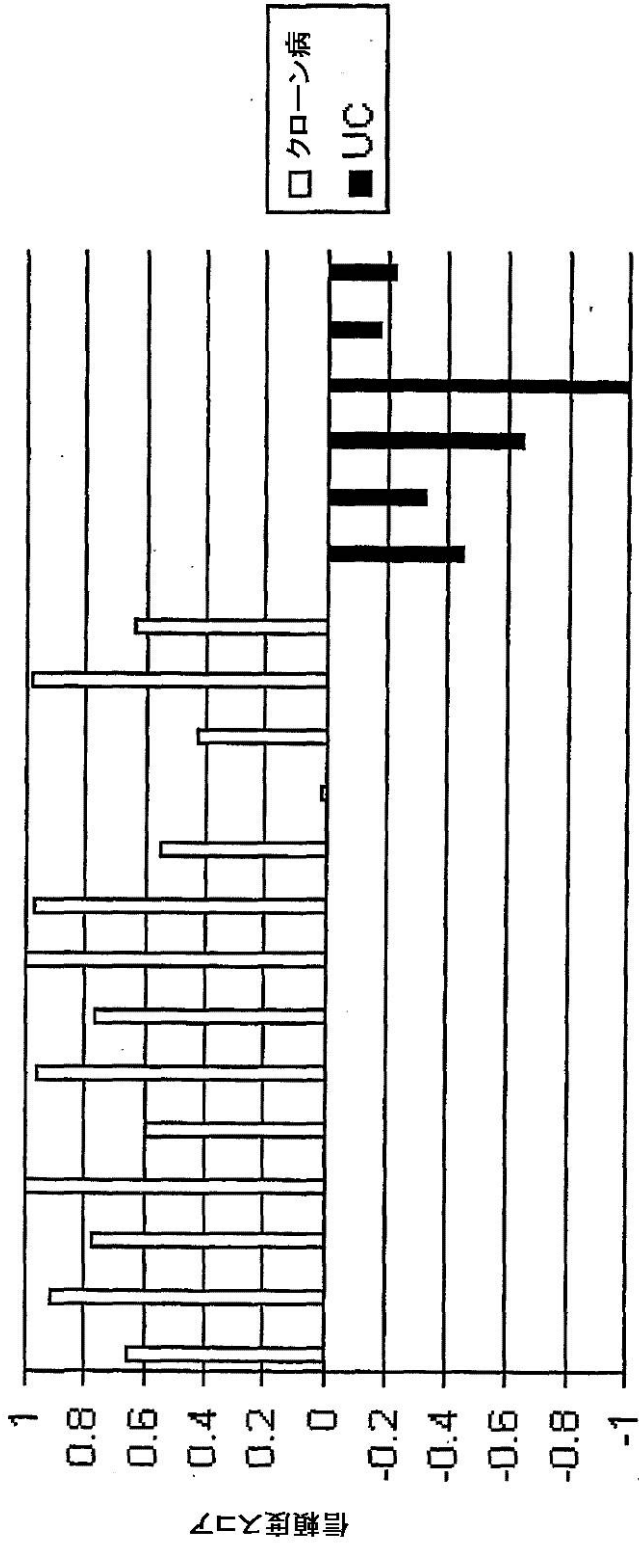


FIG. 2A

【図 2 - 2】



個々のPBMCサンプル

FIG. 2B

【図 3 - 1】

CDIにおける上昇倍率(UCと比較):

