

(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2015-522246
(P2015-522246A)

(43) 公表日 平成27年8月6日(2015. 8. 6)

(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 Z N A A	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-503288 (P2015-503288)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月26日 (2014. 11. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/031178
 (87) 国際公開番号 W02013/148232
 (87) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/616, 394
 (32) 優先日 平成24年3月27日 (2012. 3. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/707, 411
 (32) 優先日 平成24年9月28日 (2012. 9. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 アップバス, アレクサンダー アール.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー
 ジェネンテック, インコーポレイテッ
 ド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特発性肺線維症の予後予測、診断および処置の方法

(57) 【要約】

患者における特発性肺線維症の予後を判定するための組成物、キットおよび方法が提供される。さらに、特発性肺線維症のサブタイプを診断するための組成物、キットおよび方法が提供される。特発性肺線維症を処置するための方法も提供される。

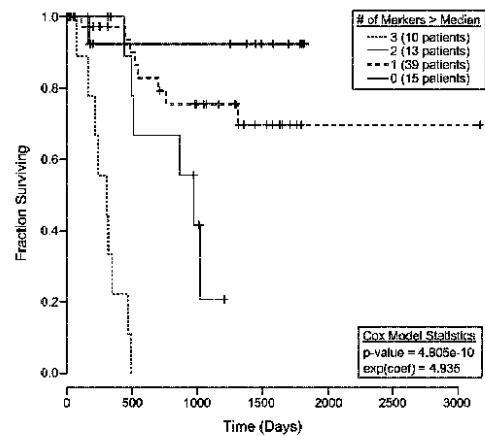


FIG. 8

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における特発性肺線維症（IPF）を予後予測するかまたは予後予測を援助する方法であって、患者から生体試料を得ることと、生体試料中の遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現を測定することとを含み、遺伝子の1つまたは組み合わせが、表2、表3、表4または表5のいずれかから選択され、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現レベルの上昇またはタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現レベルの上昇が、生存期間中央値と比較して短くなった生存期間についての予後予測を示し、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現レベルの低減またはタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現レベルの低減が、生存期間中央値と比較して増加した生存期間についての予後予測を示す方法。

10

【請求項 2】

遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせが、MUC1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3およびSAA4から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

遺伝子の1つまたは組み合わせが、CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1（CD20）、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8、IGHMから選択される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 4】

遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせが、COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF（CLEC11A）；LOXL1、LOXL2；GLI1、GLI2、SMO；SFRP2、DIO2、CDH11、POSTNおよびTGFB3から選択される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 5】

遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせが、CHI3L1（YKL-40）、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4（構成性SAA）、POSTN、およびSPP1（OPN）から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせが、MMP3およびSAA4（構成性SAA）から選択される、請求項5に記載の方法。

40

【請求項 7】

遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせが、YKL-40およびCCL18から選択される、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

CXCL13の発現レベルを測定することを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項 9】

MMP3の発現レベルを測定することを含む、請求項5に記載の方法。

【請求項 10】

SAA4（構成性SAA）の発現レベルを測定することを含む、請求項5に記載の方法

50

。

【請求項 1 1】

患者が、免疫調節治療を受けている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 1 2】

生体試料が、肺組織、血清および血漿から選択される、請求項 1 ないし 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

患者における I P F を予後予測するかまたは予後予測を援助する方法であって、患者から生体試料を得ることと、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することとを含み、

全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、C X C L 1 3、O P N および C O M P の少なくとも 1 つのタンパク質発現レベルを測定することと、発現レベルが、それぞれ C X C L 1 3、O P N および C O M P についての中央値より下であるならば 0 のスコアを割り当てることと、発現レベルが、それぞれ C X C L 1 3、O P N および C O M P についての中央値より上であるならば 1 のスコアを割り当てることとを含み、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、Y K L - 4 0 のタンパク質発現レベルを測定することと、発現レベルが、Y K L - 4 0 についての中央値より下であるならば 0 のスコアを割り当てることと、発現レベルが、Y K L - 4 0 についての中央値より上であるならば 1 のスコアを割り当てることとをさらに含み、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、各個別のスコアを加算して全ベースラインバイオマーカースコアを得ることをさらに含み、

2 以上の全ベースラインバイオマーカースコアが、生存期間中央値と比較して短くなった生存期間の予後予測を示し、0 または 1 の全ベースラインバイオマーカースコアが、生存期間中央値と比較して増加した生存期間の予後予測を示す、方法。

【請求項 1 4】

患者の全ベースラインバイオマーカースコアが 2 以上であり、患者が、臨床研究における候補治療剤での処置のために選択され、候補治療剤が、抗 I L - 1 3 剤、抗 I L - 4 剤、組み合わせ抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤、ピルフェニドン、抗 L O X L 2 抗体 (G S - 6 6 2 4)、N - アセチルシステイン、抗 T G F - 抗体 (G C 1 0 0 8)、抗 v 6 インテグリン抗体 (S T X - 1 0 0)、抗 C T G F 抗体 (F G - 3 0 1 9)、抗 C C L 2 抗体 (C N T O 8 8 8)、ソマトスタチンアナログ (S O M 2 3 0、オクトレオチド)、アンジオテンシン I I 阻害剤 (ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤 (B I B F 1 1 2 0) から選択される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

抗 I L - 1 3 剤が、レプリキズマブである、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

抗 I L - 1 3 剤が、3 つの重鎖 C D R、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 と、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3、および 3 つの軽鎖 C D R、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R - L 2 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R - L 3 を含む抗 I L - 1 3 抗体である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 7】

抗 I L - 1 3 抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

抗 I L - 1 3 抗体が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤が、二重特異性抗体である、請求項 1 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

患者における I P F を予後予測するかまたは予後予測を援助する方法であって、患者から生体試料を得ることと、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することとを含み、

全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、MMP 3 および COMP の少なくとも 1 つのタンパク質発現レベルを測定することと、発現レベルが、それぞれ MMP 3 および COMP についての中央値より下であるならば 0 のスコアを割り当てることと、発現レベルが、それぞれ MMP 3 および COMP についての中央値より上であるならば 1 のスコアを割り当てることとを含み、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、YKL - 40 のタンパク質発現レベルを測定することと、発現レベルが、YKL - 40 についての中央値より下であるならば 0 のスコアを割り当てることと、発現レベルが、YKL - 40 についての中央値より上であるならば 1 のスコアを割り当てることとをさらに含み、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、各個別のスコアを加算して全ベースラインバイオマーカースコアを得ることをさらに含み、

1 以上の全ベースラインバイオマーカースコアが、生存期間中央値と比較して短くなった生存期間の予後予測を示し、0 の全ベースラインバイオマーカースコアが、生存期間中央値と比較して増加した生存期間の予後予測を示す、方法。

【請求項 21】

生体試料が、血清および血漿から選択される、請求項 13 ないし 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

患者の全ベースラインバイオマーカースコアが、1 以上であり、患者が、臨床研究における候補治療剤での処置のために選択され、候補治療剤が、抗 IL - 13 剤、抗 IL - 4 剤、組み合わせ抗 IL - 13 / 抗 IL - 4 剤、ピルフェニドン、抗 LOXL2 抗体 (GS - 6624)、N - アセチルシステイン、抗 TGF - 抗体 (GC1008)、抗 v 6 インテグリン抗体 (STX - 100)、抗 CTGF 抗体 (FG - 3019)、抗 CCL2 抗体 (CNT0888)、ソマトスタチンアナログ (SOM230、オクトレオチド)、アンジオテンシン II 阻害剤 (ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤 (BIBF1120) から選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

抗 IL - 13 剤が、レプリキズマブである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

抗 IL - 13 / 抗 IL - 4 剤が、二重特異性抗体である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

抗 IL - 13 剤が、3 つの重鎖 CDR、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する CDR - H1 と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する CDR - H2 と、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する CDR - H3、および 3 つの軽鎖 CDR、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する CDR - L1 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する CDR - L2 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する CDR - L3 を含む抗 IL - 13 抗体である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

抗 IL - 13 抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

抗 IL - 13 抗体が、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 14 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

対象における I P F の分子サブタイプを診断する方法であって、対象から得られた生体試料中の遺伝子の 1 つもしくは組み合わせの発現、または遺伝子の 1 つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の 1 つもしくは組み合わせの発現を測定することを含み

10

20

30

40

50

、遺伝子の1つまたは組み合わせが、MUC L 1、MUC 4、MUC 2 0、PRR 7、PRR 1 5、SPRR 1 B、SPRR 2 D、KRT 5、KRT 6 B、KRT 1 3、KRT 1 4、KRT 1 5、KRT 1 7、SERP INB 3、SERP INB 4、SERP INB 5、SERP INB 1 3、CLCA 2、TRPV 4、BBS 5、MMP 3およびSAA 4から選択され、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、またはタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現の上昇が、IPF分子サブタイプを示す、方法。

【請求項 2 9】

対象におけるIPFの分子サブタイプを診断する方法であって、対象から得られた生体試料中の遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現を測定することを含み、遺伝子の1つまたは組み合わせが、CXCR 3、CXCR 5、CXCL 1 3、CCR 6、CCR 7、CD 1 9、MS 4 A 1 (CD 2 0)、TNFRSF 1 7 (BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL 2、FCRL 5、CD 7 9 A、CD 7 9 B、CD 2 7、CD 2 8、CD 1 A、CD 1 B、CD 1 C、CD 1 E、IGHV 1 - 6 9、IGL J 3、IGJ、IGHV 3 - 4 8、IGLV 3 - 2 1、IGKV 1 - 5、IGHG 1、IGKC、IGLV 6 - 5 7、IGK@ (免疫グロブリンカッパ遺伝子座)、IGHA 1、IGKV 2 - 2 4、IGKV 1 D - 8、IGHMから選択され、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、またはタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現の上昇が、IPF分子サブタイプを示す、方法。

10

【請求項 3 0】

対象におけるIPFの分子サブタイプを診断する方法であって、対象から得られた生体試料中の遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現を測定することを含み、遺伝子の1つまたは組み合わせが、COL 1 A 1、COL 1 A 2、COL 5 A 2、COL 1 2 A 1、COL 1 4 A 1、COL 1 5 A 1、COL 1 6 A 1、COL 1 8 A 1、CTHRC 1、HGF、IGFBP 7、SCGF (CLEC 1 1 A) ; LOXL 1、LOXL 2 ; GLI 1、GLI 2、SMO ; SFRP 2、DIO 2、CDH 1 1、POSTNおよびTGFB 3から選択され、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、またはタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現の上昇が、IPF分子サブタイプを示す、方法。

20

【請求項 3 1】

生体試料が、肺組織、全血または血清である、請求項 2 8 ないし 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 2】

生体試料が、肺組織、血漿または全血であり、遺伝子の1つまたは組み合わせの発現が、PCR法またはマイクロアレイチップを用いて測定される、請求項 1 2、2 1 または 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

生体試料が、血清であり、タンパク質の1つまたは組み合わせの発現が、免疫アッセイを用いて測定される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

患者におけるIPFを処置する方法であって、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現が、患者から得られた生体試料中で検出されたことを条件として、有効量のIPF治療剤を患者に投与してIPFを処置することを含み、遺伝子の1つまたは組み合わせが、MUC L 1、MUC 4、MUC 2 0、PRR 7、PRR 1 5、SPRR 1 B、SPRR 2 D、KRT 5、KRT 6 B、KRT 1 3、KRT 1 4、KRT 1 5、KRT 1 7、SERP INB 3、SERP INB 4、SERP INB 5、SERP INB 1 3、CLCA 2、TRPV 4、BBS 5、MMP 3およびSAA 4から選択される、方法。

40

【請求項 3 5】

50

患者におけるIPFを処置する方法であって、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現が、患者から得られた生体試料中で検出されたことを条件として、有効量のIPF治療剤を患者に投与してIPFを処置することを含み、遺伝子の1つまたは組み合わせが、CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1(CD20)、TNFRSF17(BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@ (免疫グロブリンカッパ遺伝子座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8、IGHMから選択される、方法。

10

【請求項36】

患者におけるIPFを処置する方法であって、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現が、患者から得られた生体試料中で検出されたことを条件として、有効量のIPF治療剤を患者に投与してIPFを処置することを含み、遺伝子の1つまたは組み合わせが、COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF(CLEC11A)；LOXL1、LOXL2；GLI1、GLI2、SMO；SFRP2、DIO2、CDH11、POSTNおよびTGFB3から

20

【請求項37】

IPF治療剤が、抗IL-13剤、抗IL-4剤、組み合わせ抗IL-13/抗IL-4剤、ピルフェニドン、抗LOXL2抗体(GS-6624)、N-アセチルシステイン、抗TGF-β抗体(GC1008)、抗α6インテグリン抗体(STX-100)、抗CTGF抗体(FG-3019)、抗CCl2抗体(CNT0888)、ソマトスタチンアナログ(SOM230、オクトレオチド)、アンジオテンシンII阻害剤(ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤(BIBF1120)から選択される、請求項34ないし36のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項38】

IPF治療剤が、抗IL-13剤であり、IL-13剤が、抗IL-13抗体であり、抗IL-13抗体が、レプリキズマブである、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

抗IL-13剤が、3つの重鎖CDR、配列番号1のアミノ酸配列を有するCDR-H1と、配列番号2のアミノ酸配列を有するCDR-H2と、配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR-H3、および3つの軽鎖CDR、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR-L3を含む抗IL-13抗体である、請求項37に記載の方法。

40

【請求項40】

抗IL-13抗体が、配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

抗IL-13抗体が、配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号14のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

抗IL-13抗体が、4週間ごとに1回、125mg、250mgおよび500mgから選択される均一用量にて皮下投与される、請求項38ないし41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

50

抗 I L - 1 3 抗体が、4 週間ごとに 1 回、2 5 0 m g の均一用量にて皮下投与される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

I P F 治療剤が、組み合わせ抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 5】

抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤が、二重特異性抗体である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

請求項 1 ないし 1 3、2 0 または 2 1 のいずれか一項に記載の方法に従って短くなった生存期間の予後予測を有すると以前に決定された I P F 患者を処置する方法であって、有効量の I P F 治療剤を投与することを含む方法。

10

【請求項 4 7】

I P F 治療剤が、抗 I L - 1 3 剤、抗 I L - 4 剤、組み合わせ抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤、ピルフェニドン、抗 L O X L 2 抗体 (G S - 6 6 2 4)、N - アセチルシステイン、抗 T G F - 抗体 (G C 1 0 0 8)、抗 v 6 インテグリン抗体 (S T X - 1 0 0)、抗 C T G F 抗体 (F G - 3 0 1 9)、抗 C C L 2 抗体 (C N T O 8 8 8)、ソマトスタチンアナログ (S O M 2 3 0、オクトレオチド)、アンジオテンシン I I 阻害剤 (ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤 (B I B F 1 1 2 0) から選択される、請求項 4 6 に記載の方法

20

【請求項 4 8】

抗 I L - 1 3 剤が、レプリキズマブである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

抗 I L - 1 3 剤が、3 つの重鎖 C D R、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 と、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3、および 3 つの軽鎖 C D R、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R - L 2 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R - L 3 を含む抗 I L - 1 3 抗体である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

抗 I L - 1 3 抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、請求項 4 9 に記載の方法。

30

【請求項 5 1】

抗 I L - 1 3 抗体が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

抗 I L - 1 3 抗体が、4 週間ごとに 1 回、1 2 5 m g、2 5 0 m g および 5 0 0 m g から選択される均一用量にて皮下投与される、請求項 4 8 ないし 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

抗 I L - 1 3 抗体が、4 週間ごとに 1 回、2 5 0 m g の均一用量にて皮下投与される、請求項 5 2 に記載の方法。

40

【請求項 5 4】

I P F 患者を処置する方法であって、患者が、請求項 1 3 に記載の方法に従って決定された 2 以上のベースラインスコアを有することを条件として、有効量の I P F 治療剤を投与することを含む方法。

【請求項 5 5】

I P F 患者を処置する方法であって、患者が、請求項 2 0 に記載の方法に従って決定された 1 以上のベースラインスコアを有することを条件として、有効量の I P F 治療剤を投与することを含む方法。

【請求項 5 6】

50

I P F 治療剤が、抗 I L - 1 3 剤、抗 I L - 4 剤、組み合わせ抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤、ピルフェニドン、抗 L O X L 2 抗体 (G S - 6 6 2 4)、N - アセチルシステイン、抗 T G F - 抗体 (G C 1 0 0 8)、抗 v 6 インテグリン抗体 (S T X - 1 0 0)、抗 C T G F 抗体 (F G - 3 0 1 9)、抗 C C L 2 抗体 (C N T O 8 8 8)、ソマトスタチンアナログ (S O M 2 3 0、オクトレオチド)、アンジオテンシン I I 阻害剤 (ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤 (B I B F 1 1 2 0) から選択される、請求項 5 4 または請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

抗 I L - 1 3 剤が、レプリキズマブである、請求項 5 6 に記載の方法。

10

【請求項 5 8】

抗 I L - 1 3 剤が、3 つの重鎖 C D R、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 と、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3、および 3 つの軽鎖 C D R、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R - L 2 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R - L 3 を含む抗 I L - 1 3 抗体である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

抗 I L - 1 3 抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

20

抗 I L - 1 3 抗体が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

抗 I L - 1 3 抗体が、4 週間ごとに 1 回、1 2 5 m g、2 5 0 m g および 5 0 0 m g から選択される均一用量にて皮下投与される、請求項 5 7 ないし 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 2】

抗 I L - 1 3 抗体が、4 週間ごとに 1 回、2 5 0 m g の均一用量にて皮下投与される、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

30

I P F 治療剤が、組み合わせ抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 6 4】

抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤が、二重特異性抗体である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

処置が、処置なしと比較して、疾患進行までの時間を延長し、疾患進行が、以下の 1 つまたは複数の最初の発生により示される：(i) 死亡；(i i) 非待機入院；(i i i) F V C のベースラインから 1 0 % 以上の減少、請求項 3 4 ないし 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

40

疾患進行が、第 5 2 週にて D L c o のベースラインから 1 5 % の減少によりさらに示される、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

処置後 5 2 週間でベースラインからの D L c o の減少が 1 5 % 未満である、請求項 3 4 ないし 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 8】

処置が、処置なしと比較して、処置後 5 2 週間で 6 分間歩行試験において患者が歩く距離のベースラインからの低下のより少ない低減をもたらす、請求項 3 4 ないし 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 9】

50

歩く距離のベースラインからの低下の低減が、50メートルより大きいか、または30メートルより大きいか、または10メートルより大きい、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

処置が、処置なしと比較して、急性IPF増悪の最初の事象またはIPF悪化の最初の事象までの時間を延長する、請求項34ないし64のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

IPF患者における疾患進行をモニタリングする方法であって、第1の時点および1つまたは複数のさらなる時点にて患者から生体試料を得ること、生体試料中の遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現を測定することを含み、遺伝子の1つまたは組み合わせが、表2、表3、表4または表5のいずれかから選択され、第1の時点から1つまたは複数のさらなる時点までの発現レベルの変化が、疾患進行を示す、方法。

10

【請求項72】

遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせが、MUC1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3およびSAA4から選択される、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

遺伝子の1つまたは組み合わせが、CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1(CD20)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8、IGHMから選択される、請求項71に記載の方法。

20

【請求項74】

遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせが、COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF(CLEC11A)；LOXL1、LOXL2；GLI1、GLI2、SMO；SFRP2、DIO2、CDH11、POSTNおよびTGFB3から選択される、請求項71に記載の方法。

30

【請求項75】

遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせが、CHI3L1(YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4(構成性SAA)、POSTN、およびSPP1(OPN)から選択される、請求項71に記載の方法。

【請求項76】

生体試料が、肺組織、血清および血漿から選択される、請求項71ないし75のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項77】

生体試料が、肺組織または血漿であり、遺伝子の1つまたは組み合わせの発現が、PCR法またはマイクロアレイチップを用いて測定される、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

生体試料が、血清であり、タンパク質の1つまたは組み合わせの発現が、免疫アッセイを用いて測定される、請求項76に記載の方法。

【請求項79】

患者を臨床研究において候補治療剤で処置することをさらに含む、請求項71ないし78のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 80】

候補治療剤が、抗 I L - 1 3 剤、抗 I L - 4 剤、組み合わせ抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤、ピルフェニドン、抗 L O X L 2 抗体 (G S - 6 6 2 4)、N - アセチルシステイン、抗 T G F - 抗体 (G C 1 0 0 8)、抗 v 6 インテグリン抗体 (S T X - 1 0 0)、抗 C T G F 抗体 (F G - 3 0 1 9)、抗 C C L 2 抗体 (C N T O 8 8 8)、ソマトスタチンアナログ (S O M 2 3 0、オクトレオチド)、アンジオテンシン I I 阻害剤 (ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤 (B I B F 1 1 2 0) から選択される、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

抗 I L - 1 3 剤が、レプリキズマブである、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

抗 I L - 1 3 剤が、3つの重鎖 C D R、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 と、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3、および 3つの軽鎖 C D R、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R - L 2 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R - L 3 を含む抗 I L - 1 3 抗体である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 83】

抗 I L - 1 3 抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む、請求項 82 に記載の方法。

【請求項 84】

抗 I L - 1 3 抗体が、配列番号 10 のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 14 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む、請求項 83 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年3月27日に出願された米国仮特許出願第 61 / 616, 394 号および 2012年9月28日に出願された米国仮特許出願第 61 / 707, 411 号 (これらはともに本明細書に参照によりそれらの全体が組み込まれている) の優先権の利益を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで E F S - W e b を通して提出され、本明細書に参照によりその全体が組み込まれている配列表を含む。2013年3月6日に作成された前記 A S C I I コピーは、P 4 8 4 1 R 1 _ S e q u e n c e L i s t i n g . t x t との名称であり、22, 866 バイトのサイズである。

【0003】

患者における特発性肺線維症の予後を判定するための組成物、キットおよび方法が提供される。さらに、特発性肺線維症のサブタイプを診断するための組成物、キットおよび方法が提供される。特発性肺線維症を処置するための方法も提供される。

【背景技術】

【0004】

特発性肺線維症 (I P F) は、肺実質の進行性間質性線維症を特徴とし、米国でおよそ 100, 000 名の患者に影響する拘束性肺疾患である (R a g h u ら、A m J R e s p i r C r i t C a r e M e d 174 : 810 ~ 816 頁 (2006))。I P F に関連するこの間質性線維症は、肺機能の進行性の喪失を導き、ほとんどの患者において呼吸不全による死をもたらす。診断時からの生存期間中央値は、2 ~ 3 年である (R a g h u ら、A m J R e s p i r C r i t C a r e M e d 183 : 788 ~ 824 頁 (2011))。I P F の病因ならびに重要な分子的小および病態生理学的駆動因子は

10

20

30

40

50

、わかっていない。IPF患者における生存期間を延長することが示された唯一の処置は、肺移植である(Thabutら、Annals of internal medicine 151:767~774頁(2009))。肺移植は、しかし、かなりの罹患率と関連し、全てのIPF患者がその候補として適当なわけではなく、適切なドナー肺が比較的不足している。多くの試みにもかかわらず、IPF患者における無作為化プラセボ対照介入試験において生存期間を実質的に延長することが示された薬物療法は、現在までない(いくつかの介入は、いくらかの患者において肺機能の低下速度を遅くすることが示されているが)(Raghuら、Am J Respir Crit Care Med 183:788~824頁(2011); Richelediら、The New England J. of Med. 365:1079~1087頁(2011); Raffiiら、J. Thorac. Dis. 5(1):48~73頁(2013))。 10

【0005】

全てのIPF患者についての予後予測は差し迫っているが、疾患の軌道はかなり不均質である(Raghuら、Am J Respir Crit Care Med 183:788~824頁(2011))。比較的緩慢進行性の経過を示し、10年以上ほど長くにわたって比較的一定の速度で肺機能を喪失する患者もいれば、肺機能のより急速な低下を経験して、診断の1~2年以内に死に届する患者もいる。さらに、肺機能の突然の劇的な減少を典型的に特徴とする疾患の急性の増悪に苦しむ患者もいる。一般的に、これらの患者は、急性事象の後に完全に回復せず、増悪の途中またはすぐ後に頻繁に死亡する。疾患の軌道のこの不均質性は、異なるIPF患者が、その疾患の根底に異なる病態生理学的因子を有する可能性があり、これらの因子は、分子標的治療に対して異なる感受性を有する可能性があることを示唆する。 20

【0006】

単一の時点からのIPF患者の疾患の軌道を予測するための候補として提案されている臨床的または生物学的マーカーは、わずかだけである(Leyら、Am J Respir Crit Care Med 183:431~440頁(2011); Leyら、Am J Respir Crit Care Med 185:6~7頁(2012))。生存期間の減少は、経時的な肺機能の喪失速度と関連することが最も説得力があり、6ヶ月以内の期間に>10%の努力肺活量(FVC)を喪失する患者は、より安定したFVCを有する患者よりもその後の生存時間がかなりより短い(Collardら、Am J Respir Crit Care Med 168:538~542頁(2003))。無作為化臨床試験に登録した1100名を超える患者のより大きい研究により、5~10%の24週FVC低下が、その次の年に死亡する危険性の2倍を超える増加と関連するが、>10%の低下は、その次の年に死亡する危険性の5倍近い増加と関連したことがわかった(du Boisら、Am J Respir Crit Care Med 184:1382~1389頁(2011))。しかし、このような判定を用いて、臨床研究での患者の登録数を階層化することの不利な点は、6ヶ月の導入期間である。MMP7、IL-8、ICAM1、VCAM1、S100A12(Richardsら、Am J Respir Crit Care Med、doi:10.1164/rccm.201101-0058OC(2011))、KL-6(Yokoyamaら、Respirology 11:164~168頁(2006))、CCL18(Prasseら、Am J Respir Crit Care Med 179:717~723頁(2009))、YKL-40(Korthagenら、Respiratory medicine 105:106~113頁(2011))およびサーファクタントタンパク質(Kinderら、Chest 135:1557~1563頁(2009))を含む、単一時点にて測定されるある種の末梢血バイオマーカーが、生存期間または疾患進行について予後予測的であることが報告されている。これらのバイオマーカー研究の多くは、しかし、再現することなく小さいコホートにおいて行われており、最適以下で、首尾一貫しない、かつ/または検証されていないバイオマーカー検出技術を採用している。 30 40

【0007】

標的にできる分子的機構に対する理解が限られていること、疾患の軌道の多様性ならびにIPF患者の非選択的集団において生存期間研究を行う時間および費用に鑑みて、IPFにおける生存期間を延長するための候補治療の可能性を判定するために、適当な力を有する臨床研究を設計することは、非常に難しい。標的にできる可能性がある経路の活性を同定し、後続の疾患進行の正確な予後予測を提供するバイオマーカーは、介入試験における登録を適切に階層化し、候補治療薬の治療価値をよりよく判定するための助けになると考えられる。

【0008】

よって、どの患者が他の者よりも迅速に進行するか、またはどの患者が中央値と比較してよりも短くなった生存時間を有するかを決定するため、ならびにこのような決定をIPF患者についてのより効果的な臨床試験設計および処置計画に組み込むためにより効果的な手段に対する必要性が存在する。

10

【0009】

よって、患者における疾患の存在を客観的に同定し、かつ/もしくは疾患を分類し、IPFの病態生理学的側面、臨床活性および生存期間についての予後を含む予後を定義するために用いることができる、分子ベースの予後予測および診断方法を含むさらなる予後予測および診断方法を得ることは、非常に有利であると考えられる。さらに、疾患の様々な臨床的および/または病態生理学的および/またはその他の生物学的指標と関連する分子ベースの診断および予後予測マーカーを得ることは、有利であると考えられる。よって、IPFおよびその他の拘束性肺障害と関連する新しい分子バイオマーカーを同定すること

20

【0010】

本明細書に記載する発明は、上記の必要性を満たし、その他の利益を提供する。

【0011】

インターロイキン(IL)-13は、多面的Tヘルパー細胞サブクラス2(Th2)サイトカインである。IL4と同様に、IL13は、4-ヘリックス疎水性束コアにより規定される3次元構造を共有するI型サイトカインのファミリーに属する。IL13は、IL4とおよそ30%のアミノ酸配列相同性を有し、IL4の特性の多くを共有する(Wynn、Ann. Rev. Immunol.、21:425頁(2003))。IL4とIL13との機能的類似性は、IL13受容体アルファ鎖(IL13R₁)と結合した後にIL13がIL4受容体アルファ鎖(IL4R_α)と結合できるという事実にある(Hershey、J. Allergy Clin. Immunol.、111:677頁(2003))。IL4R_αは、IL4およびIL13により活性化され、Jak1-依存性STAT6リン酸化をもたらす。IL4およびIL13はともにB細胞増殖を促進し、CD40/CD40L共刺激との組み合わせでIgG4およびIgEのクラススイッチを誘導する(Punnonenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:3730頁(1993)、Oettgenら、J. Allergy Clin. Immunol.、107:429頁(2001))。

30

【0012】

しかし、IL4と違って、IL13は、Th2細胞へのナイーブT細胞の分化に関与しない(Zurawskiら、Immunol. Today、15:19頁(1994))。IL13はFcγRIを上方制御し、よって肥満細胞のIgEプライミングを助ける(de Vries、Allergy Clin. Immunol. 102:165頁(1998))。単球/マクロファージでは、IL13は、CD23ならびにMHCクラスIおよびクラスII抗原の発現を上方制御し、FcγRおよびCD14の発現を下方制御し、かつ抗体依存性細胞傷害を阻害する(de Waal Malefytら、J. Immunol.、151:6370頁(1993)、Chomaratら、Int. Rev. Immunol.、17:1頁(1998))。IL4はそうではないがIL13は、好酸球の生存期間、活性化および動員を促進する(Horieら、Intern. Med.、36:179(1997)、Luttmannら、J. Immunol. 157:167

40

50

8頁(1996)、Popeら、J. Allergy Clin. Immunol.、108:594頁(2001)。IL13は、平滑筋細胞、上皮細胞、内皮細胞および線維芽細胞のような非造血細胞に対して重要な機能も発現する。IL13は、平滑筋の増殖およびコリン作動性収縮を増進する(Wills-Karp、J. Allergy Clin. Immunol.、107:9頁(2001))。上皮細胞では、IL13は、ケモカイン生成の効力のある誘導因子であり(Lira、J. Immunol.、162:2477頁(1999))、粘膜毛様体分化を変更し(Laoukiliら、J. Clin. Invest.、108:1817頁(2001))、線毛上皮細胞の線毛運動周波数を減少させ(Laoukiliら、J. Clin. Invest.、108:1817頁(2001))、杯細胞異形成をもたらす(Zhuら、J. Clin. Invest.、103:779頁(1999))、Grunigら、Science、282:2261頁(1998))。内皮細胞では、IL13は、好酸球の動員のために重要な血管細胞接着分子1(VCAM-1)の効力のある誘導因子である(Bochnerら、J. Immunol.、154:799(1995))。ヒト皮膚線維芽細胞では、IL13は、ヒト皮膚線維芽細胞における1型コラーゲン合成を誘導する(Rouxら、J. Invest. Dermatol.、103:444頁(1994))。

10

20

30

40

50

【0013】

抗IL-13抗体を含むIL-13アンタゴニストは、以前に記載されている。例えば国際特許出願パンフレットWO2005/062967を参照されたい。このような抗体は、ヒト治療薬としても開発されている。ある抗IL-13抗体、レプリキズマブを用いるある臨床研究の結果が、Correnら、New Engl. J. Med. 365:1088~1098頁(2011)に記載されている。

【0014】

特許出願および出版物を含む本明細書で引用する全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が全ての目的のために組み込まれている。

【発明の概要】

【0015】

本発明の組成物および方法は、特発性肺線維症(IPF)の少なくとも3つの新しくかつ特異な分子表現型(本明細書において、分子サブタイプともいう)を規定したことに少なくとも部分的に基づく。本明細書に記載するIPF分子サブタイプは、サブタイプ間の示差的遺伝子発現に基づいて規定された。さらに、本発明の組成物および方法は、IPF患者の生存期間について予後予測的である血清または血液バイオマーカーを規定したことに少なくとも部分的に基づく。このようなバイオマーカーは、本発明の方法に従う治療的処置のためにIPF患者を同定して選択するために特に有用である。用語「分子表現型」および「分子サブタイプ」は、本明細書において交換可能に用いられる。

【0016】

したがって、一態様では、特発性肺線維症(IPF)を予後予測するかまたは予後予測を援助する方法が提供される。ある種の実施態様では、生体試料が、患者から得られ、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現が、測定される。ある種の実施態様では、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現レベルの上昇、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現の上昇は、生存期間中央値と比較して短くなった生存期間についての予後予測を示す。ある種の実施態様では、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の低減、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現の低減は、生存期間中央値と比較して増加した生存期間についての予後予測を示す。一実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、表2、表3、表4または表5のいずれかから選択される。一実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、MUC1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB

4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3およびSAA4から選択される。一実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1(CD20)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8、IGHMから選択される。一実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF(CLEC11A); LOXL1、LOXL2; GLI1、GLI2、SMO; SFRP2、DIO2、CDH11、POSTNおよびTGFB3から選択される。ある種の実施態様では、遺伝子発現レベルは、mRNAレベルをアッセイすることにより測定される。ある種の実施態様では、アッセイは、PCR法および/またはマイクロアレイチップの使用を含む。一実施態様では、PCR法は、qPCRである。一実施態様では、PCR法は、マルチプレックスPCRである。ある種の実施態様では、キットは、ヌクレアーゼ、リガーゼおよびポリメラーゼから選択される少なくとも1つの酵素を含む。ある種の実施態様では、タンパク質発現レベルは、イムノアッセイにより測定される。ある種の実施態様では、上で定義する遺伝子の1つによりコードされる1つまたは複数のタンパク質と結合する1つまたは複数の抗体を含むイムノアッセイキットが提供される。

【0017】

上記の方法のなおさらなる実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、CHI3L1(YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4(構成性SAA)、POSTN、およびSPP1(OPN)から選択される。別の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、YKL-40、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、MMP7、CXCL13、COMP、SAAおよびOPNから選択される。さらに別の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMPおよびYKL-40から選択される。別の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、POSTN、MMP3およびCXCL13から選択される。なおさらなる実施態様では、YKL-40の発現レベルもしくはCCL18の発現レベルおよび/またはCXCL13の発現レベルが測定される。なお別の実施態様では、MMP3の発現レベルおよび/またはSAAの発現レベルが測定される。ある種の実施態様では、遺伝子発現レベルは、mRNAレベルをアッセイすることにより測定される。ある種の実施態様では、アッセイは、PCR法および/またはマイクロアレイチップの使用を含む。一実施態様では、PCR法は、qPCRである。一実施態様では、PCR法は、マルチプレックスPCRである。ある種の実施態様では、キットは、ヌクレアーゼ、リガーゼおよびポリメラーゼから選択される少なくとも1つの酵素を含む。ある種の実施態様では、タンパク質発現レベルは、イムノアッセイにより測定される。ある種の実施態様では、上で定義する遺伝子の1つによりコードされる1つまたは複数のタンパク質と結合する1つまたは複数の抗体を含むイムノアッセイキットが提供される。

