

(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2014-531584

(P2014-531584A)

(43) 公表日 平成26年11月27日(2014.11.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A Y	2 G O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	4 B O 2 4
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	4 B O 2 9
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C	4 B O 6 3
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	4 B O 6 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-530245 (P2014-530245)  
 (86) (22) 出願日 平成24年9月14日 (2012. 9. 14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年4月24日 (2014. 4. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/068146  
 (87) 国際公開番号 W02013/037970  
 (87) 国際公開日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)  
 (31) 優先権主張番号 11425234. 9  
 (32) 優先日 平成23年9月15日 (2011. 9. 15)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 61/576, 556  
 (32) 優先日 平成23年12月16日 (2011. 12. 16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514063825  
 ノグラ ファーマ リミテッド  
 アイルランド国 2, ダブリン, サ  
 ジョン ロジャーソンズ キー 3 3  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 (74) 代理人 230113332  
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

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

(57) 【要約】

被験体が抗SMAD7治療での処置に感受性であるか、または耐性であるかをモニターするための方法が開示される。上記方法は、上記被験体に由来するサンプル中のCCR9+ FOXP3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FOXP3+ T細胞、IFN- + T細胞、および/もしくはIL17A+ T細胞の量を決定することに基づく。T細胞集団の測定は、フローサイトメトリー、免疫組織化学、および/もしくはELISAによって決定され得る。

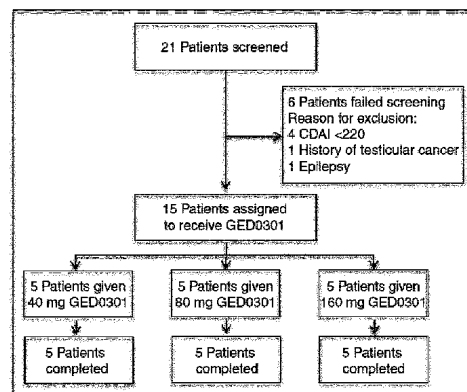


Fig. 2

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

少なくとも 1 種の抗 S M A D 7 治療での処置に対する、炎症性腸疾患 ( I B D ) を有する被験体の応答性を決定するための方法であって、前記方法は、

前記被験体から得られた少なくとも 1 つのサンプルにおいて、 C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞、 C C R 9 + I F N - + T 細胞、 C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞、 F o x P 3 + T 細胞、 I F N - + T 細胞および I L 1 7 A + T 細胞からなる群より選択される少なくとも 1 種の細胞集団の量を決定する工程、を包含し、

ここで、前記少なくとも 1 種の細胞集団の既知のコントロールレベルと比較して前記少なくとも 1 つのサンプル中の前記細胞集団 C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞の増大した量、および/もしくは前記細胞集団 C C R 9 + I F N - + T 細胞、 C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞、 F o x P 3 + T 細胞、 I F N - + T 細胞および I L 1 7 A + T 細胞のうちの少なくとも 1 つの減少した量は、前記抗 S M A D 7 治療に対する、 I B D を有する前記被験体の応答性を予測する、方法。

10

## 【請求項 2】

以下：

C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞の量における増大は、前記被験体が前記抗 S M A D 7 治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

20

C C R 9 + I F N - + T 細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗 S M A D 7 治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗 S M A D 7 治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

F o x P 3 + T 細胞の量における減少は、前記被験体が前記抗 S M A D 7 治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

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

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

30

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

## 【請求項 3】

インビトロで行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記被験体は、前記少なくとも 1 つの生物学的サンプルが得られるときに、少なくとも 1 種の抗 S M A D 7 治療を受けている最中である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記炎症性腸疾患 ( I B D ) は、クローン病 ( C D ) および/もしくは潰瘍性大腸炎 ( U C ) である、前述の請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

40

## 【請求項 6】

C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞の量における増大、 C C R 9 + I F N - + T 細胞の量における減少、 C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞の量における減少、 F o x P 3 + T 細胞の量における減少、 I F N - + T 細胞の量における減少または I L 1 7 A + T 細胞の量における減少のうちの少なくとも 1 つは、前記被験体が寛解に入る可能性があることを示す、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 7】

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

50

**【請求項 8】**

前記組織サンプルは、前記被験体の胃・腸管に由来する、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

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

**【請求項 10】**

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

10

**【請求項 11】**

前記コントロールレベルは、少なくとも 1 種の抗 SMAD7 治療の投与の前に前記患者から得られるか、または少なくとも 1 種の抗 SMAD7 治療の投与の直後に得られる少なくとも 1 種の細胞集団のベースラインレベルである、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記少なくとも 1 種の抗 SMAD7 治療は、抗 SMAD7 アンチセンス治療である、請求項 11 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記抗 SMAD7 アンチセンス治療は、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8 および配列番号 9 からなる群より選択される抗 SMAD7 アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 12 に記載の方法。

20

**【請求項 14】**

細胞集団を同定するための抗 CCR9 抗体、抗 FoxP3 抗体、抗 IFN- $\gamma$  抗体および/もしくは抗 IL17A 抗体のうちの少なくとも 2 種、または CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN- $\gamma$  + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- $\gamma$  + T細胞および IL17A + T細胞のうちの少なくとも 1 種に対するタンパク質細胞マーカーをコードする RNA の発現を検出するための試薬を含むキット。

**【請求項 15】**

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

30

**【請求項 16】**

前記抗体は、CCR9 タンパク質に対する一次抗体、FoxP3 タンパク質に対する一次抗体、およびレポーター酵素に対して結合体化される二次抗体であり、そして前記キットは、免疫組織化学を使用して細胞集団を同定するための少なくとも緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む、請求項 14 に記載のキット。

**【請求項 17】**

CCR9 タンパク質に対する捕捉抗体、FoxP3 タンパク質に対する検出抗体、および/もしくはレポーター酵素に結合体化される二次抗体を含み；そして ELISA 技術を使用して細胞集団を同定するための緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む、請求項 16 に記載のキット。

40

**【請求項 18】**

ヒトもしくは動物の身体で実施される診断法において使用するための、CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN- $\gamma$  + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- $\gamma$  + T細胞および IL17A + T細胞のうちの少なくとも 1 種のための細胞マーカーに対する少なくとも 1 種の抗体。

**【請求項 19】**

前記診断法は、少なくとも 1 種の抗 SMAD7 治療での処置に対する、炎症性腸疾患 (IBD) を有する被験体の応答性を予測もしくはモニターすること、または少なくとも 1

50

種の抗SMA D7治療での処置に対する、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の適切性を決定すること、前記被験体が前記抗SMA D7治療に対して応答する可能性があるか、もしくは応答性であることを決定すること、そして/あるいは前記被験体が寛解に入る可能性があるか否かを決定することである、請求項18に規定される使用のための少なくとも1種の抗体。

【請求項20】

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

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

参考文献への相互参照

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

【背景技術】

【0002】

（背景）

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

20

30

【0003】

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

40

【0004】

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

50

G F - 1 媒介性シグナル伝達がこれら患者において損なわれていることを示す。

【0005】

近年の研究は、IBDに罹患している患者を処置するための標的として、SMAD7に焦点を当ててきた。このような治療は、抗SMAD7アンチセンス治療を含む。よって、抗SMAD7治療での処置に应答する可能性がある（もしくは可能性が低い）患者を同定するために使用され得る推定バイオマーカーに基づく方法が、必要である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

（要旨）

10

本発明は、炎症性腸疾患（IBD）（例えば、クローン病もしくは潰瘍性大腸炎）に罹患している被験体（例えば、ヒト患者）の生物学的（例えば、血液もしくは組織）サンプル中の特定のT細胞集団の調節（例えば、増大したCCR9+ FoxP3+ T細胞、減少したCCR9+ IFN-陽性（IFN-+）T細胞、減少したCCR9+ IL17A+ T細胞、減少したFoxP3+ T細胞、減少したIFN-+ T細胞および/もしくは減少したIL17A+ T細胞）が、抗SMAD7治療での処置に対する感受性と相関するという発見に一部基づく。

【0007】

IBD患者が抗SMAD7治療での処置に应答する可能性があるか否かを、処置の開始前もしくは開始直後に予測し得ることは有利であるということが認識される。本明細書に記載されるとおりの細胞集団の調節は、IBDを有する被験体の、抗SMAD7治療での処置の効力を予測する。有利なことには、本発明の方法は、有効な治療を選択するにあたって医師を最終的に補助し、患者の疾患状態における改善、良好なメディカルケアおよび患者全体のコストの減少をもたらす。

20

【0008】

よって、第1の局面において、本発明は、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の、少なくとも1種の抗SMAD7治療での処置に対する应答性を決定するための方法を提供し、上記方法は、

上記被験体から得られた少なくとも1つのサンプルにおいて、CCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞およびIL17A+ T細胞からなる群より選択される少なくとも1種の細胞集団の量を決定する工程、を包含し、ここで上記少なくとも1種の細胞集団の既知のコントロールレベルと比較して上記少なくとも1つのサンプル中の上記細胞集団CCR9+ FoxP3+ T細胞の増大した量、および/または細胞集団CCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞およびIL17A+ T細胞のうち少なくとも1種の減少した量は、上記抗SMAD7治療に対する、上記IBDを有する被験体の应答性を予測する。

30

【0009】

「被験体の应答性を決定すること」は、IBDを有する被験体の、少なくとも1種の抗SMAD7治療での処置に対する有効性もしくは应答性を予測もしくはモニターすることを含むことは、認識されるべきである。

40

【0010】

適切なことには、上記サンプルは、生物学的サンプルである。

【0011】

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

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

CCR9+ IFN-+ T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMAD

50

7 治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

CCR9 + IL17A + T細胞の量における減少は、上記被験体が上記抗SMA D

7 治療に対して応答する可能性があるか、または応答性であることを示す；

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

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

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

【0012】

10

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

【0013】

20

適切なことには、本発明の方法は、インピボで行われ得る。

【0014】

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

【0015】

適切なことには、上記被験体は、上記少なくとも1つのサンプルが上記被験体から得られるときに、少なくとも1種の抗SMA D 7 治療を受けている最中であり得る。

【0016】

30

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

【0017】

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

【0018】

40

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

【0019】

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

【0020】

好ましくは、上記コントロールは、コントロールレベルを意味し、これは、少なくとも1種の抗SMA D 7 治療の投与の前に上記患者(IBDを有する)のサンプルから得られた、または少なくとも1種の抗SMA D 7 治療の投与直後に得られた上記少なくとも1種

