

(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2016-521540

(P2016-521540A)

(43) 公表日 平成28年7月25日(2016.7.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	A 2G045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	M 4B063
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/53	D 4C085
C12N 15/09 (2006.01)	G01N 33/50	Z
C12Q 1/02 (2006.01)	C12N 15/00	F

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-514135 (P2016-514135)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月16日 (2014. 5. 16)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年1月12日 (2016. 1. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/038434
 (87) 国際公開番号 W02014/186728
 (87) 国際公開日 平成26年11月20日 (2014. 11. 20)
 (31) 優先権主張番号 61/824, 661
 (32) 優先日 平成25年5月17日 (2013. 5. 17)
 (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 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 ハックニー, ジェイソン エー.
 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, 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】 炎症性腸疾患の診断及び治療方法

(57) 【要約】

クローン病（線維性又は線維狭窄性クローン病を含む）及び潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患を診断するためのバイオマーカー、並びに該バイオマーカーの使用方法が提供される。加えて、例えば、潰瘍性大腸炎及びクローン病（線維性又は線維狭窄性クローン病を含む）等の炎症性腸疾患のような胃腸炎症性疾患の治療方法が提供される。

【選択図】 図 1 A

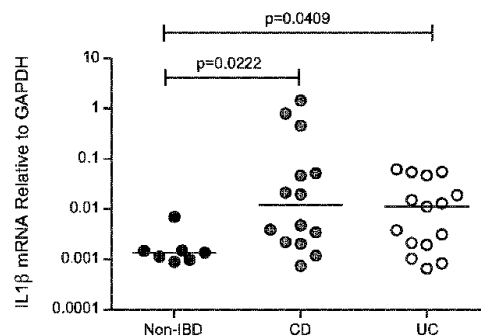


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 対象から得られた生体試料において、CSF3 (GCSF)、IL-24、SERPINB3、SERPINB4、AMIGO2、SERPINB7、ABAT、PF4、STEAP2、ELN、CCL4、VEGFA、DACT1、KCNMB4、PDLIM4、TGFB1、KCNE1L、HIF1A、SLC25A45、OSMR、P4HA2、ELF3、TGIF1、TMEM158、COL7A1、COL16A1、アンフィレグリン (AREG) 及び IL-11 から選択される、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること；

10

(b) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定された発現レベルを、基準レベルと比較すること；及び

(c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを上回る場合に炎症性腸疾患の診断を提供することを含む方法。

【請求項 2】

一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせが、CSF3 (GCSF)、TMEM158、COL7A1、COL16A1、アンフィレグリン (AREG)、IL-11 から選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせが、CSF3 (GCSF) 及びアンフィレグリンから選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

対象における炎症性腸疾患を診断又は診断支援する方法であって、

(a) 対象から得られた生体試料において、IL-1、CASP1 及び p20 から選択される、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること；

30

(b) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定された発現レベルを、基準レベルと比較すること；及び

(c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを上回る場合に炎症性腸疾患の診断を提供することを含む方法。

【請求項 5】

対象における線維性クローン病を診断又は診断支援する方法であって、

(a) 対象から得られた生体試料において、COL7A1、COL16A1、アンフィレグリン、IL-11、AEBP1 及び IL1R1 から選択される、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること；

40

(b) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定された発現レベルを、基準レベルと比較すること；及び

(c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを上回る場合に線維性クローン病の診断を提供することを含む方法。

【請求項 6】

50

対象における線維性クローン病を診断又は診断支援する方法であって、

(a) 対象から得られた生体試料において、MMP 3、INHBA、COL5A2、CHN1、LMCD1、COL12A1、COL7A1、COL18A1、TMEM158、FAM65C、IGFBP5、THY1、TMEM132A、PXDND、GPR68、TWIST1、COL4A1、SERPINH1、AEBP1、NAB2、TMEM45A、TMEM121、VIM、NOTCH4及びTIMP2から選択される、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること；

(b) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定された発現レベルを、基準レベルと比較すること；及び

(c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを上回る場合に線維性クローン病の診断を提供すること

を含む方法。

【請求項 7】

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8】

線維性クローン病が線維狭窄性クローン病である、請求項 5 又は請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

生体試料が腸組織である、請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現がPCR法又はマイクロアレイチップを用いて測定される、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 11】

一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現がイムノアッセイ又は免疫組織化学アッセイを用いて測定される、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

イムノアッセイがELISAアッセイである、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

基準レベルが、炎症性腸疾患を有さない対象から得られた生体試料において、同じ遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは同じタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現レベルを測定することにより得られる、請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 14】

基準レベルが、非線維化組織において、同じ遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは同じタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現レベルを測定することにより得られる、請求項 5、6 又は 8 に記載の方法。

【請求項 15】

対象におけるクローン病のサブタイプを診断又は診断支援する方法であって、

(a) 対象の腸組織から得られた生体試料においてIL18の発現レベルを測定すること；

(b) (a) で測定されたIL18の発現レベルを基準レベルと比較すること；及び

(c) (a) で測定されたIL18のレベルが基準レベルを上回る場合に線維性クローン病の診断を提供すること

を含む方法。

【請求項 16】

基準レベルが、炎症性腸疾患を有さない対象、又は炎症性クローン病を有する対象、又は潰瘍性大腸炎を有する対象の腸組織から得られた生体試料中のIL18の発現レベルを測定することにより得られる、請求項 15 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 17】
線維性クローン病が線維狭窄性クローン病である、請求項 15 に記載の方法。
- 【請求項 18】
発現レベルがイムノアッセイを用いて測定される、請求項 15 に記載の方法。
- 【請求項 19】
イムノアッセイが E L I S A アッセイである、請求項 18 に記載の方法。
- 【請求項 20】
対象における炎症性腸疾患を診断又は診断支援する方法であって、
(a) 対象から得られた血清試料において G C S F の発現レベルを測定すること；
(b) (a) で測定された G C S F の発現レベルを基準レベルと比較すること；及び
(c) (a) で測定された G C S F のレベルが基準レベルを上回る場合に炎症性腸疾患の診断を提供すること
を含む方法。 10
- 【請求項 21】
炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎又は炎症性クローン病又は線維性クローン病である、請求項 20 に記載の方法。
- 【請求項 22】
線維性クローン病が線維狭窄性クローン病である、請求項 21 に記載の方法。
- 【請求項 23】
G C S F の発現レベルがイムノアッセイを用いて測定される、請求項 20 から 22 の何れか一項に記載の方法。 20
- 【請求項 24】
イムノアッセイが E L I S A アッセイである、請求項 23 に記載の方法。
- 【請求項 25】
基準レベルが、炎症性腸疾患を有さない対象から得られた血清試料中の G C S F の発現レベルを測定することにより得られる、請求項 20 に記載の方法。
- 【請求項 26】
患者における炎症性腸疾患を治療する方法であって、
(a) 患者から得られた生体試料において、C S F 3 (G C S F)、I L - 2 4、S E R P I N B 3、S E R P I N B 4、A M I G O 2、S E R P I N B 7、A B A T、P F 4、S T E A P 2、E L N、C C L 4、V E G F A、D A C T 1、K C N M B 4、P D L I M 4、T G F B R 1、K C N E 1 L、H I F 1 A、S L C 2 5 A 4 5、O S M R、P 4 H A 2、E L F 3、T G I F 1、T M E M 1 5 8、C O L 7 A 1、C O L 1 6 A 1、アンフィレグリン (A R E G) 及び I L - 1 1 から選択される、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること；
(b) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定された発現レベルを、基準レベルと比較すること；及び
(c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを上回る場合に、抗 I L - 1 抗体、抗 I L - 1 8 抗体又は多重特異性抗 I L - 1 / 抗 I L - 1 8 抗体を患者に投与すること
を含む方法。 30 40
- 【請求項 27】
一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせが、C S F 3 (G C S F)、T M E M 1 5 8、C o l 7 A 1、C o l 1 6 A 1、アンフィレグリン (A R E G)、I L - 1 1 から選択される、請求項 26 に記載の方法。
- 【請求項 28】
一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせが、C S F 3 (G C S F) 及 50

びアンフィレグリンから選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

患者における炎症性腸疾患を治療する方法であって、

(a) 患者から得られた生体試料において、IL-1、CASP1 及び p20 から選択される、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること；

(b) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定された発現レベルを、基準レベルと比較すること；及び

(c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを上回る場合に、抗 IL-1 抗体、抗 IL-18 抗体又は多重特異性抗 IL-1 / 抗 IL-18 抗体を患者に投与することを含む方法。

10

【請求項 30】

患者における炎症性腸疾患を治療する方法であって、

(a) 対象から得られた生体試料において、MMP3、INHBA、COL5A2、CHN1、LMCD1、COL12A1、COL7A1、COL18A1、TMEM158、FAM65C、IGFBP5、THY1、TMEM132A、PXDN、GPR68、TWIST1、COL4A1、SERPINH1、AEBP1、NAB2、TMEM45A、TMEM121、VIM、NOTCH4、AEBP1、IL1R1 及び TIMP2 から選択される、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること；

(b) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定された発現レベルを、基準レベルと比較すること；及び

(c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを上回る場合に、抗 IL-1 抗体、抗 IL-18 抗体又は多重特異性抗 IL-1 / 抗 IL-18 抗体を患者に投与することを含む方法。

20

【請求項 31】

患者における炎症性腸疾患を治療する方法であって、

(a) 患者の腸組織から得られた生体試料において IL18 の発現レベルを測定すること；

(b) (a) で測定された IL18 の発現レベルを基準レベルと比較すること；及び

(c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを上回る場合に、抗 IL-1 抗体、抗 IL-18 抗体又は多重特異性抗 IL-1 / 抗 IL-18 抗体を患者に投与することを含む方法。

30

【請求項 32】

患者における炎症性腸疾患を治療する方法であって、

(a) 対象から得られた血清試料において GCSF の発現レベルを測定すること；

(b) (a) で測定された GCSF の発現レベルを基準レベルと比較すること；及び

(c) (a) で測定された GCSF のレベルが基準レベルを上回る場合に、抗 IL-1 抗体、抗 IL-18 抗体又は多重特異性抗 IL-1 / 抗 IL-18 抗体を患者に投与することを含む方法。