【0018】

上で定義する方法のある種の実施態様では、患者は、免疫調節治療を受けている。別の実施態様では、生体試料は、肺組織、血清および血漿から選択される。

【0019】

一態様では、上記の方法に従う遺伝子発現は、マイクロアレイにより測定される。別の態様では、遺伝子発現は、リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)により測定される。別の態様では、遺伝子発現は、マルチプレックスPCRにより測定される。別の実施態様によると、遺伝子発現は、上記の遺伝子の1つまたは複数のタンパク質発現レ

ベルを観察することにより測定される。別の実施態様によると、興味対象の遺伝子の発現は、健常対照または参照対象と比較した場合に、興味対象の遺伝子の相対的 mRNA レベルが、対照または参照遺伝子 mRNA のレベルの 2 倍より大きいならば、上昇しているとみなす。別の実施態様によると、興味対象の遺伝子の相対的 mRNA レベルは、健常対照または参照遺伝子発現レベルと比較して、3 倍、倍、10 倍、15 倍、20 倍、25 倍または 30 倍より大きい。一態様では、遺伝子発現レベルは、PCR 法、マイクロアレイ法またはイムノアッセイ法から選択される方法により測定される。一実施態様では、マイクロアレイ法は、ストリンジェントな条件下で、上記の遺伝子をコードする核酸分子とハイブリダイズできる一つもしくは複数の核酸分子を有するか、または上記の遺伝子によりコードされるタンパク質の一つもしくは複数と結合できる一つもしくは複数のポリペプチド（例えばペプチドまたは抗体）を有するマイクロアレイチップの使用を含む。一実施態様では、PCR 法は、qPCR である。一実施態様では、PCR 法は、マルチプレックス PCR である。一実施態様によると、イムノアッセイ法は、患者試料中の上記の遺伝子から発現されるタンパク質を抗体と結合させることと、患者試料からのタンパク質レベルが上昇するかを決定することとを含む。ある種の実施態様では、イムノアッセイ法は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）である。

【0020】

別の態様では、生体試料が患者から得られ、全ベースラインバイオマーカースコアが決定される、患者における IPF を予後予測するかまたは予後予測を援助する方法が提供される。ある種の実施態様では、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することは、CXCL13、OPN および COMP の少なくとも一つのタンパク質発現レベルを測定することと、発現レベルが、それぞれ CXCL13、OPN および COMP についての中央値より下であるならば 0 のスコアを割り当てることと、発現レベルが、それぞれ CXCL13、OPN および COMP についての中央値より上であるならば 1 のスコアを割り当てることとを含み、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、YKL-40 のタンパク質発現レベルを測定することと、発現レベルが、YKL-40 についての中央値より下であるならば 0 のスコアを割り当てることと、発現レベルが、YKL-40 についての中央値より上であるならば 1 のスコアを割り当てることとをさらに含み、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、各個別のスコアを加算して全ベースラインバイオマーカースコアを得ることをさらに含む。ある種の実施態様では、2 以上の全ベースラインバイオマーカースコアは、生存期間中央値と比較して短くなった生存期間の予後予測を示す。ある種の実施態様では、0 または 1 の全ベースラインバイオマーカースコアは、生存期間中央値と比較して増加した生存期間の予後予測を示す。ある種の実施態様では、タンパク質発現レベルは、イムノアッセイにより測定される。ある種の実施態様では、CXCL13、OPN、COMP および / または YKL-40 によりコードされる一つまたは複数のタンパク質と結合する一つまたは複数の抗体を含むイムノアッセイキットが提供される。

【0021】

なおまだ別の態様では、患者の全ベースラインバイオマーカースコアが上記のようにして決定して 2 以上であるならば、患者は、臨床研究における候補治療剤での処置のために選択される。ある種の実施態様では、候補治療剤は、抗 IL-13 剤、抗 IL-4 剤、組み合わせ抗 IL-13 / 抗 IL-4 剤、ピルフェニドン、抗 LOXL2 抗体（GS-6624）、N-アセチルシステイン、抗 TGF-β 抗体（GC1008）、抗 v6 インテグリン抗体（STX-100）、抗 CTGF 抗体（FG-3019）、抗 CCL2 抗体（CNT0888）、ソマトスタチンアナログ（SOM230、オクトレオチド）、アンジオテンシン II 阻害剤（ロサルタン）、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤（BIBF1120）から選択される。一実施態様では、抗 IL-13 剤は、レプリキズマブである。一実施態様では、抗 IL-13 / 抗 IL-4 剤は、二重特異性抗体である。一実施態様では、抗 IL-13 剤は、3 つの重鎖 CDR、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する CDR-

H 1 と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 と、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3、および 3 つの軽鎖 C D R、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R - L 2 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R - L 3 を含む抗 I L - 1 3 抗体である。一実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。ある種の実施態様では、患者が、上記の方法に従って決定して 2 以上のベースラインスコアを有することを条件として、上で示される有効量の I P F 治療剤を投与する、I P F 患者を処置する方法が提供される。

10

【 0 0 2 2 】

別の態様では、患者における I P F を予後予測するかまたは予後予測を援助する方法が提供され、ここで、生体試料が患者から得られ、全ベースラインバイオマーカースコアが決定され、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、M M P 3 および C O M P の少なくとも 1 つのタンパク質発現レベルを測定することと、発現レベルが、それぞれ M M P 3 および C O M P についての中央値より下であるならば 0 のスコアを割り当てることと、発現レベルが、それぞれ M M P 3 および C O M P についての中央値より上であるならば 1 のスコアを割り当てることとを含み、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、Y K L - 4 0 のタンパク質発現レベルを測定することと、発現レベルが、Y K L - 4 0 についての中央値より下であるならば 0 のスコアを割り当てることと、発現レベルが、Y K L - 4 0 についての中央値より上であるならば 1 のスコアを割り当てることとをさらに含み、全ベースラインバイオマーカースコアを決定することが、各個別のスコアを加算して全ベースラインバイオマーカースコアを得ることをさらに含む。ある種の実施態様では、1 以上の全ベースラインバイオマーカースコアは、生存期間中央値と比較して短くなった生存期間の予後予測を示す。ある種の実施態様では、0 の全ベースラインバイオマーカースコアは、生存期間中央値と比較して増加した生存期間の予後予測を示す。ある種の実施態様では、タンパク質発現レベルは、イムノアッセイにより測定される。ある種の実施態様では、M M P 3、C O M P および / または Y K L - 4 0 によりコードされる 1 つまたは複数のタンパク質と結合する 1 つまたは複数の抗体を含むイムノアッセイキットが提供される。

20

30

【 0 0 2 3 】

なおまだ別の態様では、患者の全ベースラインバイオマーカースコアが、M M P 3、C O M P および / または Y K L - 4 0 の発現に関して上記のようにして決定して 1 以上であるならば、患者は、臨床研究における候補治療剤での処置のために選択される。ある種の実施態様では、候補治療剤は、抗 I L - 1 3 剤、抗 I L - 4 剤、組み合わせ抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤、ピルフェニドン、抗 L O X L 2 抗体 (G S - 6 6 2 4)、N - アセチルシステイン、抗 T G F - 抗体 (G C 1 0 0 8)、抗 v 6 インテグリン抗体 (S T X - 1 0 0)、抗 C T G F 抗体 (F G - 3 0 1 9)、抗 C C L 2 抗体 (C N T O 8 8 8)、ソマトスタチンアナログ (S O M 2 3 0、オクトレオチド)、アンジオテンシン I I 阻害剤 (ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤 (B I B F 1 1 2 0) から選択される。一実施態様では、抗 I L - 1 3 剤は、レプリキズマブである。一実施態様では、抗 I L - 1 3 / 抗 I L - 4 剤は、二重特異性抗体である。一実施態様では、抗 I L - 1 3 剤は、3 つの重鎖 C D R、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 と、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3、および 3 つの軽鎖 C D R、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R - L 2 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R - L 3 を含む抗 I L - 1 3 抗体である。一実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有

40

50

する重鎖と、配列番号14のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。ある種の実施態様では、患者が、上記の方法に従って決定して1以上のベースラインスコアを有することを条件として、上で示される有効量のIPF治療剤を投与する、IPF患者を処置する方法が提供される。

【0024】

別の態様では、対象におけるIPFの分子サブタイプを診断する方法が提供される。ある種の実施態様では、方法は、対象から得られた生体試料中の遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現を測定することを含む。ある種の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、MUC1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3およびSAA4から選択され、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、またはタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現の上昇は、IPF分子サブタイプを示す。ある種の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1(CD20)、TNFRSF17(BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@ (免疫グロブリンカッパ遺伝子座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8、IGHMから選択され、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、またはタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現の上昇は、IPF分子サブタイプを示す。ある種の実施態様では、遺伝子の1つもしくは組み合わせは、COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF(CLEC11A); LOXL1、LOXL2; GLI1、GLI2、SMO; SFRP2、DIO2、CDH11、POSTNおよびTGFB3から選択され、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、またはタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現の上昇は、IPF分子サブタイプを示す。ある種の実施態様では、遺伝子発現レベルは、mRNAレベルをアッセイすることにより測定される。ある種の実施態様では、アッセイは、PCR法および/またはマイクロアレイチップの使用を含む。一実施態様では、PCR法は、qPCRである。一実施態様では、PCR法は、マルチプレックスPCRである。ある種の実施態様では、キットは、ヌクレアーゼ、リガーゼおよびポリメラーゼから選択される少なくとも1つの酵素を含む。ある種の実施態様では、タンパク質発現レベルは、イムノアッセイにより測定される。ある種の実施態様では、上で同定する遺伝子の1つによりコードされる1つまたは複数のタンパク質と結合する1つまたは複数の抗体を含むイムノアッセイキットが提供される。

【0025】

別の態様では、上記の方法のいずれかに従って用いるための生体試料は、肺組織、全血または血清である。ある種の実施態様では、生体試料は、肺組織または全血であり、遺伝子の1つまたは組み合わせの発現は、PCR法またはマイクロアレイチップを用いて測定される。ある種の実施態様では、生体試料は、血清であり、タンパク質の1つまたは組み合わせの発現は、イムノアッセイを用いて測定される。

【0026】

なおまだ別の態様では、患者におけるIPFを処置する方法が提供される。ある種の実施態様では、方法は、遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現の上昇、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現が、患者から得られた生体試料中で検出されたことを条件として、有効量のIPF治療剤を患者に投与してIPFを処置することを含む。一実施態様では、遺伝子の1つまたは組み

10

20

30

40

50

合わせは、MUC1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3およびSAA4から選択される。一実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1(CD20)、TNFRSF17(BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@(免疫グロブリンカッパ遺伝子座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8、IGHMから選択される。一実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF(CLEC11A); LOXL1、LOXL2; GLI1、GLI2、SMO; SFRP2、DIO2、CDH11、POSTNおよびTGFβ3から選択される。別の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、CHI3L1(YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4(構成性SAA)、POSTN、およびSPP1(OPN)から選択される。別の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、YKL-40、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、MMP7、CXCL13、COMP、SAAおよびOPNから選択される。また別の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMPおよびYKL-40から選択される。別の実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、POSTN、MMP3およびCXCL13から選択される。また別の実施態様では、YKL-40の発現レベルもしくはCCL18の発現レベルおよび/またはCXCL13の発現レベルが測定される。なお別の実施態様では、MMP3の発現レベルおよび/またはSAAの発現レベルが測定される。ある種の実施態様では、遺伝子発現レベルは、mRNAレベルをアッセイすることにより測定される。ある種の実施態様では、アッセイは、PCR法および/またはマイクロアレイチップの使用を含む。一実施態様では、PCR法は、qPCRである。一実施態様では、PCR法は、マルチプレックスPCRである。ある種の実施態様では、キットは、ヌクレアーゼ、リガーゼおよびポリメラーゼから選択される少なくとも1つの酵素を含む。ある種の実施態様では、タンパク質発現レベルは、イムノアッセイにより測定される。ある種の実施態様では、上で同定する遺伝子の1つによりコードされる1つまたは複数のタンパク質と結合する1つまたは複数の抗体を含むイムノアッセイキットが提供される。ある種の実施態様では、IPF治療剤は、抗IL-13剤、抗IL-4剤、組み合わせ抗IL-13/抗IL-4剤、ピルフェニドン、抗LOXL2抗体(GS-6624)、N-アセチルシステイン、抗TGFβ抗体(GC1008)、抗α6インテグリン抗体(STX-100)、抗CTGF抗体(FG-3019)、抗CCL2抗体(CNT0888)、ソマトスタチンアナログ(SOM230、オクトレオチド)、アンジオテンシンII阻害剤(ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤(BIBF1120)である。ある種の実施態様では、IPF治療剤は、抗IL-13抗体である。一実施態様では、抗IL-13剤は、3つの重鎖CDR、配列番号1のアミノ酸配列を有するCDR-H1と、配列番号2のアミノ酸配列を有するCDR-H2と、配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR-H3、および3つの軽鎖CDR、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR-L3を含む抗IL-13抗体である。一実施態様では、抗IL-13抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施態様では、抗IL-13抗体(レプリキズマブ)は、配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列

番号14のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。ある種の実施態様では、レプリキズマブは、4週間ごとに1回、125mg、250mgおよび500mgから選択される均一用量にて皮下投与される。一実施態様では、レプリキズマブは、4週間ごとに1回、250mgの均一用量にて皮下投与される。

【0027】

さらなる態様では、上記の方法に従って短くなった生存期間の予後予測を有すると以前に決定されたIPF患者を処置する方法が提供される。ある種のこのような実施態様では、有効量のIPF治療剤が投与される。一実施態様では、IPF治療剤は、抗IL-13剤、抗IL-4剤、組み合わせ抗IL-13/抗IL-4剤、ピルフェニドン、抗LOXL2抗体(GS-6624)、N-アセチルシステイン、抗TGF-β抗体(GC1008)、抗α6インテグリン抗体(STX-100)、抗CTGF抗体(FG-3019)、抗CCl2抗体(CNT0888)、ソマトスタチンアナログ(SOM230、オクトレオチド)、アンジオテンシンII阻害剤(ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤(BIBF1120)から選択される。一実施態様では、抗IL-13剤は、3つの重鎖CDR、配列番号1のアミノ酸配列を有するCDR-H1と、配列番号2のアミノ酸配列を有するCDR-H2と、配列番号3のアミノ酸配列を有するCDR-H3、および3つの軽鎖CDR、配列番号4のアミノ酸配列を有するCDR-L1と、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR-L2と、配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR-L3を含む抗IL-13抗体である。一実施態様では、抗IL-13抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号9のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施態様では、抗IL-13抗体(レプリキズマブ)は、配列番号10のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号14のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。一実施態様では、抗IL-13抗体は、4週間ごとに1回、125mg、250mgおよび500mgから選択される均一用量にて皮下投与される。一実施態様では、抗IL-13抗体は、4週間ごとに1回、250mgの均一用量にて皮下投与される。

【0028】

なおまださらなる態様では、上記の抗IL-13抗体またはレプリキズマブでIPF患者を処置する方法は、処置なしと比較して、疾患進行までの時間を延長し、ここで、疾患進行は、以下の1または複数の最初の発生により示される：(i)死亡；(ii)非待機的入院；(iii)FVCのベースラインから10%以上の減少。一実施態様では、疾患進行は、第52週にてDL_{C0}のベースラインから15%の減少によりさらに示される。一実施態様では、上記のような抗IL-13抗体またはレプリキズマブを用いる処置は、処置後52週間でベースラインから15%未満のDL_{C0}の減少をもたらす。一実施態様では、このような処置は、処置なしと比較して、処置後52週間で6分間歩行において患者が歩く距離のベースラインからの低下のより少ない低減をもたらす。一実施態様では、歩く距離のベースラインからの低下の低減は、50メートルより大きいか、または30メートルより大きいか、または10メートルより大きい。ある種の実施態様では、処置は、処置なしと比較して、急性IPF増悪の最初の事象またはIPF悪化の最初の事象までの時間を延長する。

【0029】

一態様では、抗IL-13抗体またはレプリキズマブを投与することによりIPF患者における疾患進行までの時間を延長する方法が提供される。ある種の実施態様では、処置された患者における疾患進行までの時間が、処置なしと比較される。ある種の実施態様では、疾患進行は、以下の1または複数の最初の発生により示される：(i)死亡；(ii)非待機的入院；(iii)FVCのベースラインから10%以上の減少。一実施態様では、疾患進行は、第52週にてDL_{C0}のベースラインから15%の減少によりさらに示される。一実施態様では、上記のような抗IL-13抗体またはレプリキズマブを用いる処置は、処置後52週間でベースラインから15%未満のDL_{C0}の減少をもたらす。一実施態様では、このような処置は、処置なしと比較して、処置後52週間で6分間歩行

10

20

30

40

50

において患者が歩く距離のベースラインからの低下のより少ない低減をもたらす。一実施態様では、歩く距離のベースラインからの低下における低減は、50メートルより大きいか、または30メートルより大きいか、または10メートルより大きい。ある種の実施態様では、処置は、処置なしと比較して、急性IPF増悪の最初の事象またはIPF悪化の最初の事象までの時間を延長する。

【0030】

まだなお別の態様では、IPF患者における疾患進行をモニタリングする方法が提供される。ある種の実施態様では、方法は、第1の時点および1または複数のさらなる時点にて患者から生体試料を得ることと、生体試料中の遺伝子の1つもしくは組み合わせの発現、または遺伝子の1つもしくは組み合わせによりコードされるタンパク質の1つもしくは組み合わせの発現を測定することとを含み、遺伝子の1つまたは組み合わせは、表2、表3、表4または表5のいずれかから選択され、第1の時点から1または複数のさらなる時点までの発現レベルの変化は、疾患進行を示す。一実施態様では、遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせは、MUC1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3およびSAA4から選択される。一実施態様では、遺伝子の1つまたは組み合わせは、CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1 (CD20)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8、IGHMから選択される。一実施態様では、遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせは、COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF (CLEC11A); LOXL1、LOXL2; GLI1、GLI2、SMO; SFRP2、DIO2、CDH11、POSTNおよびTGFB3から選択される。一実施態様では、遺伝子の1つもしくは組み合わせまたはタンパク質の1つもしくは組み合わせは、CHI3L1 (YKL-40)、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、COMP、CXCL13、MMP3、MMP7、SAA4 (構成性SAA)、POSTN、およびSPP1 (OPN) から選択される。ある種の実施態様では、生体試料は、肺組織、血清および血漿から選択される。ある種の実施態様では、遺伝子発現レベルは、mRNAレベルをアッセイすることにより測定される。ある種の実施態様では、アッセイは、PCR法および/またはマイクロアレイチップの使用を含む。一実施態様では、PCR法は、qPCRである。一実施態様では、PCR法は、マルチプレックスPCRである。ある種の実施態様では、キットは、ヌクレアーゼ、リガーゼおよびポリメラーゼから選択される少なくとも1つの酵素を含む。ある種の実施態様では、タンパク質発現レベルは、イムノアッセイにより測定される。ある種の実施態様では、上で同定する遺伝子の1つによりコードされる1つまたは複数のタンパク質と結合する1つまたは複数の抗体を含むイムノアッセイキットが提供される。

【0031】

別の態様では、上記の疾患進行をモニタリングする方法は、患者を臨床研究において候補治療剤で処置することをさらに含む。ある種の実施態様では、治療剤は、抗IL-13剤、抗IL-4剤、組み合わせ抗IL-13/抗IL-4剤、ピルフェニドン、抗LOXL2抗体 (GS-6624)、N-アセチルシステイン、抗TGF-β抗体 (GC1008)、抗α6インテグリン抗体 (STX-100)、抗CTGF抗体 (FG-3019)、抗CCL2抗体 (CNT0888)、ソマトスタチンアナログ (SOM230、オクトレオチド)、アンジオテンシンII阻害剤 (ロサルタン)、一酸化炭素、サリドマイ

10

20

30

40

50

ド、テトラチオモリブデート、ドキシサイクリン、ミノサイクリンおよびチロシンキナーゼ阻害剤（B I B F 1 1 2 0）から選択される。一実施態様では、抗 I L - 1 3 剤は、3つの重鎖 C D R、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する C D R - H 1 と、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する C D R - H 2 と、配列番号 3 のアミノ酸配列を有する C D R - H 3、および 3 つの軽鎖 C D R、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する C D R - L 1 と、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する C D R - L 2 と、配列番号 6 のアミノ酸配列を有する C D R - L 3 を含む抗 I L - 1 3 抗体である。一実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体は、配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域とを含む。一実施態様では、抗 I L - 1 3 抗体は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図 1 A】実施例 1 に記載するような I P F 患者における遺伝子発現の不均質性を示す。I P F と対照との間の 2 4 9 0 の D E マイクロアレイプロブの教師なし 2 元階層的クラスタリングは、I P F の診断により主に規定される 3 つの主要クラスター（群 1 クラスター、群 2 クラスターおよび群 3 クラスター）を示した。

【図 1 B】実施例 1 に記載するような I P F 患者における遺伝子発現の不均質性を示す。群 1 クラスターの再クラスタリングは、不均質な遺伝子発現サインを同定し、ここでは、I P F 患者の大多数（対照はほとんどいない）が、気管支上皮に特徴的な遺伝子を高いレベルで発現した（「細気管支サイン」）。

20

【図 1 C】実施例 1 に記載するような I P F 患者における遺伝子発現の不均質性を示す。群 2 クラスターの再クラスタリングは、不均質な遺伝子発現サインを同定し、ここでは、I P F 患者の多く（対照はいない）が、リンパ濾胞に特徴的な遺伝子を高いレベルで発現した（「リンパ系サイン」）。

【図 1 D】実施例 1 に記載するような I P F 患者における遺伝子発現の不均質性を示す。群 3 クラスターの再クラスタリングは、不均質な遺伝子発現サインを同定し、ここでは、I P F 患者は、筋線維芽細胞への線維芽細胞分化に特徴的な遺伝子を中程度および高いレベルで発現したが、対照の対象は、低いレベルで発現した（「線維芽細胞サイン」、本明細書において「筋線維芽細胞サイン」ともいう）。

【図 1 E】実施例 1 に記載するような I P F 患者における遺伝子発現の不均質性を示す。細気管支、リンパ系および筋線維芽細胞遺伝子発現サインが、互いに同時に変動しないことを示すプロット。

30

【図 2 - 1】実施例 1 に記載するようにして I P F 肺外植片から得た生検組織の隣接凍結切片に対する免疫組織化学（I H C）を示す。A はヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）染色を、B はトリクローム染色を、C は抗ケラチン 1 4 染色を、D は過ヨウ素酸シッフ（P A S）染色を、それぞれ示している。

【図 2 - 2】実施例 1 に記載するようにして I P F 肺外植片から得た生検組織の隣接凍結切片に対する免疫組織化学（I H C）を示す。E は濃く染色された核（矢じり）を有する細胞の凝集体を示す H & E 染色を、F は凝集体を囲むが、凝集体の中には存在しないコラーゲン沈着（矢じり）を示すトリクローム染色を、G は凝集体が高濃度の C D 2 0 陽性 B 細胞を有することを示す抗 C D 2 0 染色を、H は、G において（*）で印をつけた領域のより高い倍率を、I は細気管支様を呈する囊胞の抗ケラチン 1 4 染色を、J はリンパ系凝集体の抗 C D 2 0 染色を、それぞれ示している。

40

【図 3 A】実施例 1 に記載するようにして q P C R により測定した、I P F 患者および対照から得られた肺組織における候補バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現を示す。ペリオスチン遺伝子発現を示している。

【図 3 B】実施例 1 に記載するようにして q P C R により測定した、I P F 患者および対照から得られた肺組織における候補バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現を示す。C C L 1 3 遺伝子発現を示している。

【図 3 C】実施例 1 に記載するようにして q P C R により測定した、I P F 患者および対

50

照から得られた肺組織における候補バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現を示す。CCL18 遺伝子発現を示している。

【図3D】実施例1に記載するようにしてqPCRにより測定した、IPF患者および対照から得られた肺組織における候補バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現を示す。オステオポンチン遺伝子発現を示している。

【図3E】実施例1に記載するようにしてqPCRにより測定した、IPF患者および対照から得られた肺組織における候補バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現を示す。COMP 遺伝子発現を示している。

【図3F】実施例1に記載するようにしてqPCRにより測定した、IPF患者および対照から得られた肺組織における候補バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現を示す。YKL-40 遺伝子発現を示している。

【図3G】実施例1に記載するようにしてqPCRにより測定した、IPF患者および対照から得られた肺組織における候補バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現を示す。MMP7 遺伝子発現を示している。

【図4】実施例1に記載するようにして、中央値レベル(69%)での予測FVCパーセントにより階層化したIPF生存期間を示す。

【図5-1】実施例1に記載するような個別および組み合わせの予後予測バイオマーカーについてのIPF生存期間のロジスティックモデルを示す。Aは血清CXCL13レベルによるIPF生存期間のロジスティックモデルを、Bは血清YKL-40レベルによるIPF生存期間のロジスティックモデルを、それぞれ示している。

【図5-2】実施例1に記載するような個別および組み合わせの予後予測バイオマーカーについてのIPF生存期間のロジスティックモデルを示す。Cは血清COMPレベルによるIPF生存期間のロジスティックモデルを、Dは血漿OPNレベルによるIPF生存期間のロジスティックモデルを、それぞれ示している。

【図6A】実施例1に記載するような6つのバイオマーカー(SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMPおよびYKL-40)の可能な組み合わせの受信者動作特性(ROC)分析を示す。6つのバイオマーカーのそれぞれの可能な組み合わせのROC分析は、試料採取後1、2および3年にわたる死亡を予測することを示した。

【図6B】実施例1に記載するような6つのバイオマーカー(SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMPおよびYKL-40)の可能な組み合わせの受信者動作特性(ROC)分析を示す。6つのバイオマーカー(SAA、MMP3、CXCL13、OPN、COMPおよびYKL-40)の全ての可能な組み合わせの2年でのROC分析の曲線下面積および期間重要性を示した。

【図7】実施例1に記載するようなYKL-40とOPNとCOMPとCXCL13との組み合わせについてのベースラインバイオマーカースコアによるIPF生存期間の組み合わせロジスティックモデルを示す。

【図8】実施例1に記載するようなバイオマーカーMMP3、COMPおよびYKL-40の0、1、2または3つ全ての中央値レベルより上を発現するIPF患者のカプラン-マイヤー生存期間プロットを示す。

【図9】実施例2に記載するような対照患者(左側)およびIPF患者(右側)からの肺組織におけるIL-13Ra2発現についての定量PCRの結果を示す。

【図10】実施例2に記載するようなIMR90初代肺線維芽細胞におけるIL-4またはIL-13によるIL13R₂発現の誘導を示す。

【図11A】実施例2に記載するようなIL13R₂発現を示す。

【図11B】IL-13の存在または非存在下でのCCL26およびペリオスチン発現に対するTNFの影響を示す。

【図12】図に示しかつ実施例2に記載するようにしてTNFで前処理し、次いで様々なIL-13および/またはIL-4サイトカインならびに遮断抗IL-13 mAb1および/またはmAb2抗体処理に供したIMR90細胞におけるCCL26およびペリオスチン(POSTN)の遺伝子発現レベルを示す。

10

20

30

40

50

【図13】実施例2に記載するようにして、IL-13(A)またはIL-13およびIL-4(B)で処理し、次いで抗IL-13 mAb2または抗IL-13 mAb2のいずれかでさらに処理したIMR90細胞からのマイクロアレイデータを示す。

【図14】実施例2に記載するようなIPFコホートにおけるGLI1発現を示す。

【図15】実施例2に記載するような添加した様々な因子に应答する初代肺線維芽細胞(matrigel上で培養)におけるGLI1遺伝子発現を示す。

【図16】図に示しかつ実施例2に記載するような添加した様々な因子に应答する初代肺線維芽細胞(matrigel上で培養)におけるTGF- β 1遺伝子発現(A)およびGLI1遺伝子発現(B)を示す。

【発明を実施するための形態】

10

【0033】

ある種の定義

そうでないと定義しない限り、本明細書で用いる当該技術分野の全ての用語、表記およびその他の科学的術語は、本発明が関わる当業者に共通して理解される意味を有することを意図する。共通に理解される意味を有する用語を、明確性および容易に参照できるようにするために本明細書において定義する場合があります。このような定義を本明細書に含めることは、当該技術において一般的に理解されるものに対して実質的な差を示すと必ずしも解釈されるべきでない。本明細書に記載または参照する技術および手順は、当業者により、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual第2版(1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.に記載されるような広く利用される分子クローニング方法論のような従来の方法論を用いて全般的によく理解され、一般的に採用されている。適当であれば、市販で入手可能なキットおよび試薬の使用を伴う手順は、そうでないと示さない限り、製造者が定義するプロトコールおよび/またはパラメータに従って全般的に行われる。

20

【0034】

「細気管支遺伝子サイン」、「細気管支サイン」および「細気管支遺伝子発現サイン」は、本明細書で交換可能に用いられ、表2に示す遺伝子の組み合わせまたは部分組み合わせ(その遺伝子発現パターンは、ある種のIPF患者と相関する)のことをいう。遺伝子は、MUC1、MUC4、MUC20、PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D、KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17、SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13、CLCA2、TRPV4、BBS5、MMP3、SAA4(構成性SAAをコードする)を含む。細気管支遺伝子サインのポリペプチドは、本明細書に記載するように「標的にされるポリペプチド」である。

30

【0035】

「リンパ系遺伝子サイン」、「リンパ系サイン」および「リンパ系遺伝子発現サイン」、「リンパ濾胞遺伝子サイン」、「リンパ濾胞サイン」および「リンパ濾胞遺伝子発現サイン」は、本明細書で交換可能に用いられ、表3に示す遺伝子の組み合わせまたは部分組み合わせ(その遺伝子発現パターンは、ある種のIPF患者と相関する)のことをいう。遺伝子は、CXCR3、CXCR5、CXCL13、CCR6、CCR7、CD19、MS4A1(CD20)、TNFRSF17(BCMA)、BLK、BLNK、FCRLA、FCRL2、FCRL5、CD79A、CD79B、CD27、CD28、CD1A、CD1B、CD1C、CD1E、IGHV1-69、IGLJ3、IGJ、IGHV3-48、IGLV3-21、IGKV1-5、IGHG1、IGKC、IGLV6-57、IGK@ (免疫グロブリンカップ遺伝子座)、IGHA1、IGKV2-24、IGKV1D-8、IGHMを含む。リンパ濾胞遺伝子サインのポリペプチドは、本明細書に記載するように「標的にされるポリペプチド」である。

40

【0036】

「筋線維芽細胞遺伝子サイン」、「筋線維芽細胞サイン」および「筋線維芽細胞遺伝子

50

発現サイン」、「線維芽細胞遺伝子サイン」、「線維芽細胞サイン」および「線維芽細胞遺伝子発現サイン」は、本明細書で交換可能に用いられ、表4に示す遺伝子の組み合わせまたは部分組み合わせ（その遺伝子発現パターンは、ある種のIPF患者と相関する）のことをいう。遺伝子は、COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1、HGF、IGFBP7、SCGF(CLEC11A)；LOXL1、LOXL2；GLI1、GLI2、SMO；SFRP2、DIO2、CDH11、POSTNおよびTGFB3を含む。筋線維芽細胞遺伝子サインのポリペプチドは、本明細書で記載するように「標的にされるポリペプチド」である。

【0037】

本明細書で用いる場合、用語「標的にされるポリペプチド」は、「天然配列」ポリペプチドおよび変異体のことをいう（これらは、本明細書でさらに定義する）。

【0038】

「天然配列」ポリペプチドは、天然に由来する対応するポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。よって、用語「天然配列ポリペプチド」は、それらに限定されないが、選択的スプライシングされた形、アイソフォームおよび多型を含む、ポリペプチドの自然に存在する短縮された形、増加した形およびフレームシフトした形を含む。

【0039】

「自然に存在する変異体」は、参照ポリペプチドと少なくとも約60%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドを意味し、自然に存在する参照ポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を保持する。自然に存在する変異体は、参照ポリペプチドと少なくとも約65%のアミノ酸配列同一性、少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性、少なくとも約75%のアミノ酸配列同一性、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有する変異体ポリペプチドを含むことができる。

【0040】

本明細書で交換可能に用いる用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーのことをいい、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、改変ヌクレオチドもしくは塩基および/またはそれらのアナログ、あるいはDNAまたはRNAポリメラーゼによりポリマーに組み込むことができる任意の基質であることができる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびそれらのアナログのような改変ヌクレオチドを含むことがある。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する改変は、ポリマーの組み立ての前または後に付与してよい。ヌクレオチドの配列には、非ヌクレオチド成分が介在することがある。ポリヌクレオチドは、標識成分とのコンジュゲーションによるように、重合後にさらに改変されることがある。その他の型の改変は、例えば、1つまたは複数の自然に存在するヌクレオチドのアナログでの「キャップ」置換、ヌクレオチド間改変、例えば非荷電連結（例えばメチルホスホン酸、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど）および荷電連結（例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を有するもの、ペンダント部分を有するもの、例えばタンパク質（例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシンなど）、インターカレート物質を有するもの（例えばアクリジン、ソラレンなど）、キレート剤を有するもの（例えば金属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属など）、アルキル化剤を有するもの、改変連結を有するもの（例えばアルファアノマー核酸など）、ならびに非改変形のポリヌクレオチドを含む。さらに、糖の中に通常存在するヒドロキシ基のいずれも、例えばホスホネート基、リン酸基により置き換えられるか、標準的な保護基により保護されるか、もしくはさらなるヌクレオチドとのさらなる連結を準備するために活性化されてよいか、または固体支持体にコンジュゲートされて

10

20

30

40

50

よい。5'および3'末端OHは、リン酸化されるか、またはアミンもしくは1から20までの炭素原子の有機キャッピング基部分で置換できる。その他のヒドロキシは、標準的な保護基に誘導体化してもよい。ポリヌクレオチドは、例えば2'-O-メチル-2'-O-アシル、2'-フルオロ-または2'-アジド-リボース、炭素環式糖アナログ、-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロースもしくはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式アナログおよび塩基脱落ヌクレオシドアナログ、例えばメチルリボシドを含む、当該技術において一般的に知られるリボースまたはデオキシリボース糖の類似の形を含有することもできる。1つまたは複数のホスホジエステル連結は、代替の連結基で置き換えてよい。これらの代替の連結基は、それらに限定されないが、リン酸がP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂(「ホルムアセタール」)(ここで、それぞれのRまたはR'は、独立してHまたはエーテル(-O-)連結を場合によって含有する置換もしくは非置換のアルキル(1~20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラリジル(aryl)である)で置き換えられた実施態様を含む。ポリヌクレオチド中の全ての連結が同一である必要はない。先行する記載は、RNAおよびDNAを含んで、本明細書で言及する全てのポリヌクレオチドに当てはまる。