50

の細胞集団の量のベースラインレベルである。投与直後によって、第1日目/処置が始められる同日に関して意味される。

【0021】

関連局面において、本明細書で開示されるのは、抗SMA D7治療での処置を受けている最中である、IBDに罹患している被験体をモニターして、上記被験体が上記治療に  
 10 応答性であるか否かを決定する、そして/または治療が継続されるべきか否かを決定する  
 ための方法である。上記方法は、以下を包含する：(a) IBDを有し、かつ抗SMA D7  
 治療を受けている最中である被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+  
 T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A+ T細胞のうち  
 の少なくとも1種の量を決定する工程；ならびに(b)上記サンプル中の量と、CCR9+ Fox  
 20 P3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞  
 およびIL17A+ T細胞のうち  
 の少なくとも1種のコントロールレベルとを、それぞれ比較する工程。被験体は、上記コ  
 ントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+  
 T細胞の量における増大がある場合、または上記コントロールと比較して、上記被験体  
 から得られたサンプル中のCCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A  
 + T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A+ T細胞  
 30 のうち  
 の少なくとも1種の量における減少がある場合、治療に  
 応答性(例えば、感受性)  
 および/もしくは抗SMA D7治療での処置に  
 応答し続ける可能性があると  
 同定され得る。あるいは、被験体は、上記  
 コントロールと比較して、上記被験体から  
 得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+  
 T細胞の量における減少がある場合、また  
 は上記コントロールと比較して、上記被  
 験体から得られたサンプル中のCCR9+  
 IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、  
 FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞および  
 IL17A+ T細胞のうち  
 40 の少なくとも1種の量における増加がある  
 場合、処置に非  
 応答性(例えば、耐性)  
 および/もしくは抗SMA D7治療での  
 処置に  
 50 応答し続ける可能性が低いと同定され得る。

【0022】

別の局面において、本明細書で開示されるのは、抗SMA D7治療(例えば、抗SMA  
 D7アンチセンスオリゴヌクレオチド)での処置に  
 30 応答する  
 可能性があるか、または  
 応答性である、IBDに  
 罹患した被験体を同定  
 するための方法である。  
 上記方法は、以下を包  
 含する：(a) IBDに  
 罹患している被験体  
 から得られたサンプ  
 ル中のCCR9+ Fox  
 P3+ T細胞、CCR9+  
 IFN- + T細胞、CCR9+  
 IL17A+ T細胞、Fox  
 P3+ T細胞、IFN- +  
 T細胞およびIL17A+  
 T細胞のうち  
 40 の少なくとも1種の  
 量を決定する工程；  
 ならびに(b)上記サ  
 ンプル中の量と、CCR9+  
 FoxP3+ T細胞、CCR9+  
 IFN- + T細胞、CCR9+  
 IL17A+ T細胞、Fox  
 P3+ T細胞、IFN- +  
 T細胞およびIL17A+  
 T細胞のうち  
 50 の少なくとも1種の  
 コントロールレベル  
 とを、それぞれ比較  
 する工程。被験体は、  
 上記コントロールと  
 比較して、上記被  
 験体から得られたサ  
 ンプル中のCCR9+  
 FoxP3+ T細胞の量  
 における増大がある  
 場合、または上記コ  
 ントロールと比較し  
 て、上記被験体から  
 得られたサンプル中  
 のCCR9+ IFN- +  
 T細胞、CCR9+ IL  
 17A+ T細胞、Fox  
 P3+ T細胞、IFN- +  
 T細胞およびIL17A+  
 T細胞のうち  
 の少なくとも1種の  
 量における減少があ  
 る場合、抗SMA D7  
 治療での処置に  
 50 応答する  
 可能性があるか、ま  
 たは  
 応答性(例えば、感  
 受性)であると同定  
 され得る。ある  
 いは、被験体は、  
 上記コントロール  
 と比較して、上記  
 被験体から得られ  
 たサンプル中のCCR9+  
 FoxP3+ T細胞の  
 量における減少  
 がある場合、また  
 は上記コントロール  
 と比較して、上記  
 被験体から得られ  
 たサンプル中のCCR9+  
 IFN- + T細胞、  
 CCR9+ IL17A+  
 T細胞、FoxP3+  
 T細胞、IFN- +  
 T細胞およびIL17A+  
 T細胞のうち  
 の少なくとも1種の  
 量における増大  
 がある場合、抗SMA  
 D7治療での  
 処置に  
 50 応答する  
 可能性が低い  
 か、または非  
 応答性(例えば、  
 耐性)である

と同定され得る。

【0023】

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【0024】

関連局面において、ヒトもしくは動物の身体に対して実施される診断法における使用のための、CCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN- + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- + T細胞およびIL17A + T細胞、ならびにFoxP3 + CD103 + T細胞、CD103 + T細胞

10

20

30

40

50

胞およびインテグリン 4 7 + T細胞のうちの少なくとも1種のための細胞マーカーに対する少なくとも1種の抗体が提供される。

【0025】

適切なことには、上記診断法を使用して、炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の、少なくとも1種の抗SMA D7治療での処置に対する応答性を予測もしくはモニターし得る、または炎症性腸疾患（IBD）を有する被験体の、少なくとも1種の抗SMA D7治療での処置に対する適切性を決定し得る、上記被験体が上記抗SMA D7治療に応答する可能性があるかもしくは応答性であることを決定し得る、そして/または上記被験体が寛解に入る可能性があるか否かを決定し得る。

【0026】

関連実施形態において、細胞集団を同定するための抗CCR9抗体、抗FoxP3抗体、抗IFN-抗体および/もしくは抗IL17A抗体、またはCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞およびIL17A+ T細胞のうちの少なくとも1種に対するタンパク質細胞マーカーをコードするRNAの発現を検出するための試薬のうちの少なくとも1種を含むキットが提供される。

【0027】

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

【0028】

望ましくは、本発明のキットにおいて、上記抗体は、CCR9タンパク質に対する一次抗体、FoxP3タンパク質に対する一次抗体、およびレポーター酵素に結合体化される二次抗体であり、上記キットは、IHC技術を使用して細胞集団を同定するための少なくとも緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む。

【0029】

適切なことには、本発明のキットにおいて、CCR9タンパク質に対する捕捉抗体、FoxP3タンパク質に対する検出抗体、および/またはレポーター酵素に結合体化される二次抗体が含まれ；そしてELISA技術を使用して細胞集団を同定するための緩衝液、試薬、および詳細な指示書を必要に応じてさらに含む。

【0030】

開示される方法、使用およびキットが、抗SMA D7治療の処置を、このような治療に応答する可能性があるかもしくは応答性である被験体に対して個別化する（personalize）ために使用され得ることは、本明細書で企図される。

【0031】

開示される方法、使用およびキットが、被験体がIBDに罹患してから後に寛解に入る可能性があるか否かを決定するために使用され得ることもまた、本明細書で企図される。例えば、被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞の量における増大がある場合に、ならびに/または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量における減少がある場合に、寛解に入る可能性があると同定され得る。

【0032】

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

【0033】

上記コントロールもしくはコントロールレベルサンプルは、抗SMA D7治療での処置の前に、上記被験体から得られたサンプル（例えば、血液サンプルもしくは組織サンプル

10

20

30

40

50

)を含み得る。上記コントロールサンプルは、処置前に存在し、処置に対する上記被験体の応答をモニターするために使用され得る本発明の少なくとも1種の細胞集団の量のベースラインレベルを提供する。コントロールもしくはコントロールレベルサンプルは、上記抗S M A D 7治療が最初に施された同じ日(例えば、処置レジメンの1日目)に、上記被験体から得られ得る。他の実施形態において、コントロールもしくはコントロールレベルサンプルは、抗S M A D 7治療の開始の少なくとも1日前(例えば、処置レジメンの0日目)に被験体から得られ得る。

#### 【0034】

特定の実施形態において、サンプル中のC C R 9 + F o x P 3 + T細胞、C C R 9 + I F N - + T細胞、C C R 9 + I L 1 7 A + T細胞、F o x P 3 + T細胞、I F N - + T細胞および/もしくはI L 1 7 A + T細胞のうち少なくとも1種の量は、フローサイトメトリーによって決定される。他の実施形態において、上記決定は、免疫組織化学によって、もしくはE L I S A アッセイによって行われる。F A C S、免疫組織化学、およびE L I S A アッセイは、抗C C R 9抗体、抗F o x P 3抗体、抗I F N - 抗体、および抗I L 1 7 A抗体のうち少なくとも1種からなる群より選択される抗体を使用して行われ得る。別の実施形態において、細胞集団の量は、C C R 9、F o x P 3、I F N - 、およびI L 1 7 Aからなる群より選択される少なくとも1種のマーカーをコードするR N Aの量を測定することによって決定される。特定の実施形態において、上記抗S M A D 7治療は、抗S M A D 7アンチセンスオリゴヌクレオチドである。上記抗S M A D 7アンチセンスオリゴヌクレオチド治療は、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8および配列番号9からなる群より選択される抗S M A D 7アンチセンスオリゴヌクレオチドであり得る。例示的实施形態において、上記S M A D 7アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号6を含む。

#### 【0035】

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

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0036】

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

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

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

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

【図4】図4は、有害事象の異なるタイプ、上記治験の間のそれらの頻度、およびG E D 0 3 0 1とのそれらの関連を図示する。

【図5】図5(AおよびB)は、S M A D 7がクローン病に罹患している被験体のヒト腸腺およびパイエル板において発現されることを示す免疫組織化学分析の写真である。Bにおいて、矢印は、核および細胞質におけるS M A D 7発現を示す。パネルA, 100x倍率; パネルB, 200x倍率。

【図6】図6は、(A) C C R 9 + 集団もしくは(B) 7 + 集団内のI F N - もしくはI L - 1 7 A細胞のパーセントに対する、刺激しないまま(U n s t)か、またはS m a d 7センス(センス)もしくはG E D 0 3 0 1(A S)オリゴヌクレオチドで処置したC D患者から単離されたP B M Cの効果を示す。

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

【図8】図8は、0日後、8日後、28日後および84日後の(A) I F N - +、(B) I F N - + C C R 9 +、(C) I L - 1 7 A +、(D) C C R 9 + I L - 1 7 A

10

20

30

40

50

+、(E) FoxP3+、および(F) FoxP3+ CCR9+ T細胞のパーセンテージを示すグラフを示す。

【図9】図9は、各コホートに関して上記治験のベースライン、8日目および28日目における平均CD4I値、ならびに患者群全体に関して各時点での平均CD4I値を示す。

【発明を実施するための形態】

【0037】

(詳細な説明)

被験体が抗SMA D7治療での処置に応答性(例えば、感受性もしくは耐性)であるか否かを決定するための方法が、開示される。上記方法は、IBD(例えば、クローン病もしくは潰瘍性大腸炎)に罹患している被験体の血液サンプル中の特定のT細胞集団(例えば、増大したCCR9+ FoxP3+ T細胞、減少したCCR9+ IFN-陽性(IFN-+) T細胞、減少したCCR9+ IL17A+ T細胞、減少したFoxP3+ T細胞、減少したIFN-+ T細胞および/もしくは減少したIL17A+ T細胞)の調節が、抗SMA D7治療での処置に対する感受性と相関するという発見の一部に基づく。

10

【0038】

本明細書に記載される場合、IBDに罹患している、抗SMA D7治療での処置を受けているかもしくは受けた被験体の1種以上のT細胞集団は、上記被験体が上記治療に応答性であるか否かを決定するために、および/または治療が継続されるべきか否かを決定するために、モニターされる。一局面において、上記方法は、(a)IBDを有し、抗SMA D7治療を受けている最中である被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量を決定する工程;ならびに(b)上記サンプル中の量と、CCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞のコントロールレベルとを、それぞれ比較する工程を包含する。被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞の量において増大がある場合に、そして/または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量における減少がある場合に、治療に対して応答性(例えば、感受性)および/または抗SMA D7治療での処置に対して応答し続ける可能性があると同定される。