マイクロアレイ 対 リアルタイムPCR

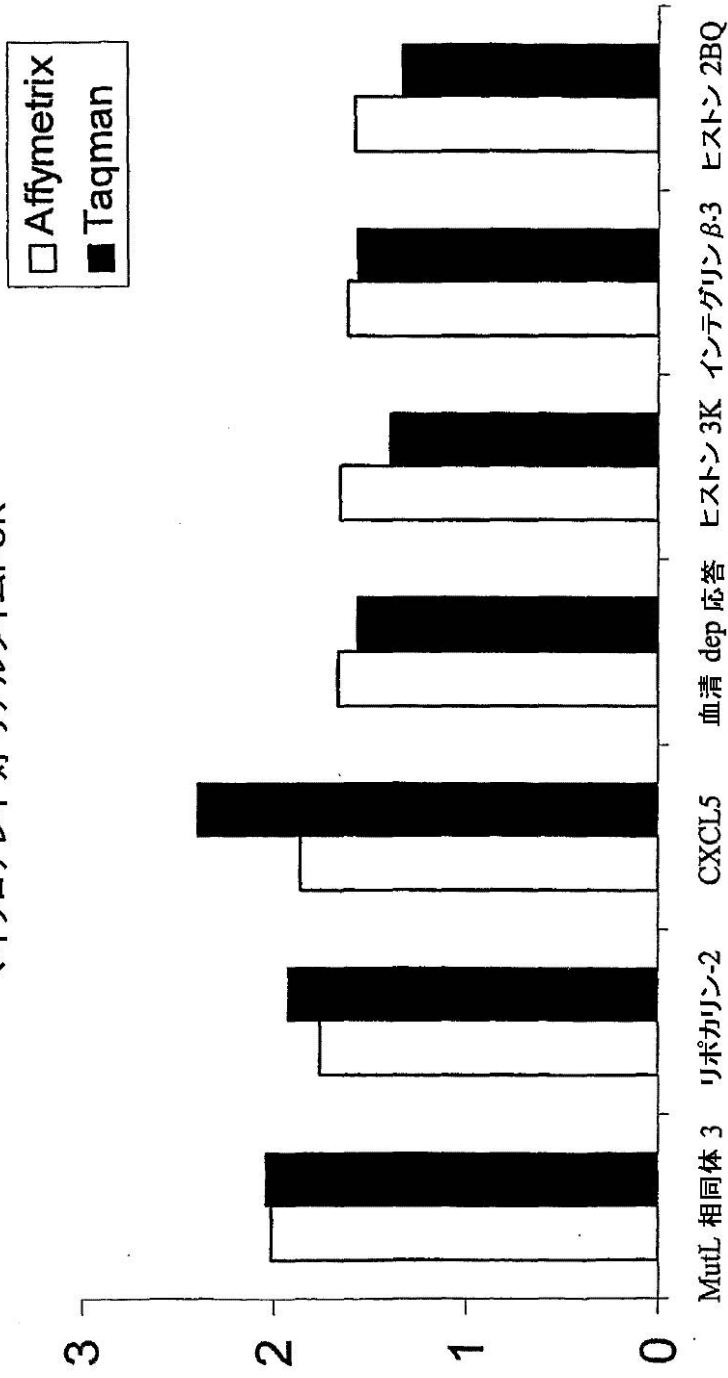


FIG. 3A

【 図 3 - 2 】

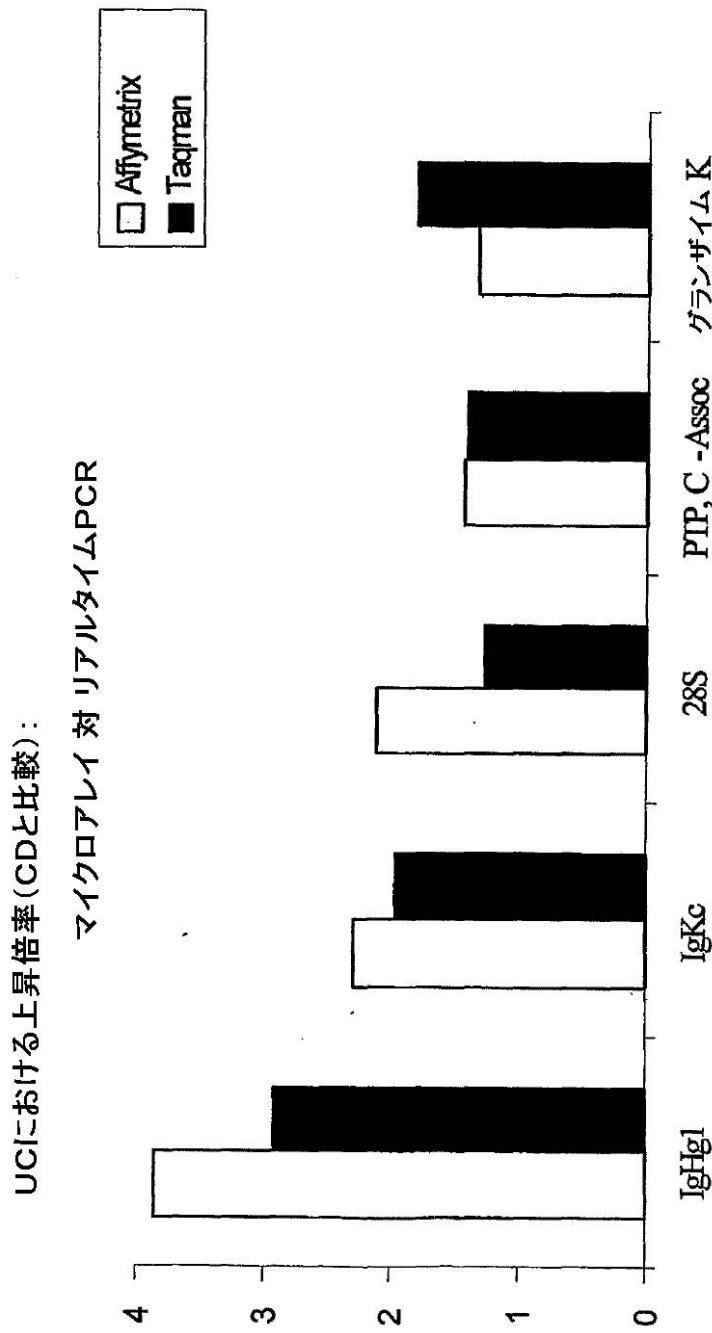


FIG. 3B

【図 4 - 1】

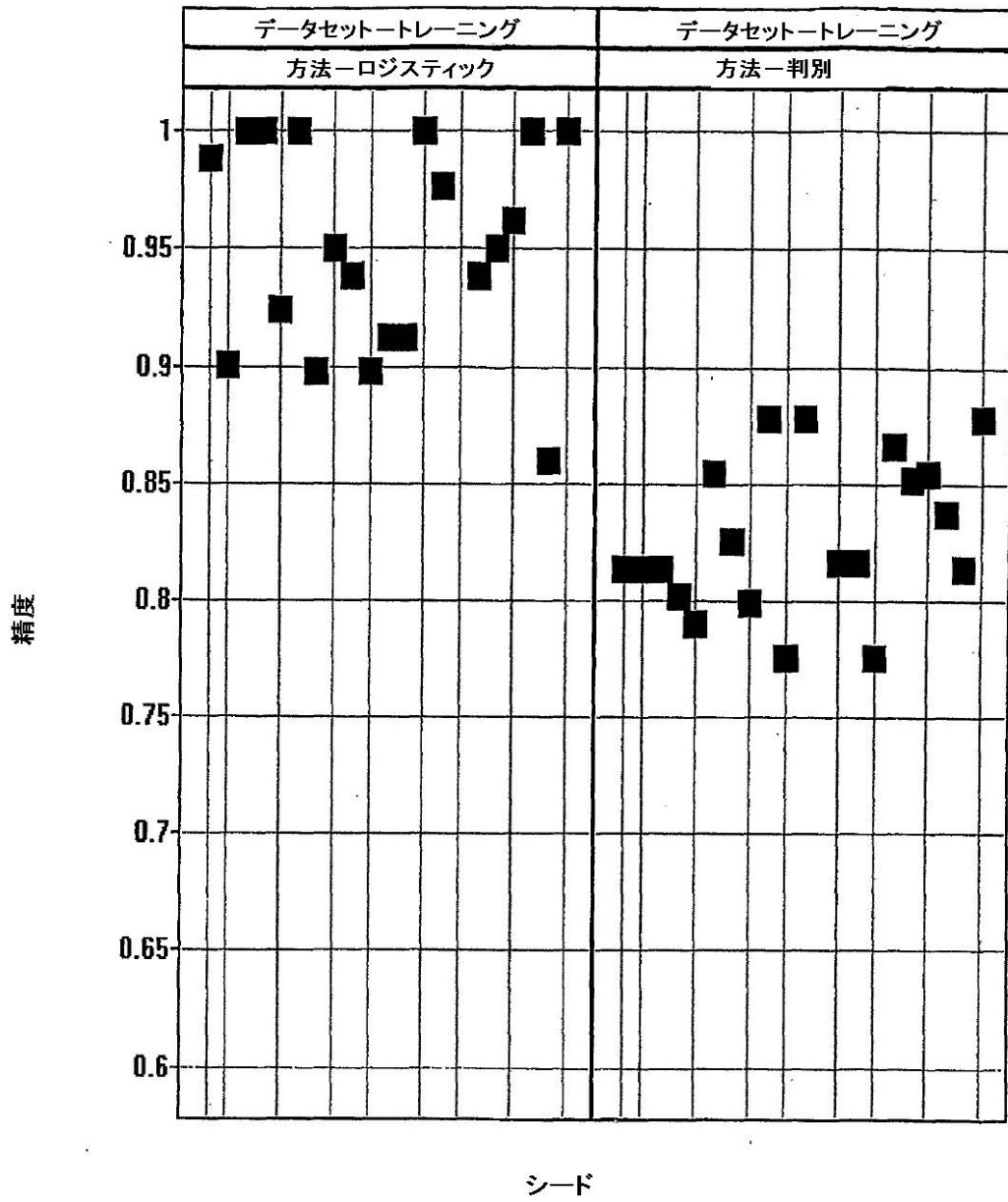


FIG. 4A

【 図 4 - 2 】

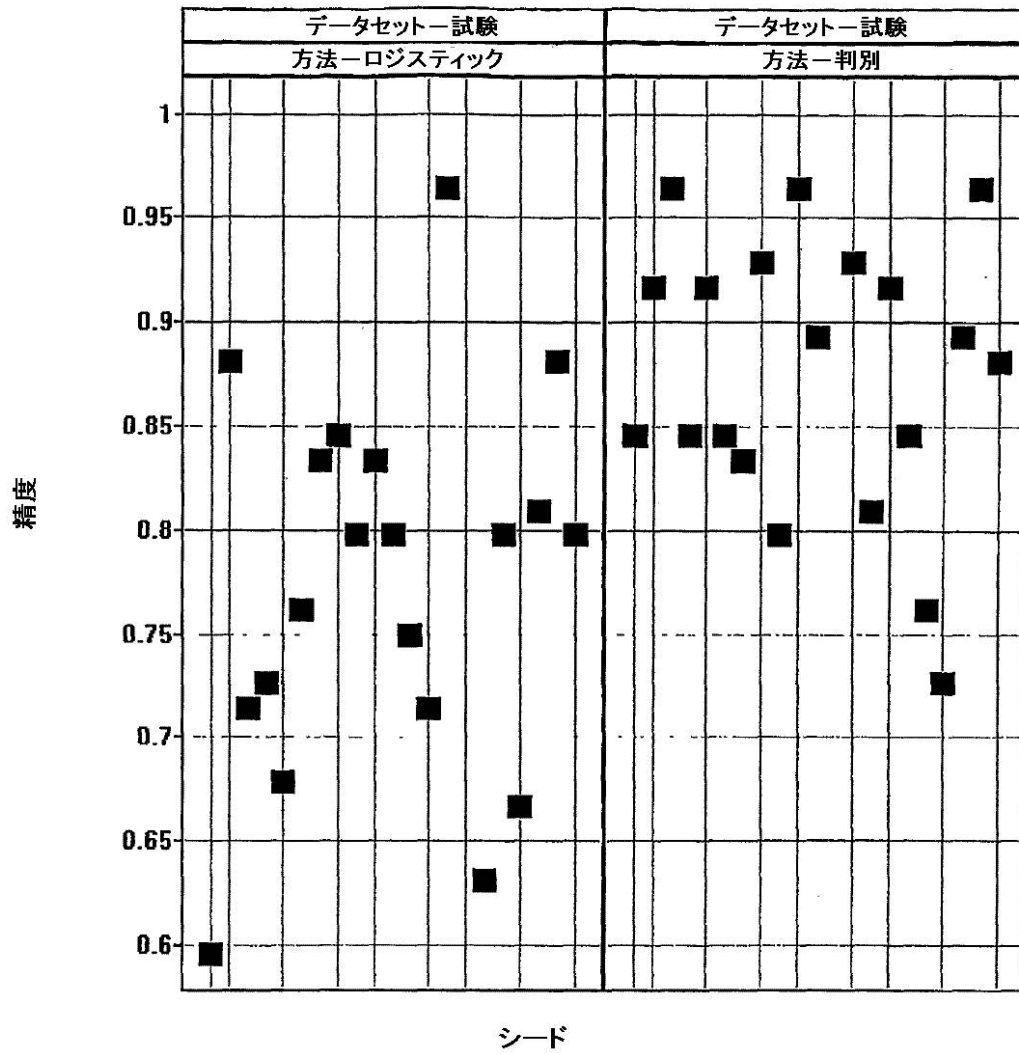


FIG. 4B

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/022102

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/059367 A (UNIV LOUISIANA STATE [US]; MANNICK ELIZABETH E [US]; LIU ZHIYUN [US];) 1 August 2002 (2002-08-01) the whole document	
A	MANNICK ELIZABETH E ET AL: "Gene expression in mononuclear cells from patients with inflammatory bowel disease." CLINICAL IMMUNOLOGY (ORLANDO, FLA.) SEP 2004, vol. 112, no. 3, September 2004 (2004-09), pages 247-257, XP002428614 ISSN: 1521-6616 the whole document ----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  10 April 2007		Date of mailing of the international search report  16/07/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Pinta, Violaine