10

【0041】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で用いる場合、少なくとも約7ヌクレオチドの長さであり、約250ヌクレオチド未満の長さである、短い一本鎖ポリヌクレオチドのことをいう。オリゴヌクレオチドは、合成であってよい。用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、互いに排他的でない。ポリヌクレオチドについての上記の記載は、オリゴヌクレオチドに対して等しくかつ全面的に当てはめることができる。

20

【0042】

用語「プライマー」は、核酸とハイブリダイズでき、通常は遊離の3'-OH基を提供することにより相補的核酸の重合を可能にする一本鎖ポリヌクレオチドのことをいう。

【0043】

用語「アレイ」または「マイクロアレイ」は、基体上のハイブリダイズ可能なアレイ要素、好ましくはポリヌクレオチドプローブ(例えばオリゴヌクレオチド)の規則的な配置のことをいう。基体は、固体基体、例えばガラススライド、または半固体基体、例えばニトロセルロースメンブレンであることができる。

30

【0044】

用語「増幅」は、参照核酸配列の1つもしくは複数のコピーまたはその相補体を生成するプロセスのことをいう。増幅は、線形的または指数関数的(例えばPCR)であってよい。「コピー」は、鋳型配列に対する完全配列相補性または同一性を必ずしも意味しない。例えば、コピーは、ヌクレオチドアナログ、例えばデオキシイノシン、意図的な配列変更(例えば鋳型と完全に相補的でないがハイブリダイズ可能な配列を含むプライマーにより導入された配列変更)および/または増幅中に生じる配列の誤りを含むことができる。

【0045】

用語「検出」は、直接および間接的検出を含む、任意の検出手段を含む。

40

【0046】

「分子表現型」と交換可能に用いられる用語「分子サブタイプ」は、1つもしくは複数の特定の遺伝子または1つもしくは複数の特定のタンパク質の発現、あるいは遺伝子の組み合わせもしくはタンパク質の組み合わせの発現の特定のパターンを特徴とするIPFのサブタイプまたは表現型のことをいう。特定の遺伝子、タンパク質または遺伝子もしくはタンパク質の組み合わせの発現は、IPFのある種の病理学的、組織学的および/または臨床的特徴とさらに関連することがある。

【0047】

用語「マルチプレックスPCR」は、単一反応で2つ以上のDNA配列を増幅することを目的として、単一供給源(例えば患者)から得られた核酸に対して、1つ超のプライマ

50

ーセットを用いて行われる単一PCR反応のことをいう。

【0048】

用語「バイオマーカー」は、本明細書で用いる場合、例えば患者の病的状態の指標のことをいい、これは、患者の生体試料中で検出できる。バイオマーカーは、それらに限定されないが、DNA、RNA、タンパク質、炭水化物または糖脂質ベースの分子マーカーを含む。

【0049】

用語「診断」は、分子のもしくは病的状態、疾患または容態の同定または分類のことをいうために本明細書で用いる。例えば、「診断」は、IPFまたはUIPの特定の型の同定のことをいうことがある。「診断」は、例えば病理組織学によるかもしくはX線撮影による基準による、または分子的特徴（例えば特定の遺伝子の1つまたは組み合わせまたは前記遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を特徴とするサブタイプ）によるIPFの特定のサブタイプの分類のことをいうこともある。

10

【0050】

用語「診断を援助する」は、IPFの特定の型の症状または容態の存在または性質に関する臨床的決定を行うことを支援する方法のことをいうために本明細書で用いる。例えば、IPFの診断を援助する方法は、個体からの生体試料中である種の遺伝子の発現を測定することを含むことができる。

【0051】

用語「予後予測」は、経時的な生存期間、および経時的に悪くなる1つまたは複数のIPFに帰する疾患症状の見込みの予測のことをいうために本明細書で用いる。

20

【0052】

「対照の対象」は、IPFであると診断されておらず、IPFと関連するいずれの徴候または症状にも苦しんでいない健常対象のことをいう。

【0053】

用語「試料」は、本明細書で用いる場合、例えば物理的、生化学的、化学的および/または生理的特徴に基づいて特徴決定および/または同定される細胞性および/またはその他の分子的物体を含有する、興味対象の対象から得られるかまたは該対象に由来する組成物のことをいう。例えば、「疾患試料」との句およびその変形は、特徴決定される細胞性および/または分子的物体を含有すると予測されるかまたは含有することがわかっている、興味対象の対象から得られた任意の試料のことをいう。

30

【0054】

「組織」または「細胞試料」により、対象または患者の組織から得られた同様の細胞の収集物を意味する。組織または細胞試料の供給源は、新鮮な、凍結したおよび/もしくは保存された器官もしくは組織試料または生検または吸引物からのような固体組織；血液または任意の血液構成成分；脳脊髄液、羊水、腹水もしくは間質液のような体液；対象の妊娠期間もしくは発達中の任意の時間からの細胞であってよい。組織試料は、初代もしくは培養細胞または株化細胞であってよい。場合によって、組織または細胞試料は、疾患組織/器官から得られる。組織試料は、天然では組織と天然に混ざり合っていない化合物、例えば保存剤、抗凝固剤、緩衝剤、固定液、栄養分、抗生物質などを含有してよい。「参照試料」、「参照細胞」、「参照組織」、「対照試料」、「対照細胞」または「対照組織」は、本明細書で用いる場合、本発明の方法または組成物を用いて同定しようとする疾患または容態に苦しんでいないことがわかっているかまたは苦しんでいないと考えられる供給源から得られた試料、細胞または組織のことをいう。一実施態様では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞または対照組織は、本発明の組成物または方法を用いて疾患または容態を同定しようとする同じ対象または患者の体の健常な部分から得られる。一実施態様では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞または対照組織は、本発明の組成物または方法を用いて疾患または容態を同定しようとする対象または患者でない個体の体の健常な部分から得られる。

40

【0055】

50

本明細書での目的のために、組織試料の「切片」は、組織試料の単一の部分または片、例えば組織試料から切断された組織の薄片または細胞を意味する。組織試料の複数の切片を採取でき、本発明に従って分析に供することができることが理解されるが、但し、組織試料の同じ切片を、形態学および分子的の両方のレベルで分析するか、またはタンパク質および核酸の両方に関して分析する方法を本発明が含むことが理解されることを条件とする。

【0056】

「関連させる」または「関連する」により、第1の分析またはプロトコルの性能および/または結果を、第2の分析またはプロトコルの性能および/または結果と任意の方式で比較することを意味する。例えば、第2プロトコルを行う場合に第1の分析もしくはプロトコルの結果を用いることができ、かつ/または第1の分析もしくはプロトコルの結果を用いて、第2の分析もしくはプロトコルを行うべきかを決定することができる。遺伝子発現分析またはプロトコルの実施態様に関して、遺伝子発現分析またはプロトコルの結果を用いて、具体的な治療計画を行うべきかを決定してよい。

10

【0057】

用語「遺伝子サイン」は、「遺伝子発現サイン」と交換可能に用いられ、ある種の分子的、病理学的、組織学的、X線撮影によるおよび/または臨床的特徴を特徴とするIPFの特定のサブタイプをその発現が示す遺伝子の1つまたは組み合わせのことをいう。ある種の実施態様では、遺伝子サインを含む1つまたは複数の遺伝子の発現は、対照の対象における発現と比較して上昇する。

20

【0058】

用語「タンパク質サイン」は、「タンパク質発現サイン」と交換可能に用いられ、ある種の分子的、病理学的、組織学的、X線撮影によるおよび/または臨床的特徴を特徴とするIPFの特定のサブタイプをその発現が示すタンパク質の1つまたは組み合わせのことをいう。ある種の実施態様では、タンパク質サインを含む1つまたは複数のタンパク質の発現は、対照の対象における発現と比較して上昇する。

【0059】

「IPF治療剤」、「IPFを処置するために効果的な治療剤」およびそれらの文法的変形は、本明細書で用いる場合、有効量で与えられた場合に、IPFの対象において治療的利益をもたらすことが臨床家によりわかっているか、臨床的に示されているかまたは期待される剤のことをいう。

30

【0060】

「候補治療剤」は、その剤が以前に販売承認を受けていない条件（例えば特定の用量、投与計画、適応症）の下で臨床試験を受けているかまたは試験をこれから受ける剤のことをいう。

【0061】

「抗IL13/IL4経路阻害剤」は、IL-13および/またはIL-4シグナル伝達を遮断する薬剤のことをいう。抗IL13、抗IL4または抗IL13/IL4阻害剤の例は、それらに限定されないが、抗IL13結合物質、抗IL4結合物質、抗IL4受容体アルファ結合物質、抗IL13受容体アルファ1結合物質および抗IL13受容体アルファ2結合物質を含む。IL-13、IL-4、IL-13Rアルファ1、IL-13Rアルファ2またはIL-4Rアルファと結合できる単一ドメイン抗体は、阻害剤として具体的に含まれる。1つ超の標的と結合できる分子が含まれることが理解される。

40

【0062】

「抗IL4結合物質」は、ヒトIL-4と特異的に結合する物質のことをいう。このような結合物質は、小分子、アプタマーまたはポリペプチドを含むことができる。このようなポリペプチドは、それらに限定されないが、イムノアドヘシン、抗体、ペプチボディおよびペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを含むことができる。一実施態様によると、結合物質は、ヒトIL-4配列と、1 μ M~1pMの間の親和性で結合する。抗IL4結合物質の具体例は、可溶性IL4受容体アルファ（例えばヒトFc領域と融合し

50

た I L 4 受容体の細胞外ドメイン)、抗 I L 4 抗体および可溶性 I L 1 3 受容体アルファ 1 (例えばヒト F c 領域と融合した I L 1 3 受容体アルファ 1 の細胞外ドメイン)を含むことができる。

【 0 0 6 3 】

「抗 I L 4 受容体アルファ結合物質」は、ヒト I L 4 受容体アルファと特異的に結合する物質のことをいう。このような結合物質は、小分子、アプタマーまたはポリペプチドを含むことができる。このようなポリペプチドは、それらに限定されないが、イムノアドヘシン、抗体、ペプチボディおよびペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを含むことができる。一実施態様によると、結合物質は、ヒト I L - 4 受容体アルファ配列と、
1 u M ~ 1 p M の間の親和性で結合する。抗 I L 4 受容体アルファ結合物質の具体例は、
抗 I L 4 受容体アルファ抗体を含むことができる。

10

【 0 0 6 4 】

「抗 I L 1 3 結合物質」は、ヒト I L - 1 3 と特異的に結合する物質のことをいう。このような結合物質は、小分子、アプタマーまたはポリペプチドを含むことができる。このようなポリペプチドは、それらに限定されないが、イムノアドヘシン、抗体、ペプチボディおよびペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを含むことができる。一実施態様によると、結合物質は、ヒト I L - 1 3 配列と、
1 u M ~ 1 p M の間の親和性で結合する。抗 I L 1 3 結合物質の具体例は、抗 I L 1 3 抗体、ヒト F c と融合した可溶性 I L 1 3 受容体アルファ 2、ヒト F c と融合した可溶性 I L 4 受容体アルファ、ヒト F c と融合した可溶性 I L 1 3 受容体アルファを含むことができる。例示的な抗 I L 1 3 抗体は、
国際公開第 2 0 0 5 / 0 6 2 9 6 7 号に記載されている。抗 I L 1 3 抗体のその他の例は、
W O 2 0 0 8 / 0 8 3 6 9 5 (例えば I M A - 6 3 8 および I M A - 0 2 6)、
U S 2 0 0 8 / 0 2 6 7 9 5 9、
U S 2 0 0 8 / 0 0 4 4 4 2 0 および
U S 2 0 0 8 / 0 2 4 8 0 4 8 に記載されている。

20

【 0 0 6 5 】

レプリキズマブとよばれる例示的な「抗 I L 1 3 抗体」は、ヒト I L 1 3 と結合するヒト化 I g G 4 抗体を意味する。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、3つの重鎖 C D R、
C D R - H 1 (配列番号 1)、
C D R - H 2 (配列番号 2) および
C D R - H 3 (配列番号 3) を含む。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、3つの軽鎖 C D R、
C D R - L 1 (配列番号 4)、
C D R - L 2 (配列番号 5)、
および
C D R - L 3 (配列番号 6) を含む。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、3つの重鎖 C D R と 3つの軽鎖 C D R、
C D R - H 1 (配列番号 1)、
C D R - H 2 (配列番号 2)、
C D R - H 3 (配列番号 3)、
C D R - L 1 (配列番号 4)、
C D R - L 2 (配列番号 5)、
および
C D R - L 3 (配列番号 6) を含む。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、配列番号 7 および 8 から選択されるアミノ酸配列を有する可変重鎖領域 V H を含む。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、配列番号 9 のアミノ酸配列を有する可変軽鎖領域 V L を含む。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、配列番号 7 および 8 から選択されるアミノ酸配列を有する可変重鎖領域 V H と、
配列番号 9 のアミノ酸配列を有する可変軽鎖領域 V L とを含む。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、配列番号 1 0 または配列番号 1 1 または配列番号 1 2 または配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。一実施態様では、抗 I L 1 3 抗体は、配列番号 1 0、
配列番号 1 1、
配列番号 1 2 および
配列番号 1 3 から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖と、
配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。

30

40

【 0 0 6 6 】

「抗 I L 1 3 受容体アルファ 1 結合物質」は、ヒト I L 1 3 受容体アルファ 1 と特異的に結合する物質のことをいう。このような結合物質は、小分子、アプタマーまたはポリペプチドを含むことができる。このようなポリペプチドは、それらに限定されないが、イムノアドヘシン、抗体、ペプチボディおよびペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを含むことができる。一実施態様によると、結合物質は、ヒト I L - 1 3 受容体アルファ 1 配列と、
1 u M ~ 1 p M の間の親和性で結合する。抗 I L 1 3 受容体アルファ 1 結合

50

物質の具体例は、抗 I L 1 3 受容体アルファ 1 抗体を含むことができる。

【 0 0 6 7 】

「抗 I L 1 3 受容体アルファ 2 結合物質」は、ヒト I L 1 3 受容体アルファ 2 と特異的に結合する物質のことをいう。このような結合物質は、小分子、アプタマーまたはポリペプチドを含むことができる。このようなポリペプチドは、それらに限定されないが、イムノアドヘシン、抗体、ペプチボディおよびペプチドからなる群から選択されるポリペプチドを含むことができる。一実施態様によると、結合物質は、ヒト I L - 1 3 受容体アルファ 2 配列と、1 u M ~ 1 p M の間の親和性で結合する。抗 I L 1 3 受容体アルファ 2 結合物質の具体例は、抗 I L 1 3 受容体アルファ 2 抗体を含むことができる。

【 0 0 6 8 】

用語「抗体」は、最も広い意味で用いられ、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多エピトープ特異性を有する抗体、単鎖抗体、多重特異性抗体および抗体の断片を具体的にカバーする。このような抗体は、キメラ、ヒト化、ヒトおよび合成であることができる。このような抗体およびそれらを作製する方法は、以下により詳細に記載する。

【 0 0 6 9 】

用語「可変」は、可変ドメインのある種のセグメントの配列が、抗体間で大幅に異なることをいう。V 領域は、抗原結合を媒介し、特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を規定する。しかし、可変性は、可変ドメインの 1 1 0 アミノ酸のスパンにわたって均一に分布しない。代わりに、V ドメインは、それぞれ 9 ~ 1 2 アミノ酸の長さである「超可変領域」とよばれる可変性が非常に高いより短い領域で分けられた、1 5 ~ 3 0 アミノ酸のフレームワーク領域 (F R) とよばれる比較的不变のひと続きからなる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、ベータシート構造を接続し、その一部を形成することもあるループを形成する 3 つの超可変領域により接続された、ベータシート構造をほぼ採用する 4 つの F R を含む。各鎖中の超可変領域は、F R により近接して一緒にされ、他の鎖からの超可変領域と一緒に、抗体の抗原結合部位の形成に貢献する (K a b a t ら、S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t、第 5 版、P u b l i c H e a l t h S e r v i c e、N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h、B e t h e s d a、M D、(1 9 9 1) を参照されたい)。定常ドメインは、抗体と抗原との結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) における抗体の参加のような様々なエフェクター機能を示す。

【 0 0 7 0 】

用語「超可変領域」(または「HVR」)は、本発明で用いる場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基のことをいう。超可変領域は、一般的に、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基(例えばVL中の残基約 2 4 ~ 3 4 (L 1)、5 0 ~ 5 6 (L 2) および 8 9 ~ 9 7 (L 3) の付近、ならびにVH中の約 3 1 ~ 3 5 B (H 1)、5 0 ~ 6 5 (H 2) および 9 5 ~ 1 0 2 (H 3) の付近 (K a b a t ら、S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t、第 5 版、P u b l i c H e a l t h S e r v i c e、N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h、B e t h e s d a、M D、(1 9 9 1)) および/または「超可変ループ」からの残基(例えばVL中の残基 2 6 ~ 3 2 (L 1)、5 0 ~ 5 2 (L 2) および 9 1 ~ 9 6 (L 3)、ならびにVH中の 2 6 ~ 3 2 (H 1)、5 2 A ~ 5 5 (H 2) および 9 6 - 1 0 1 (H 3) (C h o t h i a および L e s k J . M o l . B i o l . 1 9 6 : 9 0 1 ~ 9 1 7 頁 (1 9 8 7)) を含む。

【 0 0 7 1 】

超可変領域は、以下のような「拡大超可変領域」を含んでよい：VL中の 2 4 ~ 3 6 (L 1)、4 6 ~ 5 6 (L 2) および 8 9 ~ 9 7 (L 3) ならびにVH中の 2 6 ~ 3 5 B (H 1)、4 7 ~ 6 5 (H 2) および 9 3 ~ 1 0 2 (H 3)。可変ドメイン残基は、これらの定義のそれぞれについて K a b a t ら、既出に従って番号付けされる。

【 0 0 7 2 】

10

20

30

40

50

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書で定義する超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。例えば、軽鎖フレームワーク1 (LC-FR1)、フレームワーク2 (LC-FR2)、フレームワーク3 (LC-FR3) およびフレームワーク4 (LC-FR4) 領域は、それぞれ、抗体の1~23、35~49、57~88および98~107と番号付けされる残基を含むことがある (Kabata番号付けシステム)。別の例では、重鎖フレームワーク1 (HC-FR1)、重鎖フレームワーク2 (HC-FR2)、重鎖フレームワーク3 (HC-FR3) および重鎖フレームワーク4 (HC-FR4) は、それぞれ、抗体の残基1~25、36~48、66~92および103~113を含むことがある (Kabata番号付けシステム)。

【0073】

本明細書で言及する場合、「コンセンサス配列」またはコンセンサスVドメイン配列は、既知のヒト免疫グロブリン可変領域配列のアミノ酸配列の比較に由来する人工配列である。

【0074】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で用いる場合、実質的に均質な抗体の集団 (すなわち、モノクローナル抗体の生成中に生じ得る可能性のある変異体を除いて (このような変異体は、一般的により少ない量で存在する)、集団に含まれる個別の抗体が同一であり、かつ/または同じエピトープと結合する) からの抗体のことをいう。このようなモノクローナル抗体は、標的と結合するポリペプチド配列を含む抗体を典型的に含み、ここで、標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一標的結合ポリペプチド配列の選択を含むプロセスにより得られたものである。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローンまたは組換えDNAクローンのプールのような複数のクローンからのユニーククローンの選択であり得る。選択される標的結合配列は、さらに変更して、例えば、標的についての親和性を改善すること、標的結合配列をヒト化すること、細胞培養でのその生成を改善すること、*in vivo*でのその免疫原性を低減すること、多重特異性抗体を創出することなどができ、変更された標的結合配列を含む抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることが理解される。異なる決定基 (エピトープ) を指向する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物中のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基を指向する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、典型的には他の免疫グロブリンが混入していないという点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られたという抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の生成が要求されると解釈されない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法 (例えばKohlerら、*Nature*、256:495頁 (1975); Harlowら、*Antibodies: A Laboratory Manual*、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版、1988); Hammerlingら、*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563~681頁、(Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法 (例えば米国特許第4,816,567号を参照されたい)、ファージディスプレイ技術 (例えばClacksonら、*Nature*、352:624~628頁 (1991); Marksら、*J. Mol. Biol.*、222:581~597頁 (1991); Sidhuら、*J. Mol. Biol.* 338(2):299~310頁 (2004); Leeら、*J. Mol. Biol.* 340(5):1073~1093頁 (2004); Fellouse、*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467~12472頁 (2004); ならびにLeeら、*J. Immunol. Methods* 284(1~2):119~132頁 (2004)を参照されたい) およびヒトまたはヒト様抗体を、ヒト免疫グロブリン遺伝子座またはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部または全部を有する動物から生成するための技術 (例えばWO98/24893、WO96/34096、WO96/33735およびWO91/10741、Jakobovitsら、*Proc*

10

20

30

40

50

. Natl. Acad. Sci. USA、90:2551頁(1993); Jakobovitsら、Nature、362:255~258頁(1993); Bruggemannら、Year in Immuno.、7:33頁(1993); 米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、第5,591,669号(全てGenPharmのもの); 第5,545,807号; WO97/17852、米国特許第5,545,807号; 第5,545,806号; 第5,569,825号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; および第5,661,016号、ならびにMarksら、Bio/Technology、10:779~783頁(1992); Lonbergら、Nature、368:856~859頁(1994); Morrison、Nature、368:812~813頁(1994); Fishwildら、Nature Biotechnology、14:845~851頁(1996); Neuberger、Nature Biotechnology、14:826(1996); ならびにLonbergおよびHuszar、Intern. Rev. Immunol.、13:65~93頁(1995)を参照されたい)を含む様々な技術により作製してよい。

10

20

30

40

50

【0075】

本明細書においてモノクローナル抗体は、具体的に、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残りの部分は、別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、ならびに所望の生物活性を示す限りそのような抗体の断片を含む(米国特許第4,816,567号; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:6851~6855頁(1984))。キメラ抗体を作製する方法は、当該技術において既知である。

【0076】

非ヒト(例えばネズミ)抗体の「ヒト化」形は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖または非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab'))2または抗体のその他の抗原結合サブドメインである。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギのような非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。いくつかの場合では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体でも、取り入れられたCDRまたはフレームワーク配列でも見出されない残基を含むことがある。これらの改変は、抗体の性能をさらに洗練して最大限にするために一般的に行われる。典型的に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する超可変ループの全てまたは実質的に全てとFR領域の全てまたは実質的に全てとがヒト免疫グロブリン配列に由来する(FR領域は、例えば結合親和性を改善するために1つまたは複数のアミノ酸置換を含むことがあるが)少なくとも1つの可変ドメインの全てを実質的に含む。好ましい一実施態様では、ヒト化抗体は、典型的にヒト免疫グロブリンまたはヒトコンセンサス定常配列のものである免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分も含む。さらなる詳細について、Jonesら、Nature、321:522~525頁(1986); Reichmannら、Nature、332:323~329頁(1988); およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol.、2:593~596頁(1992)を参照されたい。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が例えば興味対象の抗原でマカクザルを免疫することにより生成された抗体に由来するPRIMATIZED(登録商標)抗体を含む。ヒト化抗体を作製する方法は、当該技術において既知である。

【0077】

ヒト抗体も、ファージディスプレイライブラリーを含む当該技術において既知の様々な技術を用いて生成できる。HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Bi

ol.、227:381頁(1991); Marksら、J. Mol. Biol.、222:581頁(1991)。ColeらおよびBoernerらの技術も、ヒトモノクローナル抗体を調製するために利用可能である。Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁(1985); Boernerら、J. Immunol.、147(1):86~95頁(1991)。LonbergおよびHuszar、Int. Rev. Immunol. 13:65~93頁(1995)も参照されたい。PCT公開パンフレットWO98/24893; WO92/01047; WO96/34096; WO96/33735; 欧州特許第0598877号; 米国特許第5,413,923号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,569,825号; 第5,661,016号; 第5,545,806号; 第5,814,318号; 第5,885,793号; 第5,916,771号; および第5,939,598号。

10

【0078】

「抗体断片」は、全長抗体の一部、一般的にその抗原結合または可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片; ダイアボディ; 直鎖抗体; 単鎖抗体分子; ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体を含む。

【0079】

「Fv」は、完全抗原認識部位および抗原結合部位を含有する最小限の抗体断片である。この断片は、緊密な非共有結合をしている1つの重鎖可変領域ドメインと1つの軽鎖可変領域ドメインとの2量体からなる。これらの2つのドメインの折り畳みから、6つの超可変ループ(HおよびL鎖からそれぞれ3ループ)が出て、これらが、抗原結合のためのアミノ酸残基をもたらし、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一可変ドメイン(またはある抗原に特異的な3つのCDRだけを含むFvの半分)は、結合部位全体よりも低い親和性であるが、抗原を認識して抗原と結合する能力を有することがある。

20

【0080】

本発明の抗体の「機能的断片」は、由来するインタクトな完全鎖分子と実質的に同じ親和性でのポリペプチドとの結合を保持し、少なくとも1つのアッセイ(例えばマウスモデルにおけるような線維症の阻害または抗体断片と*in vitro*で結合する抗原の生物活性の阻害)において活性である断片である。

【0081】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域(天然配列Fc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰することができ、抗体アイソタイプによって異なる生物活性のことをいう。抗体エフェクター機能の例は、C1q結合および補体依存性細胞傷害; Fc受容体結合; 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC); 食作用; 細胞表面受容体(例えばB細胞受容体)の下方制御; ならびにB細胞活性化を含む。「天然配列Fc領域」は、天然で見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。

30

【0082】

本明細書で同定するポリペプチドおよび抗体配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」または「相同性」は、いずれの保存的置換も配列同一性の一部とみなして配列を整列させた後の、比較するポリペプチド中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公共で利用可能なコンピュータソフトウェアを用いる当該技術における能力の範囲内である様々な方式で達成できる。当業者は、比較する配列の全長にわたって最大限のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適当なパラメータを決定できる。本明細書での目的のために、しかし、%アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.により制作され、ソースコードは、米国著作権局、Washington D.C.、20559にユーザ文書とともに提

40

50

出され、ここに米国著作権第 T X U 5 1 0 0 8 7 号の下で登録されている。A L I G N - 2 プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, California を通して公共に入手可能である。A L I G N - 2 プログラムは、U N I X オペレーティングシステム、好ましくはデジタル U N I X V 4 . 0 D で用いるためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは A L I G N - 2 プログラムにより設定され、変動しない。

【 0 0 8 3 】

用語「Fc 領域含有ポリペプチド」は、Fc 領域を含むポリペプチド、例えば抗体またはイムノアドヘシン（以下の定義を参照されたい）のことをいう。Fc 領域の C 末端リシン（EU 番号付けシステムに従って残基 4 4 7）は、例えばポリペプチドの精製中に、またはポリペプチドをコードする核酸の組換え工学的操作により取り除かれることがある。したがって、本発明による Fc 領域を有するポリペプチド（抗体を含む）を含む組成物は、全て K 4 4 7 残基が取り除かれたポリペプチドの集団、K 4 4 7 残基が取り除かれていないポリペプチドの集団、または K 4 4 7 残基を有するポリペプチドと有さないポリペプチドとの混合物を有するポリペプチドの集団を含むことができる。

10

【 0 0 8 4 】

本明細書および特許請求の範囲を通して、可変ドメイン（軽鎖のほぼ残基 1 ~ 1 0 7 および重鎖の残基 1 ~ 1 1 3）中のある残基に言及する場合に K a b a t 番号付けシステムを全般的に用いる（例えば K a b a t ら、Sequences of Immunological Interest、第 5 版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md. (1991)）。「EU 番号付けシステム」または「EU インデックス」を、免疫グロブリン重鎖定常領域中のある残基に言及する場合に全般的に用いる（例えば K a b a t ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第 5 版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD (1991) 中で報告されている EU インデックス（本明細書に参照により明示的に組み込まれている））。本明細書でそうでないと述べない限り、抗体の可変ドメイン中の残基番号への言及は、K a b a t 番号付けシステムによる残基番号付けを意味する。本明細書でそうでないと述べない限り、抗体の定常ドメイン中の残基番号への言及は、EU 番号付けシステムによる残基番号付けを意味する（例えば米国仮特許出願第 6 0 / 6 4 0 , 3 2 3 号、EU 番号付けについての図を参照されたい）。

20

30

【 0 0 8 5 】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者により容易に決定され、全般的に、プローブの長さ、洗浄温度および塩濃度に依存する経験的な算出である。全般的に、より長いプローブは、適当なアニーリングのためにより高い温度を要し、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、全般的に、相補鎖がそれらの融解温度未満の環境中に存在する場合に、変性 DNA が再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望の相同性の程度が高いほど、用いることができる相対的温度がより高い。その結果、より高い相対的温度は、反応条件をよりストリンジェントにする傾向があり、より低い温度はその傾向がより低いことになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明について、Ausubel ら、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience Publishers、(1995) を参照されたい。

40

【 0 0 8 6 】

「ストリンジェント条件」または「高いストリンジェンシー条件」は、本明細書で定義するように、(1) 洗浄のために低いイオン強度および高い温度、例えば 0 . 0 1 5 M 塩化ナトリウム / 0 . 0 0 1 5 M クエン酸ナトリウム / 0 . 1 % ドデシル硫酸ナトリウム、5 0 を採用するか、(2) ハイブリダイゼーション中にホルムアミドのような変性剤、

50

例えば50% (v/v)ホルムアミドと、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.5と、750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム、42 を採用するか、または(3)50%ホルムアミド、5xSSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5xデンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDSおよび10%デキストラン硫酸、42 を採用する溶液中での終夜のハイブリダイゼーションと、42、0.2xSSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中で10分間の洗浄と、その後のEDTAを含有する0.1xSSC、55 からなる10分間の高いストリンジェンシーでの洗浄により同定できる。

10

【0087】

「中程度のストリンジェント条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、New York: Cold Spring Harbor Press、1989により記載されるように同定でき、上記のものよりもストリンジェントでない洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば温度、イオン強度および%SDS)を用いることを含む。中程度にストリンジェントな条件の例は、20%ホルムアミド、5xSSC(150mM NaCl、15mMクエン酸3ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハルト溶液、10%デキストラン硫酸および20mg/ml変性せん断サケ精子DNAを含む溶液中で37にて終夜のインキュベーションと、その後の1xSSC中、約37~50でのフィルタの洗浄である。当業者は、プローブ長さなどのような因子を適応させるために必要なように温度、イオン強度などをどのようにして調整するかを認識している。

20

【0088】

本明細書で用いる場合、処置される対象は、哺乳動物(例えばヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコなど)である。対象は、臨床患者、臨床試験ボランティア、実験動物などであってよい。対象は、特発性肺線維症を有することが疑われるかもしくは有する危険性があるか、または特発性肺線維症と診断されていることがある。好ましい一実施態様に従って、本発明に従って処置される対象は、ヒトである。

30

【0089】

「処置する」または「処置」または「緩和」は、尺度のことであり、ここで、目的は、標的にする病的容態もしくは障害を妨げるかもしくは遅くする(小さくする)か、または該障害の症状のいくらかを軽減することである。処置を必要とするものは、既に障害を有するもの、および障害を有する傾向があるものまたは障害を妨げようとするものを含むことができる。対象または哺乳動物は、本発明の治療剤を受けた後に、患者が、以下の1つまたは複数において経時的(例えば3ヶ月間[12週間]または6ヶ月間[24週間]または9ヶ月間[36週間]または12ヶ月間[1年、52週間])にベースラインからの観察可能なおよび/もしくは測定可能な減少もしくは変化ならびに/またはベースラインからの測定可能な変化率を示すならば、特発性肺線維症について「処置」が成功している：努力肺活量(FVC)、一酸化炭素肺拡散能力(DL_{CO})、患者報告結果ツール、例えばIPFの生活の質判定ツール(ATAQ-IPF)またはEuroQol5元質問票(EQ-5D)、6分間歩行距離(6MWD)、安静時酸素流量、定量肺線維症(QLF)スコアを含む肺高分解能コンピュータ断層撮影(HRCT)でのX線撮影による知見、それらに限定されないがペリオスチン、CCL18、YKL40、COMP、OPN、CCL13を含む血清バイオマーカー。

40

【0090】

本明細書で用いる場合、「IPF増悪」は、以下の基準に合致する事象を意味する：過去30日以内の呼吸困難の説明のつかない悪化または発生；通常の間質性肺炎(UIP)と矛盾しない、網状または蜂巣背景パターンと重なりあう新しい両側スリガラス異常および/または硬化の放射線学的証拠；ならびに代替の原因、例えば左心不全、肺塞栓症、肺

50

感染（気管内吸引液もしくは利用可能であれば気管支肺胞洗浄、または調査者の判断に基づく）または急性肺傷害を導くその他の事象（例えば敗血症、誤嚥、外傷、再灌流肺水腫）が存在しないこと。

【0091】

本明細書で用いる場合、「IPF悪化」または「疾患のIPF悪化」は、以下の(i)、(ii)および(iii)に合致する事象を意味する：(i)過去30日以内の呼吸困難の説明のつかない悪化または発生ならびに(ii)以下のいずれか2つ：(a)UIPと矛盾しない、網状または蜂巣背景パターンと重なりあう新しい両側スリガラス異常および/または硬化の放射線学的証拠；(b)以下の基準の少なくとも1つに合致する肺機能の悪化：(I)少なくとも10%のFVC(L)；(II)DL_co (mL CO/min - 1/mmHg - 1)、少なくとも15%；(III)酸素飽和(SpO₂)少なくとも4%；ならびに(iii)代替の原因が存在しないこと。

10

【0092】

「有効量」は、投与量および必要な期間にて、所望の治療的または予防的結果を達成するために有効な量のことをいう。

【0093】

用語「治療有効量」は、対象における疾患または障害を「緩和」または「処置」するために有効な本発明のポリペプチドの量のことをいう。治療剤の治療有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重ならびに個体において所望の応答を惹起する抗体の能力のような因子によって変動することがある。治療有効量は、治療の利益的な効果が治療剤のいずれの毒性または有害な影響にも勝るものでもある。「予防有効量」は、投与量および必要な期間にて、所望の予防的結果を達成するために有効な量のことをいう。典型的には(しかし必ずしもではない)、予防的用量は疾患の早期段階の前または早期段階にて対象において用いられるので、予防有効量は、治療有効量より少ない。

20

【0094】

「慢性」投与は、急性モードに対して、連続的なモードで剤を投与して、初期治療効果(活性)を長期間維持することをいう。「間欠的」投与は、中断なく連続的に行うのではなく、むしろ周期的な性質での処置である。