20

30

【0039】

あるいは、被験体は、上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞の量において減少がある場合に、または上記コントロールと比較して、上記被験体から得られたサンプル中のCCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量における増大がある場合に、処置に対して非応答性(例えば、耐性)および/または抗SMA D7治療での処置に対して応答し続ける可能性が低いと同定され得る。

40

【0040】

別の局面において、IBDに罹患している被験体の1種以上のT細胞集団は、上記被験体が抗SMA D7治療での処置に応答する可能性があるか否かを同定するためにモニターされる。上記方法は、(a)IBDに罹患している被験体から得られたサンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN-+ T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量を決定する工程;ならびに(b)上記サンプル中の量と、CCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞の量を決定する工程;ならびに(c)上記サンプル中の量と、CCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN-+ T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞の量を決定する工程を包含する。

50

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

【0041】

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

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

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

【0046】

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

【0047】

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

10

20

30

40

50

ヒトタンパク質を意味する。

【0048】

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

【0049】

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

10

【0050】

本明細書で使用される場合、「a47」(腸ホーミングレセプターサブユニットおよびITGB7としても公知のインテグリン, 47)は、Entrez GeneID No. 3695によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によってコードされるヒト遺伝子を意味する。

【0051】

本明細書で使用される場合、「SMAD7」(CRC3、FLJ16482、MADH7、MADH8、MAD(mothers against decapentaplegic, Drosophila)ホモログ7、MADホモログ8、SMAD、mothers against DPP homolog 7, mothers against DPP homolog 8としても公知)は、Entrez GeneID No. 4092によって同定される遺伝子およびその対立遺伝子改変体によって同定されるヒトタンパク質を意味する。

20

【0052】

本明細書で使用される場合、「クローン病活性指数」もしくは「CDAI」とは、Bestら、Gastroenterology, 70:439-44(1976)によって記載されるように、CDに罹患した患者の進行を評価するために使用される測定値もしくは指数をいう。CDAIスコア150以下は、一般に、不活性な疾患と関連し、より高いスコアより良好な予後を示す。150より高い値は、一般に、活性な疾患と関連し、450より高い値は、極めて重篤な疾患と関連する。CDAIスコアは、どのくらい良好に、患者が治療に回答しつつあるかを決定するために使用され得、寛解にある患者を同定するために使用され得る。特定の実施形態において、ベンチマーク臨床応答は、上記被験体がCDAIスコアにおける少なくとも100ポイントの減少を示すことを意味する。臨床試験において、CDAIスコア150以下は、一般に、寛解と関連する。

30

【0053】

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

40

50

ndex、Simple Clinical Colitis Activity Index (SCCAI)、Lichtiger Index、Ulcerative Colitis Symptom Score (UCSS)、およびMayo Clinic Scoreが挙げられる。

【0054】

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

10

【0055】

抗SMAD7治療

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

20

【0056】

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

【0057】

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

30

【0058】

SMAD7を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、CpG対におけるシトシン残基が、5'-メチルシトシン(略称: Me-dC)によって置換される混合骨格を含み得ることが本明細書で企図される。メチルホスホネート結合はまた、アンチセンスオリゴヌクレオチドの5'末端および/もしくは3'末端に配置され得る(略称: MeP)。

【0059】

SMAD7を標的とする例示的アンチセンスオリゴヌクレオチド治療としては、以下が挙げられる:

5'-GTXYCCCTTCTCCX YCAG-3'(配列番号4)(ここでXは、シトシンおよび5-メチルシトシンもしくは2'-O-メチルシトシンヌクレオチドからなる群より選択される窒素塩基を含むヌクレオチドであり、Yは、グアニンおよび5-メチルグアニンもしくは2'-O-メチルグアニンヌクレオチドからなる群より選択される窒素塩基を含むヌクレオチドであるが、ただし、ヌクレオチドXもしくはYのうちの少なくとも一方は、メチル化窒素塩基を含む)；

40

5'-GTXGCCCTTCTCCXGCAG-3'(配列番号5)(ここでXは、5-メチル 2'-デオキシチジン 5'-モノホスフェートである)；

5'-GTXGCCCTTCTCCXGCAGC-3'(配列番号6)(ここでXは、5-メチル 2'-デオキシチジン 5'-モノホスフェートである)；

5'-ZTXGCCCTTCTCCXGAZ-3'(配列番号7)(ここでXは

50

、5 - メチル 2' - デオキシシチジン 5' - モノホスフェートであり、Zは、2' - デオキシグアノシン メチルホスホネートである)；

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

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

#### 【0060】

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

#### 【0061】

##### 血液サンプル

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

#### 【0062】

##### 試験サンプル

被験体由来の組織サンプル(例えば、被験体(例えば、CDもしくはUCに罹患している被験体)の小腸および/もしくは大腸から得られる組織サンプル)は、上記サンプル中のCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞の量を測定するための、細胞供給源、RNA供給源、タンパク質供給源、もしくは免疫組織化学(IHC)の薄い切片の供給源として使用され得る。上記組織サンプルは、従来の生検機器および手順を使用することによって得られ得る。内視鏡生検、切除生検および切開生検は、胃腸組織サンプルを得るために、当業者によって使用され得る認識された医学的手順の例である。上記組織サンプルは、マーカー遺伝子(例えば、CCR9、FoxP3、IFN-、および/もしくはIL17A)発現レベルを測定するか、またはフローサイトメトリー、IHC、もしくはELISAによって個々の細胞(例えば、CCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN- + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- + T細胞および/もしくはIL17A+ T細胞発現)を可視化するために、十分な細胞、RNA、タンパク質、もしくは薄い切片を提供するために十分大きくなければならない。

#### 【0063】

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

#### 【0064】

##### フローサイトメトリー

細胞集団は、フローサイトメトリー(例えば、蛍光活性化細胞選別(FACS)分析)

10

20

30

40

50

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

10

## 【0065】

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

20

## 【0066】

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

## 【0067】

複数のレーザーおよび蛍光検出器を備えたFACS機器は、複数の抗体標識の使用を可能にし、標的細胞集団を正確に同定し得る。検出を達成するために、細胞は、複数の抗体（各々、異なる蛍光標識でタグ化される）で標識され得る。例えば、血液サンプルは、CCR9+ FoxP3+ T細胞集団の検出のために、APC標識マウス抗ヒトCCR9抗体およびPE標識抗ヒトFoxP3抗体で同時に標識され得る。別の実施形態において、組織サンプルは、CCR9+ IL17A+ T細胞集団の検出のために、APC標識マウス抗ヒトCCR9抗体およびAlexa Fluor 647マウス抗ヒトIL17A抗体で標識され得る。

30

## 【0068】

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

40

## 【0069】

FACS分析によってFoxP3+ T細胞集団およびCCR9+ FoxP3+ T細胞集団を決定するために使用され得る例示的抗体としては、ヒトFoxP3に対する蛍

50

光標識抗体（例えば、フィコエリトリン（PE）標識抗ヒトFoxP3抗体（Miltenyi Biotec, カタログ番号130-093-014）、アロフィコシアニン（APC）標識抗ヒトFoxP3抗体（Miltenyi Biotec, カタログ番号130-093-013）、Alexa Fluor（登録商標）647マウス抗ヒトFoxP3抗体（BD Pharmingen, カタログ番号560045）、Alexa Fluor（登録商標）488マウス抗ヒトFoxP3抗体（AbD Serotec, カタログ番号MCA2376A488）、およびFITC標識マウス抗ヒトFoxP3抗体（Abcam, カタログ番号ab93512））が挙げられる。

【0070】

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

10

【0071】

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

20

【0072】

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

30

【0073】

FACS分析によってCD4<sup>+</sup> T細胞集団を決定するために使用され得る例示的抗体としては、ヒトCD4に対する蛍光標識抗体（BD Biosciencesから入手可能である）が挙げられる。

【0074】

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

40

【0075】

免疫組織化学

別個の細胞集団はまた、免疫組織化学（IHC）によって決定され得る。具体的には、所定の細胞集団中のCCR9 + FoxP3 + T細胞、CCR9 + IFN- $\gamma$  + T細胞、CCR9 + IL17A + T細胞、FoxP3 + T細胞、IFN- $\gamma$  + T細胞および/もしくはIL17A + T細胞の数は、IHCによって決定され得る（例えば、可視化され得る）。例えば、IHCによるCCR9 + FoxP3 + T細胞集団のアッセイは、例えば、CCR9タンパク質に対する少なくとも1種の抗体、例えば、少なくとも1種の抗CCR9抗体、およびFoxP3抗体に対する少なくとも1種の抗体、例え

50

ば、少なくとも1種の抗FoxP3抗体を必要とする。例示的实施形態において、上記抗CCR9抗体および抗FoxP3+抗体は、異なる標識(例えば、異なる蛍光標識)で標識される。特定の実施形態において、上記抗CCR9抗体および上記抗FoxP3抗体は、異なる抗体(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)であり、従って、標識された、例えば、蛍光二次抗体によって差次的検出のために提供する。

【0076】

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

10

【0077】

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

20

【0078】

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

30

【0079】

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

40

【0080】

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

【0081】

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

50

## 【0082】

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

## 【0083】

細胞ベースの酵素結合イムノソルベントアッセイ

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

10

## 【0084】

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

20

30

## 【0085】

ELISA法、試薬および装置は、当該分野で周知であり、市販されている。

## 【0086】

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

40

## 【0087】

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

50

ル抗体（カタログ番号LS-C82119-100））。

【0088】

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

【0089】

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

10

【0090】

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

【0091】

抗インテグリン47抗体は、BD Biosciencesから市販されている。

【0092】

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

20

【0093】

コントロールサンプル

コントロールサンプルは、抗SMAD7治療での処置の前に上記被験体から得られたサンプル（例えば、血液サンプルもしくは組織サンプル）を含み得る。上記コントロールサンプルは、被験体の処置への進捗をモニターするためのベースラインを提供する。コントロールサンプルは、上記抗SMAD7治療が最初に施されるその日に（例えば、処置レジメンの1日目に）、上記被験体から得られ得る。他の実施形態において、コントロールサンプルは、抗SMAD7治療を開始する1日前に（例えば、処置レジメンの0日目に）被験体から得られ得る。あるいは、コントロールサンプルは、抗SMAD7治療を開始する2日前、3日前、4日前、5日前、6日前、7日前またはそれより前に、被験体から得られ得る。例えば、特定の細胞サンプルのアップレギュレーションもしくはダウンレギュレーションは、治療（例えば、抗SMAD7治療）への被験体の応答をモニターするために、処置前に（例えば、コントロールサンプル）、処置の間に、および/もしくは処置後に、測定され得る。

30

【0094】

いくつかの実施形態において、コントロールレベルは、被験体における特定の細胞集団の長期間のモニタリングに基づいて、上記被験体について確立され得る。このような場合に、被験体が抗SMAD7治療による複数回の処置を受け得ることが企図される。複数回の処置後に検出される特定の細胞集団の量は、上記被験体が治療に応答したか否か、および/もしくはさらなる抗SMAD7治療での処置に応答する可能性があるか否かを決定するために、上記被験体の以前のコントロールレベルと比較され得る。他の実施形態において、被験体のコントロールレベルもしくはベースラインレベルは、時間をわたって得られた（例えば、数週間、数ヶ月もしくは数年の過程にわたって得られた）複数のベースラインサンプルから決定された特定の細胞集団の平均測定値に基づいて確立され得る。よって、本明細書で開示されるとおりに行われる任意の試験もしくはアッセイは、以前のもしくは確立されたコントロールレベルと比較され得、例えば、上記被験体が1回より多くの抗