40

【請求項 33】

炎症性腸疾患が、潰瘍性大腸炎又は炎症性クローン病又は線維性クローン病である、請求項 26 から 32 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 34】

50

線維性クローン病が線維狭窄性クローン病である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

発現レベルが P C R 法又はマイクロアレイチップを用いて測定される、請求項 2 6 から 3 0 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

発現レベルがイムノアッセイを用いて測定される、請求項 2 6 から 3 2 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

イムノアッセイが E L I S A アッセイである、請求項 3 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年5月17日出願の米国仮出願第61/824661号の優先権の利益を主張し、該出願はその全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

技術分野

クローン病（線維性又は線維狭窄性（*fibrostenotic*）クローン病を含む）及び潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患を診断するためのバイオマーカー、並びに該バイオマーカーの使用方法が提供される。加えて、潰瘍性大腸炎及びクローン病（線維性又は線維狭窄性クローン病を含む）を含む炎症性腸疾患のような、胃腸炎症性疾患の治療方法も提供される。

20

【背景技術】

【0003】

炎症性腸疾患（IBD）は、胃腸（GI）管の慢性自己免疫性炎症状態であり、臨床的には潰瘍性大腸炎（UC）又はクローン病（CD）の何れかとして表れる。CDは、GI管全体の如何なる部分にも影響を及ぼす可能性のある慢性貫壁性炎症性疾患であり、また、UCは結腸の粘膜炎症である。何れの状態も、日常生活に支障をきたすような頻繁な便通、栄養失調及び脱水症状により臨床的に特徴付けられる。慢性炎症は、狭窄や瘻孔等の合併症とともに、CD患者の亜集団における線維症につながる可能性があり、繰り返し手術が必要な場合がある。UCは、それほど頻繁ではないが、重度の血性下痢や中毒性巨大結腸症を併発することがあり、これもまた手術を要する。両方のIBD状態ともGI管の悪性腫瘍のリスクの増加と関連している。IBDの病因は複雑であり、発病の多くの側面は依然として不明である。

30

【0004】

腸の筋線維芽細胞の活性化は、コラーゲン及び細胞外マトリックスタンパク質の沈着の増加を通して、腸線維症において重要な役割を果たし得る。本プロセスにおける炎症サイトカインの役割は分かっていない。

【0005】

サイトカインのインターロイキン-1（IL-1）とIL-18ファミリーは、起源の機構、受容体構造、及び利用されるシグナル伝達経路により関連付けられる。このようなサイトカインは前駆体分子として合成され、細胞からの遊離中又は遊離前に酵素カスパーゼ-1により切断される。NALP-3インフラマソームは活性カスパーゼ-1を生成するのに極めて重要である（Cassel et al., 2009; Ferrero-Miliani et al., 2007）。IL-1ファミリーは、IL-1 とIL-1 の二つのアゴニスト、特異的阻害因子、IL-1受容体アンタゴニスト（IL-1R）、及び生物学的活性型IL-1Rと不活性I型IL-1Rの二つの受容体を含む（Arend et al., 2008）。IL-1RIとIL-33Rの両方は、同一の相互作用するアクセサリタンパク質（IL-1RAcP）を使用する。IL-1とIL-1Rの間のバランスは、種々の器官において疾患を予防するのに重要であり、IL-1の過剰産生は、多くのヒトの疾患と関連づけられている。IL-1

40

50

8ファミリーもまた、IL-18に液相で結合するIL-18結合タンパク質(IL-18BP)である特異的阻害因子を含む。IL-18受容体は、IL-1受容体複合体と類似し、単一のリガンド結合鎖及び異なる相互作用をするアクセサリタンパク質を含んでいる。IL-18は、自然免疫応答と獲得免疫応答の間の重要な連結を提供する。

【0006】

インフラマソーム活性化及びIL-1 / IL-18プロセッシング並びに分泌は、疾患の進行に関与し得る。全ゲノム相関解析は、インフラマソームの炎症性腸疾患(IBD)に対する役割を示している。インフラマソーム-化合物NALP-3に遺伝子多型を有する患者は、報告によればクローン病のリスクが増大している(Ferrero-Miliani et al., 2007; Villani et al., 2009)。加えて、カスパーゼ1活性化及びIL-1 / IL-18プロセッシングを制御するオートファジー構成要素Atg16I1及びIRGMにおける遺伝子多型が、報告によればクローン病に関連している(Baldassano et al., 2007; Cadwell et al., 2008; Kuballa et al., 2008; Saitoh et al., 2008)。独立の研究により、IBDを有する患者のIL-1及びIL-18の血清レベルの増加が報告されている(Ludwiczek et al., 2005; Ludwiczek et al., 2004; Monteleone et al., 1999)。ヒトにおける試験は、前臨床試験により更に裏付けられている。IL-18又はIL-1の遮断は、報告によれば、この疾患の前臨床モデルでの臨床スコアの改善をもたらす(Ten Hove et al., 2001)。

10

【0007】

中程度から重度のIBDの治療は、治療医に重大な課題を提起する。なぜなら、副腎皮質ステロイド及び免疫調節療法(例えば、アザチオプリン、6メルカプトプリン及びメトトレキサート)による一般的な療法は副作用や不耐性を伴い、維持療法(ステロイド)におけるメリットが未だ証明されていないからである。腫瘍壊死因子アルファ(TNF-)を標的にするモノクローナル抗体、例えば、インフリキシマブ(キメラ抗体)及びアダリマブ(完全ヒト抗体)が、CDの管理に現在使用されている。インフリキシマブは効力が示され、UCへの使用が承認されている。

20

しかしながら、CD患者の約10% - 20%は抗TNF療法に対する一次非応答者であり、CD患者の更に20% - 30%は時間と共に応答を失う(Schnitzler et al., Gut 58:492-00 (2009))。抗TNFに伴う他の有害事象(AE)は、細菌感染症(結核、また、ごく稀にリンパ腫や脱髄など)の割合の増加を含む(Chang et al., Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatology 3:220 (2006); Hoentjen et al., World J. Gastroenterol. 15(17):2067 (2009))。現在利用可能な治療は、慢性疾患を伴うIBD患者の20% - 30%超において持続的寛解を達成していない(Hanauer et al., Lancet 359:1541-49 (2002); Sandborn et al., N Engl J Med 353:1912-25 (2005))。加えて、ほとんどの患者は、真の疾患緩和と相関する臨床転帰である持続的ステロイドフリー寛解及び粘膜治癒を達成しない。したがって、抗TNF治療剤に全く応答しないか又は時間と共に応答を失う患者を含む患者の大部分において、持続的寛解、特にステロイドフリー寛解、及び長期合併症の防止を伴う改善された安全性プロファイルを有する慢性使用に最適なIBDにおけるより標的化された療法を開発する必要性がある。

30

【0008】

治療前に患者が特定の治療剤又は治療剤のクラスに対して応答するかどうかは、たいてい不明である。したがって、IBD患者全般、特にCD患者及びUC患者が治療を求めるとき、個々の患者に有効な治療剤を探すのにかなりの試行錯誤を伴う。このような試行錯誤は、たいてい、かなりのリスクを伴い、最も有効な治療を求める患者を不安にさせる。それ故、どの患者がどの治療に応答するのかを決定し、その決定をIBD患者のためのより効果的な治療レジメンに組み入れるためのより効果的な手段が必要である。

40

【0009】

よって、例えば、多重特異性抗IL-1 / 抗IL-18抗体又は抗IL-1抗体と抗IL-18抗体の組合せなど、IL-1及び/又はIL-18を標的にする治療を含む、種々のIBD治療剤に応答する可能性が最も高い患者を客観的に同定するために用いら

50

れる、更なる診断的バイオマーカー及び方法（予測診断バイオマーカー法を含む）を有することは非常に有利である。したがって、潰瘍性大腸炎、クローン病、及び他の炎症性腸疾患に関連し、治療応答を予測する新たなバイオマーカーを同定するための継続的な必要性が存在する。加えて、そのような関連に関する統計的及び生物学的に有意で再現可能な情報は、例えば、臨床試験において、そのような特定のUC又はCD患者の亜集団のどこで治療剤が治療上有益であるのか、又は有益であることが示されているのかといった、特定の治療剤を用いた治療から有意に利益を得ることが期待される特定のUC又はCD患者の亜集団を識別するための取り組みにおける不可欠な要素として利用され得る。

【0010】

ここに記載される発明は上記の特定の必要性を満たし、他のメリットも提供する。

10

【0011】

特許出願及び刊行物を含む本明細書中で引用されるすべての文献は、あらゆる目的のためにその全文が参照により援用される。

【発明の概要】

【0012】

本発明は、少なくとも一部は、IBDの対象の腸組織内で、場合によっては血清中で、非IBDの対象と比較して差次的に発現される特定の遺伝子の同定に基づく。更に、本発明は、少なくとも一部は、例えばクローン病の対象の線維化腸組織内で、場合によっては血清中で、非IBDの対象又は非線維性/線維狭窄性IBDの対象と比較して差次的に発現される特定の遺伝子の同定に基づく。

20

【0013】

したがって、一態様では、炎症性腸疾患を診断又は診断支援する方法が提供される。特定の実施態様では、該方法は、(a)対象から得られた生体試料中の一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの遺伝子によってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現量を測定すること、及び(b)一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの(a)で測定された発現レベルを基準レベルと比較することを含み、ここで、基準レベルを超える一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせのレベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせのレベルは、対象が炎症性腸疾患を有することを示す。特定の実施態様では、該方法は、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの(a)で測定されたレベルが基準レベルを超える場合に、炎症性腸疾患の診断を提供することを更に含む。特定の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、CSF3(GCSF)、IL-24、SERPINB3、SERPINB4、AMIGO2、SERPINB7、ABAT、PF4、STEAP2、ELN、CCL4、VEGFA、DACT1、KCNMB4、PDLIM4、TGFB1、KCNE1L、HIF1A、SLC25A45、OSMR、P4HA2、ELF3、TGIF1、TMEM158、COL7A1、COL16A1、アンフィレグリン(AREG)及びIL-11から選択される。特定の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、CSF3(GCSF)、TMEM158、COL7A1、COL16A1、アンフィレグリン(AREG)、IL-11から選択される。特定の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、CSF3(GCSF)及びアンフィレグリンから選択される。特定の実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎又はクローン病である。