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2006/022102

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MANNICK E E ET AL: "DETECTION OF POSSIBLE INFLAMMATORY BOWEL DISEASE-RELATED GENES USING MICROARRAY ANALYSIS" GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 120, no. 5, SUPPL 1, April 2001 (2001-04), page A455, XP001109428 ISSN: 0016-5085 the whole document</p>	
A	<p>WO 01/29269 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE [US]) 26 April 2001 (2001-04-26) the whole document</p>	
A	<p>EP 1 462 527 A (CONARIS RES INST AG [DE]) 29 September 2004 (2004-09-29) the whole document</p>	
A	<p>LAWRANCE ET AL.: "Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility" HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 5, 2001, pages 445-456, XP002955653 ISSN: 0964-6906 cited in the application the whole document</p>	
P, X	<p>BURCZYNSKI MICHAEL E ET AL: "Molecular classification of Crohn's disease and ulcerative colitis patients using transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells." THE JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS : JMD FEB 2006, vol. 8, no. 1, February 2006 (2006-02), pages 51-61, XP002428615 ISSN: 1525-1578 the whole document</p>	1-50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/US2006/022102**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-7, 10 (completely), 8, 9, 23 (partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /022102

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 10 (completely), 8, 9, 23 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease comprising detecting (a panel of) at least one PBMC- and IBD-associated biomarker(s), wherein said biomarker is PAI-2.

Inventions 2-45: claims 1-7 (completely), 8, 9, 23 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease comprising detecting (a panel of) at least one PBMC- and IBD-associated biomarker(s), wherein for invention 2 said biomarker is the second entry of Table 1 (Group I), for invention 3 said biomarker is the third entry of Table 1, and so forth i.e. for invention n said biomarker is the nth entry in Table 1.

Invention 46: claims 1-7, 13, 33, 34, 36-40 (completely), 11, 12, 23, 35 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease or Crohn's disease comprising detecting (a panel of) at least one PBMC- and IBD-associated biomarker(s), wherein said panel comprises at least one CD biomarker, wherein said biomarker is ALOX12.

Invention 47: claims 1-7, 14, 33, 34, 36-40 (completely), 11, 12, 23, 35 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease or Crohn's disease comprising detecting (a panel of) at least one PBMC- and IBD-associated biomarker(s), wherein said panel comprises at least one CD biomarker, wherein said biomarker is PTGDS.