40

50

S M A D 7 治療での処置を受けている場合、比較のために新たなコントロールサンプルを上記被験体から得ることは必須ではないかもしれない。

【 0 0 9 5 】

データ解釈

抗 S M A D 7 治療での処置への被験体の応答性は、処置前に上記被験体から得られたコントロールサンプルに関して解釈され得る。被験体は、上記被験体から得られたサンプル中の C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞の量において増大があるか、または上記コントロールサンプルと比較して、上記被験体から得られたサンプル中の C C R 9 + I F N - + T 細胞、C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞、F o x P 3 + T 細胞、I F N - + T 細胞および/もしくは I L 1 7 A + T 細胞の量において減少がある場合、抗 S M A D 7 治療での処置に対して感受性（例えば、応答性もしくは応答する可能性がある）と同定され得る。上記サンプルは、処置に対する感受性を決定するために、治療開始後 8 日目もしくはこれ以降に得られ得る。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、28 日間、56 日間、および/もしくは 84 日間、ならびに/またはこれ以降に得られ得る。他の実施形態において、上記サンプルは、処置に対する感受性をモニターするために、治療開始後 8 日目の後、例えば、1 週間、2 週間、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、および/もしくは 1 年間以降に得られ得る。

10

【 0 0 9 6 】

あるいは、被験体は、上記被験体から得られたサンプル中の C C R 9 + F o x P 3 + T 細胞の量において減少があるか、または上記コントロールサンプルと比較して、上記被験体から得られたサンプル中の C C R 9 + I F N - + T 細胞および/もしくは C C R 9 + I L 1 7 A + T 細胞の量において増大がある場合、抗 S M A D 7 治療での処置に耐性（例えば、非応答性もしくは応答する可能性が低い）と同定され得る。上記サンプルは、処置への耐性を決定するために、治療の開始後 8 日目もしくはこれ以降に得られ得る。いくつかの実施形態において、上記サンプルは、最初の処置後 28 日間、56 日間、84 日間もしくはこれ以降に得られ得る。他の実施形態において、上記サンプルは、処置への感受性をモニターするために、治療開始後 8 日目の後、例えば、1 週間、2 週間、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、および/もしくは 1 年以降に得られ得る。

20

【 0 0 9 7 】

試験キット

本発明は、本明細書で開示される方法を行うために特定の成分を含む試験キットを包含する。試験キットは、開示されるアッセイを行うにあたって便宜性、速度および再現性を高め得る。例えば、例示的 F A C S ベースの試験キットは、細胞を同定し、選別し、計数するための抗体（例えば、抗 C C R 9 抗体、抗 F o x P 3 抗体、抗 I F N - 抗体および/もしくは抗 I L 1 7 A 抗体）を含み得る。他の実施形態において、上記試験キットは、抗体のみならず、F A C S 技術を使用して細胞を同定し、選別し、計数するための緩衝液、試薬および詳細な指示書をも含む。いくつかの実施形態において、上記キットは、上記細胞および/もしくは組織サンプルを除いて、試験プロトコルおよび上記試験に必要とされる全ての消耗品成分を含む。

30

【 0 0 9 8 】

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

40

【 0 0 9 9 】

例示的な E L I S A ベースの試験キットは、E L I S A によって細胞集団を決定するための材料を含み得る。細胞ベースの E L I S A キットは、例えば、C C R 9 タンパク質に

50

対する捕捉抗体（例えば、ウサギ抗ヒトCCR9ポリクローナル抗体）およびFoxP3タンパク質に対する検出抗体（例えば、マウス抗ヒトFoxP3モノクローナル抗体）、ならびに/またはレポーター酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）に結合体化される二次抗体を含み得る。他の実施形態において、上記試験キットは、抗体のみならず、ELISA技術を使用して細胞集団を同定するための緩衝液、試薬および詳細な指示書をも含む。

#### 【実施例】

##### 【0100】

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

10

##### 【0101】

実施例1：CD患者における抗SMAD7アンチセンス処置の安全性および効力を評価するための第I相臨床試験

活発なCDを有する15名の患者を、CDを処置するための抗SMAD7アンチセンス治療の安全性および効力を評価するために、第I相臨床試験に登録した。患者を、21名の志願者の群から最初にスクリーニングし、登録者(enrollee)を3つの等しいサイズのコホートのうちの1つに割り当てた(図2)。登録患者の中で人口統計学的特徴および臨床的特徴において有意差はなかった。しかし、コホート1の患者は、他の2つのコホートの患者と比較して、より長い疾患継続期間を有し、コホート1およびコホート2の患者は、コホート3の患者と比較して、より頻繁に腸切除を受けていた(図3)。上記患者は、GED-0301(Smad7アンチセンスオリゴヌクレオチド(GTXGCCCTTCTCCXGCAGC(ここでXは、5-メチル-2'-デオキシシチジン5'-モノホスフェート(5-Me-dC)である(配列番号6))の40mg/日(N=5;コホートI);80mg/日(N=5;コホート2);もしくは160mg/日(N=5;コホート3)を7日間にわたって受けた。

20

##### 【0102】

以下の基準全てを満たす患者は、含まれる資格があった：1.)任意の研究関連手順の前に上記患者が自署し、日付を入れた、書面によるインフォームド・コンセント；2.)18~45歳の男性患者もしくは女性患者；3.)妊娠の可能性のない女性患者；スクリーニング時に妊娠試験陰性であり、研究の間に有効な避妊方法を使用している妊娠の可能性のある女性患者；4.)スクリーニングの通院時に活発なCDを有する患者(登録前の少なくとも1週間にわたって>220かつ400のCDアイスコアと定義される)；5.)回腸末端部および/もしくは右結腸に限定されたCD；6.)登録前の90日間で抗TNF-、他の生物製剤、免疫抑制剤(例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン、メトトレキサート)での処置なし；7.)ステロイド耐性もしくはステロイド依存性を有する患者；ならびに8.)研究手順および制限を理解しかつ従う能力があること。

30

##### 【0103】

以下の基準のうちのいずれかを満たす場合、上記研究から被験体を排除した：1.)妊婦中もしくは授乳中の女性；2.)胃および/もしくは近位小腸に影響を及ぼすCDを有する患者または横行結腸および/もしくは左結腸に限局された病変を有する患者；3.)免疫調節剤および生物製剤(例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン、メトトレキサート、インフリキシマブ、アダリムマブ、ナタリズマブ)の、最初の投与前90日間での使用；4.)局所合併症(例えば、膿瘍、狭窄およびフィステル)、異形成および悪性疾患、ならびに腸外発現の存在；5.)CD狭窄に関して、以前の内視鏡バルーン拡張、狭窄形成術もしくは外科的切除；6.)直腸結腸切除術を受けた患者；7.)以下の試験変化のうちのいずれか：APTT>1.5正常値上限(Upper Limit of Normality)(ULN)；血小板数100,000/mm<sup>3</sup>；血清クレアチニン>1.5ULN；総ビリルビン>1.5ULN(ジルベール症候群を除く)；ASTおよびALT>1.5ULN；補正QT間隔>450m秒(男性に関して)および>

40

50

470 m 秒（女性に関して）；8.）重大な、重篤なもしくは不安定な（急性のもしくは進行性の）身体疾患もしくは精神疾患の現在もしくは関連のある以前の病歴（処置を必要とし得る（例えば、腎臓もしくは肝臓の障害）か、または上記被験体が上記研究を完全に終える可能性をなくする感染症、悪性疾患、医学的障害、あるいは上記研究医薬適用もしくは手順から過度のリスクをもたらす任意の状態を含む）；9.）喫煙するか、もしくはそうでなければ煙草製品を消費する患者；10.）昨年にアルコールもしくは他の物質の濫用の病歴；11.）不十分な信頼性を潜在的に示す（例えば、精神状態が悪い）患者；12.）オリゴヌクレオチドもしくは上記研究生成物における任意の成分に対する既知の過敏反応；13.）無作為化前に過去12ヶ月以内に、別の調査中の薬剤を使用したか、または臨床試験に参加した患者。

10

**【0104】**

G E D - 0 3 0 1 の安全性を、以下を考慮することによって毎日評価した：身体検査、体重（K g）、生命徴候（収縮期血圧および拡張期血圧、心拍数、呼吸数、体温）、E C G（12誘導）、A E および S A E の収集。血液サンプルを、以下についてチェックした：ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均血球容積（mean cell volume）、赤血球数、総白血球数および白血球分画、M C H、血小板数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、クレアチニン、B U N、グルコース、尿酸、タンパク質、ビリルビン、アルカリホスファターゼ、C P K、A S T、A L T、 $\gamma$ -G T、N a、K、コレステロールおよびトリグリセリド、補体活性化（B b、C 5 a および C 3 a をモニターすることによる）。尿検査（p H、ケトン、白血球、タンパク質、グルコース、細胞細菌学試験（cyto-bacteriological examination））もまた行った。

20

**【0105】**

生命徴候における一貫した実験異常も変化も、上記研究の間にいかなる患者においても示されなかった。補体因子の血清レベルにおける有意な増大は示されなかった。3つのコホートにおけるサンプル全ては、11.2 ng / ml G E D 0 3 0 1 の結果を与えたコホート1の1名の患者の1サンプル（患者5、7日目、6時間）を除いて、定量の下限を下回る値を得た。

**【0106】**

重度の有害事象は記録されなかった。25の有害事象（A E）が11名の患者において記録され、最も共通する事象は、軽度と報告された（図4）。研究者らは、A E を14（56%）症例において処置に関連しないと評価した。これら14のA Eのうち11は、実験異常を含め、薬物投与前に8名の患者において記録された。A E は、12症例（48%）において上記研究薬物に関連する可能性はなく、おそらく1症例（4%）において上記研究薬物と関連するとみなされた。これは、上記研究薬物の投与の間に血清トリグリセリド計数の増大であった。処置によって生じたA E において明らかな用量-応答関係はなかった。コホート2の1名の患者は、84日目に上記疾患の軽度再発があったが、コホート3の別の患者は、異常な疼痛および嘔吐の2つの重篤なエピソードを経験し、これらは、ステロイドでの毎日の処置を必要とした。80 mg / 日で処置した1名の患者は、1日目に高い拡張時血圧を、84日目に、G E D 0 3 0 1 投与後数分間、T波反転（胸部誘導において）を経験した。循環器専門医による注意深い検査の後、これらA E の両方を、最近数ヶ月間にわたって患者が受けたブデソニド処置に続発的であるとみなされた。アレルギー性鼻炎のエピソードは、31日目に、アレルギー性疾患の病歴を有する1名の患者において記録された。このA E は、抗ヒスタミン化合物の1回の投与直後に解決した。

30

40

**【0107】**

独立安全委員会（と毒物学、薬剤監視および臨床炎症性腸疾患における専門家）が、安全性パラメーターをモニターしかつ評価するために指名された。1日目および7日目に、血液サンプルをまた、薬物動態分析のために、および末梢血単核細胞（P B M C）単離のために、投与後0時間、2時間、6時間、12時間および24時間で採取した。処置の効力を、異なる時点（例えば、8日目、28日目、60日目、および90日目）で、寛解基