【0095】

「強制呼気量(FEV₁)」は、強制呼気の最初の1秒において排出される空気の容量を測定する標準的な試験のことをいう。FEV₁は、結果を記録してそれをグラフ上に示す機械に接続されたマウスピースと使い捨ての配管とからなる肺活量計により測定される。肺活量測定を行うためには、深く息を吸って、管の周りで口を固く閉じ、次いで配管を通して息を吐き出し、その間に測定が行われる。吐き出された空気の容量および各呼吸にかかった時間を記録して分析する。肺活量測定の結果は、パーセンテージとして表される。肺活量測定の正常な結果の例は、1秒後に肺活量の75パーセントのFEV₁を含む。肺活量測定の異常な結果の例は、正常に予測される値の80パーセント未満の読み取り値を含む。異常な結果は、通常、喘息、肺気腫もしくは慢性気管支炎のような閉塞性肺疾患、または肺線維症のような拘束性肺疾患のある程度の存在を示す。例えば、FEV₁値(予測値に対するパーセンテージ)を用いて、喘息および肺気腫または慢性気管支炎のようなその他の閉塞性肺疾患で生じることがある閉塞を分類できる：予測FEV₁ 65パーセントから79パーセント=穏やかな閉塞、予測FEV₁ 40パーセントから59パーセント=中程度の閉塞、および予測FEV₁ 40パーセント未満=重度の閉塞。さらに、閉塞性および拘束性肺疾患は、以下の点で少なくとも異なる。閉塞性疾患では、FEV₁/FVC比は正常より低いことがあり、FVCは正常であることがあるが、拘束性疾患では、FEV₁およびFVCはともに、正常より低いことがあるが、FEV₁/FVC比は正常であることがある。このような場合、FEV₁は、FVCが低減していることによってのみ低減する。

30

40

【0096】

本明細書で用いる場合、「FVC」は、完全吸気量と残気量までの最大呼気との間の肺

50

空気量の変化（F E V 1においては1秒で吐き出された空気の容量であるのに対して）を測定する標準的な試験のことである「努力肺活量」のことをいう。これは、機能的肺能力の尺度である。I P F、過敏性肺臓炎、サルコイドーシスおよび全身性強皮症を含む間質性肺疾患のような拘束性肺疾患の患者では、F V Cは、典型的に肺実質の瘢痕により低減する。

【0097】

本明細書で記載するようにして（例えばマイクロアレイ分析により）遺伝子（および遺伝子によりコードされるタンパク質）を同定するために用いることができる核酸プローブの例は、それらに限定されないが、表2、3および4に記載するプローブを含む。

【0098】

「発現レベルの上昇」または「レベルの上昇」は、I P Fに罹患していない1つまたは複数の個体のような対照に対する、患者（例えばI P Fを有することが疑われるかまたはI P Fであると診断された患者）におけるm R N Aまたはタンパク質の発現の増加のことをいう。

【0099】

全般的な技術

本発明の実施は、そうでないと示さない限り、当該技術の熟練の範囲内である分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の慣習的な技術を用いる。このような技術は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版（Sambrookら、1989）；「Oligonucleotide Synthesis」（M. J. Gait編、1984）；「Animal Cell Culture」（R. I. Freshney編、1987）；「Methods in Enzymology」（Academic Press, Inc.）；「Current Protocols in Molecular Biology」（F. M. Ausubelら編、1987および周期的な改訂）；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」（Mullisら編、1994）のような文献に十分に説明されている。

【0100】

本発明で用いるプライマー、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、当該技術において既知の標準的な技術を用いて作製できる。

【0101】

I P FおよびI P Fのある種のサブタイプと関連する遺伝子発現サインが、本明細書において示される。これらのサインは、I P Fおよび/もしくはI P Fのサブタイプについてのバイオマーカーであり、かつ/またはI P Fの発展、持続および/もしくは進行の素因をつくるかもしくは発展、持続および/もしくは進行に貢献し、かつI P F患者の生存期間の予後予測となる。したがって、本明細書で開示する発明は、様々な背景、例えばI P F予後予測、診断および治療に関わる方法および組成物において有用である。

【0102】

遺伝子発現レベルの検出

本明細書で記載する方法のいずれかに従う核酸は、ゲノムD N Aから転写されたR N AまたはR N Aから作製されたc D N Aであってよい。核酸は、脊椎動物、例えば哺乳動物に由来してよい。核酸は、それがその供給源から直接得られるか、またはそれがその供給源で見出される核酸のコピーであるならば、ある特定の供給源に「由来する」と言われる。

【0103】

核酸は、核酸のコピー、例えば増幅により得られるコピーを含む。増幅は、例えば変動を検出するために所望の量の物質を得るために、ある種の場合において望ましいことがある。アンプリコンを、次いで、以下に記載するもののような変動検出法に供して、ある種の遺伝子の発現を決定してよい。

【0104】

10

20

30

40

50

マイクロアレイは、例えば cDNA または cRNA 試料と高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするための整列された一連の数千の核酸プローブを典型的に用いるマルチプレックス技術である。プローブ-標的ハイブリダイゼーションは、標的における核酸配列の相対的豊富さを決定するための蛍光体、銀または化学発光で標識された標的の検出により典型的に検出および定量される。典型的なマイクロアレイでは、プローブを、化学的マトリクスとの共有結合（エポキシ-シラン、アミノ-シラン、リシン、ポリアクリルアミドなどを用いて）により固体表面に付着させる。固体表面は、例えばガラス、シリコンチップまたは顕微鏡規模のビーズである。様々なマイクロアレイが、例えば Affymetrix, Inc. および Illumina, Inc. により製造されるものを含んで、市販で入手可能である。

10

【0105】

タンパク質発現レベルの検出

タンパク質の発現レベルは、全血、血漿または血清の試料中で検出できる。このような生体試料中でタンパク質発現レベルを検出するための様々な方法が、様々なイムノアッセイ法を含んで、当該技術において既知である。広範囲のイムノアッセイ技術が、以前に記載されており、例えば米国特許第 4,016,043 号、第 4,424,279 号および第 4,018,653 号を参照されたい。これらは、非競合型の単一部位および 2 部位または「サンドイッチ」アッセイの両方、ならびに伝統的な競合的結合アッセイを含む。これらのアッセイは、標的バイオマーカーとの標識された抗体の直接結合も含む。

20

【0106】

サンドイッチアッセイは、なかでも、最も有用で一般的に用いられるアッセイである。サンドイッチアッセイ技術のいくつかの変形が存在し、これらの全てを本発明に包含することを意図する。簡単に述べると、典型的なフォワードアッセイでは、未標識の抗体を固体基体上に固定化し、試験される試料を結合した分子と接触させる。抗体-抗原複合体の形成を可能にするのに十分な期間にわたる適切な期間のインキュベーションの後に、抗原に特異的で、検出可能なシグナルを生成できるレポーター分子で標識した第 2 の抗体を次いで加えてインキュベートし、抗体-抗原-標識抗体の別の複合体の形成のために十分な時間を与える。いずれの未反応物質も洗い流され、抗原の存在が、レポーター分子により生成されるシグナルを観察することにより決定される。結果は、可視化されたシグナルの単純観察により定性的であってよいが、または既知の量のバイオマーカーを含有する対照試料と比較することにより定量してよい。

30

【0107】

フォワードアッセイの変形は、同時アッセイを含み、ここでは、試料および標識された抗体をともに同時に、結合した抗体に加える。これらの技術は、容易に明らかになる任意のわずかな変形を含んで、当業者に公知である。典型的なフォワードサンドイッチアッセイでは、バイオマーカーについての特異性を有する第 1 の抗体を、固体表面に共有的または受動的に結合させる。固体表面は、典型的に、ガラスまたはポリマーであり、最も一般的に用いられるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンである。固体支持体は、管、ビーズ、マイクロプレートのディスクまたはイムノアッセイの実行のために適切な任意のその他の表面であってよい。結合プロセスは、当該技術において公知であり、一般的に、架橋共有結合または物理的吸着することからなり、ポリマー-抗体複合体を、試験試料の調製において洗浄する。分割量の試験される試料を次いで固相複合体に加え、十分な時間（例えば 2 ~ 40 分間またはより簡便であるならば終夜）、適切な条件下（例えば室温から 40 °C まで、例えば 25 °C 以上 32 °C 以下）でインキュベートして、抗体中に存在する任意のサブユニットの結合を可能にする。インキュベーション期間の後に、抗体サブユニット固相を洗浄し、乾燥し、バイオマーカーの一部分に特異的な第 2 の抗体とインキュベートする。第 2 の抗体はレポーター分子に連結されており、これを用いて分子マーカーとの第 2 の抗体の結合を示す。

40

【0108】

50

代替法は、試料中の標的バイオマーカーを固定化し、次いで、固定化された標的を、レポーター分子で標識されるかまたはされなくてよい特異的抗体に曝露することを含む。標的の量およびレポーター分子シグナルの強度に依存して、結合した標的を、抗体で直接標識することにより検出できる。代わりに、第1の抗体に特異的な第2の標識された抗体を、標的-第1の抗体複合体に曝露して、標的-第1の抗体-第2の抗体の3元複合体を形成する。この複合体は、レポーター分子が発するシグナルにより検出される。「レポーター分子」により、本明細書で用いる場合、その化学的性質により、抗原と結合した抗体の検出を可能にする分析的に同定できるシグナルを与える分子を意味する。この型のアッセイで最も一般的に用いられるレポーター分子は、酵素、蛍光体または放射性核種含有分子（すなわち放射性同位体）および化学発光分子のいずれかである。

10

【0109】

酵素イムノアッセイの場合、酵素は、一般的にグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩により第2の抗体にコンジュゲートされる。容易に認識されるように、しかし、様々な種類の異なるコンジュゲーション技術が存在し、これらは、当業者が容易に利用可能である。一般的に用いられる酵素は、なかでもセイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼを含む。特異的酵素とともに用いられる基質は、全般的に、対応する酵素による加水分解による、検出可能な色の変化の生成について選択される。適切な酵素の例は、アルカリホスファターゼおよびペルオキシダーゼを含む。上に記載する色素産生基質よりもむしろ蛍光生成物を産出する蛍光産生基質を採用することもできる。全ての場合では、酵素で標識した抗体を、第1の抗体-分子マーカー複合体に加え、結合させ、次いで過剰な試薬を洗い流す。適当な基質を含有する溶液を、次いで、抗体-抗原-抗体の複合体に加える。基質は、第2の抗体に連結された酵素と反応し、定性的な可視化シグナルが得られ、これをさらに、通常は分光学的に定量でき、試料中に存在したバイオマーカーの量の表示を得る。代わりに、フルオレセインおよびローダミンのような蛍光化合物を、それらの結合能を変更することなく抗体に化学的にカップリングさせてよい。特定の波長の光で照射することにより活性化されると、蛍光色素で標識された抗体は光エネルギーを吸着し、分子の励起状態を誘導し、その後、光学顕微鏡で視覚的に検出可能な特徴的な色で光を放射する。EIAのように、蛍光で標識された抗体を、第1の抗体-分子マーカー複合体と結合させる。未結合の試薬を洗い流した後に、残りの3元複合体を、次いで、適当な波長の光に曝露し、観察される蛍光は、対象の分子マーカーの存在を示す。免疫蛍光およびEIA技術はともに、当該技術において十分に確立されている。しかし、放射性同位体、化学発光または生物発光分子のようなその他のレポーター分子も採用してよい。

20

30

【0110】

生体試料は、当業者に既知のある種の方法を用いて得ることができる。生体試料は、脊椎動物、特に哺乳動物から得ることができる。ある種の場合では、生体試料は、肺組織、全血、血漿、血清または末梢血単核細胞(PBMC)である。このような体試料をスクリーニングすることにより、単純な早期の予後予測(例えば生存期間の)または診断(例えば分子サブタイプの)をIPFについて達成できる。さらに、治療の進行を、標的核酸(またはコードされるポリペプチド)の発現レベルの変動についてこのような体試料を試験

40

【0111】

対象、組織または細胞試料が本明細書で開示する遺伝子発現サインを含むことを決定した後に、有効量の適当なIPF治療剤を対象に投与して、対象におけるIPFを処置することが企図される。本明細書に記載する様々な病的容態の哺乳動物における臨床診断は、熟練した医師が行うことができる。例えば哺乳動物におけるIPFの診断または検出を可能にする臨床診断技術は、当該技術において利用可能である。

【0112】

IPF治療剤は、急速投与もしくはある期間にわたる連続注入による静脈内投与、筋内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、くも膜下腔内、経口、局部または吸入経路

50

によるような既知の方法に従って投与できる。場合によって、投与は、様々な市販のデバイスを用いるミニポンプ注入により行ってよい。

【0113】

ある種の治療剤

ある種の治療剤が、IPFの処置のための候補または剤として以前に記載されている。これらは、公開された文献に記載され、例えばRafiiら、J. Thorac. Dis (2013) 5(1): 48~73頁において見直すことができる。このような剤は、N-アセチルシステインのような抗酸化、免疫抑制および/または抗炎症活性を有する薬剤; IPFの処置における臨床的使用について承認されているピルフェニドン、経口投与用ピリジンのような抗線維化、抗炎症および/または抗酸化活性を有する薬剤; 全てのTGF- β 1/Aイソフォームを標的にする抗TGF- β 1抗体(例えばGC1008)またはv6インテグリンに対する抗体(例えばSTX-100)のようなトランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)を阻害する薬剤; 抗CTGF抗体(例えばFG-3019)のような結合組織増殖因子(CTGF)を阻害する薬剤; ソマトスタチンアナログ(例えばSOM230、オクトレオチド)のようなソマトスタチン受容体を阻害する薬剤; 抗IL13抗体(例えばQAX576、トラロキヌマブ、レプリキズマブ[以下にさらに記載する])、抗IL4抗体、組み合わせ抗IL13/抗IL4剤(例えばSAR156597のような二重特異性抗IL13/抗IL4抗体)、抗CCL2抗体(例えばCNTO888)のようなIL-13、IL-4およびCCL2を阻害する薬剤; サリドマイドまたはミノサイクリンのような抗血管新生、免疫調節および/または抗炎症活性を有する薬剤; 抗LOXL2抗体(例えばGS-6624[シムツズマブ])のような酵素リシルオキシダーゼ様2(LOXL2)を阻害する薬剤; チロシンキナーゼ阻害剤、BIBF1120、テトラチオモリブデートのような血管新生を阻害する薬剤; 剤ドキシサイクリンのような細胞外マトリクスの沈着を阻害し、かつ/またはコラーゲン沈着を混乱させる剤; ロサルタンのようなレニン-アンジオテンシンシステムを標的にする薬剤; ならびに一酸化炭素のような抗増殖および/または抗線維化活性を有するその他の薬剤を含む。

【0114】

特発性肺線維症の処置のためのある治療剤が本明細書で提供される。一実施態様では、治療剤は、レプリキズマブともよばれる抗IL13抗体である。レプリキズマブは、IgG4抗体である。一実施態様では、抗IL13抗体は、3つの重鎖CDR、CDR-H1(配列番号1)、CDR-H2(配列番号2)およびCDR-H3(配列番号3)を含む。一実施態様では、抗IL13抗体は、3つの軽鎖CDR、CDR-L1(配列番号4)、CDR-L2(配列番号5)およびCDR-L3(配列番号6)を含む。一実施態様では、抗IL13抗体は、3つの重鎖CDRと3つの軽鎖CDR、CDR-H1(配列番号1)、CDR-H2(配列番号2)、CDR-H3(配列番号3)、CDR-L1(配列番号4)、CDR-L2(配列番号5)およびCDR-L3(配列番号6)を含む。一実施態様では、抗IL13抗体は、配列番号7および8から選択されるアミノ酸配列を有する可変重鎖領域VHを含む。一実施態様では、抗IL13抗体は、配列番号9のアミノ酸配列を有する可変軽鎖領域VLを含む。一実施態様では、抗IL13抗体は、配列番号7および8から選択されるアミノ酸配列を有する可変重鎖領域VHと、配列番号9のアミノ酸配列を有する可変軽鎖領域VLとを含む。一実施態様では、抗IL13抗体は、配列番号10または配列番号11または配列番号12または配列番号13のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一実施態様では、抗IL13抗体は、配列番号14のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。一実施態様では、抗IL13抗体は、配列番号10、配列番号11、配列番号12および配列番号13から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖と、配列番号14のアミノ酸配列を有する軽鎖とを含む。抗IL13抗体は、国際公開パンフレット第2005/062967号にさらに記載されている。

【0115】

別の態様では、抗IL-13抗体は、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

0%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある種の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入または欠失を含有するが、この配列を含む抗IL-13抗体は、ヒトIL-13と結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号8において合計で1から10のアミノ酸が置換、変更、挿入および/または欠失されている。ある種の実施態様では、置換、挿入または欠失は、CDRの外側の領域(すなわちFR中)で生じる。場合によって、抗IL13抗体は、配列番号8中にVH配列(その配列の翻訳後改変を含む)を含む。

【0116】

別の態様では、配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む抗IL-13抗体が提供される。ある種の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換(例えば保存的置換)、挿入または欠失を含有するが、この配列を含む抗IL-13抗体は、IL-13と結合する能力を保持する。ある種の実施態様では、配列番号9において合計で1から10のアミノ酸が置換、挿入および/または欠失されている。ある種の実施態様では、置換、挿入または欠失は、CDRの外側の領域(すなわちFR中)で生じる。場合によって、抗IL13抗体は、配列番号9中にVL配列(その配列の翻訳後改変を含む)を含む。

【0117】

なお別の実施態様では、抗IL-13抗体は、配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVL領域と、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVH領域とを含む。

【0118】

キット

本明細書に記載または示唆する用途で用いるために、キットまたは製品も提供される。このようなキットは、バイアル、チューブなどのような1または複数の容器手段を緊密に閉じ込めて収容するように区画化された担持手段を含んでよく、各容器手段は、方法において用いるための分離要素の1つを含む。例えば、容器手段の1つは、検出可能に標識されているかまたは標識できるプローブを含んでよい。このようなプローブは、遺伝子発現サインの1つまたは複数の遺伝子を含むポリヌクレオチドに特異的なポリヌクレオチドであってよい。キットが核酸ハイブリダイゼーションを用いて標的核酸を検出する場合、キットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチドを含有する容器および/または酵素、蛍光もしくは放射性同位体標識のようなレポーター分子と結合したアビジンもしくはストレプトアビジンのようなビオチン結合タンパク質のようなレポーター手段を含む容器も含んでよい。

【0119】

キットは、上記の容器と、緩衝剤、希釈剤、フィルタ、針、シリンジおよび使用説明のための包装挿入物を含む、商業的およびユーザの観点から望ましい物質を含む1または複数の他の容器とを典型的に含む。組成物を特定の治療または非治療的用途のために用いることを示し、上記のもののような*in vivo*または*in vitro*での使用のいずれかについての指示も示すことがあるラベルが容器上に存在することがある。キット中のその他の任意選択の構成成分は、1または複数の緩衝剤(例えばブロッック緩衝剤、洗浄緩衝剤、基質緩衝剤など)、酵素標識により化学的に変更される基質(例えば色原体)、エピトープ修復溶液、対照試料(陽性および/または陰性対照)、対照スライドなどのようなその他の試薬を含む。

【0120】

マーケティングの方法

本明細書における発明は、本明細書で開示するように遺伝子もしくはタンパク質または遺伝子とタンパク質との組み合わせの発現レベルを示す試料が得られたIPFの患者または患者集団を処置するために、治療剤またはその医薬組成物の使用を標的消費者に対して販売促進、指示および/または明示することを含む、IPF治療剤またはその薬学的に許容される組成物をマーケティングする方法も包含する。

【0121】

マーケティングは、通常、出資者が同定され、メッセージが制御される非個人媒体による有給の通信である。本明細書における目的のためのマーケティングは、周知、広告活動、プロダクトプレースメント、財政援助、引受業務および販売促進を含む。この用語は、本明細書における発明を購入、支持または承認する好ましいパターンに向けて説得、認知、促進、動機づけ、または挙動を変更するように多数の消費者に訴えるように設計された任意の印刷通信媒体に現れる出資された情報公示も含む。

10

【0122】

本明細書における診断方法のマーケティングは、任意の手段により達成してよい。これらのメッセージを送達するために用いられるマーケティング媒体の例は、テレビ、ラジオ、映画、雑誌、新聞、インターネットおよび放送媒体に現れるメッセージであるコマーシャルを含む広告掲示版を含む。

【0123】

用いられるマーケティングの型は、多くの因子、例えば到達する標的消費者の性質、例えば病院、保険会社、診療所、医師、看護師および患者、ならびに費用の点および医薬品および診断薬のマーケティングを管轄する関連する管轄の法および規則に依存する。マーケティングは、サービス相互作用ならびに/またはユーザ人口統計および地理的位置のようなその他のデータにより規定されるユーザの特徴に基づいて個別化またはカスタマイズしてよい。

20

【0124】

本明細書で引用する全ての出版物（特許および特許出願を含む）は、本明細書にそれらの全体が参照により組み込まれている。

【0125】

本明細書および特許請求の範囲を通して、語句「含む（comprise）」または「含む（comprises）」または「含む（comprising）」のような変形は、記載する整数または整数の群の包含を意味するが、任意のその他の整数または整数の群の除外を意味しないことが理解される。

30

【0126】

上記の記載は、当業者が本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。以下の実施例は、説明の目的のみのために与えられ、本発明の範囲をいずれの方式でも限定することを意図しない。実際に、本明細書で示し記載するものに加えて本発明の様々な改変が、上記の記載から当業者に明らかになり、添付の特許請求の範囲内にある。

【0127】

特許出願および出版物を含む本明細書で引用する全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が全ての目的のために組み込まれている。

40

【実施例】

【0128】

実施例1：IPFにおける生存期間予後予測のための全身性バイオマーカーの同定

IPF生存期間を予後予測するために有用になり得る分子バイオマーカーを同定するために、我々は、まず、40名のIPF患者および8名の未使用ドナー対照からの肺組織（「コホート1」）においてマイクロアレイおよびqPCR法を用いて遺伝子発現分析を行った。遺伝子発現の結果から、我々は、次いで、候補予後予測血清バイオマーカーを同定した。それぞれの候補予後予測血清バイオマーカーの血清レベルおよび肺機能を、University of California, San Franciscoの間質性肺

50

疾患診療所への提示の時に採取された80名のIPF患者の別のコホート(「コホート2」)において判定した。生存状態を、試料採取後2~8年にわたって追跡した。

【0129】

方法

ヒト肺組織

組織は、University of California, San Francisco Lung Centerにて生検または肺移植の時にIPF患者から採集した。非IPF対照は、ドナー肺から採集した。さらなる詳細は、結果の項に示す。

【0130】

組織培養

IMR-90細胞(ATCC, Manassas, VA;カタログ#CCL-186)を、10%FBS(Sigma, St. Louis, MO;カタログ#F2442)およびペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen, Carlsbad, CA;カタログ#15140)を補ったDMEM培地で培養した。細胞を、増殖因子低減Matrigel(商標)(GFR Matrigel(商標);BD Biosciences, Bedford, MA;カタログ#354230)の床の上に播種した。Matrigel(商標)を氷上で終夜融解し、Matrigel(商標)を37℃にて30分間固まらせることにより、12ウェルプレート中に450ul/ウェルの充填容積を得た。細胞(1E5-2E5)を次いでMatrigel(商標)の床の上に播種した。そうでないと示さない限り、IL-13刺激は、10ng/ml(IL-13およびTNF)および3ng/ml(IL-4)を用いて行った。

【0131】

RNA調製

急速凍結肺生検試料を、予め冷却した(液体窒素中で)Bessman組織粉碎機(Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA;カタログ#189475)中で粉碎した。Trizol(登録商標)を粉碎した物質に加え、数回ピペット操作した。可溶化液を氷上で10~15分間インキュベートした。可溶化液をさらなる処理まで-80℃にて貯蔵した。RNAは、Trizol(登録商標)可溶化液から、製造者のプロトコールに従って単離した。Trizol(登録商標)で単離したRNAを、次いで、製造者のプロトコールに従ってQiagen RNeasyカラムを用いることによる別の精製ステップに供した。

【0132】

組織培養した細胞を、1ml(12ウェルプレートのウェルあたり)のTrizol(登録商標)を加え、混合物を数回ピペット操作することにより採集した。Trizol(登録商標)可溶化液を、Qiagen RNeasyプロトコールに示されるように鋼鉄ビーズ/TissueLysor(Qiagen)法(20s⁻¹、4分間)を用いてホモジナイズした。ホモジナイゼーションの際に、RNAは、Trizol(登録商標)の製造者のプロトコールに従って単離した。Trizol(登録商標)で単離したRNAを、次いで、製造者のプロトコールに従ってQiagen RNeasyカラムを用いることによる別の精製ステップに供した。

【0133】

RNA濃度は、分光分析(Nanodrop, Thermo Scientific)により決定し、全てのマイクロアレイ試料は、バイオアナライザ(Agilent)により分析した。

【0134】

RT-qPCR

100~300ngのトータルRNAを、製造者のプロトコールに従って高容量cDNA逆転写キット(ABI,カタログ#4368814)を用いてランダムプライマーを用いる逆転写に供した。リアルタイムqPCRは、Taqmanアッセイを用いて行った。全ての反応は、ABI 7900HT装置またはFluidigmプラットフォーム(4

10

20

30

40

50

8.48または96.96フォーマット)のいずれかで行った。

【0135】

IL-13レポーターアッセイ

L-Luc-BEAS-2B (Genentechにより構築された株化細胞; BEAS-2B、ATCC、Manassas、VAに由来; cat.no. CRL-9609)を、以下に示すような試薬を包埋したGFR Matrigel (商標)で成長させた: 12 ng/ml IL-13 (R&D Systems、カタログ# 213-IL)および抗IL-13遮断抗体 (Genentech)。ホタルルシフェラーゼ活性を、ホタルルシフェラーゼのみを測定するように変更して製造者のプロトコールに従ってDual-Gloルシフェラーゼアッセイシステム (Promega、カタログ# E2920)を用いて測定した。

10

【0136】

マイクロアレイ分析

RNAを、Quick Amp 標識化キット (Agilent Technologies、Cat.No. 5190-0444)を用いて増幅および標識して、1ugのトータルRNAから標識されたcRNAを作製した。実験試料を、Cy5で標識した。ユニバーサルヒト参照RNA (Stratagene、La Jolla、CA)を参照チャンネルのために用い、Cy3で標識した。Cy5およびCy3で標識されたcRNAを、2色全ヒトゲノム4x44K遺伝子発現マイクロアレイプラットフォーム (Agilent Technologies、Cat.No. G4112F)と競合的にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしたマイクロアレイを製造者のプロトコール (Agilent)に従って洗浄し、全ての特徴強度を、Agilentマイクロアレイスキャナを用いて収集した。走査したスライドのTIFF画像を、特徴抽出ソフトウェアバージョン7.5 (Agilent)、プロトコールGE2-v5__95 (Agilent)を用いて分析した。フラグが付けられたアウトライアーは、いずれの後続の分析にも含めなかった。全てのデータを、染料で標準化したCy5/Cy3比のlog₂値として報告する。全ての試料のlog₂比を、対応する模擬処理試料 (または非IPF対照)の平均log₂比に対して標準化した。

20

【0137】

異なる発現プロファイリングデータセットを比較した場合、公共で利用可能なデータセットを、元の研究と同様にまずフィルタにかけ、標準化し、中心にした。Kaminskiデータセット (GSE10667) (Konishiら、Am.J.Respir.Crit.Care Med. 180(2): 167~75頁 (2009))を、全ヒトゲノムAgilentマイクロアレイプラットフォームについて運転し、よって、プラットフォーム特異的プローブ識別子を用いてデータセットを接続した。ヒートマップを、Java Treeviewを用いて作成した。

30

【0138】

示差的に発現される遺伝子を、R (LIMMA)において、3つの因子、すなわち診断、組織供給源および性別 (Y連鎖遺伝子の発現分析から推測される)を取り込んだ線形モデルを構築することにより同定した。

40

【0139】

血液バイオマーカーアッセイ

以下のマーカーのレベルを、製造者の使用説明に従って市販のアッセイを用いて血清中で判定した: COMP (Abnova、Taipei、Taiwan、カタログ# KA0021); MMP7 (R&D Systems、Minneapolis、MN、カタログ# DMP700); CXCL13 (R&D Systems、Minneapolis、MN、カタログ# DCX130); CCL13 (R&D Systems、Minneapolis、MN、カタログ# DY327); YKL-40 (R&D Systems、Minneapolis、MN、カタログ# DY2599); MMP3 (Meso Scale Discovery、Gaithersburg、MD、カタログ# K150

50

34C); SAA (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, カタログ# K151EOC-1); CCL11 (エオタキシン) および CCL17 (TARC) (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, カタログ# 15031C)。OPNのレベルは、血漿中で、製造者の使用説明に従って市販のアッセイを用いて判定した (R&D Systems, カタログ# DOST00)。血清ペリオスチンは、以前に記載されるようにして、特許権により保護されているアッセイを用いて分析した (例えば国際特許出願第 PCT/US2011/065410号)。血清 CCL18 について、マトリクス干渉を以下のようにして改善するための改変を製造者のプロトコルに加えて、市販のアッセイを用いた (R&D Systems, カタログ# DY394) : 96 ウェルプレート を、マウス抗ヒト CCL18 モノクローナル抗体で4 にて終夜被覆し、次いで、1 x PBS pH 7.4、0.5% BSA、0.05% Tween 20、0.25% CHAPS、5 mM EDTA、0.35 M NaCl および 15 PPM プロクリン を含有する緩衝液を用いてブロックした。5% FBS 含有アッセイ希釈剤で 1 : 1000 に希釈した血清試料を二重に加え、プレートを、室温 (20) にて2時間インキュベートした。洗浄の後に、5% ヤギ血清含有アッセイ希釈剤中のビオチン化ヤギ抗ヒト CCL18 モノクローナル抗体をプレートに加え、室温 (20) にて1時間インキュベートした。ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼおよび基質 TMB を用いて洗浄の後に発色させた。このアッセイの検出限界は、およそ 7.8 pg/ml であった。

10

【0140】

20

結果

研究コホートの特徴決定

コホート1から得られた試料について、40名のIPF患者および8名の対照からの生検組織を、マイクロアレイおよびqPCR研究において用いた。IPF試料のうち11は、胸腔鏡下生検から得て、29の試料は、肺移植の時に得られた外植片から得た。対照組織は全て、未使用のドナー肺から外植した。ドナー肺は、肺以外の原因 (例えば外傷) で死亡したが、死亡からの時間が過剰であることまたは血液型、血管もしくはHLAミスマッチによる適切なレシピエントが入手可能でないことのような理由により移植のために用いることができなかった、間質性肺疾患の証拠がない対象から全般的に得られた。全てのIPF生検検体からの隣接組織は、通常の間質性肺炎 (UIP) パターンを有することを確認した。31のIPFおよび15の対照試料からなる公共でダウンロードして入手した再現データセットは、以前に記載されている (Konishiら、Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180 (2) : 167~75頁 (2009))。

30

【0141】

コホート2から得られた試料について、血清および血漿はともに、University of California, San Franciscoの間質性肺疾患診療所への提示の時に80名のIPF患者のそれぞれから採取した。このコホートの臨床的および人口統計学的特徴を、以下の表1に記載する。健常対照からの血清 (N = 29) または血漿 (N = 10) を用いて、バイオマーカーレベルについての正常範囲を確立した。

表1.コホート2の臨床的および人口統計学的特徴

変数	中央値(IQR)(そうでないと示さない限り)
性別(M:F)	62:16
最初の訪問時の年齢、中央値(範囲)	70(50-87)
その後の肺移植(Y:N)	7:63
喫煙経験(Y:N)	58:16
現在の喫煙(Y:N)	1:73
全身性ステロイド剤±アザチオプリン(Y:N)	21:59
予測 FVC%	69(57-81)
予測 TLC%	70(59-78)
予測 DL _{CO} %	48(36-60)
呼吸困難スコア ¹	10(5.5-16)
X線撮影によるスコア ²	12(7.7-20.4)

10

FVC=努力肺活量; TLC=全肺気量; DL_{CO}=拡散能力(一酸化炭素を用いて測定); IQR=四分位範囲、25~75パーセントイル;¹=Wattersら、Ann.Rev.Resp.Dis.133:97頁(1986)による1~20の尺度での呼吸困難スコア;²=Bestら、Radiology246:935頁(2008)に記載される方法に従う、線維性である肺のパーセントのX線撮影によるスコア見積もり。

20

【0142】

IPFにおいて示差的に発現される遺伝子の同定

我々は、コホート1(40名のIPF患者および8名の未使用ドナー対照の対象)からの肺組織から単離したRNAのゲノム規模のトランスクリプトーム分析を、全ヒトゲノムマイクロアレイ(Agilent Technologies、Cat.No.G4112F)を用いて行った。限られて利用可能であったメタデータ(性別、組織供給源(生検または肺移植の時に採集された組織)、診断)を、用いた線形モデルに含めて、IPF患者と対照との間で示差的に発現される(DE)遺伝子を同定した。我々は、対照組織と比較してIPF組織において示差的に発現される($q < 0.05$ 、倍数変化 > 1.5)2940のマイクロアレイプローブを同定した(部分的なリストを表2に示す)。ここで観察される全体的なIPF発現プロファイルが試料採取方法またはその他の混乱させる因子により与えられる系統的バイアスの影響を受ける可能性を低減させるために、我々は、発現プロファイルを、類似するが独立して作製されたIPFデータセット(Konishiら、Am.J.Respir.Crit.Care Med.180(2):167~75頁(2009))と比較した。このデータセット(GSE10667)は、31名のIPF患者および肺腫瘍切除の後に周囲の非悪性領域から採集した15名の対照肺組織からの肺生検の発現プロファイルについて表した。我々は、各遺伝子について、対照試料と比較した、IPF試料の発現レベルの偏差について示すT統計量を算出した。互いに対してプロットした場合に、我々は、高い程度の類似性を見出した(データは示さず)。2つのデータセットを独立して作製したので、同様のt統計量は、各研究の妥当性を支持し、トランスクリプトーム規模の効果が研究特異的因子または技術的アーチファクトによる見込みを低減する。

30

40

【0143】

IPFにおける細気管支、リンパ系および線維芽細胞/筋線維芽細胞遺伝子発現サイン

IPFと対照との間の2490のDEマイクロアレイプローブの教師なし2元階層的クラスタリング(上で定義するような)は、図1Aに示すような、診断(例えばIPFまたは対照)により主に規定される3つの主要クラスタ;群1クラスタ、群2クラスタおよび群3クラスタを示した。我々は、群1(図1Bに示すヒートマップ)、群2(図1Cに示すヒートマップ)および群3(図1Dに示すヒートマップ)を再クラスタリングした。図1B~Dに示すヒートマップのうち、我々は、IPF患者のうちで不均質であるとみられる同時調節される遺伝子のいくつかの群を観察した。同時調節される遺伝子のこれらの群

50

のうち3つは、それぞれ気管支上皮（表2を参照されたい；群1クラスタともいう）、濾胞ともいうリンパ系凝集体（表3を参照されたい、群2クラスタともいう）および筋線維芽細胞（表4を参照されたい、群3クラスタともいう）において発現される遺伝子が濃縮されていた。