30

40

【0014】

炎症性腸疾患の診断又は診断支援の幾つかの実施態様では、測定された発現レベルの一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコー

50

ドされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、IL-1、CASP1及びp20から選択される。特定の実施態様では、IL-1、CASP1及びp20のうちの一又はそれらの組み合わせの基準レベルを超える発現レベルは、対象が炎症性腸疾患を有することを示す。特定の実施態様では、該方法は、IL-1、CASP1及びp20のうちの一又はそれらの組み合わせのレベルが基準レベルを超える場合に炎症性腸疾患の診断を提供することを更に含む。特定の実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎又はクローン病である。

【0015】

別の態様では、線維性クローン病又は線維狭窄性クローン病を診断又は診断支援する方法が提供される。特定の実施態様では、該方法は、(a)対象から得られた生体試料中の一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること、及び(b)一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの(a)で測定された発現レベルを基準レベルと比較することを含み、ここで、基準レベルを超える一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせのレベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせのレベルは、対象が炎症性腸疾患を有することを示す。特定の実施態様では、該方法は、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの(a)で測定されたレベルが基準レベルを超える場合に炎症性腸疾患の診断を提供することを更に含む。特定の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、COL7A1、COL16A1、アンフィレグリン、IL-11、AEBP1及びIL1R1から選択される。特定の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、MMP3、INHBA、COL5A2、CHN1、LMCD1、COL12A1、COL7A1、COL18A1、TMEM158、FAM65C、IGFBP5、THY1、TMEM132A、PXDN、GPR68、TWIST1、COL4A1、SERPINH1、AEBP1、NAB2、TMEM45A、TMEM121、VIM、NOTCH4及びTIMP2から選択される。特定の実施態様では、基準レベルは、非線維化組織において、同じ遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは同じタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現レベルを測定することにより得られる。

【0016】

特定の実施態様では、生体試料は腸組織である。特定の上記の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現はPCR法又はマイクロアレイチップを用いて測定される。特定の上記の実施態様では、一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは免疫アッセイ又は免疫組織化学アッセイを用いて測定される。幾つかの実施態様では、免疫アッセイはELISAアッセイである。特定の上記の実施態様では、基準レベルは、炎症性腸疾患を有さない対象から得られた生体試料において、同じ遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは同じタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現レベルを測定することにより得られる。

【0017】

更に別の態様では、対象のクローン病のサブタイプを診断又は診断支援する方法が提供される。特定の実施態様では、該方法は、対象の腸組織から得られた生体試料においてIL18の発現レベルを測定すること、及び(b)(a)で測定されたIL18の発現レベルを基準レベルと比較することを含み、ここで、基準レベルを超えるIL18のレベルは対象がクローン病のサブタイプを有することを示し、この場合サブタイプとは線維性クローン病又は線維狭窄性クローン病である。特定の実施態様では、該方法は、(a)で測定されたIL18のレベルが基準レベルを超える場合に線維性クローン病又は線維狭窄性クローン病の診断を提供することを更に含む。特定の実施態様では、基準レベルは、炎症性腸疾患を有さない対象の腸組織から得られた生体試料においてIL18の発現レベルを測

10

20

30

40

50

定することにより得られる。特定の実施態様では、基準レベルは、炎症性クローン病を有する対象の腸組織から得られた生体試料においてIL18の発現レベルを測定することにより得られる。特定の実施態様では、基準レベルは、潰瘍性大腸炎を有する対象の腸組織から得られた生体試料においてIL18の発現レベルを測定することにより得られる。特定の実施態様では、発現レベルは免疫アッセイを用いて測定される。特定の実施態様では、免疫アッセイはELISAアッセイである。

【0018】

別の態様では、対象の炎症性腸疾患を診断又は診断支援する追加的方法が更に提供される。特定の実施態様では、該方法は、(a)対象から得られた血清試料中のGCSFの発現レベルを測定すること、及び(b)(a)で測定されたGCSFの発現レベルを基準レベルと比較することを含み、ここで、基準レベルを超える対象の血清試料中のGCSFのレベルは、対象が炎症性腸疾患を有することを示す。特定の実施態様では、該方法は、(a)で測定されたGCSFのレベルが基準レベルを超える場合に炎症性腸疾患の診断を提供することを更に含む。特定の実施態様では、炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎又は炎症性クローン病、又は線維性クローン病又は線維狭窄性クローン病である。特定の実施態様では、GCSFの発現レベルは免疫アッセイを用いて測定される。特定の実施態様では、免疫アッセイはELISAアッセイである。特定の実施態様では、基準レベルは、炎症性腸疾患を有さない対象から得られた血清試料中のGCSFの発現レベルを測定することにより得られる。

【0019】

一態様では、患者の炎症性腸疾患を治療する方法が提供される。特定の実施態様では、該方法は、(a)患者から得られた生体試料において、CSF3(GCSF)、IL-24、SERPINB3、SERPINB4、AMIGO2、SERPINB7、ABAT、PF4、STEAP2、ELN、CCL4、VEGFA、DACT1、KCNMB4、PDLIM4、TGFB1、KCNE1L、HIF1A、SLC25A45、OSMR、P4HA2、ELF3、TGIF1、TMEM158、COL7A1、COL16A1、アンフィレグリン(AREG)及びIL-11から選択される、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせの発現レベル、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの発現を測定すること、(b)一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの(a)で測定された発現レベルを基準レベルと比較すること、及び(c)一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの(a)で測定されたレベルが基準レベルを超える場合に、抗IL-1抗体、抗IL-18抗体又は多重特異性抗IL-1/抗IL-18抗体を患者へ投与することを含む。特定の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、CSF3(GCSF)、TMEM158、COL7A1、COL16A1、アンフィレグリン(AREG)、IL-11から選択される。特定の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、CSF3(GCSF)及びアンフィレグリンから選択される。特定の実施態様では、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、MMP3、INHBA、COL5A2、CHN1、LMCD1、COL12A1、COL7A1、COL18A1、TMEM158、FAM65C、IGFBP5、THY1、TMEM132A、PXDN、GPR68、TWIST1、COL4A1、SERPINH1、AEBP1、NAB2、TMEM45A、TMEM121、VIM、NOTCH4、AEBP1、IL1R1及びTIMP2から選択される。特定の実施態様において、一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ、或いは一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせによってコードされた一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせは、IL-1、CASP1及びp20から選択される。特定の実施態様では、抗IL-1抗体、抗IL-18抗体又は多重特異性抗IL

10

20

30

40

50

- 1 / 抗 I L - 1 8 抗体 が、炎症性腸疾患を有する患者の治療における使用のために提供され、ここで、該患者は本人から得られた血清中の上記バイオマーカーの何れかのレベルが基準レベルを超える場合に治療される。特定の実施態様では、炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎、又は炎症性クローン病、又は線維性クローン病、又は線維狭窄性クローン病である。特定の実施態様では、発現レベルは P C R 法又はマイクロアレイチップを用いて測定される。特定の実施態様では、発現レベルはイムノアッセイ又は E L I S A アッセイを用いて測定される。

【 0 0 2 0 】

別の態様では、患者の炎症性腸疾患を治療する追加的方法が提供される。特定の実施態様において、(a) 患者の腸組織から得られた生体試料において I L 1 8 の発現レベルを測定すること、(b) (a) で測定された I L 1 8 の発現レベルを基準レベルと比較すること、及び (c) 一の遺伝子又は遺伝子の組み合わせ或いは一のタンパク質又はタンパク質の組み合わせの (a) で測定されたレベルが基準レベルを超える場合に、抗 I L - 1 抗体、抗 I L - 1 8 抗体又は多重特異性抗 I L - 1 / 抗 I L - 1 8 抗体を患者へ投与することを含む。特定の実施態様において、抗 I L - 1 抗体、抗 I L - 1 8 抗体又は多重特異性抗 I L - 1 / 抗 I L - 1 8 抗体は、炎症性腸疾患を有する患者の治療における使用のために提供され、ここで、該患者は、本人の腸組織標本中の I L 1 8 のレベルが基準レベルを超える場合に治療される。特定の実施態様では、炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎、又は炎症性クローン病、又は線維性クローン病、又は線維狭窄性クローン病である。特定の実施態様では、発現レベルは P C R 法又はマイクロアレイチップを用いて測定される。

10

20

【 0 0 2 1 】

また更に別の態様では、患者の炎症性腸疾患を治療する追加的方法が提供される。特定の実施態様において、(a) 対象から得られた血清試料において G C S F の発現レベルを測定すること、(b) (a) で測定された G C S F の発現レベルを基準レベルと比較すること、及び (c) (a) で測定された G C S F のレベルが基準レベルを超える場合に、抗 I L - 1 抗体、抗 I L - 1 8 抗体又は多重特異性抗 I L - 1 / 抗 I L - 1 8 抗体を患者へ投与することを含む。特定の実施態様において、抗 I L - 1 抗体、抗 I L - 1 8 抗体又は多重特異性抗 I L - 1 / 抗 I L - 1 8 抗体は、炎症性腸疾患を有する患者の治療における使用のために提供され、ここで、該患者は、本人の血清試料中の G C S F のレベルが基準レベルを超える場合に治療される。特定の実施態様では、炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎、又は炎症性クローン病、又は線維性クローン病、又は線維狭窄性クローン病である。特定の実施態様では、発現レベルはイムノアッセイ又は E L I S A アッセイを用いて測定される。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 2 】