50

準 ( C D A I < 1 5 0 ) を満たしたかもしくは C D A I スコアにおけるベースラインから 7 0 点以上の減少として規定される臨床応答を達成した患者の数を評価することによって確立した。

【 0 1 0 8 】

実施例 2 : S M A D 7 は、ヒト腸腺およびパイエル板において発現される

腸サンプルは、慢性的に活発な疾患のために外科的切除を受けており、医学的処置に十分に応答しない 4 名の C D 患者から利用可能であった。これらサンプルを、免疫組織化学による S M A D 7 の分析のために使用した。

【 0 1 0 9 】

C D を有する患者の組織切片を切り出し、脱パラフィン化し、キシレンおよびエタノールを通して脱水した。抗原回復の目的で、上記スライドを、0.01 M クエン酸緩衝液 ( p H 6 ) 中に 1 0 分間にわたってマイクロ波オープン中でインキュベートした。内因性ペルオキシダーゼをブロックするために、上記スライドを、次に、2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中で 2 0 分間にわたって室温でインキュベートした。マウス抗ヒト S M A D 7 抗体でのインキュベーションを、室温において 1 時間にわたって行った。T r i s 緩衝化食塩水中ですすいだ後、スライドを、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化したウサギ抗マウス抗体とともに 3 0 分間にわたって室温でインキュベートした。免疫反応性細胞を、基質としてジアミノベンジジンを添加することによって可視化し、ヘマトキシリンで軽く対比染色した。陰性コントロールとして、組織切片を、一次 S M A D 7 抗体の代わりに、精製した正常ウサギ抗血清を使用して処理した。

【 0 1 1 0 】

これら研究から、S M A D 7 は、ヒト腸腺およびパイエル板において発現されることが示された ( 図 5 ) 。この観察は、配列番号 6 を有する S M A D 7 のダウンレギュレーションもしくはノックダウンが、T G F - 1 がこれら構造において作用することを可能にし得、従って、炎症性サイトカイン ( 例えば、I F N - ) を発現する T 細胞の割合を減少させ、調節性 T 細胞 ( これは、本明細書で T r e g と いわれる ) のパーセンテージを高めることを示唆する。

【 0 1 1 1 】

実施例 3 : 抗 S M A D 7 アンチセンスオリゴヌクレオチド処理は、培養 T 細胞における炎症性サイトカインの発現を調節する

培養 C C R 9 陽性細胞における炎症性サイトカインの発現に対する G E D 0 3 0 1 の効果を調査した。C C R 9 陽性細胞に対する G E D 0 3 0 1 曝露の効果を決定するために、P B M C ( 治験に登録されなかった活発なステロイド依存性 C D 患者 5 名から単離した ) を、ペニシリン ( 1 0 0 U / m l ) およびストレプトマイシン ( 1 0 0 U / m l ) を補充した X v i v o 無血清培養培地 ( L o n z a , V e r v i e r s , B e l g i u m ) 中で再懸濁し、S m a d 7 アンチセンス ( G E D 0 3 0 1 ) もしくはセンスオリゴヌクレオチド ( 2 μ g / m l ) の存在下もしくは非存在下で、4 8 時間にわたって培養した。S m a d 7 アンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチドの両方を、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 ( I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ) と合わせて、培養細胞の効率的トランスフェクションを促進した。細胞を染色し、各処理条件下で、C C R 9 + 集団もしくは 7 + 集団内の I F N - もしくは I L 1 7 A のいずれかを発現する T 細胞のパーセンテージを決定するために、C C R 9 、 7 、 I F N - 、および I L 1 7 A に対して指向される抗体を使用して、フローサイトメトリーによって分析した。

【 0 1 1 2 】

上記の培養 P B M C に由来する C C R 9 + 集団および 7 + 集団中の I F N - および I L 1 7 A の発現を、G E D 0 3 0 1 が、C C R 9 + 細胞における炎症性サイトカインの発現を直接阻害するか否かを決定するために分析した。C D P B M C の、G E D 0 3 0 1 ( S m a d 7 アンチセンス ) での処理は、I F N - 発現および I L - 1 7 A 発現 C C R 9 + 細胞 ( 図 6 A ) のパーセンテージを有意に減少させたが、サイトカイン発現 7 + 細胞の割合は、変化しないままであった ( 図 6 B ) 。例えば、I F N - を発

10

20

30

40

50

現するCCR9+ 細胞のパーセンテージは、非処理細胞において $78.9 \pm 7.3$ ；センス鎖で処理した細胞において $78.3 \pm 7.3$ ；およびGED0301で処理した細胞において $54 \pm 7.2$ であった。同様に、IL-17Aを発現するCCR9+ 細胞のパーセンテージは、非処理細胞において $77.4 \pm 7.3$ ；センス鎖で処理した細胞において $74.3 \pm 6.4$ ；およびGED0301で処理した細胞において $53.9 \pm 5.7$ であった。対照的に、IFN- $\gamma$ を発現する未処理、センス処理およびGED0301処理の $\gamma$ + 細胞のパーセンテージは、それぞれ、 $13.1 \pm 1.2$ ； $11.7 \pm 0.7$ 、および $11 \pm 0.8$ であった。IL-17Aを発現する未処理、センス処理およびGED0301処理の $\gamma$ + 細胞のパーセンテージは、 $12.1 \pm 1.5$ ； $10.4 \pm 1.2$ 、および $10.6 \pm 1.1$ であった。従って、培養CCR9+ CD<sup>+</sup>PBMCの、GED0301への直接曝露から、炎症性サイトカインの減少した発現が生じる。

#### 【0113】

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

この実施例は、循環するCCR9+ FoxP3+ T細胞、CCR9+ IFN- $\gamma$ + T細胞、CCR9+ IL17A+ T細胞、FoxP3+ T細胞、IFN- $\gamma$ + T細胞、IL17A+ T細胞、FoxP3+ CD103+ T細胞およびインテグリン $\alpha$ 4 $\beta$ 7+ T細胞の割合を調査する研究を記載する。なぜなら、これらTreg細胞集団の活性化状態は、腸の小胞およびパイエル板において起こる免疫応答を反映するからである。以下で記載される研究において、試験した各コホートに関して、T細胞集団を0日目に測定して、各患者のベースライン測定値を決定した。GED-0301を実施例1において上記のように7日間にわたって投与し、T細胞集団を再び、8日目、28日目に、およびいくつかの細胞集団については84日目に測定した。

#### 【0114】

Tregの末梢プールの操作は、免疫媒介性疾患および移植の処置のための特定の焦点であった。以前の研究から、末梢血Tregの数は、抗TNF 抗体によって増大され得ること、そして増大は、抗TNF 治療に应答する患者でのみ見いだされることが示された。Tregに対する抗TNF 治療の効果は、TGF- $\beta$ 1によって媒介され得る。

#### 【0115】

SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチド治療の効果は、SMAD7アンチセンスオリゴヌクレオチド治療が、増強したTGF- $\beta$ 1活性の結果としてTregの数を正に調節するか否かを決定するために調節した。SMAD7アンチセンス治療の効果はまた、このような処置が循環するFoxP3+ Tregの数の変化をもたらすか否か、およびこの効果がエフェクターTh1/Th17細胞のパーセンテージにおける変化と関連するか否かを決定するために研究した。

#### 【0116】

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

#### 【0117】

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

#### 【0118】

PBMCを、10% 不活性化FBS、ペニシリン（100U/ml）、およびストレプトマイシン（100mg/ml）を補充したRPMI 1640中に再懸濁した。細胞

を、以下の抗体を使用してフローサイトメトリーによって表現型を特徴付けた：APC 標識抗ヒトCCR9 およびPE 標識抗ヒトFoxp3。全ての抗体を、1：50 最終希釈において使用した。

【0119】

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

10

【0120】

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

【0121】

炎症性リンパ球 / 拮抗作用リンパ球 (counter-regulatory lymphocyte) の割合に対するGED0301 処理の効果を調査した。GED0301 処理は、治験の8 日目および28 日目にモニターした場合、循環するCD3+、CD4+、CD8+、CD25+、CD161+、CD62L+、47+、もしくはCCR9+ 細胞のパーセンテージを有意に変化させなかった (図7)。同様に、GED0301 処理後にインターロイキン (IL) - 17A+ 細胞、IL-10+ 細胞、FoxP3+ 細胞、インターフェロン (IFN) - 発現およびIL-17A 発現の47+ 細胞、またはFoxP3 発現CD103+ 細胞の割合において有意な変化は全く観察されなかった。

20

【0122】

表I および表Ia は、コホート1 (7 日間にわたって40 mg のGED-0301 / 日を受けた) の結果を示す。表I は、0 日目、8 日目、28 日目の総細胞集団における所定のT 細胞集団のパーセンテージを示す。表Ia は、0 日目、8 日目、28 日目および84 日目の総細胞集団におけるCCR9+ FoxP3+ T 細胞、FoxP3+ T 細胞およびCD103+ FoxP3+ T 細胞のパーセンテージを示す。

30

【0123】

表II は、コホート2 (80 mg のGED-0301 / 日を7 日間にわたって受けた) の結果を示す。表II は、0 日目、8 日目、および28 日目の総細胞集団における所定のT 細胞集団のパーセンテージを示す。表IIa は、0 日目、8 日目、28 日目および84 日目の総細胞集団におけるCCR9+ FoxP3+ T 細胞、FoxP3+ T 細胞およびCD103+ FoxP3+ T 細胞のパーセンテージを示す。

40

【0124】

表III は、コホート3 (160 mg のGED-0301 / 日を7 日間にわたって受けた) の結果を示す。表III は、0 日目、8 日目、および28 日目の総細胞集団における所定のT 細胞集団のパーセンテージを示す。表IIIa は、0 日目、8 日目、28 日目および84 日目の総細胞集団におけるCCR9+ FoxP3+ T 細胞、FoxP3+ T 細胞およびCD103+ FoxP3+ T 細胞のパーセンテージを示す。

【0125】

表IV は、コホート1 ~ 3 の全ての患者の合わせた結果を示す。表IV は、0 日目、8 日目、および28 日目の総細胞集団における所定のT 細胞集団のパーセンテージを示す。表IVa は、0 日目、8 日目、28 日目および84 日目の総細胞集団におけるCCR9+