【0144】

群1クラスタまたは細気管支群は、ムチン（MUC1、MUC4、MUC20）；プロリンリッチ分泌因子（PRR7、PRR15、SPRR1B、SPRR2D）；ケラチン（KRT5、KRT6B、KRT13、KRT14、KRT15、KRT17）、セリンプロテアーゼ阻害剤（SERPINB3、SERPINB4、SERPINB5、SERPINB13）、イオンチャネルおよび関連因子（CLCA2、TRPV4）ならびに線毛成分（BBS5）ならびにMMP3およびSAA4を含有した。これらの遺伝子は、正常肺実質において期待されると考えられる肺胞上皮よりもむしろ分化気管支上皮の典型であり、このような遺伝子の発現は、重度の癒痕と関連する蜂巢状嚢胞空間の上皮化を表す可能性がある、IPFにおける肺胞空間の異常な「細気管支化」についての以前の報告と一貫する（Chilosira、Lab Invest. 82(10):1335~45頁(2002)）。細気管支サインは、TP63、CLCA2、FGF14、PTPRZ1、SOX2、DSC3、CP、MMP1、MUC4、SERPINB3、SERPINB13および複数のケラチンを含む、随伴性の肺線維症および肺動脈高血圧症の患者からの肺組織において上方制御されることが報告されている遺伝子サインと著しく類似する（Muraら、Chest 141:661~673頁(2012)）。よって、組織コンプライアンスの減少ならびに癒痕、蜂巢化および細気管支化と関連するガス交換の減損は、肺血管耐性およびその後の肺高血圧の増加に貢献すると思われる。我々は、ある種の遺伝子が、このクラスタ内で下方制御され、これらがNotch4、カドヘリン、Wnt7AおよびDKK2を含んだことにも注目した。

10

20

表2.細気管支遺伝子発現サインと関連する、示差的に発現される遺伝子(>1.5倍上方制御、 $q < 0.05$)の部分的なリスト。

プローブ ID	遺伝子記号	遺伝子名	Entrez ID	LogFC	p 値	調整 p 値
A_23_P150979	MUCL1	ムチン様1	118430	1.61921533	0.00665823	2.60E-02
A_24_P208825	MUC4	ムチン4、細胞表面結合	4585	2.11873294	2.50E-05	2.72E-04
A_23_P92222	MUC20	ムチン20、細胞表面結合	200958	1.23642525	0.00022861	1.70E-03
A_23_P30464	PRR7	プロリンリッチ7(シナプス性)	80758	1.04150995	3.35E-06	5.34E-05
A_32_P154911	PRR15	プロリンリッチ15	222171	1.58791565	0.00882268	3.23E-02
A_23_P159406	SPRR1B	小プロリンリッチタンパク質1B	6699	1.76462785	5.26E-05	5.02E-04
A_23_P11644	SPRR2D	小プロリンリッチタンパク質2D	6703	1.15788562	0.00025497	1.86E-03
A_23_P218047	KRT5	ケラチン5	3852	2.52682152	5.44E-06	7.87E-05
A_23_P76249	KRT6B	ケラチン6B	3854	2.90550487	9.76E-05	8.39E-04
A_24_P228149	KRT13	ケラチン13	3860	1.22487349	0.00497946	2.06E-02
A_24_P265346	KRT14	ケラチン14	3861	3.71369769	1.31E-10	1.53E-08
A_23_P27133	KRT15	ケラチン15	3866	1.8933655	0.00097625	5.56E-03
A_23_P96158	KRT17	ケラチン17	3872	4.14444061	1.20E-11	2.15E-09
A_23_P55632	SERPINB3	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードB(オボアルブミン)、メンバー3	6317	3.73336698	0.00023029	1.71E-03
A_23_P502413	SERPINB4	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードB(オボアルブミン)、メンバー4	6318	3.54380018	0.00032106	2.25E-03
A_23_P208126	SERPINB5	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードB(オボアルブミン)、メンバー5	5268	2.18225921	9.31E-05	8.03E-04
A_23_P432978	SERPINB13	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードB(オボアルブミン)、メンバー13	5275	1.33876843	0.01364005	4.56E-02
A_23_P397248	CLCA2	塩素イオンチ	9635	2.34309417	7.25E-05	6.52E-04

10

20

30

40

		ヤネルアクセサリ2				
A_24_P13381	TRPV4	一過性受容体電位カチオンチャンネル、サブファミリーV、メンバー4	59341	1.144662	0.00052144	3.34E-03
A_23_P5785	BBS5	バルデ-ビードル症候群5	129880	0.60446077	0.00254271	1.20E-02
A_23_P161698	MMP3	マトリクスメタロペプチダーゼ3(ストロメライシン1、プロゼラチナーゼ)	4314	2.33843742	3.32E-06	2.09E-05
A_23_P87238	SAA4	血清アミロイドA4、構成性	6291	1.73735951	0.01243724	0.0131173

10

プローブID=Agilent全ヒトゲノムマイクロアレイ上のプローブの識別番号;遺伝子記号=NCBI Entrez遺伝子記号;遺伝子名=NCBI Entrez遺伝子名;ENTREZ ID=NCBI Entrez遺伝子ID;logFC=IPF試料中の2を底とするlog発現レベルの平均から健常対照試料中の2を底とするlog発現レベルの平均を減じたもの;p値=プローブごとにIPFと対照との間の示差的発現についてt検定を用いて算出;調整p値=ボンフェローニ法を用いて複数の試験について調整。

20

【0145】

IPFにおいて不均質性を示した、高度に同時調節される遺伝子の第2のクラスター(群2クラスター;図1A)は、リンパ濾胞(凝集体ともいう)に関する遺伝子を含んだ。遺伝子の以下の群が、IPF患者において群2クラスターで上方制御された: B細胞特異的遺伝子(CD19、CD20[MS4A1]、BCMA[TNFRSF17]、BLKおよびBLNK);複数の免疫グロブリン遺伝子ならびにCD79AおよびCD79B; T細胞およびAPC遺伝子(CD27、CD28、CD1);Fc受容体遺伝子(FCRLA、FCRL2、FCRL5);ならびにケモカインおよびそれらの受容体(CXCL13、CXCR3、CXCR5、CCR6、CCR7)。このパターンの遺伝子発現は、IPF生検における活動性線維症の領域中のリンパ球の数の増加を示す以前の報告と一貫する(Nuovoら、Mod. Pathol. (2011) 1~18頁)。我々は、高度に同時調節される遺伝子のこの群を選択し、これらの「リンパ系」遺伝子の発現パターンに拘束されるデータセットを再クラスタリングした(図1C)。この分析により、リンパ系遺伝子の低い、中程度または高い協調発現を特徴とする3つの主要サブセットが得られた。低い発現群は、全ての対照といくらかのIPF対象とを含んだが、中程度および高い発現群は、残りのIPF対象を含んだ。

30

表3.リンパ濾胞遺伝子発現サインと関連する、示差的に発現される遺伝子(>1.5倍上方制御、 $q < 0.05$)の部分的なリスト。

プローブ ID	遺伝子記号	遺伝子名	Entrez ID	LogFC	p 値	調整 p 値
A_23_P114299	CXCR3	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体3	2833	1.46371763	6.45E-09	3.29E-07
A_24_P252945	CXCR5	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体5	643	2.37673236	2.81E-05	2.99E-04
A_23_P121695	CXCL13	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド13	10563	3.4378017	0.00012013	9.96E-04
A_24_P234921	CCR6	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体6	1235	2.56106982	1.49E-10	1.65E-08
A_23_P343398	CCR7	ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体7	1236	3.29053652	2.33E-12	5.59E-10
A_23_P113572	CD19	CD19分子	930	2.01576251	3.16E-05	3.30E-04
A_23_P116371	MS4A1 (CD20)	膜貫通4-ドメイン、サブファミリーA、メンバー1	931	2.39890071	1.31E-05	2.86E-05
A_23_P37736	TNFRSF17 (BCMA)	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー17	608	2.44042243	2.62E-05	5.09E-05
A_23_P31725	BLK	Bリンパ系チロシンキナーゼ	640	1.58760468	0.0035697	1.58E-02
A_24_P64344	BLNK	B細胞リンカー	29760	0.90832362	0.00025269	1.84E-03
A_23_P46039	FCRLA	Fc受容体様A	84824	1.64791428	0.00036031	2.47E-03
A_23_P160751	FCRL2	Fc受容体様2	79368	1.44435616	0.00408379	1.75E-02
A_23_P201211	FCRL5	Fc受容体様5	83416	2.47293587	2.31E-06	3.96E-05
A_23_P107735	CD79A	CD79a分子、免疫グロブリン結合アルファ	973	1.45014719	0.0006872	4.19E-03
A_23_P207201	CD79B	CD79b分子、免疫グロブリン結合ベータ	974	1.13800823	0.00031683	2.22E-03
A_23_P48088	CD27	CD27分子	939	1.4445514	1.87E-06	3.38E-05
A_23_P91095	CD28	CD28分子	940	3.18508221	1.28E-13	5.59E-11
A_23_P63167	CD1A	CD1a分子	909	2.71941185	1.34E-08	6.07E-07
A_23_P351844	CD1B	CD1b分子	910	1.13359253	0.00323118	1.45E-02
A_23_P51767	CD1C	CD1c分子	911	2.00435627	4.79E-09	2.57E-07
A_23_P201160	CD1E	CD1e分子	913	1.75899432	0.00031177	2.20E-03
A_24_P367432	IGHV1-69	免疫グロブリン重鎖可変1-69	28461	3.31557265	6.44E-10	5.39E-08
A_24_P605563	IGLJ3	免疫グロブリンラムダ連結3	28831	3.1763507	2.66E-08	1.07E-06
A_23_P167168	IGJ	免疫グロブリンJポリペプチ	3512	2.99945067	2.33E-06	3.98E-05

10

20

30

40

		ド、免疫グロブリンアルファおよびミューポリペプチドのためのリンカータンパク質				
A_24_P204727	IGHV3-48	免疫グロブリン重鎖可変3-48	28424	2.68775596	1.20E-07	3.66E-06
A_24_P465799	IGLV3-21	免疫グロブリンラムダ可変3-21	28796	2.40390705	5.16E-08	1.87E-06
A_32_P722809	IGKV1-5	免疫グロブリンカッパ可変1-5	28299	2.25836578	1.69E-05	1.97E-04
A_23_P390209	IGHG1	免疫グロブリン重鎖定常ガンマ1(G1mマーカー)	3500	2.23089237	0.00120748	6.60E-03
A_24_P263786	IGKC	免疫グロブリンカッパ定常	3514	2.17465687	0.00103502	5.84E-03
A_24_P361816	IGLV6-57	免疫グロブリンラムダ可変6-57	28778	2.15352717	1.79E-06	3.25E-05
A_24_P677559	IGK@	免疫グロブリンカッパ遺伝子座	50802	2.02637845	8.18E-08	2.70E-06
A_24_P395415	IGHA1	免疫グロブリン重鎖定常アルファ1	3493	1.93646716	0.00186451	9.26E-03
A_24_P306905	IGKV2-24	免疫グロブリンカッパ可変2-24	28923	1.89765893	4.50E-06	6.74E-05
A_24_P93523	IGKV1D-8	免疫グロブリンカッパ可変1D-8	28904	1.82178807	4.23E-05	4.21E-04
A_24_P417352	IGHM	免疫グロブリン重鎖定常ミュー	3507	0.71477012	0.00015195	1.21E-03

10

20

30

プローブID=Agilent全ヒトゲノムマイクロアレイ上のプローブの識別番号;遺伝子記号=NCBI Entrez遺伝子記号;遺伝子名=NCBI Entrez遺伝子名;ENTREZ ID=NCBI Entrez遺伝子ID;logFC=IPF試料中の2を底とするlog発現レベルの平均から健常対照試料中の2を底とするlog発現レベルの平均を減じたもの;p値=プローブごとにIPFと対照との間の示差的発現についてt検定を用いて算出;調整p値=ボンフェローニ法を用いて複数の試験について調整。

40

【 0 1 4 6 】

IPFにおいて不均質性を示した、高度に同時調節される遺伝子の第3のクラスタは、筋線維芽細胞への線維芽細胞の分化および創傷治癒に関する遺伝子を含んだ。このクラスタは、コラーゲンをコードする複数の遺伝子(COL1A1、COL1A2、COL5A2、COL12A1、COL14A1、COL15A1、COL16A1、COL18A1、CTHRC1);増殖因子(HGF、IGFBP7、SCGF);リシルオキシダーゼ(LOXL1、LOXL2);ヘッジホッグシグナル伝達のメディエータ(GLI1、

50

GLI2、SMO) ; Wntシグナル伝達のメディエータ(SFRP2、DIO2)、CDH11、ペリオスチンおよびTGFβ3を含んだ。このパターンは、IPFにおける筋線維芽細胞および/または線維芽細胞集と関連するこれらのメディエータの多くの発現の上昇を示す以前の報告と一貫する(Elliottら、*J. Cell Science* 125:121~132頁(2012); Barry-Hamiltonら、*Nature Med.* 16:1009~1017頁(2010); Schneiderら、*FASEB* 26:503~512頁(2012); Okamotoら、*The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 37:1119~1127頁(2011); Guyら、*Hepatology* doi:10.1002/hep.25559(2011)、Lamら、*Curr. Opin. Rheum.* 23:562~567頁(2011); Lomasら、*Intn'l J. Clin. and Exp. Pathol.* 5:58~71頁(2012))。我々は、高度に同時調節される遺伝子のこの群を選択し、これらの「筋線維芽細胞」遺伝子の発現パターンに拘束されるデータセットを再クラスタリングした(図1D)。この分析により、筋線維芽細胞関連遺伝子の低い、中程度または高い協調発現を特徴とする3つの主要サブセットが得られた。低い発現群は、全ての対照といくつかのIPF対象とを含んだが、中程度および高い発現群は、残りのIPF対象を含んだ。

表4.筋線維芽細胞遺伝子発現サインと関連する、示差的に発現される遺伝子(>1.5倍上方制御、 $q < 0.05$)の部分的なリスト。

プローブ ID	遺伝子記号	遺伝子名	Entrez ID	LogFC	p 値	調整 p 値
A_24_P254789	COL14A1	コラーゲン、XIV型、アルファ1	7373	3.41189889	2.34E-16	2.58E-14
A_23_P112554	COL15A1	コラーゲン、XV型、アルファ1	1306	2.26212501	2.40E-10	1.65E-09
A_23_P207520	COL1A1	コラーゲン、I型、アルファ1	1277	2.12583648	3.83E-08	1.56E-07
A_24_P277934	COL1A2	コラーゲン、I型、アルファ2	1278	1.10628708	0.00034794	0.00045028
A_23_P33196	COL5A2	コラーゲン、V型、アルファ2	1290	1.05662729	0.00154581	0.00171757
A_24_P291814	COL12A1	コラーゲン、XII型、アルファ1	1303	0.97095129	0.00038437	0.00048047
A_23_P211212	COL18A1	コラーゲン、XVIII型、アルファ1	80781	0.96802064	7.89E-06	1.58E-05
A_23_P160318	COL16A1	コラーゲン、XVI型、アルファ1	1307	0.7694129	0.00031612	0.00042374
A_23_P111888	CTHRC1	コラーゲン3重らせん反復含有1	115908	2.96408731	5.87E-10	3.80E-09
A_23_P153489	CLEC11A	C型レクチンドメインファミリー11、メンバーA	6320	0.63080724	0.00020336	0.00028316
A_23_P93787	HGF	肝細胞増殖因子(ヘパトポエチンA;散乱因子)	3082	0.82101019	8.11E-05	0.00012564
A_23_P353035	IGFBP7	インスリン様増殖因子結合タンパク質7	3490	0.96418065	3.14E-06	6.91E-06
A_23_P124084	LOXL1	リシルオキシダーゼ様1	4016	1.19477688	7.34E-07	2.02E-06
A_23_P111995	LOXL2	リシルオキシダーゼ様2	4017	0.71925849	0.00080392	0.00094075
A_23_P105251	GLI1	GLIファミリージंकフィンガー1	2735	2.08216778	4.61E-11	3.84E-10
A_23_P500034	GLI2	GLIファミリージंकフィンガー2	2736	1.53294083	7.06E-09	3.24E-08
A_23_P70818	SMO	smoothened、frizzledファミリー受容体	6608	1.50997486	6.02E-12	8.28E-11
A_24_P137501	SFRP2	分泌frizzled関連タンパク質2	6423	4.337804	1.89E-14	6.94E-13
A_23_P48740	DIO2	脱ヨード酵素、ヨードチロニン、II型	1734	3.33676014	5.27E-15	2.90E-13
A_23_P152305	CDH11	カドヘリン11、	1009	0.7647008	0.00102531	0.00115274

10

20

30

40

		2型、OB-カドヘリン(骨芽細胞)				
A_24_P347411	POSTN	ペリオスチン、骨芽細胞特異的因子	10631	2.13051858	1.37E-07	4.85E-07
A_24_P373096	TGFB3	トランスフォーミング増殖因子、ベータ3	7043	1.91410548	0.00011172	0.0001617

プローブID=Agilent全ヒトゲノムマイクロアレイ上のプローブの識別番号;遺伝子記号=NCBI Entrez遺伝子記号;遺伝子名=NCBI Entrez遺伝子名;ENTREZ ID=NCBI Entrez遺伝子ID;logFC=IPF試料中の2を底とするlog発現レベルの平均から健常対照試料中の2を底とするlog発現レベルの平均を減じたもの;p値=プローブごとにIPFと対照との間の示差的発現についてt検定を用いて算出;調整p値=ボンフェローニ法を用いて複数の試験について調整。

10

【0147】

細気管支、リンパ系および筋線維芽細胞サインが、個別の対象において互いに関連するかを決定するために、我々は、各クラスタにおける全ての遺伝子の標準化された平均発現をとることにより、各サインについての発現の指標を導いた。このことにより、個別の患者ベースで各サインの強さを比較できた。ほとんどのIPF対象は対照よりも高い細気管支、リンパ系または筋線維芽細胞サインスコアを有したが、各スコアには広い範囲の変動性があり、2つのサインは、IPFの個別の対象内でいずれの著しい相関パターンも示さなかった(図1E)。この結果は、3つのサインが、IPF患者にわたって不均質に発現される直交プロセスおよび/またはIPF組織において反映される不均質なプロセスの示差的なサンプリングを反映し得ることを示唆する。

20

【0148】

3つのサインのそれぞれに含まれる選択した遺伝子がIPF肺組織の空間的に別個の領域で発現されたかを決定するために、我々は、IPF肺外植片(N=5)から採取した生検組織の凍結切片に対して免疫組織化学(IHC)を行った。我々は、蜂巣状嚢胞を特徴とする細気管支化の領域が、コラーゲン沈着の領域の近くであるがそれとは別個の領域で(図2B)、豊富な細胞質を有する円柱上皮細胞(図2A)で裏打ちされていたことを見出した。これらの上皮細胞は、細気管支サインに含まれる遺伝子によりコードされるタンパク質であるケラチン14についての染色が陽性であり(図2C)、PAS染色により検出されるようにムチンを発現した(図2D)。空間的に別個の領域では、我々は、高いコラーゲン沈着の領域の近くであるがそれとは別個の領域で(図2F)、H&Eにより濃く染色される核を有する細胞の凝集体(図2E)を観察した。これらの凝集体は、リンパ系サインに含まれる遺伝子によりコードされるB細胞表面マーカーであるCD20についての染色が陽性であった(図2G~H)。細気管支化領域は、リンパ系凝集体とは空間的に別個であり(図2IおよびJ)、細気管支化領域およびリンパ系凝集体はともに、高いコラーゲン沈着の領域の近くであるが空間的に別個の領域で頻繁に出現した(図2BおよびF)。複数のコラーゲン遺伝子が、線維芽細胞サインに含まれる。

30

40

【0149】

候補血清バイオマーカーをコードする示差的に発現される遺伝子の同定

候補血清バイオマーカーをコードすることを評価するための候補遺伝子のリストを狭め、バイオマーカーとして評価するための候補血液タンパク質を同定するために、我々は、UCSFコホート1データセットおよびGSE10667データセット(Konishiら、Am. J. Respir. Crit. Care Med. 180(2):167~75頁(2009))の両方において、IPFにおける>2倍の上方制御(q<0.05)というより厳しいカットオフを用いた。この分析により、両方のデータセットにおいて共通して上方制御される291の遺伝子を得た(表5を参照されたい)。これらの共通遺伝子のうち、末梢血中で検出できる可能性がある細胞外および/または分泌タンパク質をコ

50

ードし、よって、可能性のある血清またはその他のバイオマーカーとしてのさらなる評価のための良好な候補となるものがいくつかあった。これらの結果および以前に発表されたデータおよび血清バイオマーカー検出についての容易に利用可能なアッセイに基づいて、我々は、YKL-40、COMP、OPN、MMP7、ペリオスチン、CXCL13、CCL11（エオタキシン）、CCL13、CCL17（TARC）、CCL18、MMP3および血清アミロイドA（SAA）、特に構成性SAAであるSAA4をIPFにおける候補予後予測血液バイオマーカーとして選択した。（例えばKorthagenら、*Respir. Med.* 105:106~113頁（2011）、Pardoら、*PLoS Med.* 2(9):891~903頁（2005）、Richardsら、*Am J Respir Crit Care Med*、doi:10.1164/rccm.201101-0058OC（2011）、Yokoyamaら、*Respirology* 11:164~168頁（2006）、Kinderら、*Chest* 135:1557~1563頁（2009）を参照されたい）。さらに、CCL18は、IPFにおける生存期間についての予後予測バイオマーカーとして以前に報告されている（Prasseら、*Am J Respir. Crit. Care Med.* 179:717~723頁（2009））が、これは、我々のマイクロアレイ実験において著しくDEとして検出されなかった。

【0150】

血液バイオマーカーを、それらの予測される生物学に関連する様々な範疇に従って選択した。CCL11、CCL13、CCL17およびCCL18は、2型炎症と関連するケモカインである。我々は、CCL13およびCCL17が、喘息においてIL13遮断に応答して薬力学的に調節されることを以前に示した（Corren *The New England journal of medicine* 365:1088~1098頁（2011））。ペリオスチンは、IL13生物学と関連し（Corren *The New England journal of medicine* 365:1088~1098頁（2011）；Woodruffら、*Proc Natl Acad Sci USA* 104:15858~15863頁（2007）；Woodruffら、*Am J Respir Crit Care Med* 180:388~395頁（2009）；Jiaら、*The Journal of allergy and clinical immunology* 130(3):647~654.e10（2012））、上記の線維芽細胞遺伝子サインにおける代表的な遺伝子でもある。CXCL13は、リンパ系凝集体で高度に発現されるB細胞化学誘引物質であり、上記のリンパ系遺伝子サインにおける代表的な遺伝子でもある。MMP3およびSAA4は、上記の細気管支遺伝子サインにおける代表的な遺伝子である。YKL-40は、骨髄系細胞活性化と関連するキチナーゼ様タンパク質であり、全身レベルは、複数の疾患状態において上昇する。以前に発表された研究は、YKL-40がIPFにおいて高度に発現され、YKL-40の血清レベルが生存期間について予後予測的であることを示している（Korthagenら、*Respiratory medicine* 105:106~113頁（2011））。COMPは、TGFにより誘導され、強皮症において筋線維芽細胞中で高度に発現される（Farinaら、*Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology* 25:213~222頁（2006）；Farinaら、*Annals of the rheumatic diseases* 68:435~441頁（2009））。OPNおよびMMP7は、IPF組織で高度に発現される。OPNの血液レベルは、IPFにおける肺機能と負に相関することが示されており（Kadotaら、*Respiratory medicine* 99:111~117頁（2005））、MMP7の血液レベルは、IPFにおける生存期間について予後予測的であることを示されている（Richardsら、*Am J Respir Crit Care Med* 185(1):67~76頁（2012））。

【0151】

IPF肺におけるこれらの候補バイオマーカー遺伝子の示差的な発現を確認するために、我々は、定量RT-PCR (qPCR) (方法を参照されたい) を、マイクロアレイ実験において用いたのと同じRNA試料について行った。表6は、マイクロアレイ遺伝子発現データを示し、図3A~Gは、qPCRデータを示す。表6および図3A~Gに示すように、我々は、対照と比べてIPF患者において、それぞれの選択した候補バイオマーカー遺伝子の発現が著しく上昇したことを観察した。

表5.2つの独立するIPFデータセットにおいて示差的に発現される遺伝子(>2.0倍上方制御、 $q < 0.05$)の部分的なリスト。

遺伝子記号	GSE10667 調整 p 値	GSE10667 logFC	UCSF コホート 1 調整 p 値	UCSF コホート 1 logFC
CHI3L1 (YKL-40)	0.010960171	1.39622824	1.19997E-07	2.972810559
CCL13	0.000480298	1.650926419	0.029881609	1.104407622
COMP	1.64133E-10	4.382169308	2.0246E-06	2.52240034
CXCL13	0.005238542	2.637421496	0.000629905	3.437801699
MMP7	3.26412E-05	2.874722338	6.8955E-11	3.413531235
POSTN	8.94681E-05	2.473564333	8.46908E-06	2.103941264
SPP1 (OPN)	5.94635E-07	3.762235672	8.37419E-05	3.64564152

10

遺伝子記号=NCBI Entrez遺伝子記号; logFC=IPF試料中の2を底とするlog発現レベルの平均から健常対照試料中の2を底とするlog発現レベルの平均を減じたもの; 調整p値=ボンフェローニ法を用いて複数の試験について調整。

20

表6.マイクロアレイにより決定される、IPF生検における候補バイオマーカー遺伝子の遺伝子発現

遺伝子記号	倍数変化、マイクロアレイ (log ₂)	q 値、マイクロアレイ
SPP1 (OPN)	3.65	8.4×10^{-5}
MMP7	3.41	6.9×10^{-11}
CXCL13	3.44	6×10^{-4}
CHI3L1 (YKL-40)	2.97	1.3×10^{-6}
COMP	2.52	2.0×10^{-6}
POSTN	2.10	8.5×10^{-6}
CCL13	1.10	0.03

30

【 0 1 5 2 】

対照と比べてIPFにおける選択したマーカーの遺伝子発現レベルの上昇が、末梢血中のこれらの遺伝子によりコードされるタンパク質のレベルの上昇と対応するかを決定するために、我々は、コホート2 IPF試料 (N = 80) および健常対照からの試料において、血漿 (OPN) または血清 (その他全て) 中のそれらのレベルを評価した。血漿対照について N = 10; 血清対照について N = 29。血液バイオマーカーアッセイはそれぞれ、上記のようにして行った。

【 0 1 5 3 】

全てのIPF患者を全ての対照と比較すると、YKL-40、COMP、OPN、MMP7、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18、SAAおよびCXCL13の末梢血レベルは、IPFにおいて著しく上昇した (表7)。IPF 対 対照についてウィルコクソン順位和検定を用いて、我々は、以下のp値を得た: YKL-40、COMP、MMP7、CCL13、CCL18およびCXCL13、 $p < 10^{-4}$; OPN、 $p = 0.04$ 。いくらかのIPF患者は、対照と比べて血清ペリオスチンまたはMMP3のレベルが上昇したが、全体的に、この差は、統計的有意性に到達しなかった。以前の報告は、ペリオスチンのレベルの上昇が、IPF肺および末梢血において検出できることを示唆した (Okamotoら、The European respiratory journal : official journal of the European S

40

50

society for Clinical Respiratory Physiology 37: 1119~1127頁(2011)。免疫調節治療(具体的には副腎皮質ステロイド)がペリオスチンの遺伝子発現レベルを低減できることが以前に示されており(Woodruffら、Proc. Natl. Acad. Sci. 104(40): 15858~63頁(2007); Woodruffら、Am J. Respir. Crit. Care Med. 180(5): 388~95頁(2009)、ペリオスチンの末梢血レベルがそのような治療の存在下で同様に低減されることが予期される。よって、IPF患者における血清ペリオスチンレベルの変動および対照との有意差の欠如は、21/80のIPF患者が、試料採取時に免疫調節治療(IT、全身性副腎皮質ステロイドまたはアザチオプリン)を受けていたという事実により説明できると考えられた。

10

【0154】

我々は、よって、ペリオスチンを含むバイオマーカーのいずれかの末梢血レベルが、ITを受けているIPF患者とITを受けていないIPF患者との間で異なるかを調べた。ITを受けているIPF患者は、ITを受けていないIPF患者と比較して、より低いレベルのCOMPおよびペリオスチンを示す傾向を示した。これとは対照的に、ITを受けているIPF患者は、ITを受けていないIPF患者と比較して、CXCL13、MMP3およびSAAのレベルが著しく上昇した(表7)。IT状態によるその他のバイオマーカーのいずれのレベルにおける差に向かっても、著しい差または傾向はなかった。

表7. IPF患者および対照における血液バイオマーカーレベルの範囲および分布。

バイオマーカー	対照における中央値レベル(IQR) ¹	IPF患者における中央値レベル(IQR) ¹	ITを受けていないIPF患者における中央値レベル(IQR)(N=59)	ITを受けているIPF患者における中央値レベル(IQR)(N=21)
POSTN(ng/ml)	26.6(23.9-33.8)	28.6(23.3-38.4)	30.0(23.4-39.4)	25.0(21.5-35.1) ³
CCL11(pg/ml)	257(188-292)	225(259-447) ²	335(259-440)	340(255-456)
CCL13(pg/ml)	159(111-215)	299(226-400) ²	300(244-387)	297(193-441)
CCL17(pg/ml)	275(228-411)	510(304-823) ²	453(298-760)	572(353-1083)
CCL18(ng/ml)	42(29-51)	94(76-122) ²	94(77-119)	100(74-124)
MMP3(ng/ml)	20(14-26)	22(16-42)	20(11-26)	45(26-112) ²
SAA(ng/ml)	695(286-1038)	1618(773-4625) ²	1234(630-2543)	4625(2910-8815) ²
CXCL13(pg/ml)	28(22-39)	80(55-136) ²	69(50-125)	113(82-221) ²
COMP(ng/ml)	540(432-720)	901(706-1163) ²	943(756-1191)	749(576-1101) ³
OPN(ng/ml)	51(41-68)	69(53-85) ²	68(53-83)	70(47-89)
YKL-40(ng/ml)	41(23-54)	105(76-170) ²	104(74-158)	110(77-195)
MMP7(ng/ml)	2.7(2.4-3.5)	7.4(5.9-9.4) ²	7.5(6.2-9.4)	6.6(5.0-9.8)

20

30

¹=オステオポンチンおよびMMP3以外の全てのバイオマーカーについて、N=29の対照およびN=80のIPF患者、かつ値は血清レベルである;オステオポンチンについて、N=10の対照およびN=80のIPF患者、かつ値は血漿レベルである;MMP3について、N=29の対照およびN=78のIPF患者;IQR=四分位範囲、25~75パーセントイル。

²=対照よりもIPFにおいて有意に高い、ウィルコクソン順位和検定によりp<0.05。

³=免疫調節治療(IT)状態によるIPF患者間の有意な差に向かう傾向、ウィルコクソン順位和検定によりp<0.1。

40

【0155】

我々は、次に、個別のバイオマーカーと人口統計学および臨床的変数との間の相関について評価した。試験した8つのバイオマーカーのうち、OPNだけが以前の喫煙状態により著しい差を示したが、血漿OPNレベルは、喫煙経験のない者よりも喫煙経験者においてより低かった(p=0.01、データは示さず)。臨床的変数を比較する際に、我々は、期待されるように、予測全肺気量(TLC)%と予測努力肺活量(FVC)%との間と、各肺活量変数と拡散能力(予測DLco%)との間に、名目上の著しい正の相関を観察した。我々は、呼吸困難スコア(Wattersら、Am. Rev. Respir. D

50

is. 133(1): 97~103頁(1986)、予測FVC%および予測DLCO%の間にも負の相互相関を観察した(表8)。血液バイオマーカーのうち、我々は、MMP7、ペリオスチンおよびCOMPの間;ならびにOPN、YKL-40、SAA、MMP3、CCL11およびCXCL13の間に全般的に弱い相互相関を観察し、CCL13とCCL17との間に強い相互相関を観察した。観察された全般的に低い相関係数は、合計で、バイオマーカーのレベルが、集団全体にわたって互いにほぼ直交することを示唆する(表8)。我々は、個別のバイオマーカーと臨床的/人口統計学的変数との間に比較的少ない数の著しい相関も観察した。これらのうち、CXCL13は、予測DLCO%と負に相関し、呼吸困難スコアと正に相関した。CCL11は、X線撮影によるスコアと正に相関した。SAAは、予測TLC%と負に相関し、X線撮影によるスコアおよび呼吸困難スコアと正に相関した。MMP3は、予測FVC%と負に相関し、呼吸困難スコアと正に相関した。そして、OPNおよびCOMPは、年齢と弱く相関した(表8)。

表8. バイオマーカーと臨床的/人口統計学的特徴との間の相関

変数	対応する変数	r_s	p値
予測TLC%	予測FVC%	0.83	0.0001
予測TLC%	予測DLCO%	0.34	0.0177
予測DLCO%	予測FVC%	0.34	0.0044
呼吸困難スコア	予測DLCO%	-0.43	0.0004
呼吸困難スコア	予測FVC%	-0.29	0.0118
X線撮影によるスコア	予測FVC%	-0.37	0.0326
CXCL13(pg/ml)	予測DLCO%	-0.35	0.0035
CXCL13(pg/ml)	呼吸困難スコア	0.40	0.0004
CCL11	X線撮影によるスコア	0.44	0.0086
SAA	予測TLC%	-0.30	0.0427
SAA	X線撮影によるスコア	0.43	0.0108
SAA	呼吸困難スコア	0.35	0.0024
MMP3	予測FVC%	-0.25	0.0313
MMP3	呼吸困難スコア	0.24	0.0427
OPN(ng/ml)	最初の訪問時の年齢	0.23	0.0395
COMP(ng/ml)	最初の訪問時の年齢	0.26	0.0239
MMP7(ng/ml)	POSTN(ng/mL)	0.40	0.0002
MMP7	SAA	-0.29	0.0107
COMP(ng/ml)	POSTN(ng/mL)	0.24	0.0337
COMP(ng/ml)	MMP7(ng/ml)	0.24	0.0342
OPN(ng/ml)	YKL40(ng/mL)	0.23	0.0385
CXCL13(pg/ml)	YKL40(ng/ml)	0.26	0.0180
CXCL13(pg/ml)	OPN(ng/ml)	0.27	0.0145
CXCL13	MMP3	0.37	0.0008
CXCL13	SAA	0.37	0.0009
CCL11	MMP3	0.23	0.0449
CCL11	YKL40	0.24	0.0333
CCL11	CCL13	0.25	0.0245
CCL11	CXCL13	0.29	0.0101
CCL13	CCL17	0.43	0.0001
SAA	MMP3	0.41	0.0002

r_s =スピアマンの順位相関;p値は、スピアマン相関のことをいう。

【0156】

血液バイオマーカーの予後予測価値の確立

以前の研究は、IPF患者におけるその後の生存期間について肺機能、拡散能力、喫煙状態および年齢の単一時点の値が予後予測価値を弱く有するかまたは全く有さないことを示した。これらの知見と一貫して、我々は、個別に得られたこれらの変数のいずれについ