【 図 1 A - 1 C 】 実施例 1 に記載の I B D 患者又は非 I B D 患者から得られた切除組織中の I L - 1 のレベルの増加を示す。(図 1 A) C D 患者、U C 患者及び非 I B D 患者間の I L - 1 m R N A レベルの比較、疾病状態を横軸に、相対的 m R N A 発現レベルを縦軸に示す；(図 1 B) 線維性又は炎症性疾患のために腸切除を受けた C D 患者、又は非 I B D 患者(横軸に示す) 間の I L - 1 m R N A レベルの比較；相対的 m R N A 発現レベルを縦軸に示す。すべての m R N A レベルはハウスキーピング遺伝子である G A P D H のレベルに対して正規化されている。(図 1 C) I L - 1 タンパク質の免疫組織化学染色；上の枠は、周辺組織よりも広い面積の染色を表す、低倍率での C D 患者の切除組織の切片を示す；下の枠は、高倍率による矢印で表した同一切片を示す。

40

【 図 2 】 実施例 2 に記載の非 I B D、U C 又は C D 生検組織のイムノプロット分析を示す。

【 図 3 A - 3 F 】 実施例 1 に記載のように q R T - P C R により決定され、続いて培地、I L - 1 又は T N F で刺激した三種の一次上皮筋線維芽細胞株中の m R N A レベルを示す。各ケースにおいて、得られたデータは、G A P D H に対して正規化されている。

50

細胞は、6時間刺激された図3Eを除いて、24時間刺激された。(図3A) GCSF ; (図3B) TME M158 ; (図3C) Col7A1 ; (図3D) Col16A1 ; (図3E) アンフィレグリン (AREG) ; (図3F) IL11。

【図4A - 4B】実施例1に記載のように、培地、IL-1 又はTNF で24時間処理した三種の一次上皮筋線維芽細胞株の処理に続く、細胞上清ELISAの(図4A) GCSF及び(図4B) アンフィレグリンの結果を示す。

【図5A - 5B】(図5A)は、炎症性CD (iCD)、線維性/線維狭窄性CD (fCD)、UC、結腸がん、憩室炎の患者又は健常なコントロールにおける血清GCSFレベルを示す; LOD = 検出下限値、及び(図5B)は、実施例1に記載の結腸ライセート中のIL-1 レベルと血清GCSF中のIL-1 レベルとの相関関係を示す。

【図6A - 6F】実施例1に記載のRNA単離、H&E染色(炎症スコアをもたらした)及びIHCによるSMA染色に対応したCD組織切片における、表示のコラーゲン関連遺伝子及び線維性関連遺伝子についてのqRT-PCRにより決定されるRNA発現レベルを示す。切片はSMAについて病理学者によりスコア化された; SMA + 試料は線維症のエビデンスを有すると考えられる。(図6A) コラーゲンサブタイプ 7A1 ; (図6B) コラーゲンサブタイプ 16A1 ; (図6C) アンフィレグリン ; (図6D) IL-1 (図6E) AEBP1 ; (図6F) IL1R1。

【図7A - 7F】実施例2に記載の対応する患者試料由来の腸組織ライセート及び血清中の、IL18及びIL18BPタンパク質レベルを示す。(図7A) 腸組織ライセート IL18 ; (図7B) 血清 IL18 ; (図7C) 腸組織ライセート IL18BP ; (図7D) 血清 IL18BP ; (図7E) 腸組織ライセート IL18 : IL18BPの比率 ; (図7F) 炎症性CD (点状の円) 及び線維性CD (輪郭が点線の白い円) についての、腸組織ライセート IL18 vs 血清 IL18BPの比較。

【発明を実施するための形態】

【0023】

特に定義しない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、一般的に、本発明が属する技術分野の当業者によって理解されるのと同じ意味を有する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), 及びMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)は、本願で使用される用語の多くに対する一般的な指針を当業者に提供する。

【0024】

特定の定義

本明細書の説明のために、以下の定義を適用し、適切な場合はいつでも、単数形で用いられる用語は複数形を含み、その逆の場合も同じである。以下に記載のいかなる定義も、参照により本明細書に援用される任意の文書と矛盾する場合には、以下に記載する定義が支配する。

【0025】

本明細書において使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が明らかに他を指さない限り複数形を含む。したがって、例えば、「タンパク質」への言及は、複数のタンパク質を含み、「細胞」への言及は、細胞の混合物などを含む。

【0026】

本明細書中及び添付の特許請求の範囲に提供される範囲は、端点と端点間のすべての点の両方を含む。したがって、例えば、2.0から3.0の範囲は2.0、3.0及び2.0と3.0の間のすべての点を含む。

【0027】

「治療 (treatment)」、「治療すること (treating)」及びその文法上の変形は、治療されている個体又は細胞の自然の経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理経過中に実施され得る。治療の望ましい効果は、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的又は間接的な病理学的帰結

10

20

30

40

50

の縮小、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を含む。

【0028】

「治療レジメン」とは、投与量、投与頻度、又は治療の期間、第二の薬の追加の有無の組み合わせを指す。

【0029】

「効果的な治療レジメン」とは、治療を受ける患者に有益な応答を与える治療レジメンを指す。

【0030】

「患者の応答」又は「患者の応答性」は、患者の利益を示す評価項目を使用して評価され得、限定されないが、以下のものを含む：(1) 疾患進行の減速及び完全停止を含む、疾患進行のある程度の阻害；(2) 疾患エピソード及び/又は症状の数の減少；(3) 病変サイズの縮小；(4) 疾患細胞の近隣の末梢器官及び/又は組織への浸潤の阻害(すなわち、低減、減速又は完全停止)；(5) 疾患拡大の阻害(すなわち、低減、減速又は完全停止)；(6) 自己免疫応答の低下、これにより必須ではないが病変の退縮や消失をもたらし得る；(7) 疾患関連の一又は複数の症状のある程度の軽減；(8) 治療後の無増悪状態の延長化；及び/又は(9) 治療後の所定の時点での死亡率低下。用語「応答性」とは、完全寛解(CR)と部分寛解(PR)を含む測定可能な応答を指す。

10

【0031】

本明細書で使用される場合、「完全奏功」又は「CR」は、治療への反応として炎症のすべての徴候の消失又は寛解を指す。これは、必ずしも疾患が治癒されたことを意味するわけではない。

20

【0032】

「部分寛解」又は「PR」は、治療への反応として炎症の重症度の少なくとも50%低下を指す。

【0033】

治療剤を用いた治療に対する患者の「有益な応答」及び類似の表現は、該治療剤を用いた治療により又は治療の結果、胃腸炎症性疾患のリスクがあるか又はそれに罹患している患者にもたらされる臨床的又は治療上の利益を指す。このような利益は、細胞性応答又は生物学的応答、完全奏功、部分奏功、安定した疾患(進行又は再発なし)、又は該治療剤を用いた治療により若しくは治療の結果、患者の後に再発した応答を含む。

30

【0034】

本明細書で使用される場合、「非応答」又は「応答の欠如」又は類似の表現は、治療剤を用いた治療に対する完全奏功、部分奏功又は有益な応答がないことを意味する。

【0035】

治療の過程で時間と共に患者の応答性が低下しない場合、「治療は治療に対する応答性を維持している」。

【0036】

本明細書で使用される用語「試料」又は「試験試料」は、例えば、物理的、生化学的、化学的及び/又は生理学的特性に基づいて特徴付けられる及び/又は同定される細胞実体及び/又は他の分子実体を含有する、目的の対象から得られるか又は由来する組成物を指す。一実施態様では、この定義は、血液及び他の生物学的起源の液体試料、生検標本又は組織培養物等の組織標本、或いはそれに由来する細胞を包含する。組織標本の原料は、新鮮凍結及び/又は保存臓器又は組織試標本又は生検又は吸引液由来の固形組織；血液又はあらゆる血液成分；体液；対象の妊娠期又は発生期の任意の時点からの細胞又は血漿であってよい。用語「試料」又は「試験試料」は、それらの調達後に何らかの方法で、例えば、試薬での処理、可溶化、又はタンパク質若しくはポリヌクレオチド等の特定の構成成分の濃縮、又は切片作成のための半固体又は固体マトリックス中への包埋によって、操作された生体試料を含む。本明細書の目的のために、組織標本の「切片」は、組織標本の単一の部分又は片、例えば、組織標本から切り出した組織又は細胞の薄片を意味する。試料は

40

50

、限定されないが、全血、血液由来の細胞、血清、血漿、リンパ液、滑液、細胞抽出物、及びこれらの組み合わせを含む。一実施態様において、試料は臨床試料である。別の実施態様では、試料は診断検査で用いられる。

【0037】

「基準試料」は、本明細書で用いられる場合、比較目的のために用いられる、任意の試料、標準、又はレベルを指す。一実施態様では、基準試料は、同じ対象又は患者の身体の健全な及び／又は非疾患部分（例えば、組織又は細胞）から得られる。別の実施態様では、基準試料は同じ対象又は患者の身体の未処置組織及び／又は細胞から得られる。更に別の実施態様では、基準試料は、対象又は患者ではない個体の身体の健全な及び／又は非疾患部分（例えば、組織又は細胞）から得られる。更に別の実施態様では、基準試料は対象又は患者ではない個体の身体の未処置組織及び／又は細胞から得られる。

10

【0038】

「胃腸炎症性疾患」とは、粘膜に炎症及び／又は潰瘍を引き起こす慢性疾患の群である。こうした疾患は、例えば、炎症性腸疾患（例：クローン病、潰瘍性大腸炎、不確定性大腸炎）、粘膜炎（例：口腔粘膜炎、胃腸粘膜炎、鼻粘膜炎及び直腸炎）、壊死性腸炎及び食道炎を含む。

【0039】

「炎症性腸疾患」又は「IBD」は、本明細書では互換的に使用され、炎症及び／又は潰瘍を引き起こす腸の疾患を指し、クローン病及び潰瘍性大腸炎を含むがこれらに限定されない。

20

【0040】

「クローン病（CD）」及び「潰瘍性大腸炎（UC）」は、原因不明の慢性炎症性腸疾患である。クローン病は、潰瘍性大腸炎と違い、腸の如何なる部分にも影響し得る。クローン病の最も顕著な特徴は、腸壁の粒状で赤紫色の浮腫性肥厚である。炎症の進行に伴い、こうした肉芽腫は、多くの場合、外接境界を失い、周囲の組織と一体化する。下痢や腸の閉塞が主な臨床的特徴である。潰瘍性大腸炎と同様に、クローン病の経過は持続性又は再発性であり得、軽度又は重度であり得るが、潰瘍性大腸炎とは異なり、クローン病は腸の患部の切除によって治癒可能ではない。クローン病患者の大半は、ある時点で手術を必要とするが、その後の再発は一般的であり、継続的な治療が通常である。