50

F o x P 3 + T細胞、F o x P 3 + T細胞およびC D 1 0 3 + F o x P 3 + T細胞のパーセンテージを示す。

【 0 1 2 6 】

【 表 1 】

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

表I

【 0 1 2 7 】

表Ia

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

表II

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

【表 2】

表 IIa

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

表 III

細胞集団	0日目			8日目			28日目		
	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小	メジアン	最大	最小
CCR9+IFN-g+	<b>14.00%</b>	35.00%	2.80%	<b>8.00%</b>	16.00%	0.40%	<b>10.30%</b>	31.00%	1.30%
CCR9+IL-17A+	<b>4.40%</b>	7.80%	3.50%	<b>4.00%</b>	8.00%	0.30%	<b>1.50%</b>	280.00%	1.00%
CCR9+FoxP3+	<b>0.80%</b>	1.20%	0.10%	<b>1.30%</b>	1.90%	0.70%	<b>0.70%</b>	1.5%	0.28%
IFN-g+	<b>10.80%</b>	26.00%	3.60%	<b>8.50%</b>	15.00%	1.70%	<b>13.00%</b>	29.00%	3.40%
IL-17A+	<b>2.10%</b>	3.60%	1.00%	<b>1.20%</b>	5.30%	1.10%	<b>1.50%</b>	5.60%	0.80%
FoxP3+	<b>2.80%</b>	3.30%	1.70%	<b>2.10%</b>	4.60%	1.60%	<b>1.50%</b>	4.40%	0.80%
FoxP3+ CD103+	<b>0.80%</b>	1.20%	0.20%	<b>0.70%</b>	1.80%	0.50%	<b>0.70%</b>	1.40%	0.24%
インテグリン $\alpha 4 \beta 7+$	<b>2.80%</b>	6.30%	2.50%	<b>1.10%</b>	6.80%	0.60%	<b>3.50%</b>	5.20%	0.90%

表 IIIa

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

【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

【表 3】

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

表 IV'a

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

10

20

30

40

## 【0129】

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

## 【0130】

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

50

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

【0131】

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

【0132】

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

【0133】

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

【0134】

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

【0135】

FoxP3+ CD103+ T細胞集団において変化なし（例えば、表IVは、0日目において0.2%発現および8日目において0.34%発現を示す）およびインテグリン 4 7 T細胞集団において変化なし（例えば、表IVは、0日目において2.7%発現および8日目において2%発現を示す）が認められた。

【0136】

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

【0137】

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

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

【0138】

10

20

30

40

【表4】

表V

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

【0139】

10

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

【0140】

【表5】

表VI

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

20

【0141】

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

【0142】

【表6】

表VII

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

30

【0143】

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

40

50

においても明らかであり（表V～VII）、ベースラインからのCD4Iスコアの有意な減少があった（ $P < 0.0001$ ）。28日目における臨床的寛解は、13/15名の患者（86%）（コホート1の5/5名、コホート2の3/5名、およびコホート3の5/5名）において記録された（表V～VII）。84日目に、総CD4Iスコアは、ベースラインにおいて測定されたものより有意に低く（表V～VII,  $P < 0.0001$ ）、9/15名（60%）の患者は、なお寛解状態にあった。特に、これは、コホート1の3名の患者、コホート2の2名の患者、およびコホート3の4名の患者において認められた（表V～VII）。ベースラインから8日目、28日目および84日目までのCD4Iスコアの有意な減少は、各コホートにおいて分析を行った場合にすら認められた（図9）。上記結果は、寛解の誘導および/または改善された転帰とT細胞亜集団との間に相関関係があることを示唆する。さらに、84日目に認められたCD4Iスコアは、より早い時点から増大を示し（例えば、8日目および28日目）、このことは、84日目の特定のT細胞集団における対応する変動と一致した（例えば、CCR9+ FoxP3+ T細胞集団は、0日目から8日目まで増大したが、84日目には、T細胞のこの集団は、減少するようである）。