ても、予測FVC%を除いては、生存期間におけるいずれの劇的な差も観察しなかったが、集団についての予測FVC%の中央値(>69%)よりも大きい値を示した患者は、<69%の予測FVC%を示す患者よりも生存期間において有利であった(HR=0.37、p=0.02、図4)。

【0157】

様々な血液バイオマーカのその後の生存期間についての予後予測価値を判定するために、我々は、コックス比例ハザードモデルを当てはめて、各血液バイオマーカの予後予測価値を個別に判定した(ペリオスチン、CCL13、CCL18、オステオポンチン、COMP、YKL-40、MMP3、MMP7、SAAおよびCXCL13)。これらのバイオマーカのうち、我々は、CXCL13、YKL-40、COMP、OPN、MMP3およびSAAのベースラインでのレベルが、その後の移植のない生存期間によってIPF患者を著しく区別したことを見出した(図5A~Dおよび表9)。以前に発表された報告とは反対に(Richardsら、Am J Respir Crit Care Med、doi:10.1164/rccm.201101-0058OC(2011); Prasseら、Am J Respir Crit Care Med 179:717~723頁(2009))、我々は、このコホートにおいてMMP7またはCCL18のレベルについていずれの予後予測価値も観察せず、このコホートにおいて試験したいずれのその他のバイオマーカ(CCL13およびペリオスチンを含む)についても統計的に有意な予後予測価値を観察しなかった。

表9.IPF患者における個別のバイオマーカの予後予測価値。

バイオマーカ	Exp(係数)	p値
ペリオスチン	1.017	0.2
CCL11	1.002	0.05
CCL13	1.000	0.7
CCL17	1.000	0.4
CCL18	0.994	0.3
MMP3	1.018	5.0x10⁻⁸
SAA	1.000	3.0x10⁻⁴
CXCL13	1.003	7.3x10⁻⁶
COMP	1.000	0.030
OPN	1.026	0.004
YKL-40	1.006	0.010
MMP7	1.053	0.1

【0158】

個別の予後予測マーカ-CXCL13、YKL-40、OPN、COMP、MMP3およびSAAのレベルはIPF患者内で高度に相互相関しなかったので、我々は、これらのマーカの組み合わせが、予後予測価値をさらに強化するかについて調べた。我々は、上記の6つのバイオマーカのそれぞれの可能な組み合わせの複合値を判定して、試料採取後1、2および3年にわたる死亡を、受信者動作特性(ROC)分析を用いて予測した。我々は、全般的に、単一バイオマーカまたは対のバイオマーカが、3つ以上のバイオマーカの組み合わせと比較して不利に作動したことを見出した(図6A)。組み合わせにおけるバイオマーカの最適な最小限の数を決定するために、我々は、2年でのROC分析の曲線下面積(AUC)および6つのバイオマーカの全ての可能な組み合わせの期間重要性を判定し、3バイオマーカの多くの組み合わせが、4つ以上のバイオマーカの組み合わせと同等に作動したことを見出した(図6B)。

【0159】

範疇にわたってIPF患者の数の比較的同等な分布を達成するために、我々は、単純な評点システムを考案したが、これにより、コホート全体についての中央値レベルより上の

ベースラインバイオマーカーレベルは、それぞれのバイオマーカーについて1のスコアを獲得した。よって、4つ全てのバイオマーカーについて中央値レベルより下のバイオマーカーレベルを有する患者は、0のスコアを割り当てられ、1つのバイオマーカーについて中央値より上で、その他の3つのバイオマーカーについて中央値より下であると1のスコアを割り当てられる、などであった。我々は、各バイオマーカーについて以下の値を導いた。CXCL13についての中央値レベルは、80 pg/mlであった。YKL-40についての中央値レベルは、105 ng/mlであった。COMPについての中央値レベルは、901 ng/mlであった。そして、OPNについての中央値レベルは、69 ng/mlであった(表7を参照されたい)。この評点システムは、コックス比例ハザードモデルを用いて、患者の群を生存期間により劇的に区別した($p < 10^{-6}$ 、図7)。

10

【0160】

ROC分析において最高に作動する3バイオマーカーの組み合わせ(MMP3、COMPおよびYKL40)を用いて、範疇にわたってIPF患者の数の比較的同等な分布を達成するために、我々は、上記の評点システムを当てはめたが、ここでは、3つ全てのバイオマーカーについて中央値より下の患者は0のスコアを割り当てられ、1つのバイオマーカーについて中央値より上であり他の2つのバイオマーカーについて中央値より下である患者は1のスコアを割り当てられ、いずれか2つのバイオマーカーについて中央値より上であるが3番目のバイオマーカーについて中央値より下の患者は2のスコアを割り当てられ、3つ全てのバイオマーカーについて中央値より上の患者は3のスコアを割り当てられた。この評点システムは、コックス比例ハザードモデルを用いて、患者の群を生存期間により劇的に区別した($p < 10^{-9}$ 、図8;カプラン-マイヤー生存期間データをプロットする)。スコアが0の15名の患者のうち、フォローアップ期間において1件の死亡だけが記録されたが、スコアが3の患者は全て、試料採取の500日以内に死亡した。

20

【0161】

したがって、我々は、ある種のバイオマーカー、CXCL13、YKL-40、COMP、OPN、MMP3およびSAAの血液レベルを測定し、各バイオマーカーの値が中央値レベルより上または下であるかを決定することを用いて、診断時にIPF患者の生存期間予後予測を判定できることを示した。さらに、本明細書に記載する評点システムを用いて血液バイオマーカーレベルが中央値レベルより上または下であるかをIPF患者について、バイオマーカーCXCL13、YKL-40、COMPおよびOPNの0、1、2、3もしくは4つ全て、またはバイオマーカーMMP3、COMPおよびYKL-40の0、1、2もしくは3つ全てについて判定することは、生存期間予後予測の正確性を増加できる。このようなシステムは、積極的な治療的介入のためまたは肺移植のための患者を同定するため、および治療剤の臨床試験のために患者を階層化するために有用である。

30

【0162】

IPFにおける危険性予測は、肺移植のような処置および患者管理について決定するために重要であり、治療薬の臨床試験の登録を階層化するために有用である。肺の直接サンプリングはIPF患者において頻繁に实际的でないかまたは実行不可能であるので、疾患活動性および進行の非侵襲的判定は、非常に価値がある。高分解能コンピュータ断層撮影(HRCT)によるイメージング、肺活量測定およびその他の肺機能の測定、例えば拡散能力および運動耐容能は、経時的な反復尺度により個別の患者の疾患の進行をモニタリングすることにおいていくらかの有用性を有するが、肺機能の単一点判定は、集団ベースで与える情報は比較的わずかである(Leyら、Am J. Respir. Crit. Care Med. 183:431~440頁(2011))。本明細書に記載する血液ベースのバイオマーカーは、IPFについての薬物開発およびIPFの臨床的管理を、疾患活動性の予測的、予後予測的、薬力学的および代用の指標としていくつかのレベルで可能にする能力を有する。

40

【0163】

予測的バイオマーカーは、処置前に特定の分子経路の活性の証拠を示し、標的治療により最も利益を受ける可能性がある患者の部分集団を同定する。ある所定の経路はIPF患

50

者の集団にわたって不均質に発現されることがあり、その経路を標的にする薬剤からの臨床的利益を同定する能力は、そうでなければ将来を見越して同定できない患者の部分集合だけが利益を示すならば、脅かされる可能性がある。標的治療から最も利益を受ける可能性があるIPF患者を同定する予測的バイオマーカーは、治療的仮定をより厳密に試験するために臨床試験における登録を階層化する助けとなり得る。

【0164】

予後予測バイオマーカーは、将来の疾患進行または死亡の危険性を階層化する。IPFでの高い死亡率に鑑みて、プラセボと比べて寿命を著しく延長するために、治療的介入の成功が期待される。疾患の軌道の多様性に鑑みて、しかし、多数の患者を長年にわたって処置することなく、早期段階の臨床試験で生存期間利益を評価することは難しい。1~2年の期間内に著しい疾患進行または死亡に苦しむ可能性が最も高いIPF患者を同定する予後予測バイオマーカーは、試験中に進行する可能性が最も高い患者において短期間の生存期間利益があるかを判定するために臨床試験における登録を階層化するために有用である。さらに、ある所定の治療的介入が比較的良い予後予測を有する患者に利益をもたらすことが可能であるが、ある種の引き返し限界点を超過して疾患が進行した患者においては有効でない。例えば、BIBF1120の最近の第2相研究の部分群の分析は、肺機能のプラセボで調整した利益のほとんどがベースラインにて70%より大きい予測FVCを有する患者で観察されたが、70%未満の予測FVCの患者は、それほど利益を示さなかったことを示した(Richeldiら、アブストラクト、ERS 2011 Annual Congress)。

10

20

【0165】

薬力学的バイオマーカーは、疾患プロセスに関与する特定の分子経路の基部に近い活性を反映し、具体的な治療的介入に応答して変化するはずである。処置による薬力学的マーカーの変化は、分子的介入がその標的に影響しているかおよびどの程度で影響するかを示し、よって、これらのマーカーは、用量範囲探索研究において適当な用量を選択できる助けとなることができる。IPFのような短期間臨床転帰尺度がほとんど規定されていない疾患では、いずれの臨床的利益も存在しない場合の著しい薬力学的効果は、試験の失敗の理由として、不適当な標的選択と、不適当な投薬との間を識別する助けとなることができる。代用バイオマーカーは、薬力学的マーカーと同様に、処置に応答して変化するはずであるが、標的経路から離れていることがあり、疾患および臨床転帰の下流の顕在化とより密接に連結している。短期間での代用バイオマーカーの変化は、例えば生存期間転帰に対する継続処置の長期間の効力の見込みを示すことができる。ある所定のバイオマーカーは、予測的、予後予測的、薬力学的および代用の範疇のいずれか、いくつかまたは全てを示すことができる。

30

【0166】

IL-13は線維症のメディエータであり、IPFにおける可能性のある治療標的として関与している(Wynn, TA, J. Exp. Med. 208: 1339~1350頁(2011))。上で論じたように、我々は、IL-13、ならびにIL-13により調節される可能性がある遺伝子、例えばIL13R2、CCL11、CCL13、CCL17、CCL18およびペリオスチンが、IPF患者からの肺生検において上昇したレベルで発現されることを見出した。ある第II相研究では、治療的IL-13遮断が喘息において臨床的利益を示し、この利益は、血清ペリオスチンレベルにより決定されるそれらの気道でのIL-13発現の上昇が予測される患者の部分集合において増進された(Correnら、New Engl. J. Med. 365: 1088~1098頁(2011))。上で論じた実験では、我々は、IPF患者のコホート全体にわたって、血清ペリオスチンレベルが、健常対照で測定したものより有意に高くなかったことを見出した(表7)。しかし、ペリオスチンレベルは、IPF患者の部分集合において明らかに上昇しており(表7)、IPFにおける血清ペリオスチンレベルの分布は、重度の喘息で観察されたものと同様である(Jiaら、The Journal of allergy and clinical immunology 130(3): 647~654.e10(2

40

50

012))。ペリオスチンは、本明細書で記載する線維芽細胞/筋線維芽細胞サインにおいて発現され、IHCによりIPFにおいて線維芽細胞巢に限局されている(Okamotoら、The European respiratory journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology 37:1119~1127頁(2011))。IL-13遮断がIPF患者において臨床的効力を有するならば、血清ペリオスチンレベルが処置前に上昇している患者の部分集合においてのみ明白である可能性がある。同様に、我々は、CCL13およびCCL17レベルが喘息患者において上昇し、治療的IL-13遮断に応答して著しく減少することを見出した(Correnら、New Engl. J. Med. 365:1088~1098頁(2011))。CCL13およびCCL17レベルはIPF患者において上昇するので、CCL13およびCCL17もIPFにおけるIL-13経路活性の薬力学的マーカーとして働く可能性がある。CCL11は、IL-13に応答して上方制御される間質細胞の生成物である(Matsukuraら、Am. J. of Respir. Cell and Mol. Biol. 24:755~761頁(2001))。CCL18は、それら自体がIL-13の供給源であり得る(Kimら、Nature Med. 14:633~640頁(2008))選択的活性化マクロファージの生成物である(Prasseら、Arthritis and Rheum. 56:1685~1693頁(2007))。よって、CCL11およびCCL18も、IPFにおけるIL-13遮断の治療的研究において予測的および/または薬力学的バイオマーカーとして働く可能性がある。

10

20

【0167】

OPN、YKL-40、COMP、CXCL13、MMP3およびSAAの血清レベルはそれぞれ、IPFにおけるその後の疾患進行を著しく予測した。しかし、これらのレベルは、調べた集団にわたって患者内で劇的に相互相関しなかった。各マーカーは、異なる細胞供給源により生成され、IPF損傷内で異なる発症プロセスの活性を反映することがある。

【0168】

OPNは、IPFにおける発現が上昇し(Pardoら、PLoS Med 2:e251(2005))、その発現は、線維芽細胞巢およびUIP損傷における過形成性肺上皮に限局される(Kellyら、Am J Respir Crit Care Med 174:557~565頁(2006))。OPNは、細胞接着、遊走、炎症および組織リモデリングにおいて役割を有すると考えられ(O'Regan, A., Cytokine & growth factor reviews 14:479~488頁(2003))、OPN欠損マウスは、ブレオマイシン誘発性肺線維症から保護される(Bernarら、American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 286:L1311~1318頁(2004))。血漿OPNレベルは、IPF患者において上昇し、IPF内で、OPNレベルは、酸素飽和と負に相関したことが他の調査者により報告されている(Kadotaら、Respiratory medicine 99:111~117頁(2005))。

30

40

【0169】

YKL-40は、活性化マクロファージのような骨髄由来細胞により主に生成されるキチナーゼ様タンパク質である(Rehliら、The Journal of biological chemistry 278:44058~44067頁(2003))。その全身レベルは、組織リモデリングと関連するいくつかの炎症性および腫瘍性の容態において上昇し(Leeら、Annual review of physiology 73:479~501頁(2011))、我々の知見は、ベースライン血清YKL-40レベルがIPF患者におけるその後の死亡について予後予測的であることを示す以前の報告と一貫する(Korthagenら、Respiratory medicine 105:106~113頁(2011))。

50

【0170】

COMPは、軟骨、靭帯、腱および骨において線維芽細胞により主に発現される細胞外基質タンパク質である。全身性強皮症の患者では、損傷性皮膚筋線維芽細胞のCOMP発現レベルが上昇したことが見出され、その発現は、TGFにより誘導された可能性がある(Farinaら、Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology 25: 213~222頁(2006); Farinaら、Annals of the rheumatic diseases 68: 435~441頁(2009))。

【0171】

CXCL13は、濾胞性樹状細胞により生成されるケモカインである。これは、その同族受容体CXCR5と結合することによりB細胞を2次および3次リンパ構造に動員し、これらはともにリンパ濾胞形成のために必要である(Anselら、Nature 406: 309~314頁(2000))。最近、リンパ系凝集体が、IPF生検においてUIP損傷と関連することが報告され(Nuovoら、Mod. Pathol. (2011) 1~18頁)、高いCXCL13発現とともにB細胞浸潤が、腎線維症において報告されている(Hellerら、The American journal of pathology 170: 457~468頁(2007))。血清CXCL13は、関節びらの重症度(Meeuwisseら、Arthritis and rheumatism 63: 1265~1273頁(2011))、および関節リウマチにおけるリツキシマブ処置後のB細胞再増殖(Rosengrenら、Rheumatology (Oxford) 50: 603~610頁(2011))のバイオマーカーとして記載されている。CXCL13発現は、本明細書で記載するリンパ系サインとともにクラスタを形成する。

【0172】

MMP3およびSAA4は、本明細書で記載する細気管支サインにおいて発現される。MMP3タンパク質レベルの上昇は、IPF患者からのBAL液で表されている(Richterら、Thorax 64: 156~161頁(2009))が、IPFのバイオマーカーとしてのMMP3の全身レベルは、以前に記載されていない。SAAは、多くの炎症性の容態において上昇している急性相反応物質であるが、IPFについてのバイオマーカーであると記載されていない。

【0173】

まとめると、IPF患者におけるこれらの6つのバイオマーカー(OPN、YKL-40、COMP、CXCL13、MMP3およびSAA)のそれぞれの全身レベルは、別個の発症プロセスの変動性の相対的貢献を反映し得る。

【0174】

IPF病理学の地理的不均質性およびまだらな性質に鑑みて、これらのバイオマーカーの末梢血レベルは、単一の小さい生検からの遺伝子発現レベルよりもIPFにおける累積的な疾患の負担についてのより包括的な図を与えることができる。6つのバイオマーカー(OPN、YKL-40、COMP、CXCL13、MMP3およびSAA)のほとんどは健常対照と比較してIPF患者において全般的に上昇したが、IPF集団内のこれらのバイオマーカーのそれぞれの相対的レベルは広く変動し、疾患進行に対して異なって影響することがある。よって、本明細書で記載する様々なバイオマーカーの組み合わせの値は、単一マーカーよりもさらなる利益さえ与えることができる。臨床的疾患進行に関して経時的にこれらのマーカーの動態を判定することは興味深い。

【0175】

実施例2 - IPFにおけるシグナル伝達経路の特徴決定

IL-13、TGFおよびヘッジホッグ(Hh)経路を含む上皮-間葉通信のメディエータは、特発性肺線維症(IPF)の病因に関わる。例えば、マウス肺におけるトランスジェニックIL-13過剰発現は、深在性肺線維症を誘発するために十分であることが示されており(Zhuら、J. Clin. Invest. 103(6): 779~88頁(1999))、IL-13欠損マウスは、プレオマイシン誘発性線維症および住血吸虫

10

20

30

40

50

誘発性肝線維症から部分的に保護される。IL-13は、IL-13R 1およびIL-4R を含むヘテロマー受容体複合体と結合し、それによりJakファミリーキナーゼが、IL-13およびIL-4の下流のシグナル伝達を媒介する転写因子であるSTAT6をリン酸化する。第2のIL13受容体であるIL13R 2は、IL13結合についてIL13R 1/IL4R 複合体と競合できる非シグナル伝達デコイ受容体として関わり、それによりSTAT6活性化を低減する。IL13R 2は、STAT6依存性およびSTAT6非依存性シグナルにより誘導でき、線維性組織において発現レベルが上昇する。いくつかの報告(Fichtner-Feiglら、Nat. Med. 12(1): 99~106頁(2006); Mandalら、Inflamm Bowel Dis. 16(5): 753~64頁(2010))は、IL13R 2が、線維症に貢献し得るSTAT6非依存性シグナルを伝達できることを示唆するが、これらの研究は、株化細胞での異所性IL13R 2過剰発現に頼っており、IL13R 2シグナル伝達についての機構は不明なままである。IL13R 2欠損動物は、組織線維症の増加を示すが、IL13R 1欠損動物は、組織線維症の減少を示す(Wilsonら、J. Clin. Invest. 117(10): 2941~51頁(2007); Mentink-Kaneら、Gastroenterology 141(6): 2200~2209頁(2011))。ノックアウト動物において行われたこれらの研究は、線維症の開始におけるIL13およびその受容体の役割に関して情報を与えるが、これらは、ヒト線維性疾患のような確立された線維症の関係で解釈することがより困難である。IL13R 2が、リガンド-受容体係合によりシグナル伝達できないデコイ受容体を形成することを示唆する研究がある一方で、線維形成におけるIL13R 2の正の役割を指摘する、明らかに矛盾した研究がある。よって、ヒトIPFにおける内因性IL13およびIL13R 2の役割は、ほとんど理解されていない。

【0176】

IPFにおける分子経路の我々の理解を増進するために、我々は、IPFおよび非IPF、対照組織におけるゲノム規模の転写プロファイルを特徴決定した。これらの実験により、初代肺線維芽細胞におけるIL13の下流のシグナル伝達経路の同定および特徴決定が可能になった。

【0177】

材料および方法

ヒト肺組織試料

ヒト肺組織試料は、上記、実施例1に記載するようにして得た。

【0178】

組織培養

IMR-90細胞(ATCC、Manassas、VA;カタログ#CCL-186)を、10%FBS(Sigma、St. Louis、MO;カタログ#F2442)およびペニシリン/ストレプトマイシン(Invitrogen、Carlsbad、CA;カタログ#15140)を補ったDMEM培地で培養した。細胞を、増殖因子低減Matrigel(GFR Matrigel)[BD Biosciences、Bedford、MA;カタログ#354230]の床の上に播種した。Matrigelを氷上で終夜融解し、matrigelを37にて30分間固まらせることにより、12ウェルプレート中に450μl/ウェルの充填容積を得た。細胞(1E5-2E5)を次いでMatrigelの床の上に播種した。そうでないと示さない限り、IL-13刺激は、10ng/ml(IL-13およびTNF)および3ng/ml(IL4)を用いて行った。

【0179】

RNA調製

急速凍結肺生検試料を、予め冷却した(液体窒素中で)Bessman組織粉碎機(Spectrum Laboratories、Rancho Dominguez、CA;カタログ#189475)中で粉碎した。Trizolを粉碎した物質に加え、数回ピ

ペット操作した。可溶化液を氷上で10～15分間インキュベートした。可溶化液をさらなる処理まで-80にて貯蔵した。RNAは、Trizol可溶化液から、製造者のプロトコールに従って単離した。Trizolで単離したRNAを、次いで、製造者のプロトコールに従ってQiagen RNeasyカラムを用いることによる別の精製ステップに供した。

【0180】

組織培養した細胞を、1ml(12ウェルプレートのウェルあたり)のTrizolを加え、混合物を数回ピペット操作することにより採集した。Trizol可溶化液を、Qiagen RNeasyプロトコールに示されるように鋼鉄ビーズ/TissueLysers(Qiagen)法(20s⁻¹、4分間)を用いてホモジナイズした。ホモジナイズの際に、RNAは、Trizolの製造者のプロトコールに従って単離した。Trizolで単離したRNAを、次いで、製造者のプロトコールに従ってQiagen RNeasyカラムを用いることによる別の精製ステップに供した。

10

【0181】

RNA濃度は、Nanodropにより決定し、全てのマイクロアレイ試料は、バイオアナライザ(Agilent)により分析した。

【0182】

RT-qPCR

100～300ngのトータルRNAを、製造者のプロトコールに従って高容量cDNA逆転写キット(ABI、カタログ#4368814)を用いてランダムプライマーを用いる逆転写に供した。リアルタイムqPCRは、Taqmanアッセイを用いて行った。全ての反応は、ABI7900HT装置またはFluidigmプラットフォーム(48.48または96.96フォーマット)のいずれかでいった。

20

【0183】

IL-13レポーターアッセイ

L-Luc-Beas2B細胞(ATCC Cat No. CRL-9609)を、以下の試薬を包埋したGFR matrigelで成長させた:12ng/ml IL-13(R&D Systems、カタログ#213-IL)および抗IL-13遮断抗体(Genentech)。ホタルルシフェラーゼ活性を、ホタルルシフェラーゼのみを測定するように改変して製造者のプロトコールに従ってDual-Gloルシフェラーゼアッセイシステム(Promega、カタログ#E2920)を用いて測定した。

30

【0184】

マイクロアレイ分析

RNAを、Quick Amp標識化キット(Agilent)を用いて増幅および標識して、1ugのトータルRNAから標識されたcRNAを作製した。実験試料を、Cy5で標識した。ユニバーサルヒト参照RNA(Stratagene、La Jolla、CA)を参照チャンネルのために用い、Cy3で標識した。Cy5およびCy3で標識されたcRNAを、2色全ヒトゲノム4x44K遺伝子発現マイクロアレイプラットフォームと競合的にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしたマイクロアレイを製造者のプロトコール(Agilent)に従って洗浄し、全ての特徴強度を、Agilentマイクロアレイスキャナを用いて収集した。走査したスライドのTIFF画像を、特徴抽出ソフトウェア(Agilent)、プロトコールGE2-v5__95(Agilent)を用いて分析した。フラグが付けられたアウトライナーは、いずれの後続の分析にも含めなかった。全てのデータを、染料で標準化したCy5/Cy3比のlog₂値として報告する。全ての試料のlog₂比を、対応する模擬処理試料(または非IPF対照)の平均log₂比に対して標準化した。

40

【0185】

異なる発現プロファイリングデータセットを比較した場合、公共で利用可能なデータセットを、元の研究と同様にまずフィルタにかけ、標準化し、中心にした。Kaminskiデータセット(GSE10667)を、全ヒトゲノムAgilentマイクロアレイプ

50

プラットフォームで運転し、よって、プラットフォーム特異的プローブ識別子を用いてデータセットを接続した。ヒートマップを、Java Treeviewを用いて作成した。

【0186】

示差的に発現される遺伝子を、Rコード(LIMMA)において、3つの因子、すなわち診断、組織供給源および性別(Y連鎖遺伝子の発現分析から推測される)を取り込んだ線形モデルを構築することにより同定した。

【0187】

結果

IL13R2は、IPF肺組織において最も示差的に発現される遺伝子である

我々は、40名のIPF患者および8名の非IPF対照の対象から生検で採取した肺組織のゲノム規模トランスクリプトーム分析を行った。我々は、これらの臨床試料からRNAを単離し、全ヒトゲノムAgilentマイクロアレイ(GEO受託ID)を用いて転写産物を分析した。限られて利用可能であったメタデータ[性別、組織供給源(生検または肺移植の時に採集された組織)、診断]を、用いた線形モデルに含めて、示差的に発現される遺伝子を同定した。

10

【0188】

我々は、1508の遺伝子を、対照組織と比較してIPF組織において示差的に発現される($q < 0.05$ 、倍数変化 $> |2|$)と同定した。部分的なリストを表10に示す。IPFにおいて著しく上方制御される遺伝子は、マトリクスメタロプロテイナーゼ(MMP1、3、7、10、11、12、13、16)、コラーゲン(COL15A、10A1、8A2、1A1、24A1、6A3、7A1、1A2、5A2、3A1、17A1、14A1)およびIL-13経路遺伝子(IL-13、IL13R2、POSTN、CCL13)を含んだ。実際に、IPFにおいて最も著しく上昇した遺伝子はIL13R2であり、これは、44倍の変化を示した($q = 3.4 \times 10^{-14}$)。我々は、定量RT-PCRを行うことによりこの観察結果を検証した(図9)。

20

表10.IPFにおけるIL-13シグナル伝達と関連する、示差的に発現される遺伝子(>1.5倍上方制御、 $q < 0.05$)の部分的なリスト。

プローブ ID	遺伝子記号	遺伝子名	Entrez ID	LogFC	p 値	調整 p 値
A_23_P85209	IL13RA2	インターロイキン13受容体、アルファ2	3598	5.46608533	1.06E-17	5.45E-14
A_23_P251031	IL13	インターロイキン13	3596	3.60162356	8.56E-06	1.14E-04
A_23_P55632	SERPINB3	セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードB(オボアルブミン)、メンバー3	6317	3.73336698	0.00023029	1.71E-03
A_24_P347411	POSTN	ペリオスチン、骨芽細胞特異的因子	10631	2.10394126	5.96E-07	1.35E-05
A_24_P125335	CCL13	ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド13	6357	1.10440762	0.00986751	3.53E-02
A_23_P70818	SMO	smoothenedホモログ(ショウジョウバエ属(Drosophila))	6608	1.44870366	1.65E-11	2.81E-09
A_23_P105251	GLI1	GLIファミリージンクフィンガー1	2735	2.08669039	1.87E-10	1.96E-08
A_23_P500034	GLI2	GLIファミリージンクフィンガー2	2736	1.57463899	8.12E-09	3.98E-07
A_24_P398572	IGF1	インスリン様増殖因子1(ソマトメジンC)	3479	1.70343868	0.00081381	4.79E-03
A_23_P153571	IGFL2	IGF様ファミリーメンバー2	147920	4.11862384	5.27E-08	1.90E-06
A_23_P102113	WNT10A	無翅型MMTV組み込み部位ファミリー、メンバー10A	80326	2.83702687	1.14E-17	5.45E-14

10

20

30

プローブID=Agilent全ヒトゲノムマイクロアレイ上のプローブの識別番号; 遺伝子記号=NCBI Entrez遺伝子記号; 遺伝子名=NCBI Entrez遺伝子名; ENTREZ ID=NCBI Entrez遺伝子ID; LogFC=IPF試料中の2を底とするlog発現レベルの平均から健常対照試料中の2を底とするlog発現レベルの平均を減じたもの; p値=limma分析からの線形モデルにおいて診断期間の効果有意性の名目上のp値; 調整p値=遺伝子が統計的に有意であり得る最大p値での推定偽発見率。

40

【 0 1 8 9 】

IL13R 2発現は、培養初代肺線維芽細胞においてIL-13により誘導される

上で論じたように、IL13R 2は、対照である非IPF試料と比較してIPF試料において最も高度に示差的に発現される遺伝子であり、IPFにおいて、対照におけるよりも平均で4.4倍大きい発現を示した。我々は、IL13R 2の役割をよりよく理解す

50

るために、追跡可能で適切な肺組織培養系を開発することを試みた。初代肺線維芽細胞 (IMR90) を、増殖因子低減 (GFR) *matrigel* 上で成長させて、プラスチックよりも生理的成長基材により近くなるようにした。(そうでないと記載しない限り、本実施例における全ての培養実験は、GFR-*Matrigel* 上で成長した細胞を用いて行った。) IL-13 または IL-4 で刺激した IMR90 細胞は、IL13R₂ の実質的な (およそ 8 ~ 10 倍) 誘導を導いた (図 10)。よって、これは、遮断抗体および小分子阻害剤を用いて異所的に過剰発現されるよりも内因的に誘導された IL13R₂ の機能を研究するための実験系を提供する。

【0190】

IL13R₂ 誘導は、初代肺線維芽細胞において IL13R₁ / IL4R からシグナルを減弱する

IL13R₂ は、規範的なシグナル伝達ドメインを欠く、短い細胞質尾部を有する。いくつかの証拠が、IL-13 と結合できる IL13R₂ の細胞外ドメインが、IL13R₁ / IL4R 受容体複合体に対してデコイとして機能し、STAT6 依存性 IL-13 シグナルを減弱するというモデルを支持する。組織培養系の開発中に、我々は、TNF 刺激が IMR90 細胞において IL13R₂ 発現を誘導したことを観察した (図 11A)。TNF は IL-13 依存性 IL13R₂ 誘導を強化することが示されているが、TNF 処理単独は、他の系において IL13R₂ を上方制御することが示されていない。この培養系におけるある重要な違いは、細胞が *Matrigel* 上で成長したことである。IL-13 が GFR *matrigel* 中に存在した可能性を試験するために、我々は、高感度 IL-13 バイオアッセイを行い、これは、増殖因子低減 *Matrigel* 上で培養した細胞で IL-13 が検出可能でなかったことを示した (データは示さず)。

【0191】

IL13R₂ 発現の上昇を示す TNF で刺激された IMR90 細胞は、IL-13 刺激の下流の事象に対する IL13R₂ の発現の上昇が与える影響を調べる機会を提供した。我々は、IL-13 および IL-4 に対する用量応答性を、その発現が TNF 処理により影響されない既知の STAT6 応答性遺伝子 (CCL26 およびペリオスチン) の転写産物レベルを測定することによりモニタリングした (図 11B)。TNF で予め刺激された細胞 (これは、IL13R₂ 発現の増加をもたらした) は、CCL26 およびペリオスチン遺伝子誘導により判定して (図 11B)、IL-13 に対する感受性の低減を示したが、IL-4 に対しては示さず (データは示さず)、このことは、IL-13 の用量を増加することにより克服できた。TNF で予め刺激され、IL13R₂ 発現の上昇を示す細胞において IL-13 により同じレベルの CCL26 またはペリオスチン遺伝子誘導を達成するために、10 倍近くより高い濃度の IL-13 が必要であったが、IL-4 刺激に対する感受性 (データは示さず) は、TNF での前処理により変わらなかった。まとめると、これらのデータは、TNF 媒介 IL13R₂ 誘導が、デコイ受容体としての IL13R₂ の役割と一貫して、IL13R₁ / IL4R 受容体複合体と結合し、該複合体を介してシグナル伝達する IL-13 の能力を特異的に減弱することを示す。

【0192】

異なる抗 IL13 抗体は、IL13R₁ / IL4R または IL13R₂ との結合を選択的に遮断する

上記のデータは、IL13R₂ が IL13R₁ / IL4R シグナル伝達に関してデコイ受容体であるというモデルと一貫するが、代替の下流シグナルが IL13R₂ を起源とする可能性が残される。我々は、不偏遺伝子発現プロファイリングアプローチを用いて、可能性のある IL13R₂ シグナルを、特異的 IL13 / IL4 受容体複合体からのシグナル伝達を遮断する特異的遮断抗体を用いることにより同定した。一方の抗体 (抗 IL-13 mAb1) は、IL4R を IL13R₁ に動員する IL-13 の能力を遮断するが、IL13R₂ との IL-13 の結合に影響しない。第 2 の抗体 (抗 IL

10

20

30

40

50

- 13 mAb 2) は、IL13R 1 および IL13R 2 の両方と結合する IL-13 の能力を遮断する。これらの抗体はともに、IL13R 1 / IL4R 受容体複合体を介する IL-4 シグナル伝達に影響することなく IL13R 1 / IL4R 依存性 STAT6 活性化を妨げることができるが、抗 IL-13 mAb 2 だけが、IL13R 2 との IL-13 の結合も妨げることができる。初代線維芽細胞培養系におけるこれらの抗体のそれぞれの活性を評価するために、細胞を、mAb 1 または mAb 2 遮断抗 IL-13 抗体の存在下または非存在下で、IL-13 および / または IL-4 で処理した。以下に記載するように、我々は、STAT6 の下流の IL-13 / IL-4 シグナル伝達のマーカーである CCL26 およびペリオスチンの転写産物レベルを測定した。

【0193】

我々は、まず、初代肺線維芽細胞培養系において IL-13 または IL-4 単独により誘導される遺伝子発現プロファイルの特徴決定した。細胞を、10 ng/ml の IL-13 または 3 ng/ml の IL-4 のいずれかで 48 時間刺激し、その後、RNA を抽出し、ゲノム規模の発現プロファイリングに供した。各サイトカインにより誘導されるプロファイルは、模擬処理細胞と比べてほぼ同一の遺伝子発現変化を示した(データは示さず)。我々は、IL-4 で刺激された条件と IL-13 で刺激された条件との間に統計的に有意な差を同定せず、このことは、これらのサイトカインがともに、IL13R 1 / IL4R 受容体複合体の下流の同一シグナル伝達経路を活性化することを強く示唆した。