【0041】

クローン病は、一般的には、回結腸、小腸、結腸、肛門直腸の領域に現れるが、口から肛門までの消化管の任意の部分に影響し得る。病理組織学的に、この疾患は非連続性の肉芽腫症、陰窩膿瘍、裂溝及びアフタ性潰瘍により顕在化する。炎症性浸潤物は、リンパ球（T細胞とB細胞の両方）、形質細胞、マクロファージ及び好中球からなる混合物である。IgM分泌形質細胞及びIgG分泌形質細胞、マクロファージ並びに好中球における不均衡な増加がある。

30

【0042】

抗炎症薬のスルファサラジン及び5-アミノサリチル酸（5-ASA）は、穏やかに活性な結腸クローン病を治療するために使用され、一般に、疾患の寛解を維持するために処方される。メトロニダゾール及びシプロフロキサシンはスルファサラジンと有効性が類似しており、特に肛門周囲の疾患を治療するために処方される。より重症なケースでは、副腎皮質ステロイドは、激しい増悪を治療するために処方され、時には寛解を維持し得る。また、アザチオプリン及び6-メルカプトプリンも、副腎皮質ステロイドの慢性投与を必要とする患者において用いられている。これらの薬物は、長期の予防において役割を果たし得ることが示唆されている。残念ながら、一部の患者において、作用の発現までに非常に長い遅延（最大6ヶ月）が生じ得る。また、止瀉薬も一部の患者において症状緩和を提供し得る。栄養療法又は成分栄養法は、患者の栄養状態を改善し、急性疾患の症状改善を誘導するものの、持続的な臨床的寛解は誘導しない。抗生物質は、二次小腸細菌の異常増殖の治療及び化膿性合併症の治療に使用される。

40

【0043】

50

「潰瘍性大腸炎（UC）」は大腸に影響を与える。疾患の経過は、持続性又は再発性であり得、軽度又は重度であり得る。最初期の病変は、リーベルキューンの陰窩の基部に膿瘍形成を伴う炎症性浸潤である。こうした膨張性且つ破裂性の陰窩の癒着は、覆っている粘膜をその血液供給から切り離す傾向にあり、潰瘍形成をもたらす。疾患の症状は痙攣、下腹部痛、直腸出血、並びに主として血液、膿及びわずかな糞便粒子を伴う粘液からなる、頻発する緩い排出物を含む。急性、重度又は慢性、非寛解性の潰瘍性大腸炎では結腸全摘除術が必要となる場合がある。

【0044】

UCの臨床的特徴は極めて変動的であり、発症は潜行性又は突発性であってもよく、下痢、しづり腹及び再発性直腸出血を含み得る。全結腸に急激な発症があれば、中毒性巨大結腸、致命的な緊急事態が起こり得る。腸外の徴候は関節炎、壊疽性膿皮症、ブドウ膜炎及び結節性紅斑を含む。

10

【0045】

UCの治療は軽度の症例ではスルファラジン及び関連のサリシレート含有薬、また、重度の症例では副腎皮質ステロイド薬を含む。サリシレート又は副腎皮質ステロイドの局所投与は場合によっては、特に疾患が遠位の腸に限局されている場合は有効であり、全身使用と比較して低減された副作用を伴う。鉄及び抗下痢剤の投与のような補助的処置が場合により適応される。また、アザチオプリン、6-メルカプトプリン及びメトトレキサートは場合により、難治性の副腎皮質ステロイド依存症例における使用のために処方される場合がある。

20

【0046】

「有効量」とは、所望の治療的又は予防的結果を達成するのに必要な用量及び期間での有効量を指す。

【0047】

本明細書で使用される場合、用語「患者」は治療が望まれる任意の単独の対象を指す。特定の実施態様では、本明細書中の患者はヒトである。

【0048】

本明細書中の「対象」は典型的にはヒトである。特定の実施態様では、対象は非ヒト哺乳動物である。例示的非ヒト哺乳動物は、実験動物、家畜、ペット、競技用動物及び畜産動物、例えば、マウス、ネコ、イヌ、ウマ及びウシを含む。一般的に、対象は治療、例えば、胃腸炎症性疾患の治療の対象である。

30

【0049】

用語「抗体」及び「イムノグロブリン」は互換性をもって広義の意味で用いられ、モノクローナル抗体（例えば、完全長抗体又はインタクトなモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、単価抗体、多価抗体、多重特異性抗体（例えば、所望の生物活性を示す限り、二重特異性、三重特異性抗体等）を含み、また（本明細書で更に詳述される）特定の抗体断片も含み得る。抗体はヒト、ヒト化及び/又は親和性成熟したものであり得る。

【0050】

「抗体断片」はインタクトな抗体の一部のみを含み、該一部は、特定の実施態様において、インタクトな抗体に存在する場合に、その一部に通常関連している機能の少なくとも一部、及び典型的にはその殆ど又はすべてを保持している。一実施態様では、抗体断片はインタクトな抗体の抗原結合部位を含み、よって抗原に結合する能力を保持している。別の実施態様では、抗体断片、例えばFc領域を含むものは、インタクトな抗体に存在する場合に、Fc領域に通常関連している少なくとも一の生物学的機能、例えばFcRn結合、抗体半減期調節、ADCC機能及び補体結合等を保持している。一実施態様では、抗体断片は、インタクトな抗体と実質的に同様のインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるFc配列に結合した抗原結合アームを含み得る。

40

【0051】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団か

50

ら得られる抗体を意味し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る自然に生じる可能性がある変異体を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原に対するものである。更に、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。

【 0 0 5 2 】

本明細書においてモノクローナル抗体は、重鎖及びノ又は軽鎖の一部が特定の種に由来するか又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一若しくは相同であるが、残りの鎖は別の種に由来するか又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一若しくは相同である、「キメラ」抗体、及び、所望の生物活性を呈する限り、該抗体の断片を特に含む（例えば、米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号；及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。

10

【 0 0 5 3 】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来の残基によって置換された、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体はレシピエント抗体にも、又はドナー抗体にも見出されない残基を含み得る。こうした修飾は、抗体性能を更に改良するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインのすべてを実質的に含み、可変ドメイン中の超可変ループのすべて又は実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRのすべて又は実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである。また、ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリンの定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。更なる詳細については、例えばJones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988);及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照のこと。またこれらの文献中で引用されている次の概説及び参考文献も参照のこと：Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

20

30

【 0 0 5 4 】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含む抗体、及びノ又は本明細書に開示のヒト抗体を作製するための任意の技術を使用して製造された抗体である。そのような技術は、ファージディスプレイ等のヒト由来のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすること（例えば、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)及びHoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)参照）；ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株を使用すること（例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Broudeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 55-93 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及び内因性免疫グロブリン産生の非存在下で、ヒト抗体の全レパートリーを産生可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）においてモノクローナル抗体を生成すること（例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggemann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)参照）を含む。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト動物由来の抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除く。

40

【 0 0 5 5 】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離され、及びノ又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害

50

する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質を含み得る。特定の実施態様において、抗体は(1)ローリー法により測定して、抗体の95重量%を超えるまで、また通常99重量%を超えるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用により、N末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度にまで、或いは(3)クーマシーブルー又は銀染色を使用した還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性にまで精製される。単離された抗体は組換え細胞内の*in situ*の抗体を含むが、これは抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製される。

【0056】

本明細書で使用される場合、用語「超可変領域」、「HVR」又は「HV」は、配列が超可変であり、及び/又は構造的に定義されたループを形成する、抗体可変ドメインの領域を指す。通常、抗体は、VHに3つ(H1、H2、H3)、及びVLに3つ(L1、L2、L3)の計6つの超可変領域を含む。多数の超可変領域の描写が使用され、本明細書に包含される。Kabata相補性決定領域(CDR)は配列可変性に基づいており、最も一般的に使用される(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。Chothiaは、代わりに、構造ループの位置を指す(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM超可変領域は、Kabata CDRとChothia構造的ループの折衷であり、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」超可変領域は、利用可能な複合体結晶構造の解析に基づく。これらの各HVRからの残基を以下に記す。

【0057】

ループ	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabata 番号付け)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 番号付け)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58

【0058】

超可変領域は、次の「拡大超変領域」を含み得る：VLの24~36又は24~34(L1)、46~56又は49~56又は50~56又は52~56(L2)、及び89~97(L3)、並びにVHの26~35(H1)、50~65又は49~65(H2)及び93~102、94~102、又は95~102(H3)。可変ドメイン残基には、これら各々を定義するために、上掲のKabataらに従って番号を付した。

【0059】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、本明細書で定義している超可変可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0060】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選別は、可変ドメイン配列のサブグループからなされる。通常、Kabataらによると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、VLについて、Kabataらによると、サブグループはサブグループIである。一実施態様では、VHについて、Kabataらによると、サブグループはサブグループIIIである。

【0061】

「親和性成熟」抗体は、その一又は複数のCDRに一又は複数の改変を有する抗体であ

10

20

30

40

50

って、そのような改変を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性が向上している。特定の実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産される。Marksらは、Bio/Technology 10:779-783 (1992)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発が、Barbasら, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schierら, Gene 169:147-155 (1996); Yeltonら, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jacksonら, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995);及びHawkinsら, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)に記載されている。

【0062】

本明細書で用いられる「実質的に類似」又は「実質的に同じ」なる句は、二つの数値の差異に、該値によって測定される生物学的性質上殆ど又は全く生物学的及び/又は統計学的有意差がないと当業者に認められるほど、二つの数値の類似性が十分に高いことを指す。

【0063】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総計の強度を意味する。特に明記しない限り本明細書では、「結合親和性」とは、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の1対1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数(Kd)によって表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当該技術分野で周知の一般的な方法により測定され得る。低親和性抗体は一般的に抗原にゆっくり結合してすぐに解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は一般的に抗原により速く結合し、より長く結合を維持する傾向がある。結合親和性の様々な測定方法が当該技術分野で知られている。