10

**【0144】**

援用の表示

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

**【0145】**

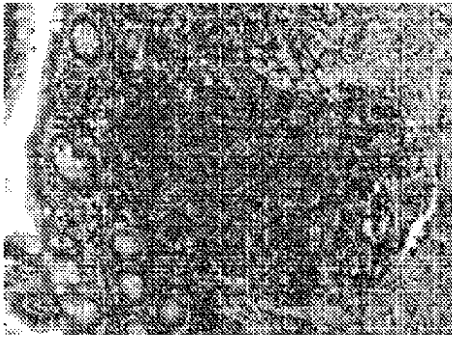
等価物

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

20

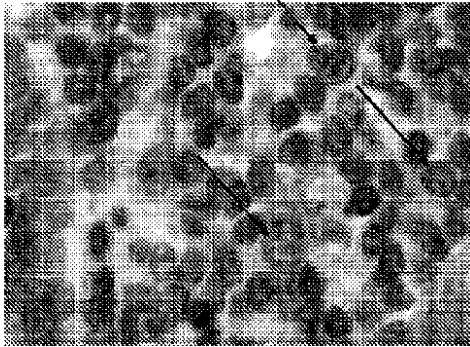
【 図 5 A 】

A



【 図 5 B 】

B



## 【 図 1 A 】

```

1  ggcaacgagcgg gagagccgcg caggggcgcgg gccgcgcgcgg gtgggggcagc cggagcgcag
61  gcccccgatc cccggcgggc gcccccgggc ccccgcgcg cccccggcct ccgggagact
121 ggcgcatgcc acggagcgcc cctogggccg ccgcccgtcc tgcccgggccc cctgctgctg
181 ctgctgtcgc ctgcccctgc tgcccact cggcgcccga cttcttcatg gtgtgcggag
241 gtcatgttcg ctccctagca ggcaaacgac ttttctctc gcctctcgc cccgcatggt
301 caggacaaa cgatctgcgc tctctcggcg tctctggagg agcctcgcgc ccggcggcga
361 ggacgaggag gagggcgag ggggaggtgg aggaggaggc gagctcggg gagaaggggc
421 gacggacagc cgagcgcatg gggcgggtgg cggcggccc ggaggggctg gatgctgct
481 gggcaaggcg gtgcgaggtg ccaaagggtca ccaccatccc caccgcag ccgcccggc
541 cggcggcgcc gggggcgccg agggcgatct gaaggcgctc acgcactcgg tgctcaagaa
601 actgaaggag cggcagctgg agctgctgct ccaggccgtg gagtcccgc ggggacgcg
661 caccgcgtgc ctccctgctc ccggccgcct ggactgcagg ctgggcccgg gggcggccc
721 cggcgcgag cctgcgcagc cgcccctcgc ctactcgcct cccctcctgc tgtgcaaagt
781 gttcaggtgg ccggatctca ggcattcctc ggaagtcaag aggctgtgtt gctgtgaatc
841 ttacgggaag atcaacccc agctgggtgtg ctgcaacccc catcacctta gccgactctg
901 cgaactagag tctccccccc ctccctactc cagataccc atggattttc tcaaaccaac
961 tgcagactgt ccagatgctg tgcccttctc cgctgaaaca gggggaacga attatctggc
1021 ccctgggggg ctttcagatt cccaacttct tctggagcct ggggatcggc cacactggtg
1081 cgtgggtggc tactgggagg agaagacgag agtggggagg ctctactgtg tccaggagcc
1141 ctctctggat atcttctatg atctacctca ggggaatggc ttttgcctcg gacagctcaa
1201 ttcggacaac aagagtcagc tggtcagaaa ggtgcggagc aaaaatcggc cggcctcca
1261 gctgacgcgg gaggtggatg gtgtgtgggt gtacaaccgc agcagttacc ccatcttcat
1321 caagtccgcc aactggaca acccggactc caggacgctg ttggtacaca aggtgttccc
1381 cggtttctcc atcaaggctt tcgactacga gaaggcgtac agcctgcagc ggcccactga
1441 ccaocgagttt atgcagcagc cgtggacggg ctttaccgtg cagatcagct ttgtgaaggg
1501 ctgggggtcag tgctacacc gccagttcat cagcagctgc ccgtgctggc tagaggtcat
1561 cttcaacagc cggtagccgc gtgcggaggg gacagagcgt gagctgagca ggccacactt
1621 caaactactt tgctgcta attttctctc tgagtgtctg cttttcatgc aaactctttg
1681 gtggtttttt tttgtttt taggtgtttt tcttctctc gtccctgttt ttttctgtt
1741 ttgtttcgtc ttttgagaaa tagcttatga aaagaattgt tgggggtttt tttggaagaa
1801 ggggcaggta tgatcggcag gacaccctga taggaagagg ggaagcagaa atccaagcac
1861 caccaaacac agtgtatgaa ggggggcggc catcatttca cttgtcagga gtgtgtgtga
1921 gtgtgagtggt gcggtgtgt gtgcacgcgt gtgcaggagc ggcagatggg gagacaacgt
1981 gctctttgtt ttgtgtctct tatggatgtc cccagcagag aggtttgcag tccaagcgg
2041 tgtctctctc gcccttggc caocgtcagt ggggcagagg cagtacctgg gcaagctggc
2101 ggctgggggtc ccagcagctg ccaggagcac ggctctgtcc ccagcctggg aaagcccctg
2161 cccctctctc ccctcatcaa ggcacggggc ctgtccacag gcttctgagc agcagcctg
2221 ctagtggccg aaccagaacc aattatttct atcctgtctc tattccttc ctgccagcc
2281 ctgcccattgt agcgtcttct ttttttggcc atctgctctc ggatctccct gagatgggtc
2341 tcccaggggc tgcccgggca gcccctcac agtattgtct acccagtgcc ctctcccctc
2401 agcctctccc ctgcccctc tggtgacatc aggtttttcc cggacttaga aaaccagctc
2461 agcactgcct gctcccctc tgtgtgttaa gctctgctat taggocagca agcggggatg
2521 tccctgggag ggacatgctt agcagtcctc tccctccaa gaaggatttg gtccgtcata
2581 acccaaggta ccatcctagg ctgacaceta actcttcttt catttcttct acaactcata
2641 cactcgtatg ataactcagc actgttctta gctcaatgag catgtttaga ctttaacata
2701 agctattttt ctaactaaa aggttttaaat gaacaagaga agcattctca ttggaaattt
2761 agcattgtag tgctttgaga gagaaaggac tctgaaaaa aaacctgaga tttattaaag
2821 aaaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac ttgtaaatat aaagacgttt
2881 tataagcctc attatttatg tattgtgcaa tgtgtataaa caagaaaaat aaagaaaaga
2941 tgcactttgc tttaataata atgcaataaa caaatgcaa attaaaaaag ataaacacaa
3001 gattggtgtt ttttctatg ggtgttatca cctagctgaa tgtttttcta aaggagttaa
3061 tgttccatta aacgattttt aaaatgtaca cttgaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

( 配列番号 1 )

Fig. 1A

【 図 1 B 】

MFRTKRSALVRRLWRSRAPGGEEDEEEGAGGGGGGGGELRGEGATD  
SRAHGAGGGGPGRAGCCLGKAVRGAKGHHHPHPPAAGAGAAGGAEADLKALTHSVLKK  
LKERQLELLLQAVESRGGTRTACLLLPGRLDLCRLGPGAPAGAQPAQPPSSYSLPLLLC  
KVFRWPDLRHSSEVKRLCCCESYKINPELVCCNPHELLSRLCELESPPPPYSRYPMDF  
LKPTADCPDAVPSSAETGGTNYLAPGGLSDSQLLLEPGDRSHWCVVAYWEEKTRVGRL  
YCVQEPSLDIFYDLPQGNGFCLGQLNSDNKSQLVQKVRISKIGCGIQLTREVVDGVVWYN  
RSSYPIFIKSATLDNPDSTRLLVHKVFPFGFSIKAFDYEKAYSLQRPNDHEFMQQPWTG  
FTVQISFVKGWGQCYTRQFISSCPCWLEVIFNSR  
( 配列番号 2 )

Fig. 1B

【 図 2 】

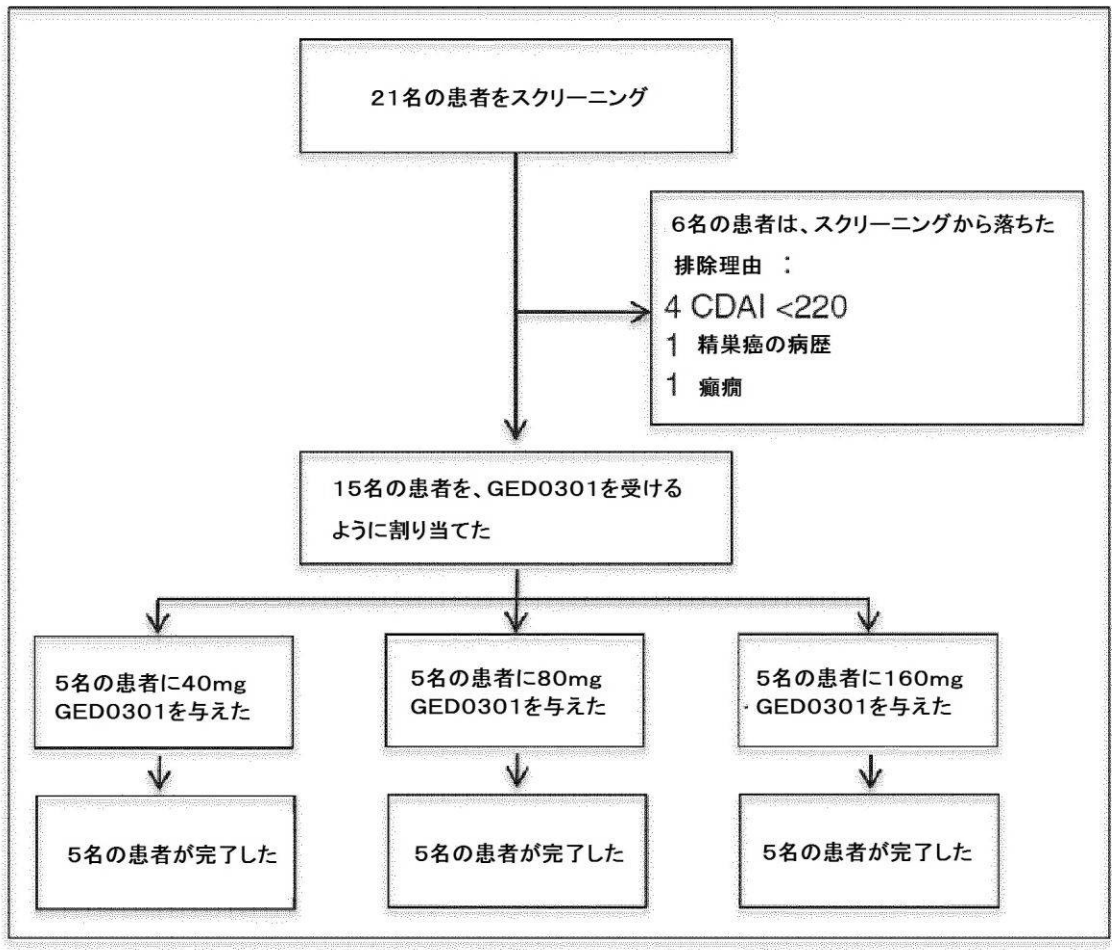


Fig. 2

【 図 3 】

	40 mg	80 mg	160 mg	全体
	N = 5	N = 5	N = 5	N = 15
	コホート 1	コホート 2	コホート 3	
性別, 男性 : n (%)	3 (60)	4 (80)	4 (80)	11 (73)
年齢:メジアン(範囲)	38 (32-41)	34 (31-42)	39 (24-45)	37 (24-45)
CDの継続期間: 年数メジアン(範囲)	6 (1-29)	2 (1-5)	1 (1-9)	4 (1-29)
以前のI-C切除 : n (%)	4 (80)	4 (80)	1 (20)	9 (60)
CD位置 : n (%)				
回腸末端部	1 (20)	1 (20)	4 (80)	6 (40)
前吻合部	4 (80)	4 (80)	1 (20)	9 (60)
CD挙動 : n (%)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	15 (100)
炎症				
同時薬物適用 : n (%)				
全身性コルチコステロイド	0 (0)	0 (0)	1 (20)	1 (6.6)
ブデソニド	4 (80)	2 (40)	3 (60)	9 (60)
メサラミン	3 (60)	4 (80)	5 (100)	12 (80)
不耐性もしくは非応答性 : n (%)				
免疫抑制薬	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5 (33.3)
抗TNF	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5 (33.3)

略語: CD, クロウン病; TNF, 腫瘍壊死因子

Fig. 3

【 図 4 】

	コホート 1	コホート 2	コホート 3	グレード	研究薬物との関連性
	事象数	事象数	事象数		
CD再発	0	1	0	軽度	UN (1)
腹痛	0	0	2	重篤	UN (2)
嘔吐	0	0	2	重篤	UN (2)
トリグリセリド および/もしくは コレステロール増加	0	0	3	軽度	NT (3)
	2	0	0	軽度	UN (2)
	1	0	0	軽度	PR (1)
ビリルビン増加	3	0	0	軽度	NT (3)
リンパ球数増加	0	0	1	軽度	NT (1)
血清カリウム減少	1	0	0	軽度	NT (1)
尿中白血球数増加	1	0	0	軽度	NT (1)
	0	0	1	軽度	UN (1)
尿中白血球エステラーゼ数増加	1	0	0	軽度	NT (1)
尿路感染	1	2	0	軽度	NT (3)
高血圧	0	1	0	軽度	NT (1)
ECG変化(T波反転)	0	1	0	軽度	UN (1)
鼻炎	1	0	0	軽度	UN (1)

データは、少なくとも1つの有害事象を有する患者数(記録された関連性を有する患者数)を示す。

略語: CD, クロウン病; ECG, 心電図; NT, 研究薬に関連なし; PR, 恐らく研究薬に関連; UN, 研究薬に関連する可能性低い;

Fig. 4

【 図 6 】

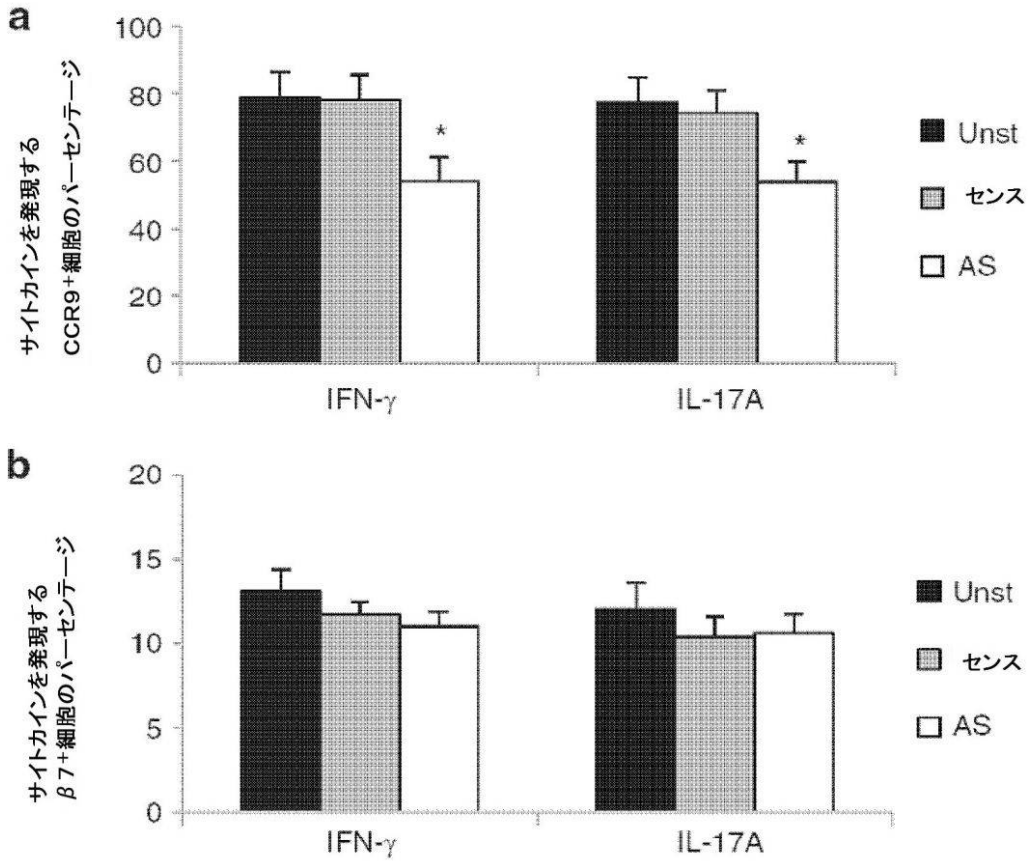


Fig. 6

【 図 7 】

	ベースライン	8日目	28日目
細胞			
CD3 <sup>+</sup>	66.8% ± 12.5%	70.8% ± 12.5%	70.4% ± 10.3%
CD4 <sup>+</sup>	44.8% ± 14.2%	50.4% ± 12.8%	50.7% ± 12.6%
CD8 <sup>+</sup>	16.6% ± 6.6%	20.0% ± 6.2%	19.8% ± 5.4%
CD25 <sup>+</sup>	44.2% ± 15.5%	39.2% ± 11.6%	39.4% ± 13.8%
CD161 <sup>+</sup>	4.9% ± 2.8%	4.3% ± 2.7%	4.7% ± 4.6%
CD62L <sup>+</sup>	50.3% ± 13.7%	54.9% ± 11.6%	54.9% ± 12.9%
CCR9 <sup>+</sup>	2.9% ± 1.6%	3.8% ± 3.1%	3.6% ± 2.8%
$\alpha 4\beta 7$ <sup>+</sup>	3.0% ± 1.5%	2.7% ± 2.1%	2.4% ± 1.3%

Fig. 7

【 図 8 】

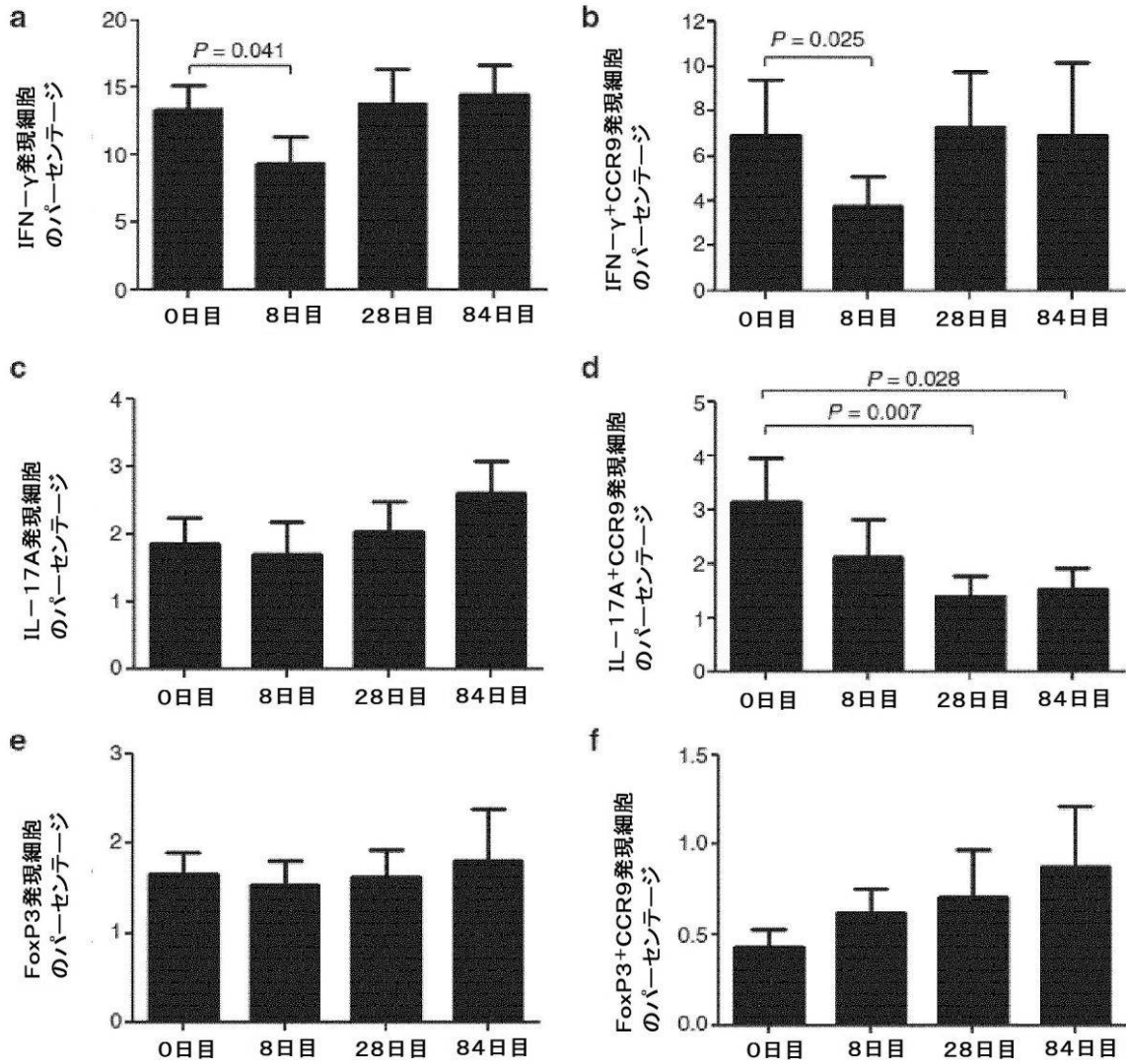


Fig. 8

【 図 9 】

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

Fig. 9

spec3106

【 配列表 】

2014531584000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2012/068146

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2009/275496 A1 (BALDWIN SAM [US] ET AL) 5 November 2009 (2009-11-05) abstract; claims 1-6, 9, 12 paragraph [0102] -----	14-20 1-13
X A	WO 2008/157394 A2 (JOLLA INST ALLERGY IMMUNOLOG [US]; CHEROUTRE HILDE [US]; PARK YUNJI [U] 24 December 2008 (2008-12-24) abstract; claims 1, 19, 25, 29-31 paragraphs 152, 164-166, 188 ----- -/--	14-20 1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
*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)		*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
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 27 November 2012		Date of mailing of the international search report 06/03/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mulder, Lonneke

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/068146

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MONTELEONE G ET AL: "BLOCKING SMAD7 RESTORES TGF-BETA1 SIGNALING IN CHRONIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASE", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL INVESTIGATION, US, vol. 108, no. 4, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 601-609, XP001152527, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI200112821	1-13
A	abstract section methods	14-20