【0194】

我々は、次に、遮断抗 IL-13 抗体 mAb 1 および / または mAb 2 を用いるかまたは用いずに様々なサイトカイン処理条件下で、IMR90 初代肺線維芽細胞培養系(TNF で予め刺激した)における CCL26 およびペリオスチン(POSTN)の転写産物レベルを測定した。図14では、様々な処理条件を、各条件についての遺伝子発現の結果とともに図に示す。

【0195】

IL13R 2 は後続の IL-13 シグナル伝達を調節する役割が示唆される先行するシグナルに応答して内因的に上方制御されるので、図12に示す実験結果について、我々は、細胞を TNF で前処理した後に 2 次刺激を行うことにより、IL13R 2 発現を誘導した。IL-4 での刺激により、または IL13R 2 の負の調節の影響を克服するのに十分に高いレベルの IL-13 により、CCL26 およびペリオスチン転写産物は、著しく誘導された(すなわち CCL26 およそ > 100x ; ペリオスチン およそ > 10x) (図12)。細胞を IL-13 と抗 IL-13 mAb 1 もしくは抗 IL-13 mAb 2 または mAb の組み合わせとで処理した場合、CCL26 およびペリオスチンの誘導は、ほぼ完全に廃止された(図12)。しかし、抗 IL-13 mAb 1 または抗 IL-13 mAb 2 はいずれも、CCL26 またはペリオスチンの IL-4 により媒介される誘導を遮断せず(図12)、このことは、IL-4 よりも IL-13 に対する各 mAb の選択性と一貫する。CCL26 およびペリオスチン発現レベルを測定することにより、IL13R 1 を遮断すること(抗 IL-13 mAb 1 を用いて)と、IL13R 1 および IL13R 2 の両方を遮断すること(抗 IL-13 mAb 2 を用いて)との間に、認識可能な差は検出できなかった。

【0196】

我々は、次に、全体的な遺伝子発現プロファイルに対する IL13R 2 の貢献度を判定することを試みた。これらの実験を設定するにあたり我々が有していたある懸念は、IL13R 2 シグナル伝達が、IL4R / IL13R 1 受容体複合体から発せられる同時共シグナルを必要とする可能性であった。IMR90 細胞は共通ガンマ鎖(IL2R、データは示さず)を欠くので、IL-4 媒介シグナル伝達は、IL4R / IL13R 1 受容体複合体の活性化によってのみ生じる。したがって、IMR90 細胞をサイトカイン IL-4 で処理することは、IL-13 での処理と同様の様式で IL4R / IL13R 1 によるシグナル伝達を活性化し、よって、これらの細胞の IL-4 処理は、IL4R / IL13R 1 受容体複合体を介する IL-13 シグナル伝達の代用である。

10

20

30

40

50

【0197】

図13Aは、IL-13またはIL-13およびIL-4でかつそれぞれの場合においてmAb1またはmAb2で処理した細胞からのマイクロアレイデータの分析を示す。図から観察できるように、この分析は、IL-13での細胞の処理とmAb1もしくはmAb2での細胞の処理との間、またはIL-13およびIL-4での細胞の処理とmAb1もしくはmAb2での細胞の処理との間で、有意に示差的な発現された遺伝子（調整p値 < 0.01 ）がないことを明らかにした（全ての場合において、細胞はTNFで前処理した）。IL-4の非存在下でのIL-13刺激細胞では、mAb1およびmAb2による抑制はほぼ同一であったが（図13A）、IL-4の存在下では、mAb1またはmAb2はいずれも遺伝子発現における意味のある変化をもたらさなかった（図13B）。まとめると、これらのデータは、リガンド-受容体IL13-IL13R₂係合が、遺伝子発現変化をもたらすシグナル伝達事象を誘導しないことを示唆する。

10

【0198】

IPFおよびIL13/IL4で刺激した初代肺線維芽細胞におけるGLI1発現の上昇
IPFコホートにおいて最も著しく発現された遺伝子は、発経路における重要な転写因子であるGLI1を含む（図14）。ヘッジホッグ（Hh）およびTGFシグナル伝達は、GLI1発現を誘導することが示されている。GLI1およびIL13R₂発現レベルは、IPF試料内で著しく相関した（ $r_s = 0.69$ 、q値 < 0.01 ）。細胞培養マイクロアレイ実験では、我々は、GLI1発現がIL13刺激により上方制御されたことを見出した（データは示さず）。よって、我々は、GLI1が、IL13R₂と同様に、IL13シグナル伝達により直接的または間接的に調節されると仮定した。この観察結果を確認するために、我々は、初代肺線維芽細胞（matrigel上で培養）をIL13で刺激して、GLI1発現をRT-qPCRにより測定した。GLI1発現は、IL13刺激により誘導された（およそ4x）（データは示さず）。

20

【0199】

HhまたはTGFシグナル伝達の遮断は、IL13により誘導されるGLI1発現を廃止しない

Hh経路活性はGLI1発現を誘導できるので、我々は、IL13刺激がHh経路のHh依存性自己分泌/傍分泌刺激を導くと仮定した。この可能性を試験するために、我々は、まだらな結合により滑らかな抑制解除を誘導するHhリガンドの能力を遮断する小分子Hh経路阻害剤（本明細書でM1という）を用いた（Yauchら、Nature 455: 406~410頁（2008）、これはCur-691またはHhAntag691に言及する）。M1での前処理は、SHH媒介GLI1誘導を遮断したが、IL13依存性GLI1誘導には影響しなかった（図15）。

30

【0200】

TGFによる細胞の刺激は、GLI1発現を誘導することが示されており、IL13は、いくつかの実験系でTGF活性を誘導できる。GLI1のIL13依存性誘導がTGF依存性自己分泌/傍分泌機構により生じるかを評価するために、細胞を2つのTGF経路阻害剤（抗体1D11 [Edwardsら、J. of Bone and Mineral Res. 25: 2419~2426頁、2010]およびTGFBIIRb-Fc [R&D Systems, Cat. No. 1003-RT-050]）で前処理した。両方のTGF経路阻害剤はTGF1（既知のTGF応答性遺伝子）のTGF媒介誘導を遮断したが（図16A）、これらはいずれもIL13依存性GLI1誘導に影響しなかった（図16B）。

40

【0201】

これらのデータは、以前は記載されていなかったIL13とGLI1誘導との間の関係を示唆し、これは、以前に特徴決定されたHhおよびTGFシグナル伝達経路により媒介されない。

【0202】

肺組織の遺伝子発現分析により、非IPF対照と比較した場合にIPF患者においてト

50

ランスクリプトームが著しく変更されていることが明らかになる。線維性の素因と一貫して、我々は、細胞外基質のリモデリングに関与する多くの遺伝子の発現レベルがIPFにおいて上昇したことを見出した。さらに、本研究と以前に発表された同様のサイズの研究からの発現マイクロアレイデータとの間のランスクリプトーム規模の程度が著しく類似することは、本研究で観察された遺伝子発現パターンが誤診または技術的もしくは分析的アーチファクトによる偽シグナルではなくヒトIPFにおいて真に活性であるプロセスを広く示すという我々の結論を支持する。

【0203】

IL13は、線維症の潜在的駆動因子として前臨床モデルに関わる。IPF生検では、我々は、IL13経路活性化の転写的証拠と、ペリオスチン、CC13、CC18およびIL13R₂を含む以前に記載されたIL13標的遺伝子の発現の上昇とを観察した。さらに、IL13自体の発現レベルは、IPFにおいて上昇した。IPFにおいて最も強くかつ一貫して上方制御された遺伝子は、IL13R₂であった。以前の研究は、IL13R₂の役割に関して異なる結論、すなわち1) IL13R₂は、線維症の増加を支持し得るシグナルを伝達できるか、または2) IL13R₂はIL13についてデコイ受容体であり、シグナル伝達能力を有さないという結論に達した。これらの対照的な可能性に鑑みて、我々の生検マイクロアレイデータにおけるIL13関連遺伝子発現パターンが、IL13R₂の高い発現がIPFにおけるIL13活性の正味の正の役割または正味の負の役割を反映することを示すかどうか、そしてIL13R₂の見込みのある機能は何であるかを決定することは難しい。

10

20

【0204】

IPFと関連する追跡可能な系においてIL13R₂の役割を明らかにするために、我々は、増殖因子低減Matrigel上で成長したIMR90細胞(ヒト初代肺線維芽細胞株化細胞)を用いるin vitro系を開発した。IL13で刺激した場合に、これらの細胞は、IL13R₂発現の増加を示した。我々は、この系においてIL13R₂がTNF α によっても強く誘導可能であったことを観察した。TNF α はSTAT6を介してシグナル伝達することが知られていないので、我々は、この特徴を探索して、IL13R₂レベルを異所的にではなく内因的に調節して、IL13シグナル伝達に対するIL13R₂発現の影響を決定した。細胞をTNF α で予め刺激した場合に、これらは、2つのIL13標的遺伝子(ペリオスチンおよびCC26)により判定して、IL13刺激に対する感受性の減少を示した。TNF α で予め刺激した細胞は、TNF α で予め刺激していない細胞と比べて同等のペリオスチンおよびCC26誘導を達成するために、およそ10倍のIL13濃度を必要とした。しかし、TNF α 前処理に関わらず細胞はIL4に対して同様に感受性のままであったので、TNF α での予め刺激は、IL13R₁/IL4R複合体の固有のシグナル伝達能力に影響しないことがわかった。これらの観察は、IL13R₂がIL13-IL13R₁/IL4R相互作用についてのデコイ受容体として作用するモデルを支持する。しかし、これらのデータは、IL13R₂がそれ自体の独特の細胞内シグナルを増加させ得るという可能性を排除しない。この可能性をより徹底的に調査するために、我々は、IL13と2つの受容体複合体との相互作用の選択的遮断を可能にする試薬を利用した。MAb2は、IL13R₁およびIL13R₂の両方と結合するIL13の能力を混乱させる遮断抗体である。MAb1は、しかし、IL4Rと結合し、それを介してシグナル伝達するIL13の能力を遮断するが、IL13R₂結合を遮断しない。我々は、これらの遮断抗体のいずれか一方の存在下で、IL13で処理した細胞の発現プロファイルを比較することにより、存在するならば、IL13R₂特異的な下流の転写事象を同定できると推論した。我々は、細胞がいずれかの抗体で遮断される条件の間で単一の統計的に有意な差を同定することができず、このことは、この細胞培養系では、IL13のみとのIL13R₂の係合は、遺伝子発現に影響する細胞内シグナル伝達カスケードを上昇させないことを強く示唆する。IL13-IL13R₂結合はin vivoでのIL13とIL13R₁/IL4Rとの係合と同時に生じる見込みがあるので、我々は、IL13R₂シグナルが、IL

30

40

50

13R 1 / IL4R 複合体の同時係合に依存し得るかを決定することを試みた。しかし、IL13 - IL13R 1 / IL4R シグナル伝達に影響することなくIL13 - IL13R 2相互作用を選択的に遮断する試薬は同定されなかった。IL13およびIL4はともにIL13R 1 / IL4R シグナル伝達複合体と結合し、それを介してシグナル伝達し、同一の発現プロファイルを上昇させるので、我々は、上記のようなMAb 1対MAb 2遮断実験にIL4を導入することにより、活性IL13R 1 / IL4R シグナルを模倣できると推論した。この関係において、我々は、いずれのIL13R 2依存性シグナル伝達事象もまだ同定できなかった。まとめると、これらのデータは、IL13R 2が肺線維芽細胞においてデコイ受容体であるモデルを強く支持する。

【0205】

我々は、肺発生、EMT、腫瘍形成および組織修復において重要であることが知られているGLI1が、対照の対象と比べてIPF患者において上方制御されることも示した。我々は、IL13が、培養線維芽細胞においてGLI1発現の増加を導くことも観察した。これらの結果は、GLI1が、創傷治癒消散の最終段階を遮断し、継続的な線維症を支持し得る線維芽細胞の継続的な成長および生存期間を支持し得ることを示唆する。

【0206】

実施例3：第II相臨床研究
研究原理

IPFは、様々な程度の間質性線維症を特徴とする。I、IIIおよびIV型コラーゲン、フィブロネクチンならびにテネイシン-Cを含むいくつかの細胞外基質タンパク質が、間葉系細胞の異常増殖、肺構造の歪みおよび上皮線維芽細胞巢の発生と一緒に、IPF患者における線維症のプロセスに関わる。IL-13およびIL-4は、組織線維症の強い誘発物質である。非臨床モデルでは、マウスの肺におけるIL-13のトランスジェニック過剰発現は、コラーゲン遺伝子発現および深在性上皮線維症を誘発するために十分である(Leeら、2001、J Exp Med 194:809~22頁; Zhuら、1999、J Clin Invest 103:779~88頁)。逆に、IL-13が標的化により混乱させられたマウスおよびIL-13に特異的な遮断抗体で処置されたマウスは、プレオマイシンおよびフルオレセインイソチオシアネートで誘発された肺線維症モデルにおいて細胞外基質沈着の低減を示す(Belperioら、2002、Am J Respir Cell Mol Biol 27:419~27頁; Kolodsi c kら、2004、J Immunol 172:4068~76頁; Liuら、2004、J Immunol 173:3425~31頁)。

【0207】

複数の研究が、IL-13の発現および活性がIPF患者において上昇すると結論付けている。IL-13およびIL-13受容体(IL-13R)であるIL-13R 1およびIL-13R 2の発現は、正常対照と比較して、メッセンジャーRNAおよびタンパク質の両方のレベルにてIPF患者からの肺生検試料において増加することが見出された(Jakubzickら、2004、Am J Pathol 164:1989~2001頁)。IL-13は、正常対照と比較してIPF患者からの気管支肺胞洗浄液中で上昇することも見出された。重要なことに、これらの試料中のIL-13のレベルは、肺機能の重要な尺度、予測努力肺活量(FVC)および一酸化炭素肺拡散能力(DLco)のパーセンテージと負に相関し(Parkら、2009、J Korean Med Sci 24:614~20頁)、このことは、IPF患者におけるIL-13の病原性機能を示唆した。

【0208】

IL-13自体に加えて、IL-13シグナル伝達から下流で発現されることが知られている血清バイオマーカーも、IPF患者において上昇することが示された。喘息患者におけるレプリキズマブを用いる処置からの利益と相関する血清レベルを有するIL-13誘発性タンパク質である(Correnら、2011、N Engl J Med 365(12):1088~98頁)ペリオスチンも、IPF患者の血清中で上昇し、これらの

10

20

30

40

50

レベルは、肺機能パラメータ（FVCおよびDL_{CO}）と6ヶ月の期間にわたって負に相関したことが示されている（Okamotoら、2011、Eur Respir J 37:1119~27頁）。ペリオスチンは、ペリオスチン欠損マウスにおいて観察されたブレオマイシン誘発肺線維症の低減に基づいて、IPFにおける病原性因子であることが提案され（Uchidaら、2012、Am J Respir Cell Mol Biol 46:677~86頁）、このことは、IL-13が疾患に貢献する原因となり得るさらなる機構を示唆する。IL-13シグナル伝達は、*in vitro*でのマクロファージおよびIPF患者から単離され（しかし、正常対照からではない）、CCL-18タンパク質を構成的に発現する肺胞マクロファージからのケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド18（CCL-18）の堅固な生成も誘導する（Prasseら、2006、Am J Respir Crit Care Med 173:781~92頁）。ペリオスチンと同様に、CCL-18は、IPF患者の血清中で増加し、CCL-18レベルは、疾患進行および予後予測と相関することが報告されており、ベースラインCCL-18のレベルがより高い患者は、FVCのより大きい低下とより高い死亡率とを経験する（Prasseら、2007、Arthritis Rheum 56:1685~93頁；Prasseら、2009、Am J Respir Crit Care Med 179:717~23頁）。まとめると、これらのデータは、IL-13発現がIPF患者において上昇し、このサイトカインから複数の型の線維症関連細胞へのシグナルが疾患発生を駆動することにおいて重要な役割を有することを強く示唆する。

10

20

【0209】

抗IL13抗体（レプリキズマブ）アミノ酸配列

以下の表は、レプリキズマブのCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3領域のアミノ酸配列を、VH、VL、重鎖配列および軽鎖配列とともに示す。以下の表11に示すように、VHおよび重鎖は、N末端グルタミンを含むことがあり、重鎖は、C末端リシンも含むことがある。当該技術において公知であるように、N末端グルタミン残基はピログルタメートを形成でき、C末端リシン残基は、製造プロセス中に切り取ることができる。

表11.抗IL13抗体(レブリキズマブ)アミノ酸配列

CDR-H1 (配列番号 1)	Ala Tyr Ser Val Asn	
CDR-H2 (配列番号 2)	Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser	
CDR-H3 (配列番号 3)	Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn	
CDR-L1 (配列番号 4)	Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His	10
CDR-L2 (配列番号 5)	Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser	
CDR-L3 (配列番号 6)	Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr	
VH (配列番号 7)	Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser	20
VH (配列番号 8)	Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Ser Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Met Ile Trp Gly Asp Gly Lys Ile Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser	
VL (配列番号 9)	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	30
H 鎖 (配列番号 10)	VTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSQVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSEQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLA LSLG	40
H 鎖 (配列番号 11)	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDT ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSQVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSEQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLA LSLG	
H 鎖	VTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PGKALEWLAM	

(配列番号 12)	IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDV ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSLKG
H 鎖 (配列番号 13)	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTVSGFSLA AYSVNWIRQP PGKALEWLAM IWGDGKIVYN SALKSRLTIS KDTSKNQVVL TMTNMDPVDV ATYYCAGDGY YPYAMDNWGQ GSLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL SLSLKG
L 鎖 (配列番号 14)	DIVMTQSPDS LSVSLGERAT INCRASKSVD SYGNSFMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQNNEDPR TFGGGKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

10

20

【0210】

用量、投薬計画および原理

これは、IPFの患者におけるレプリキズマブの無作為化、多施設、二重盲検、プラセボ対照、並行群間研究である。およそ250名の患者（処置群あたり125名の患者）が、全世界にあるおよそ100の場所で研究に登録する。全処置期間は、盲検処置の少なくとも13回の用量（ $q4wks$ ）と、最長で2.5年の期間にわたる主要評価項目についての少なくとも75の事象の観察を受ける全ての対象に基づく。

【0211】

書面でのインフォームドコンセントを提出する患者は、参加時基準を確立するためにスクリーニング期間（4週間）を開始する。スクリーニング期間の最後に、対象となる患者は、皮下注射（SC）レプリキズマブ250mgでの二重盲検処置またはプラセボ（それぞれ予め充填されたシリンジから投与する）に1:1の比で無作為化される。ブロック無作為化を中央で行い、肺機能（予測FVC<50%、50%~75%、>75%）および領域（北米、欧州、その他）で階層化する。

30

【0212】

研究薬物は、SC注射により4週間ごとに投与し、1回目の注射は、無作為化訪問時に行う（第1日）。SC注射は、腕、大腿または腹部で行い、全ての患者は、投薬訪問あたり合計で2回の注射を受ける。患者は、最短投薬期間（第0週~第48週）中に最小限で13回の用量の盲検処置を受ける。患者は、主要評価項目についての少なくとも75の事象が生じ、かつ登録した最後の患者が少なくとも13回の用量の盲検処置を受ける機会を有するまでの延長処置期間中に、4週間ごとに盲検研究処置を受け続ける。これらの事象が一旦生じたら、全ての進行中の患者は、研究薬物の最後の用量のおよそ4週間後に診療所に戻り、処置終了（EOT）訪問時と、18週間の安全性フォローアップ期間中の2回のその後の訪問時にフォローアップ判定を完了する。登録および事象頻度の割合に応じて、処置の合計期間は、1年から最長で2.5年までの範囲であると期待される。処置期間は、各患者について2.5年を超えず、最長研究期間は、2.8年と期待される。時期尚早に研究薬物を中止することを選択した患者は、研究に残って全ての残りの判定を完了することを奨励される。このことが実行可能でない場合、患者は、同意が撤回されない限り、安全性フォローアップ期間に入ってそれを完了するべきである。

40

【0213】

50

用量および投薬計画原理は、以下のとおりである。レプリキズマブは、IL-13シグナル伝達を阻害するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。非臨床および臨床データはともに、IL-13シグナル伝達がIPFの病原性において重要な役割を有することを示唆する（上記を参照されたい）。レプリキズマブの作用の機構は、IL-13とその受容体との間の相互作用を遮断し、よってIL-13の細胞内シグナル伝達を遮断することである。サイトカインの代謝回転が速いので、最適なIL-13遮断は、肺において持続濃度のレプリキズマブを維持することを必要とすると仮定される。肺におけるIL-13レベルが文献で報告される範囲であり（200～2000 pg/mL；Hart 2001、Immunology and Cell Biology 79：149～53頁）、血清：肺の分配比が1：500であると仮定して、10 μg/mLの血清濃度が、IL-13を中和するための肺における十分に高い薬物レベルを維持すると期待される。この目標濃度は、第II相研究の観察第12週トラフ濃度の下端とも一貫したが（平均±SD：28.8±11.9 μg/mL）、この研究では、レプリキズマブは、吸入副腎皮質ステロイド治療にもかかわらず喘息を管理できなかった患者において、重症喘息の増悪速度の低減についての有効性を示した。喘息患者と同様に、IPF患者は、IL-13生物学と関連するバイオマーカーのレベルが上昇しており、このことは、喘息において臨床的利益をもたらすレプリキズマブの濃度がIPFにおいても生物活性を生じ得ることを示唆する。

10

【0214】

IPF患者における第II相研究のために、4週間ごとの250 mg（q4wk）の用量を選択して、この目標濃度以上の定常状態血清トラフ濃度を維持した。IPF患者でのレプリキズマブの薬物動態は喘息患者におけるものと同様であると仮定して、この用量/計画は、およそ30 μg/mLの平均定常状態トラフ濃度を維持すると期待される。目標濃度よりも3倍高い濃度は、より厚い間質、および自己抗体が存在するならばより速い可能性があるレプリキズマブのクリアランスのために、IPF患者における肺分配の低減を可能にする（Papirisら、2012、Curr Opin Pulm Med 18：433～40頁）。250 mg用量q4wkを選択することは、喘息におけるレプリキズマブの以前の臨床研究からの安全性データベースによっても支持される。

20

【0215】

レプリキズマブおよびプラセボは、予め充填されたシリンジで提供される。各シリンジは、単回用量SC投与のみのためであり、保存剤を含有しない。活性研究薬物のそれぞれの予め充填されたシリンジは、125 mg/mLレプリキズマブの濃度の1 mLの滅菌液を含有する。この製剤は、酢酸ヒスチジン（20 mM）、ショ糖（60 mg/mL）、ポリソルベート20（およそ0.03%）および注射用滅菌水USP、pH 5.4～6.0も含有する。プラセボのそれぞれの予め充填されたシリンジは、酢酸ヒスチジン（20 mM）、ショ糖（75 mg/mL）およびポリソルベート20（およそ0.03%）、pH 5.4～6.0を含む注射用滅菌水からなる1 mLの滅菌液プラセボ製剤を含有する。研究薬物およびプラセボの予め充填されたシリンジは、2～8℃にて冷蔵し、過剰の光および熱から保護されるべきである。シリンジは、凍結するべきでなく、振動させるべきでなく、室温で貯蔵すべきでない。

30

40

【0216】

参加および除外基準

IPFを有する35～80歳のおよそ250名の患者が、本研究に登録する。参加基準は、以下のとおりである：スクリーニング時より5年前以内で、ベースライン時に確認された、2011 ATS/ERSガイドラインに基づく確定的または高可能性のIPFの診断；スクリーニング時の予測FVC>40%および90%；スクリーニング時の予測DLco>25%および90%；経口副腎皮質ステロイド治療を受けている患者について：第1日より4週間前に定常用量10 mgプレドニゾン（または同等）；支援なしで100メートルの歩行能力。除外基準は、以下を含む：生物学的薬剤に対する重度のアレルギー反応もしくはアナフィラキシー反応の履歴、またはレプリキズマブ注射の成分

50

のいずれかに対する既知の過敏症；間質性肺疾患の他の既知の原因の証拠；6ヶ月以内に予期される肺移植；著しい閉塞性肺疾患またはIPF以外のその他の臨床的に著しい肺疾患または感染性疾患を含むその他の臨床的に著しい医療疾患の証拠；クラスIVのNew York Heart Associationの慢性心不全または左室駆出率<35%の証拠の履歴；スクリーニングの30日前以内のIPFの増悪による入院；体重<40kg。

【0217】

有効性評価項目

主要有効性評価項目は、進行のない生存期間(PFS)であり、これは、研究処置無作為化から以下のいずれかの事象の最初の発生までの時間と定義される：任意の原因での死亡；任意の原因での非待機的入院；および10%のFVC(L)におけるベースラインからの減少。副次有効性評価項目は、絶対FVC(L)の年率変化；第52週での15%のDLCO(mL CO/min-1/mmHg-1)のベースラインからの減少；無作為化から任意の原因での死亡または非待機的入院までの時間；ベースラインから第52週までのIPFの生活の質判定ツール(ATAQ-IPF)における変化；無作為化からベースラインと比べて10%のFVC(L)の最初の減少までの時間；絶対DLCO(mL CO/min-1/mmHg-1)の年率変化；ならびにベースラインから第52週までの6分間歩行距離(6MWD)の変化である。探索評価項目は、ベースラインから第52週までのFVCの変化([L]および予測パーセント)；ベースラインから第52週までのFVC(L)のパーセント変化；ベースラインから第52週までの絶対FVC(L)の200mLまたは10%の変化の発生；ベースラインから第52週までのDLCOの変化([mL CO/min-1/mmHg-1]および予測パーセント)；ベースラインから第52週までのDLCOのパーセント変化(mL CO/min-1/mmHg-1)；ベースラインにて酸素補給療法を受けている患者についてベースラインから第52週までの安静時酸素流量の変化；ベースラインにて酸素補給療法を受けていない患者について無作為化から酸素補給療法の追加までの時間；無作為化から任意の原因での非待機的入院までの時間；無作為化から急性IPF増悪の最初の事象までの時間；無作為化からIPF悪化の最初の事象までの時間；ベースラインから第24週および第52週までの、定量肺線維症(QLF)スコアを含む肺HRCCTでのX線撮影による知見の変化；6分間歩行試験(6MWT)において歩いた距離のベースラインからの変化；血清バイオマーカー(例えばペリオスチン、CCL-18、YKL40、COMP、OPN、CCL-13)のベースラインからの変化；ならびにEuroQol5元質問票(EQ-5D)におけるベースラインから第52週までの変化である。

【0218】

研究判定

特発性肺線維症増悪

IPF増悪は、以下の基準に合致する事象と定義する：過去30日以内の説明のつかない呼吸困難の悪化または発生；通常の間質性肺炎(UIP)と矛盾しない、網状または蜂巣背景パターンと重なりあう新しい両側スリガラス異常および/または硬化の放射線学的証拠；ならびに代替の原因、例えば左心不全、肺塞栓症、肺感染(気管内吸引液もしくは利用可能であれば気管支肺胞洗浄、または調査者の判断に基づく)または急性肺傷害を導くその他の事象(例えば敗血症、誤嚥、外傷、再灌流肺水腫)が存在しないこと。

【0219】

疾患の特発性肺線維症悪化

疾患のIPF悪化は、以下に合致する事象と定義する：(i)過去30日以内の呼吸困難の説明のつかない悪化または発生ならびに(ii)以下のいずれか2つ：

- ・UIPと矛盾しない、網状または蜂巣背景パターンと重なりあう新しい両側スリガラス異常および/または硬化の放射線学的証拠；
- ・以下の基準の少なくとも1つに合致する肺機能の悪化：
 - 少なくとも10%のFVC(L)、

10

20

30

40

50

- DL_{CO} ($mL CO/min - 1/mmHg - 1$)、少なくとも15%、
- 酸素飽和 (SpO_2) 少なくとも4%

ならびに (iii) IPF増悪について上に列挙したもののような代替の原因が存在しないこと。

【0220】

肺活量測定

気管支拡張剤試験についての手順を含む肺活量測定は、ATS/ERSコンセンサス声明に基づく研究 Pulmonary Function Manual に従って行う (Millerら、2005、Eur Respir J 26:319~38頁)。この手引きは、装置、手順、患者指示および注意事項に関する情報を含む。収集される肺活量の尺度は、 FEV_1 および FVC の値ならびに最大呼気流量の値、ならびに流量-容量および容量-時間曲線を含む。予測 FEV_1 および FVC のパーセンテージは、これらの容量測定から、Hankinson および同僚 (Hankinsonら、1999、Am J Respir Crit Care Med 159:179~87頁) により記載される National Health and Nutrition Examination Survey データベースから得られる等式を用いて得る。

10

【0221】

肺活量測定は、研究の要件に合い、肺活量測定のATS/ERS規格化により発表されたガイドラインに従う (Millerら、2005、Eur Respir J 26:319~38頁) ように設定されたコンピュータ化された肺活量測定システムで行う。

20

【0222】

DL_{CO} は、血清ヘモグロビン濃度についての補正を含んでATS/ERSガイドラインに従って行い、主要および副次評価項目判定の一部として FVC とともに測定される。この計略の図画表示を含むデータの許容可能性は、盲検オーバーリーダーにより決定される。許容できる計略の再現性についての算出は、プログラム化される。

【0223】

高分解能コンピュータ断層撮影

腹臥位肺HRCTスキャンを行って記録する。肺HRCTスキャンによるIPFの診断は、両肺底部、周辺または胸膜下小葉内中隔肥厚の対称的パターン、線維性の変化、蜂巣化および牽引性気管支拡張症または細気管支拡張症を示すはずである。これらは、肺のスリガラス影を伴うことがある。

30

【0224】

6分間歩行試験

6MWT試験は、集中的ATSガイドライン (ATS Statement 2002、Am J Respir Crit Care Med 166:111~117頁) に従って行う。

【0225】

患者報告結果

患者報告結果 (PRO) データは、レプリキズマブの臨床プロファイルをより完全に特徴決定するために、本研究における患者から引き出す。患者は、必要に応じて現地の言語に翻訳されたPRO文書を、研究中の特定の時点で完成する。2つのPROツールを用いる：

40

【0226】

特発性肺線維症の生活の質判定ツール (ATAQ - IPF)

ATAQ - IPF は、74項目のIPF特異的生活の質文書である (Swigrisら、2010、Health and Quality of Life Outcomes 8:77頁)。生活の質判定ツール (ATAQ) は、13のドメインからなる：咳 (6項目)、呼吸困難 (6項目)、先見 (5項目)、睡眠 (6項目)、死亡 (6項目)、消耗 (5項目)、感情的幸福 (7項目)、社会的参加 (5項目)、財政 (6項目)、独立性 (5項目)、性的健康 (5項目)、親族関係 (6項目) および治療 (6項目)。ATAQの

50

各項目は、1（強く反対）から5（強く賛成）までの範囲の尺度で判定される。想起期間はATAQで特定されない。ATAQ - IPFスコアとIPFにおいて重要であることが知られている生理的変数との間の相関のパターンは、補充酸素を用いる対象と補充酸素を用いない対象との間のATAQ - IPFスコアの著しい差とともに、その妥当性を支持する。

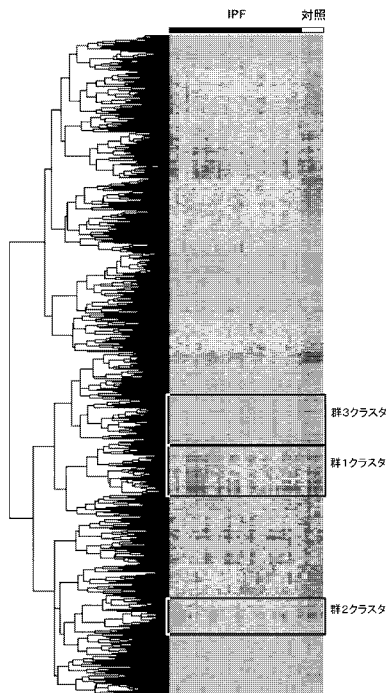
【0227】

EuroQoL5元質問票

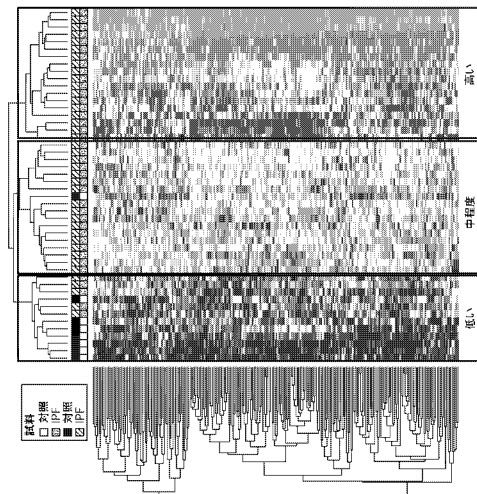
EQ-5Dは、健康状態についての単一指標の値を与える、包括的な嗜好に基づく健康に関する生活の質の質問票である（Rabinおよびde Charro 2001、Ann Med 33：337～43頁）。このツールは、患者の複合的健康状態を構築するために用いられる可動性、自己ケア、通常の活動、疼痛/不快感および不安/うつに関する質問を含む。