【0064】

抗体又は免疫グロブリンに関連した用語「可変」は、可変ドメインの特定の部分が抗体間で配列が広範囲に異なり、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合及び特異性に使用されているという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメインにわたって均一に分布しているのではない。それは、軽鎖及び重鎖可変ドメイン双方の超可変領域と称される三つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存されている部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ4つのFRを含み、これらは主にBシート立体配置を採り、三つの超可変領域により連結され、これらの超可変領域はBシート構造を連結し場合によってはその構造の一部を形作るループを形成する。各鎖の超可変領域は、FRによって極めて近接した状態に保持され、他の鎖の超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)参照)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、例えば抗体依存性細胞傷害性(ADCC)への抗体の関与等、種々のエフェクター機能を呈する。

【0065】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる二つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理は、二つの抗原結合部位を有し、なお抗原を架橋することができるF(ab')₂断片を生じる。

【0066】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした、一つの重鎖と一つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。各可変ドメインの三つの超可変領域が相互作用しVH-VL二量体の表面に抗原結合部位を既定するのは、この配置においてである。集合的に、六つの超可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的

10

20

30

40

50

な三つの超可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低下するものの、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0067】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加されている点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が少なくとも一の遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0068】

任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる二つの明確に区別される型の一つが割り当てられ得る。

【0069】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体(免疫グロブリン)には異なるクラスが割り当てられる。免疫グロブリンには五つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、これらの幾つかは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IGA1及びIgA2等のサブクラス(アイソタイプ)に更に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれアルファ、デルタ、エプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位は周知であり、その概説は、例えばAbbasら, Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. (W. B. Saunders, Co., 2000)に記載されている。抗体は、抗体と一又は複数の他のタンパク質若しくはペプチドとの共有的又は非共有的結合により形成される大きな融合分子の一部であってもよい。

【0070】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、以下に定義する抗体断片ではなく、その実質的に無傷の形態の抗体を指すために本明細書では互換的に使用される。該用語は特にFc領域を含む重鎖を持つ抗体を指す。

【0071】

本明細書の目的のための「ネイキッド抗体」は、細胞傷害性部分又は放射標識にコンジュゲートされない抗体である。

【0072】

本明細書の用語「Fc領域」は、天然配列Fc領域及び変異形Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化し得るが、通常、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226位又はPro230位のアミノ酸残基から、Fc領域のカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによれば残基447)は、例えば、抗体の産生若しくは精製の間、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え操作することによって取り除かれ得る。したがって、インタクト抗体の組成物は、すべてK447残基が除かれた抗体集団、K447残基が除かれていない抗体集団、及びK447残基を有する抗体と有さない抗体との混合を含む抗体集団を含み得る。

【0073】

特に明記しない限り、本明細書中の免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、出典明示により本明細書に援用されるKabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)によるEUインデックスの番号付けである。「KabatのEUインデックス」はヒトIgG1 EU抗体の残基番号を指す。

【0074】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。例示的「エフェクター機能」は、C1q結合、補体依存性細胞傷害、Fcレセプター結合、抗体依

10

20

30

40

50

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 ; BCR) の下方制御等を含む。そのようなエフェクター機能は、通常、Fc 領域が結合ドメイン (例えば、抗体可変ドメイン) と結合していることが必要であり、例えば本明細書中に開示されるような様々なアッセイを用いて評価され得る。

【0075】

「天然配列の Fc 領域」は、天然に見出される Fc 領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列のヒト Fc 領域は、天然配列のヒト IgG1 Fc 領域 (非 A - 及び A - アロタイプ) ; 天然配列のヒト IgG2 Fc 領域 ; 天然配列のヒト IgG3 Fc 領域 ; 及び天然配列のヒト IgG4 Fc 領域 ; 並びに、これらの自然に生じる変異体を含む。

10

【0076】

「変異体 Fc 領域」は、少なくとも一のアミノ酸修飾のために天然配列の Fc 領域と異なるアミノ酸配列を含む。変異体 Fc 領域は、天然配列の Fc 領域又は親ポリペプチドの Fc 領域と比較して少なくとも一つのアミノ酸置換、例えば、天然配列の Fc 領域又は親ポリペプチドの Fc 領域に、特定の実施態様では約 1 から約 10 個のアミノ酸置換、また、特定の実施態様では約 1 から約 5 個のアミノ酸置換を有する。特定の実施態様では、本明細書中の変異体 Fc 領域は、天然配列の Fc 領域及び / 又は親ポリペプチドの Fc 領域と、少なくとも約 80% の同一性、又はそれらと少なくとも約 90% の同一性、又はそれらと少なくとも約 95% の同一性を有するであろう。

20

【0077】

重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、インタクトな抗体は異なる「クラス」に割り当てられ得る。インタクトな抗体には五つの主要なクラス : IgA、IgD、IgE、IgG 及び IgM があり、これらの幾つかは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IGA 及び IgA2 等の「サブクラス」(アイソタイプ) に更に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 及び μ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び 3 次元構造はよく知られている。

【0078】

「抗体依存性細胞媒介細胞傷害性」及び「ADCC」は、Fc 受容体 (FcR) (例えば、ナチュラルキラー (NK) 細胞、好中球及びマクロファージ) を発現する非特異性細胞傷害性細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介反応を指す。ADCC を媒介する第一の細胞である NK 細胞は FcRIII のみを発現するのに対し、単球は FcRI、FcRII 及び FcRIII を発現する。造血細胞上の FcR 発現は Raveitch 及び Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991) の 464 ページの表 3 に要約されている。対象とする分子の ADCC 活性を評価するために、例えば米国特許第 5500362 号又は同第 5821337 号に記載されているようなインビトロ ADCC アッセイが実施され得る。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞 (PBMC) 及びナチュラルキラー (NK) 細胞を含む。或いは又は加えて、対象とする分子の ADCC 活性は、例えば Clynes ら, PNAS (USA) 95:652-656 (1998) に開示されているような動物モデルでインビボの評価がされ得る。

30

40

【0079】

「ヒトエフェクター細胞」は、一又は複数の FcR を発現する白血球であり、エフェクター機能を果たす。特定の実施態様では、該細胞は、少なくとも FcRIII を発現し、ADCC エフェクター機能を果たす。ADCC を媒介するヒト白血球の例は、末梢血単核細胞 (PBMC)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、単球、細胞傷害性 T 細胞及び好中球を含む。エフェクター細胞は、その天然の供給源、例えば本明細書に記載の血液又は PBMC から単離されてもよい。

【0080】

「Fc 受容体」又は「FcR」なる用語は、抗体の Fc 領域に結合する受容体を記述するために使用される。特定の実施態様では、FcR は天然配列ヒト FcR である。更に、

50

FcRは、IgG抗体に結合し(ガンマ受容体)、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスを受容体を含み、これらの受容体の対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcRII受容体は、FcRIIA(「活性化受容体」)及びFcRIIB(「阻害受容体」)を含み、それらは、主としてそれらの細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を含有する。阻害受容体FcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシン-ベース阻害モチーフ(ITIM)を含有する(Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)の概説Mを参照されたい)。FcRはRavetch及びKinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capelら, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及びde Hasら, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)で概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRも、本明細書における用語「FcR」により包含される。また、この用語は、胎児への母性IgGの移動の原因であり(Guyerら, *J. Immunol.* 117:587 (1976)及びKimら, *J. Immunol.* 24:249 (1994))、免疫グロブリンのホメオスタシスを調節する、新生児受容体であるFcRnも含む。新生児Fc受容体(FcRn)への結合性が向上し、半減期が延長されている抗体は、国際公開第00/42072号(Presta, L.)及び米国特許出願公開第2005/0014934号(Hintonら)において記述されている。こうした抗体は、FcRnへのFc領域の結合性を向上させる一又は複数の置換を有するFc領域を含む。例えば、Fc領域は、一又は複数の位置238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428又は434(残基のEu番号付け)において置換を有してもよい。特定の実施態様において、向上したFcRn結合性を有するFc領域含有抗体変異体は、そのFc領域の位置307、380及び434(残基のEu番号付け)のうちの一つ、二つ又は三つにおいてアミノ酸置換を含む。

【0081】

「単鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は抗体のVHドメイン及びVLドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、FvポリペプチドはVHドメインとVLドメインの間にポリペプチドリンカーを更に含み、このリンカーはscFvが抗原結合にとって望ましい構造を形成するのを可能にする。scFvの概説については、例えば、Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rose nburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照のこと。HER2抗体scFv断片は、国際公開第93/16185号; 米国特許第5571894号; 及び米国特許第5587458号に記載されている。

【0082】

用語「ダイアボディ」は、抗原結合部位を二つ備える小さな抗体断片を指し、この抗体断片は同じポリペプチド鎖(VH-VL)内で可変軽鎖ドメイン(VL)に連結した可変重鎖ドメイン(VH)を含む。同じ鎖の上の二つのドメインの間で対合させるにはあまりに短いリンカーを用いて、このドメインを他の鎖の相補性ドメインと強制的に対合させ、二つの抗原結合部位をつくる。ダイアボディは、例えば、EP404097号; 国際公開第93/01161号; 及びHudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (11161); 及びHollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

【0083】

「親和性成熟」抗体は、その一又は複数の超可変領域に一又は複数の改変を有する抗体であって、そのような改変を有さない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性が向上している。特定の実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産される。Marksらは、*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)で、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和性成熟を記述している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発が、Barbasら, *Proc Natl. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994)

); Schierら, Gene 169:147-155 (1995); Yeltonら, J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jacksonら, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995);及びHawkinsら, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)に記載されている。