Invention 48: claims 1-7, 15, 33, 34, 36-40 (completely), 11, 12, 23, 35 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease or Crohn's disease comprising detecting (a panel of) at least one biomarker(s), wherein said biomarker is lipocalin 2.

Inventions 49-113: claims 1-7, 14, 33, 34, 36-40 (completely), 11, 12, 23, 35 (partially)

International Application No. PCT/US2006 /022102

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Method for diagnosing inflammatory bowel disease or Crohn's disease comprising detecting (a panel of) at least one biomarker(s), wherein said biomarker is chosen amongst the markers of Group II (Table 2) except for ALOX12, PTGDS and lipocalin 2.

---

Invention 114: claims 1-7, 18, 24, 25, 27-32 (completely), 16, 17, 23, 26 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease or ulcerative colitis comprising detecting (a panel of) at least one biomarker(s), wherein said biomarker is IgHG3.

---

Inventions 115-135: claims 1-7, 24, 25, 27-32 (completely), 16, 17, 23 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease or ulcerative colitis comprising detecting (a panel of) at least one biomarker(s), wherein said biomarker is chosen amongst the markers of Group III (Table 3) except for IgHG3, wherein each entry of Table 3 corresponds to one of inventions 115-135, following the order of said Table.

---

Inventions 136-184: claims 1-7 (completely), 19, 20, 23 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease comprising detecting (a panel of) at least one biomarker(s), wherein said biomarker is chosen amongst the markers of Group IV (Table 4), wherein each entry of Table 4 corresponds to one of inventions 136-184, following the order of said Table.

---

Inventions 185-198: claims 1-7, 41, 42, 44-48 (completely), 21-23, 43, 49, 50 (partially)

Method for diagnosing inflammatory bowel disease or distinguishing between Crohn's disease and ulcerative colitis comprising detecting (a panel of) at least one biomarker(s), wherein said biomarker is chosen amongst the markers of Group V (Table 5), wherein each entry of Table 5 corresponds to one of inventions 185-198, following the order of said Table.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/022102

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02059367	A	01-08-2002	NONE
WO 0129269	A	26-04-2001	AU 784861 B2 06-07-2006 AU 2468501 A 30-04-2001 CA 2356207 A1 26-04-2001 EP 1287162 A2 05-03-2003
EP 1462527	A	29-09-2004	WO 2004085677 A2 07-10-2004

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 パースジンスキー, マイケル, イー.  
アメリカ合衆国, ペンシルバニア州 19426, カレッジビル, レッドコートロード 824

(72) 発明者 ピーターソン, ロン, エル.  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 01863, ノースケルムスフォード, キャッスルウッドドライブ 15

(72) 発明者 トワイン, ナタリー, シー.  
アメリカ合衆国, ニューハンプシャー州 03045, ゴッフスタウン, シャーリーヒルロード 379

(72) 発明者 ストラス, アンドリュー  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 01754, メイナード, マッキンリーストリート 30

(72) 発明者 イマーマン, フレデリック, ダブリュ.  
アメリカ合衆国, ニューヨーク州 10901, サッフアーン, ヘーバーストロウロード 194

(72) 発明者 シュワーツチュラグ, ウーリッチ  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 01915, ビバリーファームズ, ストーンリッジロード 3

(72) 発明者 コトロー, モネット, エム.  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 01720, アクトン, キャリッジドライブ 12

(72) 発明者 ドーナー, アンドリュー, ジェイ.  
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 02421, レキシントン, バスキンロード 20

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QQ42 QR32 QR56 QR62 QR77 QS25 QS34 QX02  
4C084 AA30 BA44 CA18 ZA662 ZA682