10

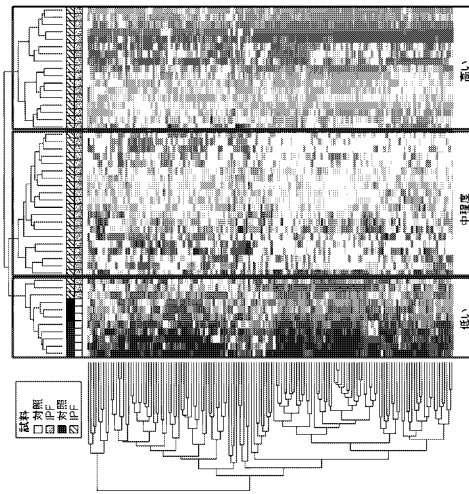
【図1A】



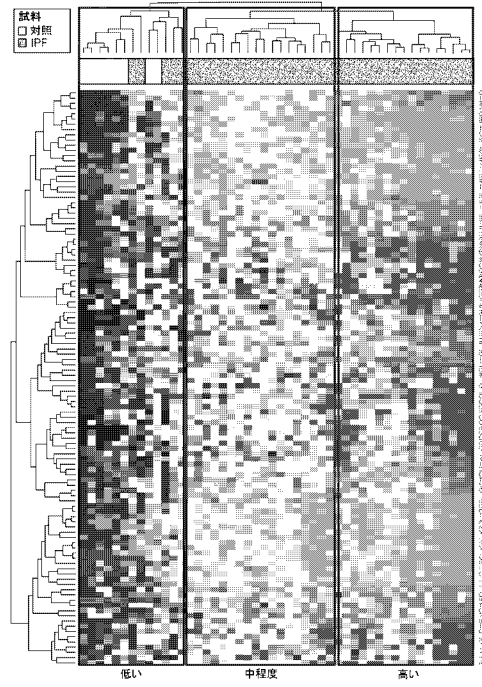
【図1B】



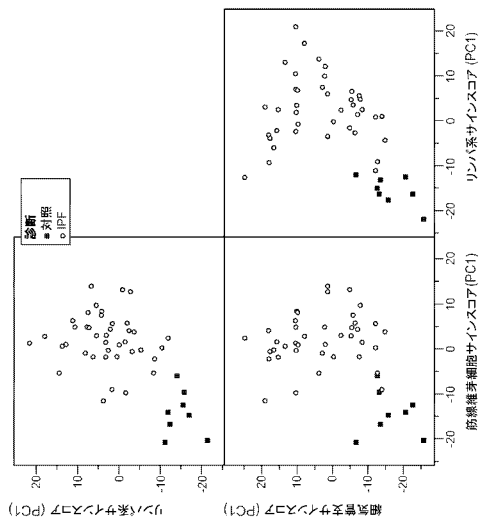
【図 1 C】



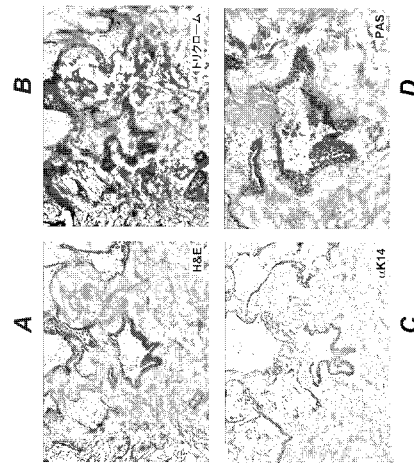
【図 1 D】



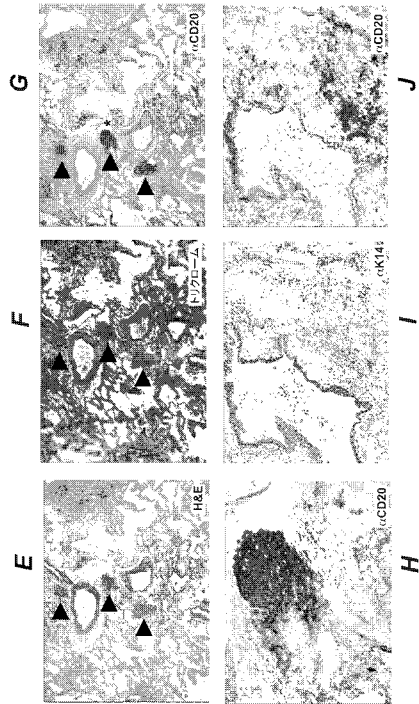
【図 1 E】



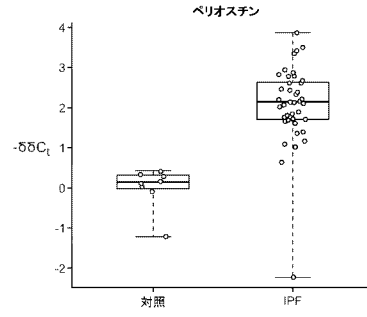
【図 2 - 1】



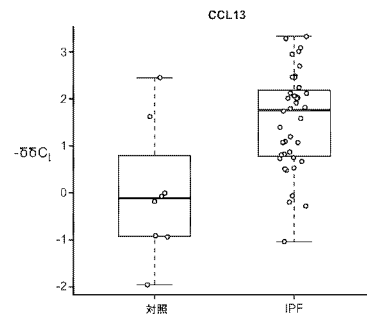
【 図 2 - 2 】



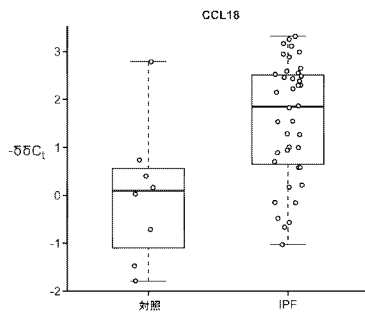
【 図 3 A 】



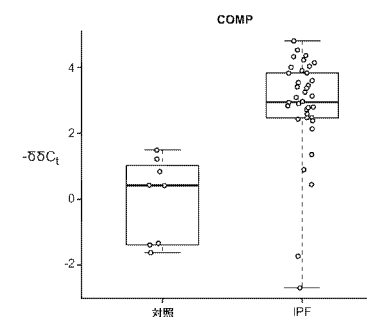
【 図 3 B 】



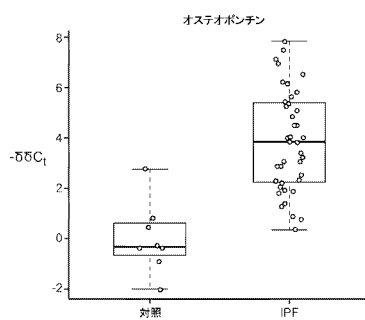
【 図 3 C 】



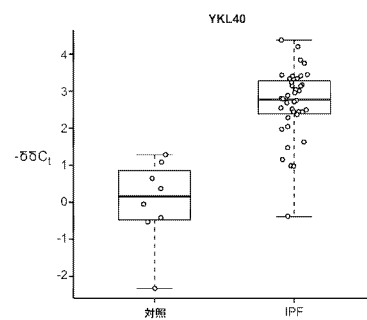
【 図 3 E 】



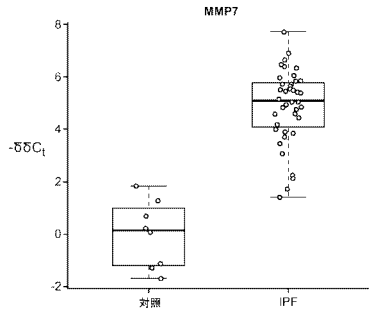
【 図 3 D 】



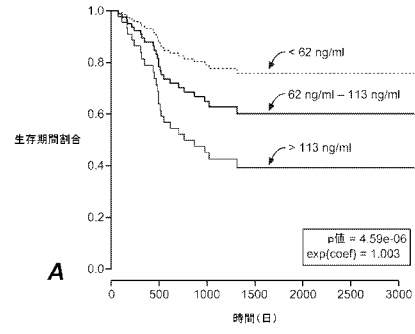
【 図 3 F 】



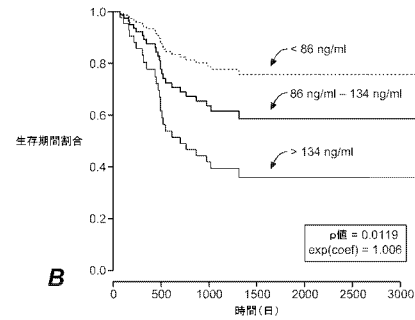
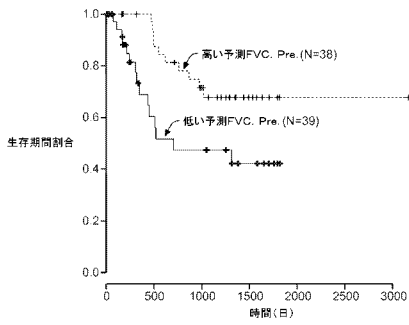
【 図 3 G 】



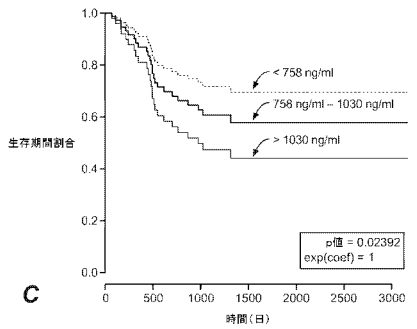
【 図 5 - 1 】



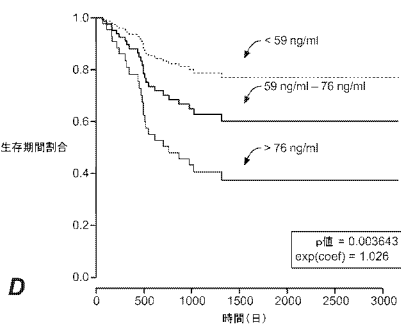
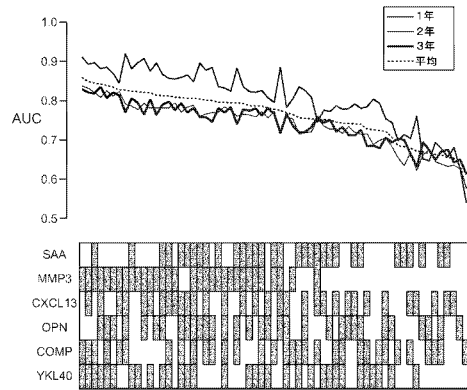
【 図 4 】



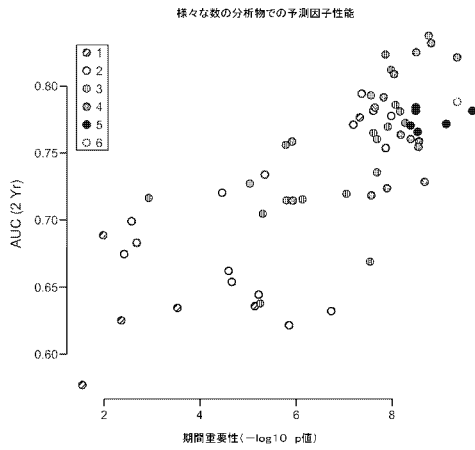
【 図 5 - 2 】



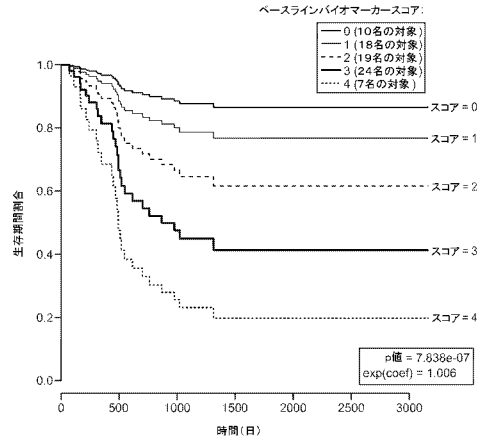
【 図 6 A 】



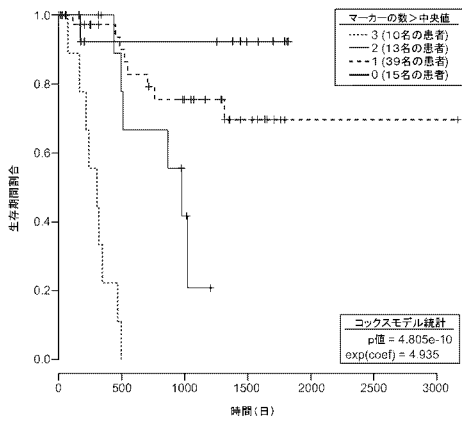
【 図 6 B 】



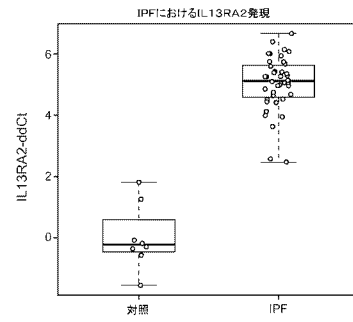
【 図 7 】



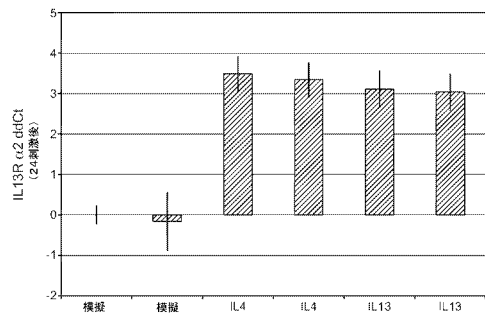
【 図 8 】



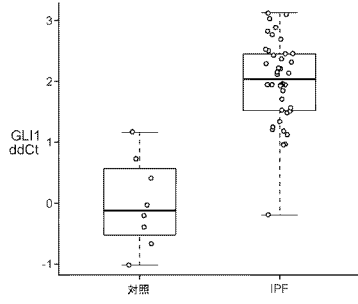
【 図 9 】



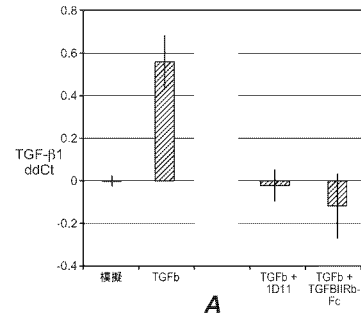
【 図 10 】



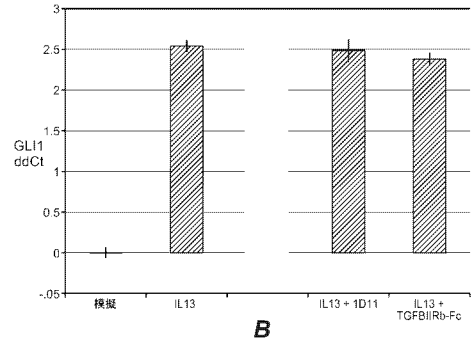
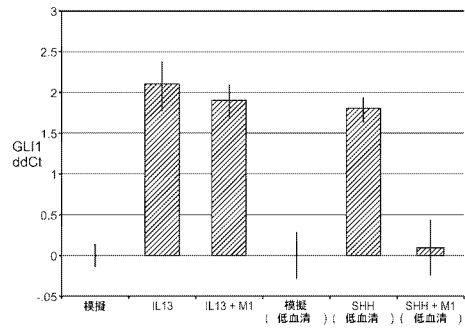
【 図 1 4 】



【 図 1 6 】



【 図 1 5 】



【 配 列 表 】

[2015522246000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 13/31178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C12Q 1/68; G01N 33/53; A61K 38/00, 39/395; C07K 16/00 (2013.01) USPC - 435/6.1, 7.1; 514/1.1; 424/130.1; 530/387.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																			
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B) - C12Q 1/68; G01N 33/53; A61K 38/00, 39/395; C07K 16/00 (2013.01) USPC - 435/6.1, 7.1; 514/1.1; 424/130.1; 530/387.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/6.11, 6.12, 7.92, 326, 328, 335; 424/136.1, 145.1, 158.1; 530/387.3, 388.23, 389.2; 514/1.8 (Text Search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); PatBase; Google and Google Scholar. Search Terms: idiopathic pulmonary fibrosis, IPF, MUC1, mucin-like 1, SBEM, Small Breast Epithelial Mucin, BS106, MUC1, MUC-1, mucin 1, CD227, KL6, KL-6, DF3, DF-3, EMA, H23AG, PEMT, MAM6, H23, 15-3, SAA,SAA1, SAA2, SAA4, serum amyloid, CSAA,																			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																			
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y — A</td> <td>US 2012/0035067 A1 (KAMINSKI et al.) 09 February 2012 (09.02.2012) para [0033], [0081], [0133]</td> <td>1-2, 5-6, 9 and 11-12 20-28, 55-59 and 63-64 27 and 60</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>SUNG, H.J. et al. Identification and Validation of SAA as a Potential Lung Cancer Biomarker and its Involvement in Metastatic Pathogenesis of Lung Cancer. J. Proteome Res. 09 December 2010, Vol 10, pages 1383-1395: Table 1; Supplementary Table 1; pg 1384, col 1, para 3; pg 1388, col 1, para 2 to pg 1389, col 1, para 1</td> <td>1-2, 5-6 and 10</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>WANG, C.K. et al. Pulmonary changes induced by trans,trans-2,4-decadienal, a component of cooking oil fumes. Eur Respir J. 24 September 2009, Vol 35(3), pages 667-675: abstract; pg 669, col 2, para 6 to pg 670, col 1, para 1; pg 670, col 2, para 1</td> <td>1, 3, 5 and 8 13</td> </tr> <tr> <td>X — Y — A</td> <td>BOON, K. et al. Molecular Phenotypes Distinguish Patients with Relatively Stable from Progressive Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). PLoS ONE. 06 April 2009, Vol 4(4), e5134, pages 1-14: abstract; pg 1, col 1, para 2 to col 2, para 1; pg 4, col 1, para 3</td> <td>1 and 5 13-17, 19 and 54 18</td> </tr> <tr> <td>X — Y</td> <td>BRIDGES, R.S. et al. Gene Expression Profiling of Pulmonary Fibrosis Identifies Twist1 as an Antiapoptotic Molecular "Rectifier" of Growth Factor Signaling. The American Journal of Pathology. December 2009, Vol. 175, No. 6, pages 2351-2361: Table 2; abstract</td> <td>1 and 5 13 and 20</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y — A	US 2012/0035067 A1 (KAMINSKI et al.) 09 February 2012 (09.02.2012) para [0033], [0081], [0133]	1-2, 5-6, 9 and 11-12 20-28, 55-59 and 63-64 27 and 60	X	SUNG, H.J. et al. Identification and Validation of SAA as a Potential Lung Cancer Biomarker and its Involvement in Metastatic Pathogenesis of Lung Cancer. J. Proteome Res. 09 December 2010, Vol 10, pages 1383-1395: Table 1; Supplementary Table 1; pg 1384, col 1, para 3; pg 1388, col 1, para 2 to pg 1389, col 1, para 1	1-2, 5-6 and 10	X — Y	WANG, C.K. et al. Pulmonary changes induced by trans,trans-2,4-decadienal, a component of cooking oil fumes. Eur Respir J. 24 September 2009, Vol 35(3), pages 667-675: abstract; pg 669, col 2, para 6 to pg 670, col 1, para 1; pg 670, col 2, para 1	1, 3, 5 and 8 13	X — Y — A	BOON, K. et al. Molecular Phenotypes Distinguish Patients with Relatively Stable from Progressive Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). PLoS ONE. 06 April 2009, Vol 4(4), e5134, pages 1-14: abstract; pg 1, col 1, para 2 to col 2, para 1; pg 4, col 1, para 3	1 and 5 13-17, 19 and 54 18	X — Y	BRIDGES, R.S. et al. Gene Expression Profiling of Pulmonary Fibrosis Identifies Twist1 as an Antiapoptotic Molecular "Rectifier" of Growth Factor Signaling. The American Journal of Pathology. December 2009, Vol. 175, No. 6, pages 2351-2361: Table 2; abstract	1 and 5 13 and 20	<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																	
X — Y — A	US 2012/0035067 A1 (KAMINSKI et al.) 09 February 2012 (09.02.2012) para [0033], [0081], [0133]	1-2, 5-6, 9 and 11-12 20-28, 55-59 and 63-64 27 and 60																	
X	SUNG, H.J. et al. Identification and Validation of SAA as a Potential Lung Cancer Biomarker and its Involvement in Metastatic Pathogenesis of Lung Cancer. J. Proteome Res. 09 December 2010, Vol 10, pages 1383-1395: Table 1; Supplementary Table 1; pg 1384, col 1, para 3; pg 1388, col 1, para 2 to pg 1389, col 1, para 1	1-2, 5-6 and 10																	
X — Y	WANG, C.K. et al. Pulmonary changes induced by trans,trans-2,4-decadienal, a component of cooking oil fumes. Eur Respir J. 24 September 2009, Vol 35(3), pages 667-675: abstract; pg 669, col 2, para 6 to pg 670, col 1, para 1; pg 670, col 2, para 1	1, 3, 5 and 8 13																	
X — Y — A	BOON, K. et al. Molecular Phenotypes Distinguish Patients with Relatively Stable from Progressive Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). PLoS ONE. 06 April 2009, Vol 4(4), e5134, pages 1-14: abstract; pg 1, col 1, para 2 to col 2, para 1; pg 4, col 1, para 3	1 and 5 13-17, 19 and 54 18																	
X — Y	BRIDGES, R.S. et al. Gene Expression Profiling of Pulmonary Fibrosis Identifies Twist1 as an Antiapoptotic Molecular "Rectifier" of Growth Factor Signaling. The American Journal of Pathology. December 2009, Vol. 175, No. 6, pages 2351-2361: Table 2; abstract	1 and 5 13 and 20																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																		
Date of the actual completion of the international search 17 July 2013 (17.07.2013)	Date of mailing of the international search report 24 JUL 2013																		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 13/31178

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

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
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.: 32, 42-43, 46-53, 61-62, 65-70 and 79-84
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Group I+: Claims 1-27, 54-60, 63-64, drawn to methods related to prognosing or of aiding prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in a patient. The first invention encompasses MUCL1 (the first gene listed in Table 2), namely, Claims 1-2 and 12(1,2). Applicant is invited to elect additional genes to be searched, for example, gene CXCL13, and an additional fee be paid for each additional invention elected. The exact claims searched will depend on the specifically elected inventions. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the ?+? group will result in only the first claimed invention to be searched.

.....Continued in Supplemental Box.....

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: Claims 1-27, 54-60 and 63-64, restricted to MUCL1, SAA, MMP3, CXCL13, OPN, COMP and YKL-40, namely, Claims 1-3, 5-27, 54-60 and 63-64.
- 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.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/31178

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y — A	KORTHAGEN, N.M. et al. Serum and BALF YKL-40 levels are predictors of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. <i>Respiratory Medicine</i> . 2011, Vol 105, pages 106-113: abstract	1, 5 and 7 ----- 13-17, 19-26, 54-59 and 63-64 ----- 18, 27 and 60
Y	YOKOYAMA, A. et al. Prognostic value of circulating KL-6 in idiopathic pulmonary fibrosis. <i>Respirology</i> . 2006, Vol 11, pages 164-168: abstract	1-2
Y	ROSCHMANN, K.I.L. et al. Timothy grass pollen extract-induced gene expression and signalling pathways in airway epithelial cells. <i>Clinical & Experimental Allergy</i> . 2011, Vol 41, pages 830-841: table 2; pg 831, col 1, para 1, para 3	1-2
Y — A	US 2009/0176228 A1 (BIRSE et al.) 09 July 2009 (09.07.2009) para [0059], [0617], [0618]	13-17, 19-26, 54-59 and 63-64 ----- 18, 27 and 60
Y	DHIMOLEA, E. et al. World Bispecific Antibody Summit, September 27-28, 2011, Boston, MA. <i>mAbs</i> . January/February 2012, Vol 4(1), pages 4-13: Table 1; abstract	14, 19, 22, 24, 56 and 63-64
Y	CORREN, J. et al. Lebrikizumab Treatment in Adults with Asthma. <i>N Engl J Med</i> . 03 August 2011, Vol 365, pages 1088-1098: abstract	15, 23 and 57
Y — A	US 2009/0214523 A1 (FUNG et al.) 27 August 2009 (27.08.2009) SEQ ID NOs: 99, 104, 115, 117, 123, 135 and 142-143; para [0014], [0015], [0139]	14-17, 22-23, 25-26 and 56-59 ----- 18, 27 and 60
A	US 2005/0118169 A1 (BARTKE et al.) 02 June 2005 (02.06.2005) SEQ ID NO: 32; para [0087]	18, 27 and 60
A	US 2007/0253951 A1 (NG et al.) 01 November 2007 (01.11.2007) SEQ ID NO: 2; para [0009], [0024].	18, 27 and 60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 13/31178

Continuation of Box No. III - Observations where unity of invention is lacking:

Group II+: Claims 28-31 and 33, drawn to methods related to diagnosing a molecular subtype of IPF in a subject. Applicant is invited to elect additional genes to be searched, for example, the first invention encompasses the gene MUCL1, the first gene listed in Table 2 (claims 28, 31(28) and 33(28)), and an additional fee be paid for each additional invention elected. The exact claims searched will depend on the specifically elected inventions. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the ?+? group will result in only the first claimed invention to be searched.

Group III+: Claims 34-41, 44-45, drawn to methods related to treating IPF in a patient. Applicant is invited to elect additional genes to be searched, for example, the first invention encompasses the gene MUCL1, the first gene listed in Table 2 (claims 34, 37(34)-41(34) and 44(34)-45(34)), and an additional fee be paid for each additional invention elected. The exact claims searched will depend on the specifically elected inventions. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the ?+? group will result in only the first claimed invention to be searched.

Group IV+: Claims 71-78, drawn to methods related to monitoring disease progression in an IPF patient. Applicant is invited to elect additional genes to be searched, for example, the first invention encompasses the gene MUCL1, the first gene listed in Table 2 (claims 71-72 and 76(71,72)-78(71,72)), and an additional fee be paid for each additional invention elected. The exact claims searched will depend on the specifically elected inventions. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the ?+? group will result in only the first claimed invention to be searched.

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

Special Technical Features:

Group I+ includes the special technical feature of a method of prognosing or of aiding prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in a subject, wherein an elevated expression level of the one or the combination of genes, or an elevated expression level of the one or the combination of proteins, is indicative of a prognosis for shortened survival compared to median survival and wherein a reduced expression level of the one or the combination of genes, or a reduced expression level of the one or the combination of proteins, is indicative of a prognosis for increased survival compared to median survival, OR determining a total baseline biomarker score, wherein the determining of the total baseline biomarker score comprises measuring the protein expression level of at least one gene and assigning a score of 0 if the expression level is below the median for the gene and assigning a score of 1 if the expression level is above the median for the gene wherein the determining of the total baseline biomarker score further comprises measuring the protein expression level of YKL-40 and assigning a score of 0 if the expression level is below the median for YKL-40 and assigning a score of 1 if the expression level is above the median for YKL-40, and wherein the determining of the total baseline biomarker score further comprises adding each individual score to obtain the total baseline biomarker score, wherein a total baseline biomarker score of two or above is indicative of a prognosis of shortened survival compared to median survival and wherein a total baseline biomarker score of zero or one is indicative of a prognosis of increased survival compared to the median survival; not required by Groups II+ - IV+.

Group II+ includes the special technical feature of a method of diagnosing a molecular subtype of IPF in a subject, wherein elevated expression of the one or the combination of genes, or elevated expression of the one or the combination of proteins, is indicative of the IPF molecular subtype. Not required by Groups I+, III+ and IV+.

Group III+ includes the special technical feature of a method of treating IPF in a patient comprising administering an effective amount of an IPF therapeutic agent to the patient to treat the IPF. Not required by Groups I+, II+ and IV+.

Group IV+ include the special technical feature of a method of monitoring disease progression in an IPF patient comprising obtaining a biological sample from the patient at a first time point and one or more additional time points, wherein a change in expression level from the first time point to the one or more additional time points is indicative of disease progression. Not required by Group I+, II+ and III+.

Common Technical Features:

Groups I+ and II+ share the technical feature of a method relating to IPF in a patient, the method comprising measuring in a biological sample obtained from the subject expression of one or a combination of genes, or expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combination of genes, wherein elevated expression of the one or the combination of genes, or elevated expression of the one or the combination of proteins, is indicative of a conclusion regarding IPF.

Groups I+, II+ and III+ share the technical feature of a method relating to IPF in a patient based on elevated expression of one or a combination of genes, or expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combination of genes, has been detected in a biological sample obtained from the patient.

Groups I+ and IV+ share the technical feature of a method relating to IPF in a patient comprising obtaining a biological sample from the patient, measuring in the biological samples the expression of one or a combination of genes, or expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combination of genes, wherein the result of the measurement is indicative of a conclusion regarding IPF.

Groups II+ and IV+ share the technical feature of a method relating to IPF in a patient, the method comprising measuring in a biological sample obtained from the subject expression of one or a combination of genes, or expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combination of genes, wherein the result of the measurement is indicative of a conclusion regarding IPF.

*****Continued on Next Page*****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/31178

Continuation of Previous page:

However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art, as being obvious over US 2012/0035067 A1 to Kaminski et al. (published on 09 February 2012) (hereinafter 'Kaminski'), in view of the article titled 'Serum and BALF YKL-40 levels are predictors of survival in idiopathic pulmonary fibrosis' by Korthagen, N.M. et al. (published on *Respiratory Medicine*, 2011, Vol 105, pages 106-113) (hereinafter 'Korthagen') and US 2009/0176228 A1 to Birse et al. (hereinafter 'Birse').

Kaminski teaches a method of prognosing or of aiding prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) in a patient (para [0080]-[0081]-MMP7) comprising obtaining a biological sample from the patient, measuring in the biological sample the expression of one or a combination of genes (para [0080]-[0081]-MMP7), or expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combination of genes (para [0080]-[0081]-MMP7), wherein an elevated expression level of the one or the combination of genes, or an elevated expression level of the one or the combination of proteins (para [0006]-[0007], [0009]-FIG. 2A-C, MMP7 and MMP1 gene and protein levels, [0011]-average levels), is indicative of a prognosis for shortened survival compared to median survival and wherein a reduced expression level of the one or the combination of genes, or a reduced expression level of the one or the combination of proteins, is indicative of a prognosis for increased survival compared to median survival (para [0011]-[0043]-survival, [0080]-[0085]-survival prognosis, [0134]-[0145]-compare levels). Kaminski further teaches a method of diagnosing IPF in a subject, the method comprising measuring in a biological sample obtained from the subject expression of MMP3 (para [0175]), wherein elevated expression of said MMP3, is indicative of IPF (para [0065], [0111], [0117], [0133], [0175]). Further, Kaminski teaches measuring the protein expression level of MMP3, wherein an elevated expression level of said MMP3 is indicative of a prognosis for shortened survival compared to median survival and wherein a reduced expression level of said MMP3 is indicative of a prognosis for increased survival compared to median survival (para [0081]). Kaminski further teaches a method of treating IPF in a patient comprising administering an effective amount of an IPF therapeutic agent to the patient to treat the IPF, provided that elevated expression of one or a combination of genes, or expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combination of genes, has been detected in a biological sample obtained from the patient, wherein the one or the combination of genes is MMP3 (para [0080]-[0081]). Kaminski further discloses a method of monitoring disease progression in an IPF patient comprising obtaining a biological sample from the patient at a first time point and one or more additional time points, measuring in the biological samples the expression of one or a combination of genes, or expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combination of genes, wherein the one or the combination of genes wherein a change in expression level from the first time point to the one or more additional time points is indicative of disease progression (para [0072]). Further, Kaminski teaches that the method further comprises determining a total baseline biomarker score (para [0100], [0118], [0124], TABLES 11-12), wherein the determining of the total baseline biomarker score comprises measuring the protein expression level of at least one biomarker (para [0100], [0118], [0124], TABLES 11-12).

However, Kaminski does not specifically delineate the steps of assigning a score of 0 if the expression level is below the median, and assigning a score of 1 if the expression level is above the median for CXCL13, OPN, and COMP, respectively, wherein the determining of the total baseline biomarker score further comprises measuring the protein expression level of YKL-40 and assigning a score of 0 if the expression level is below the median for YKL-40 and assigning a score of 1 if the expression level is above the median for YKL-40, and wherein the determining of the total baseline biomarker score further comprises adding each individual score to obtain the total baseline biomarker score, wherein a total baseline biomarker score of two or above is indicative of a prognosis of shortened survival compared to median survival and wherein a total baseline biomarker score of zero or one is indicative of a prognosis of increased survival compared to the median survival.

Korthagen teaches a method of prognosing IPF in a patient comprising obtaining a biological sample from the patient (summary), measuring in the biological sample the expression level of YKL-40, wherein an elevated expression level of said YKL-40 is indicative of a prognosis for shortened survival compared to median survival and wherein a reduced expression level of said YKL-40 is indicative of a prognosis for increased survival compared to median survival (summary). Accordingly, it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to include said YKL-40 expression level into the prognostic method of Kaminski so as to further improve prognostic accuracy by incorporate more relevant biomarkers into the method.

In addition, Birse teaches a diagnostic method comprising determining a total baseline biomarker score (para [0059], [0164], [0182]-[0189], [0616]-[0618]), wherein the determining the total baseline biomarker score comprises assigning a score of 0 if the expression level of a biomarker is below the median for said biomarker, and assigning the score of 1 if the expression level is above the median for said biomarker, and wherein the determining the total baseline biomarker score further comprises adding each individual score for each biomarker to obtain the total baseline biomarker score (para [0617]-[0618]). Accordingly, it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to determine a total baseline biomarker score for the biomarkers used in Kaminski and Korthagen (MMP3 and YKL-40), comprising assigning a score of 0 if the expression level of MMP3 is below the median for MMP3, and assigning a score of 1 if the expression level of the MMP3 is above the median for MMP3, and further assigning a score of 0 if the expression level of YKL-40 is below the median for YKL-40, and assigning a score of 1 if the expression level is above the median for YKL-40, wherein determining the total baseline biomarker score further comprises adding said two scores to obtain a total baseline biomarker score, wherein the total baseline biomarker score of one or more (at least one of MMP3 and YKL-40 is above median) is indicative of a prognosis of shortened survival compared to median survival and wherein a total baseline biomarker score of zero (both are lower than median) is indicative of a prognosis of increased survival compared to the median survival, because use of said total baseline biomarker score takes into consideration of the expression levels of multiple relevant biomarkers with equal weight assigned to each relevant biomarker.

As the common technical features would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Therefore, inventions of Groups I+ - IV+ lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

NOTE re item 4: Claims 32, 42-43, 46-53, 61-62, 65-70 and 79-84 are unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	C 1 2 N 15/00	A

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. UNIX
2. JAVA
3. Qiagen
4. RNeasy
5. Nanodrop
6. Agilent

(72) 発明者 アーロン, ジョーセフ アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72) 発明者 シャンドリアニ, サンジェイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94110, サンフランシスコ, 28番 ストリート 5
5

(72) 発明者 チア, コイチュアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72) 発明者 ルーウィン - コー, ニコラス ジェー. アイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72) 発明者 デピアントー, ダリル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA26 CB01 DA14 DA36 FB02 FB03
4B024 AA11 CA12 GA30 HA12
4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ28 QQ53 QR42 QR50 QR55 QR62 QS25
QS28 QS34 QS36
4C084 AA17 NA14 ZA59
4C085 AA14 EE01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015522246A5	公开(公告)日	2016-05-12
申请号	JP2015503288	申请日	2013-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	アッパースアレクサンダーアール アーロンジョーセフアール シャンドリアニサンジェイ チアコイチュアン ルーウィンコーニコラスジェーアイ デピアントーダリル		
发明人	アッパース, アレクサンダー アール. アーロン, ジョーセフ アール. シャンドリアニ, サンジェイ チア, コイチュアン ルーウィン-コー, ニコラス ジェー. アイ. デピアントー, ダリル		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 A61K45/00 A61P11/00 A61K39/395 C12N15/09		
CPC分类号	A61K38/00 A61K45/00 C07K16/244 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2333 /521 G01N2333/775 G01N2333/96494 G01N2800/12 G01N2800/52 A61P11/00 A61K2039/505 A61K2039/54 A61K2039/545		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/68 G01N33/53.M G01N33/53.D A61K45/00 A61P11/00 A61K39/395.N C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024 /AA11 4B024/CA12 4B024/GA30 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ28 4B063/QQ53 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063 /QS34 4B063/QS36 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA59 4C085/AA14 4C085/EE01		
优先权	61/616394 2012-03-27 US 61/707411 2012-09-28 US		
其他公开文献	JP2015522246A JP6404208B2		

摘要(译)

提供了用于确定患者中特发性肺纤维化预后的组合物，试剂盒和方法。此外，提供了用于诊断特发性肺纤维化亚型的组合物，试剂盒和方法。还提供了治疗特发性肺纤维化的方法。