【 0 0 8 4 】

本明細書において、「アミノ酸配列変異体」抗体は、主要種の抗体と異なるアミノ酸配列を有する抗体である。特定の実施態様において、アミノ酸配列変異体は、主要種の抗体と少なくとも約70%の相同性を有し、又は、主要種の抗体と少なくとも約80%、若しくは少なくとも約90%の相同性である。アミノ酸配列変異体は、主要種の抗体のアミノ酸配列内の、又は主要種の抗体のアミノ酸配列に隣接した特定の位置における置換、欠失及び/又は付加を有する。本明細書中のアミノ酸配列変異体の例は、酸性変異体(例:脱アミド化抗体変異体)、塩基性変異体、一つ又は二つの軽鎖上にアミノ末端リーダー伸長(例:VHS-)を有する抗体、一つ又は二つの重鎖上にC末端リジン残基を有する抗体等を含み、また、重鎖及び/又は軽鎖のアミノ酸配列に対する変異体の組合せも含む。本明細書で特に対象となる抗体変異体はその一つ又は二つの軽鎖上にアミノ末端リーダー伸長を含み、場合により主要種抗体と比較したその他のアミノ酸配列及び/又はグリコシル化の相違を更に含む抗体である。

10

【 0 0 8 5 】

本明細書中の「グリコシル化変異体」抗体は、それに付着した一又は複数の糖質部分を有する抗体であり、その部分は、主要種抗体に付着した一又は複数の糖質部分とは異なる。本明細書において、グリコシル化変異体の例は、抗体のFc領域に付着した、G0オリゴ糖構造の代わりにG1又はG2オリゴ糖構造を有する抗体、抗体の一つ又は二つの軽鎖に付着した一又は複数の糖質部分を有する抗体、抗体の一つ又は二つの重鎖に付着する糖質がない抗体及び類似のもの、並びにグリコシル化改変の組み合わせを含む。抗体がFc領域を有する場合、オリゴ糖構造は、抗体の一つ又は二つの重鎖、例えば、残基299において(298、残基のEu番号付け)に結合してもよい。

20

【 0 0 8 6 】

本明細書で使用される場合の用語「細胞傷害性剤」は、細胞の機能を阻害又は阻止し、及び/又は細胞破壊をもたらす物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えばAt211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32及びLuの放射性同位体)、化学療法剤、及び小分子毒素又は細菌、真菌、植物、又は動物起源の酵素的に活性な毒素等の毒素、並びにそれらの断片及び/又は変異体を含むことが意図される。

30

【 0 0 8 7 】

用語「サイトカイン」は、一つの細胞集団により放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエーターとして作用するものの総称である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン;副甲状腺ホルモン;チロキシン;インスリン;プロインスリン;リラクシン;プロリラクシン;卵胞刺激ホルモン(FSH)のような糖タンパク質ホルモン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体ホルモン(LH);肝臓成長因子;線維芽細胞成長因子;プロラクチン;胎盤性ラクトゲン;腫瘍壊死因子及び腫瘍壊死因子;ミューラー管抑制因子;マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド;インヒピン;アクチピン;血管内皮成長因子;インテグリン;トロンボポエチン(TPO);NGFB等の神経成長因子;血小板成長因子;TGF又はTGFのようなトランスフォーミング増殖因子(TGF);インスリン様成長因子I及びII;エリスロポイエチン(EPO);骨誘導因子;インターフェロン、及びのようなインターフェロン;マクロファージCSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF);顆粒球マクロファージCSF(GM-CSF);及び顆粒球CSF(G-CSF);IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-18等のインターロイ

40

50

キン (I L) ; T N F - 又は T N F - のような腫瘍壊死因子 ; 及び L I F 及びキトリリガンド (K L) を含む他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書で使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来又は組換え細胞培養物由来のタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

【 0 0 8 8 】

本明細書で補助療法として用いられる場合の「免疫抑制剤」なる用語は、本明細書中で治療される対象の免疫系を抑制又は遮断するように働く物質を表す。これは、サイトカイン産生を抑制する、自己抗原の発現を下方制御又は抑制する、或いは M H C 抗原を遮断する物質を含む。そのような薬剤の例は、2 - アミノ - 6 - アリール - 5 - 置換ピリミジン (米国特許第 4 6 6 5 0 7 7 号を参照) ; 非ステロイド性抗炎症薬 (N S A I D) ; ガンシクロビル ; タクロリムス ; 糖質ステロイド、例えばコルチゾール又はアルドステロン ; 抗炎症剤、例えばシクロオキシゲナーゼ阻害剤 ; 5 - リボキシゲナーゼ阻害剤 ; 又はロイコトリエン受容体アンタゴニスト ; プリンアンタゴニスト、例えばアザチオプリン又はミコフェノール酸モフェチル (M M F) ; アルキル化剤、例えばシクロホスファミド ; プロモクリプチン ; ダナゾール ; ダブソン ; グルタルアルデヒド (米国特許第 4 1 2 0 6 4 9 号に記載のように、M H C 抗原を遮断する) ; M H C 抗原及び M H C 断片に対する抗イデオタイプ抗体 ; シクロスポリン ; 6メルカプトプリン ; 副腎皮質ステロイド又は糖質副腎皮質ステロイド又は糖質ステロイド類似体等のステロイド、例としてプレドニゾン、メチルプレドニゾン、例えば S O L U - M E D R O L (登録商標) メチルプレドニゾンコハク酸ナトリウム、及びデキサメタゾン ; ジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、例としてメトトレキサート (経口又は皮下) ; クロロキン及びヒドロキシクロロキン等の抗マラリア剤 ; スルファサラジン ; レフルノミド ; サイトカイン又はサイトカイン受容体抗体又はアンタゴニスト、例として抗インターフェロンアルファ、 - ベータ、又は - ガンマ抗体、抗腫瘍壊死因子 (T N F) アルファ抗体 (インフリキシマブ (レミケード (登録商標)) 又はアダリムマブ)、抗 T N F アルファイムノアドヘシン (エタネルセプト)、抗 T N F ベータ抗体、抗インターロイキン 2 (I L - 2) 抗体及び抗 I L - 2 受容体抗体、及び抗インターロイキン 6 (I L - 6) 受容体抗体及びアンタゴニスト ; 抗 C D 1 1 a 及び抗 C D 1 8 抗体を含む抗 L F A - 1 抗体 ; 抗 - L 3 T 4 抗体 ; 異種性抗リンパ球グロブリン ; 全 T 抗体、抗 C D 3 又は抗 C D 4 / C D 4 a 抗体 ; L F A - 3 結合ドメインを含む可溶性ペプチド (1 9 9 0 年 7 月 2 6 日公開の国際公開第 9 0 / 0 8 1 8 7 号) ; ストレプトキナーゼ ; トランスフォーミング成長因子 - (T G F - ベータ) ; ストレプトドルナーゼ (s t r e p t o d o r n a s e) ; 宿主由来の R N A 又は D N A ; F K 5 0 6 ; R S - 6 1 4 4 3 ; クロランブシル ; デオキシスベルグアニン (d e o x y s p e r g u a l i n) ; ラパマイシン ; T 細胞受容体 (C o h e n ら , 米国特許第 5 1 1 4 7 2 1 号) ; T 細胞受容体断片 (O f f n e r ら , S c i e n c e 2 5 1 : 4 3 0 - 4 3 2 (1 9 9 1) ; 国際公開第 9 0 / 1 1 2 9 4 号 ; l a n e w a y , N a t u r e , 3 4 1 : 4 8 2 (1 9 8 9) ; 及び国際公開第 9 1 / 0 1 1 3 3 号) ; B A F F 又は B R 3 抗体又はイムノアドヘシン等の B A F F アンタゴニスト及び z T N F 4 アンタゴニスト (概説については、Mackay and Mackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002) と以下の定義を参照のこと) ; T 細胞ヘルパー信号を阻害する生物学的薬剤、例えば、C D 4 0 - C D 4 0 リガンドに対する阻止抗体等の抗 C D 4 0 受容体又は抗 C D 4 0 リガンド (C D 1 5 4) (例えば、Durie et al., Science, 261: 1328-30 (1993); Mohan et al., J. Immunol., 154: 1470-80 (1995)) 及び CTLA4-Ig Finck et al., Science, 265: 1225-7 (1994)) ; 及び T 1 0 B 9 等の T 細胞受容体抗体 (E P 3 4 0 1 0 9) を含む。

【 0 0 8 9 】

本明細書で使用される用語「改善する」又は「改善」は、異常又は症状を含む、病態、疾患、障害又は表現型の減少、低減又は排除を指す。

【 0 0 9 0 】

疾患又は障害 (例えば炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病) の「症状」とは、対象によって経験され且つ疾患を示す、構造、機能又は感覚における任意の病的現象又は正常からの逸脱である。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 1 】

「治療的有効量」なる表現は、疾患又は障害（例えば炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病）を予防、改善、又は治療するために有効な量を指す。例えば、抗体の「治療的有効量」とは特定の疾患又は障害を予防、改善又は治療するために有効な抗体の量を指す。同様に、抗体と第二の化合物との併用剤の「治療的有効量」とは、併用して特定の疾患又は障害を予防、改善又は治療するために有効な抗体の量と第二の化合物の量を指す。

【 0 0 9 2 】

二種類の化合物の「併用剤」なる用語は、それらが相互に混合して投与される必要があることを意味するものではない。したがって、このような併用剤を用いた治療又はそれらの使用は、化合物の混合又は別々の投与を包含し、同日又は別の日の投与を含む。したがって、「併用」なる用語は二種類以上の化合物が別々に又は相互に混合して治療に使用されることを意味する。例えば、抗体と第二の化合物を対象に併用投与する場合には、抗体と第二の化合物が対象に別々に投与されるか又は混合して投与されるかに関係なく、抗体が対象の体内に存在するときに第二の化合物も対象の体内に存在する。特定の実施態様では、抗体以外の化合物は抗体より先に投与される。特定の実施態様では、抗体以外の化合物は抗体より後に投与される。

10

【 0 0 9 3 】

本明細書における目的のために、「腫瘍壊死因子アルファ（TNF - アルファ）」は、Pennicaら, Nature, 312:721 (1984)又はAggarwalら, JBC, 260:2345 (1985)に記載のアミノ酸配列を含むヒトTNF - アルファ分子を指す。