X	MONTELEONE G ET AL: "Smad7 in TGF-beta-mediated negative regulation of gut inflammation", TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 25, no. 10, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 513-517, XP004581624, ISSN: 1471-4906, DOI: 10.1016/J.IT.2004.07.008	1-13
A	abstract page 515, right-hand column, last paragraph	14-20
X	FANTINI M C ET AL: "Smad7 Controls Resistance of Colitogenic T Cells to Regulatory T Cell-Mediated Suppression", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 136, no. 4, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 1308-1316.e3, XP026070063, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1053/J.GASTRO.2008.12.053 [retrieved on 2008-12-27]	1-13
A	abstract	14-20
X	BOIRIVANT ET AL: "Inhibition of Smad7 With a Specific Antisense Oligonucleotide Facilitates TGF-beta1-Mediated Suppression of Colitis", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 131, no. 6, 22 December 2006 (2006-12-22), pages 1786-1798, XP005750980, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1053/J.GASTRO.2006.09.016	1-13
A	abstract page 1788, right-hand column	14-20
	----- -/--	

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/068146

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Konstantinos Papadakis ET AL: "CC Chemokine Receptor 9 Expression Defines a Subset of Peripheral Blood Lymphocytes with Mucosal T Cell Phenotype and Th1 or T-Regulatory 1 Cytokine Profile1", The Journal of Immunology Copyright, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 159-165, XP055045489, Retrieved from the Internet: URL:http://www.jimmunol.org/content/171/1/159.full.pdf#page=1&amp;view=FiH [retrieved on 2012-11-23] abstract</p>	1-20
A	<p>PAPADAKIS K A ET AL: "Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9(+) T lymphocytes", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 174, no. 8, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 4985-4990, XP002407269, ISSN: 0022-1767 abstract</p>	1-20
A	<p>KEVIN J. MALOY ET AL: "Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease", NATURE, vol. 474, no. 7351, 15 June 2011 (2011-06-15), pages 298-306, XP055045571, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature10208 abstract; figure 2 page 303</p>	1-20
A	<p>WARREN STROBER: "The Multifaceted Influence of the Mucosal Microflora on Mucosal Dendritic Cell Responses", IMMUNITY, vol. 31, no. 3, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 377-388, XP055045575, ISSN: 1074-7613, DOI: 10.1016/j.immuni.2009.09.001 abstract; figure 1</p>	1-20

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/068146

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FANTINI MASSIMO C ET AL: "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 172, no. 9, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 5149-5153, XP002521312, ISSN: 0022-1767 abstract	1-20
X,P	----- MONTELEONE G ET AL: "Phase I clinical trial of smad7 knockdown using antisense oligonucleotide in patients with active crohn's disease", MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 20, no. 4, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 870-876, XP008158192, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/MT.2011.290 the whole document	1-20
X,P	----- US 2012/079611 A1 (SHIH DAVID Q [US] ET AL) 29 March 2012 (2012-03-29) abstract; figure 1; examples 4,13	14-20
X,P	----- GIOVANNI MONTELEONE ET AL: "Emerging immunological targets in inflammatory bowel disease", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, vol. 11, no. 6, 12 October 2011 (2011-10-12), pages 640-645, XP028124092, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2011.09.013 [retrieved on 2011-09-30] abstract	14-20
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2012/068146**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.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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

1-20(partially)

**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 Application No. PCT/ EP2012/ 068146

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

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

1. claims: 1-20(partially)

Method and kits for monitoring whether a subject with IBD responds to anti-SMAD7 therapy using CCR9 + FOXP3+ T-cells  
---

2. claims: 1-20(partially)

Method and kits for monitoring whether a subject with IBD responds to anti-SMAD7 therapy using CCR9+ IFNgamma+ T-cells  
---

3. claims: 1-20(partially)

Method and kits for monitoring whether a subject with IBD responds to anti-SMAD7 therapy using CCR9+ IL17A+ T-cells  
---

4. claims: 1-20(partially)

Method and kits for monitoring whether a subject with IBD responds to anti-SMAD7 therapy using FOXP3+ T-cells  
---

5. claims: 1-20(partially)

Method and kits for monitoring whether a subject with IBD responds to anti-SMAD7 therapy using IFNgamma+ T-cells  
---

6. claims: 1-20(partially)

Method and kits for monitoring whether a subject with IBD responds to anti-SMAD7 therapy using IL17A+ T-cells  
---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/068146

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009275496	A1	05-11-2009	NONE
-----			
WO 2008157394	A2	24-12-2008	EP 2167647 A2 31-03-2010
			JP 2010531138 A 24-09-2010
			US 2009136470 A1 28-05-2009
			WO 2008157394 A2 24-12-2008
-----			
US 2012079611	A1	29-03-2012	NONE
-----			

## 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 31/7088 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 P	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 A	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	
	C 1 2 M 1/34 Z	
	C 0 7 K 16/28	
	C 1 2 P 21/08	

(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, T M), 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, R S, 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, H U, 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, N I, 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

(72)発明者 モンテレオーネ, ジョヴァニ  
イタリア国 イ - 0 0 1 3 3 ローマ, ヴィア モントペッリエル 1

(72)発明者 ヴィーティ, フランチェスカ  
イタリア国 イ - 2 0 0 9 9 セスト サン ジョヴァニ, ヴィア ベネデット クローチェ  
4 4

(72)発明者 ベリンヴィーア, サルヴァトーレ  
イタリア国 イ - 3 3 1 7 0 ポルデノーネ, ヴィア ブルザフィエラ 1 2

F ターム(参考) 2G045 AA25 BB20 BB24 CA25 CB01 FA16 FA37 FB03  
4B024 AA11 BA44 BA46 CA09 CA12 DA03 HA14 HA15  
4B029 AA07 BB15 BB17 BB20 FA12  
4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QQ79 QR36 QR48 QR62 QR72  
QR77 QS02 QS33 QS34 QX01  
4B064 AG27 CA19 DA13  
4C084 AA13 ZA681 ZA682  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA66  
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA50 EA54 FA71

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014531584A5</a>	公开(公告)日	2015-11-05
申请号	JP2014530245	申请日	2012-09-14
申请(专利权)人(译)	Nogura制药有限公司		
[标]发明人	モンテレオーネジョヴァニ ヴィーティフランチェスカ ベリンヴィーアサルヴァトーレ		
发明人	モンテレオーネ, ジョヴァニ ヴィーティ, フランチェスカ ベリンヴィーア, サルヴァトーレ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/48 G01N33/536 G01N33/50 A61K31/7088 A61K48/00 A61P1/04 C12Q1/04 C12Q1/68 C12N15/09 C12M1/34 C07K16/28 C12P21/08		
CPC分类号	G01N33/5094 G01N33/56972 G01N2800/065 G01N2800/52 A61P1/04 G01N33/505 G01N33/6866 G01N33/6869 G01N33/6872 G01N33/68 G01N2333/54 G01N2333/7158		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.Y G01N33/543.597 G01N33/48.P G01N33/536.C G01N33/543.501.A G01N33/50.P A61K31/7088 A61K48/00 A61P1/04 C12Q1/04 C12Q1/68.A C12N15/00.A C12M1/34.A C12M1/34.F C12M1/34.Z C07K16/28 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045 /FB03 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA46 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA14 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/FA12 4B063/QA18 4B063 /QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064 /CA19 4B064/DA13 4C084/AA13 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA66 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/EA54 4H045/FA71		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	2011425234 2011-09-15 EP 61/576556 2011-12-16 US		
其他公开文献	JP6389122B2 JP2014531584A		

#### 摘要(译)

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