专利名称(译)	外周血单个核细胞在炎症性肠病中的表达谱		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008545437A</a>	公开(公告)日	2008-12-18
申请号	JP2008515865	申请日	2006-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	バースジンスキーマイケルイー ピーターソンロンエル トワインナタリーシー ストラスアンドリユー イーママンフレデリックダブリュ シュワーツチュラグウーリッチ コトローモネットエム ドーナードリユージェイ		
发明人	バースジンスキー,マイケル,イー. ピーターソン,ロン,エル. トワイン,ナタリー,シー. ストラス,アンドリユー イーママン,フレデリック,ダブリュ. シュワーツチュラグ,ウーリッチ コトロー,モネット,エム. ドーナードリユー,ジェイ.		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 A61K38/00 A61P1/04		
CPC分类号	A61P1/04 C12Q1/6883 C12Q2600/136 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.D A61K37/02 A61P1/04		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA30 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/ZA662 4C084/ZA682		
代理人(译)	小林 浩 片山英二 鈴木康仁		
优先权	60/687331 2005-06-06 US 60/692295 2005-06-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及鉴定可用于诊断炎症性肠病的PBMC和IBD相关生物标志物，并任选地区分从患有克罗恩病的患者分离的PBMC和从患有溃疡性结肠炎的患者分离的PBMC。本发明还涉及筛选方法，包括高通量筛选方法，用于能够调节PBMC-和IBD-相关生物标志物活性的调节剂。提供PBMC和IBD相关生物标志物的组合物，包括至少一种PBMC和IBD相关生物标志物的调节剂，用于诊断，预后，治疗干预和预防炎症性肠病，例如克罗恩病和溃疡性结肠炎的方法。。此外，本发明还涉及可用于评估测试化合物和疗法在治疗炎症性肠病（即克罗恩病或溃疡性结肠炎）中的功效的方法。

表1. 1群のPBMCおよびPBEDに開通するバイオマーカー: 共通バイオマーカー						
アンセクション	名称	開通方向	差倍率 CD vs. 正常	CD vs. 正常 ANOVA p-値	差倍率 UC vs. 正常	UC vs. 正常 ANOVA p-値
Hs.75716	ゼリン(またはシステイン) シロリン酸(または)大腸菌 シロリン酸(または)大腸菌 シロリン酸(または)大腸菌	↑	6.93	6.84E-12	3.35	3.87E-05
Hs.154654	シロリン酸(または)大腸菌 シロリン酸(または)大腸菌	↑	3.31	6.49E-10	2.37	2.81E-05
Hs.79516	細胞膜に存在する総 糖タンパク質	↑	1.94	6.81E-09	2.13	2.61E-09
Hs.177781	未知	↑	1.88	6.34E-08	1.92	3.99E-07
Hs.104624	アクリルアミド	↑	1.88	9.92E-06	2.02	9.06E-05
Hs.20084	レチノイド受容体, $\alpha$	↑	1.80	1.33E-06	1.68	9.18E-05
Hs.2161	糖体成分受容体1 (G1 リガンド)	↑	1.74	2.65E-05	1.81	5.05E-05
Hs.865	EGP1A, EAG2糖質転 移酵素	↑	1.64	5.95E-10	1.53	1.01E-06
Hs.177486	アミノ酸(AA)前駆タ ンパク質(C10H10N2O 5) (糖)	↑	1.63	6.11E-10	1.60	4.81E-08
Hs.198282	リン脂質 スクワンブラー ド1	↑	1.60	3.90E-05	1.76	1.09E-05
Hs.288555	EGP1A, EAG2糖質転 移酵素	↑	1.59	4.25E-10	1.51	2.75E-07
Hs.101695	EGP1A, EAG2糖質転 移酵素	↑	1.57	2.72E-14	1.51	1.08E-10
Hs.198282	リン脂質 スクワンブラー ド1	↑	1.56	1.02E-05	1.55	7.12E-05
Hs.285313	アミノ酸(AA)前駆タ ンパク質(C10H10N2O 5) (糖)	↓	2.78	8.63E-05	5.65	9.23E-09
Hs.151411	KIAA0916 タンパク質	↓	2.47	7.92E-05	3.21	6.01E-06
Hs.20072	アミノ酸(AA)前駆タ ンパク質(C10H10N2O 5) (糖)	↓	2.45	3.21E-07	2.47	2.73E-06
Hs.81248	EGP1A, EAG2糖質転 移酵素	↓	2.44	8.74E-08	2.52	4.84E-07
Hs.211610	EGP1A, EAG2糖質転 移酵素	↓	2.27	5.40E-06	2.62	1.77E-06
Hs.86896	プロトミエリン含有3	↓	2.24	1.22E-06	2.26	8.83E-06