20

【 0 0 9 4 】

本明細書における「TNF - アルファ阻害剤」は、一般にTNF - アルファに結合してその活性を中和することにより、TNF - アルファの生物学的機能のある程度阻害する薬剤である。本明細書で特に意図されるTNF阻害剤の例は、エタネルセプト（エンブレル（登録商標））、インフリキシマブ（レミケード（登録商標））、アダリムマブ（ヒュミラ（登録商標））、ゴリムマブ（シンボニーTM）、及びセルトリズマブベゴル（シムジア（登録商標））である。

【 0 0 9 5 】

「副腎皮質ステロイド」は、天然に存在する副腎皮質ステロイドの効果を模倣するか又は増大させるステロイドの一般的化学構造を有する合成又は天然の幾つかの物質のいずれかを指す。合成副腎皮質ステロイドの例は、プレドニゾン、プレドニゾロン（メチルプレドニゾロンを含む）、デキサメタゾン、トリアムシノロン及びベタメサゾンを含む。

30

【 0 0 9 6 】

「アンタゴニスト」とは特定のタンパク質の活性（例えばリガンドの場合には一又は複数の受容体とのその結合、又は受容体の場合には一又は複数のリガンドとの結合）を中和、遮断、阻害、抑止、低下又は妨害することが可能な分子である。アンタゴニストは、抗体とその抗原結合断片、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生体有機分子、ペプチド模倣薬、薬物とその代謝産物、転写及び翻訳制御配列等を含む。アンタゴニストは、タンパク質の小分子阻害剤、及び融合タンパク質、タンパク質と特異的に結合し、それによりその標的との結合を隔離する受容体分子及び誘導體、タンパク質のアンタゴニスト変異体、タンパク質に対するアンチセンス分子、RNAアプタマー、並びにタンパク質に対するリボザイムを更に含む。

40

【 0 0 9 7 】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用される場合、長さが少なくとも約7ヌクレオチドであり、約250ヌクレオチド未満である、短い一本鎖ポリヌクレオチドを指す。オリゴヌクレオチドは合成でもよい。用語「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」は相互に排他的ではない。ポリヌクレオチドについての上記の説明は、等しく十分にオリゴヌクレオチドにも適用可能である。

【 0 0 9 8 】

50

用語「プライマー」は、通常、遊離 3' - OH 基を提供することによって核酸にハイブリダイズし、相補的な核酸の重合を可能にすることができる一本鎖ポリヌクレオチドを指す。

【0099】

用語「増幅」は、参照核酸配列又はその補体の一又は複数のコピーを生成するプロセスを指す。増幅は、線形又は指数関数的であってよい（例えば、PCR）。「コピー」は、鋳型配列に対して必ずしも完全な配列相補性又は同一性を意味するものではない。例えば、コピーは、デオキシイノシン等のヌクレオチド類似体、意図的な配列改変（例えば、鋳型とハイブリダイズ可能だが完全に相補的ではない配列を含むプライマーを介して導入される配列変化）及び/又は増幅の間に発生する配列の誤りを含み得る。

10

【0100】

用語「検出」は、直接的及び間接的な検出を含む検出する任意の手段を含む。

【0101】

「発現上昇」又は「上昇レベル」は、例えば自己免疫疾患（IBD等）に罹患していない個体又は個人のようなコントロールと比較した、或いは事前設定された閾値又はカットオフ値と比較した、或いは患者及び/又は対象の集団の中央値と比較した、患者の mRNA 又はタンパク質発現の増加を指す。

【0102】

「発現低下」又は「低下レベル」は、例えば自己免疫疾患（IBD等）に罹患していない個体又は個人のようなコントロールと比較した、或いは事前設定された閾値又はカットオフ値と比較した、或いは患者及び/又は対象の集団の中央値と比較した、患者の mRNA 又はタンパク質発現の低下を指す。

20

【0103】

用語「多重PCR」は、単一の反応内で二以上のDNA配列を増幅する目的で二以上のプライマーセットを使用して、単一の供給源（例えば、患者）から得られた核酸上で実施される単一のPCR反応を指す。

【0104】

本明細書で使用する用語「バイオマーカー」は、例えば病理学的状態又は治療剤に対する適切な応答性といった患者の表現型の指標を指し、患者の生体試料中で検出され得る。バイオマーカーは、限定されないが、DNA、RNA、プロテイン、炭水化物又は糖脂質ベースの分子マーカーを含む。

30

【0105】

用語「診断」は、本明細書では、分子又は病理学的状態、疾患又は病態の同定或いは分類を意味するために用いられる。例えば、「診断」は、UC又はクローン病等の特定のタイプのIBDの同定を意味し得る。「診断」はまた、例えば組織病理学的な基準による、又は分子的特徴による、IBDの特定のサブタイプ（例えば、特定の遺伝子のうちの一又はそれらの組み合わせ或いは前記遺伝子によりコードされるタンパク質の発現により特徴付けられるサブタイプ）の分類も意味し得る。

【0106】

用語「診断を支援する」とは、症状又は病態の特定のタイプの存在又は性質に関する臨床判断を下すのに役立つ方法を指すために本明細書中で使用される。例えば、IBDの診断を支援する方法は、個体由来の生体試料中の特定の遺伝子の発現を測定することを含み得る。

40

【0107】

本明細書で用いられる「診断を提供する」なる句は、患者における潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性クローン病、線維性/線維狭窄性クローン病を含む炎症性腸疾患を診断するために、患者の試料中の、本明細書に記載のバイオマーカーの何れか一又は複数又は組み合わせのレベル又は存在に関して作成された情報又はデータを使用することを指す。情報又はデータは、書面、口頭又は電子的形態等、いかなる形態でもよい。幾つかの実施態様において、作成された情報又はデータの使用は、伝達、提示、報告、保管、送付、転送

50

、供給、伝送、分配、又はそれらの組み合わせを含む。幾つかの実施態様では、伝達、提示、報告、保管、送信、転送、供給、伝送、分配、又はそれらの組み合わせは、コンピューター、分析装置、又はそれらの組み合わせにより実施される。更に幾つかの実施態様では、伝達、提示、報告、保管、送信、転送、供給、伝送、分配、又はそれらの組み合わせは、研究又は医療の専門家により実施される。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、本明細書に記載のバイオマーカーの何れか一又は複数又は組み合わせのレベルの基準レベルとの比較を含む。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、本明細書に記載のバイオマーカーの何れか一又は複数又は組み合わせが試料中に存在しているか存在していないかの指標を含む。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、患者が炎症性腸疾患と診断される指標を含む。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、患者が潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性クローン病、又は線維性/線維狭窄性クローン病と診断される指標を含む。

10

20

30

40

50

【0108】

本明細書で用いられる「治療を推奨する」なる句は、治療に適しているか又は適していない患者を識別するために、患者の試料中の、本明細書に記載のバイオマーカーの何れか一又は複数又は組み合わせのレベル又は存在に関して作成された情報又はデータを使用することを指す。幾つかの実施態様では、治療は、抗IL-1抗体及び/又は抗IL-18抗体(単数又は複数)を含み得る。情報又はデータは、書面、口頭又は電子的形態等、いかなる形態でもよい。幾つかの実施態様において、作成された情報又はデータの使用は、伝達、提示、報告、保管、送付、転送、供給、伝送、分配、又はそれらの組み合わせを含む。幾つかの実施態様では、伝達、提示、報告、保管、送信、転送、供給、伝送、分配、又はそれらの組み合わせは、コンピューター、分析装置、又はそれらの組み合わせにより実施される。更に幾つかの実施態様では、伝達、提示、報告、保管、送信、転送、供給、伝送、分配、又はそれらの組み合わせは、研究又は医療の専門家により実施される。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、本明細書に記載のバイオマーカーの何れか一又は複数又は組み合わせのレベルの基準レベルとの比較を含む。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、本明細書に記載のバイオマーカーの何れか一又は複数又は組み合わせが試料中に存在しているか存在していないかの指標を含む。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、患者が、抗IL-1抗体及び/又は抗IL-18抗体(単数又は複数)を含む療法による治療に適しているか又は適していないかの指標を含む。

【0109】

用語「予後」は、IBDのような自己免疫疾患の自己免疫障害に起因する病徴の可能性の予測を表すために本明細書中で使用される。

【0110】

「予測」なる用語は、患者が、薬(治療剤)又は薬のセット又は治療レジメンに対して好ましい応答か或いは好ましくない応答を示す可能性に言及するために用いられる。一実施態様において、予測はこうした応答の程度に関する。一実施態様において、予測は、患者が、治療(例えば特定の治療剤を用いた治療)の後で、又は疾患再発なしに一定の期間、生存するか或いは改善するか否か、及び/又はその可能性に関する。本明細書に記載の予測方法は、任意の特定の患者のために最も適切な治療法を選択することによって治療決定を行うために臨床的に使用され得る。本明細書に記載の予測方法は、患者が、例えば所定の治療剤の投与又は併用、外科的介入、ステロイド治療を含む所定の治療法等の治療レジメンに対して好ましい応答をしそうかどうか、又は治療法後に患者の長期生存又は寛解又は持続的寛解があるかどうかを予測する上で貴重なツールである。

【0111】

「コントロール群」は、例えばIBD等の特定の疾病を有していると診断されておらず、且つその疾病に関連する如何なる徴候や症状にも苦しんでいない健常な対象を指す。

【0112】

「相関」又は「相関する」とは、第一の分析又はプロトコルの成績及び/又は結果と、第二の分析又はプロトコルの成績及び/又は結果とを任意の方法で比較することを意

味する。例えば、第一の分析又はプロトコールの結果を、第二のプロトコールの実施に使用してもよいし、及び/又は第二の分析又はプロトコールを実施すべきかどうかを決定するために第一の分析又はプロトコールの結果を使用してもよい。遺伝子発現分析又はプロトコールの実施態様に関して、特定の治療法を実施すべきかどうかを決定するために遺伝子発現分析又はプロトコールの結果を使用してもよい。

【0113】

「添付文書」は、治療薬又は医薬品の商業的パッケージに慣習的に含まれる説明書を表すべく使用され、その説明書は、当該治療薬又は医薬品の使用に関する適応症、用法、用量、投与、禁忌、パッケージされている製品と併用させる他の治療薬、及び/又はその治療薬又は医薬品の用途に関する警告等についての情報を含む。

10

【0114】

「キット」は、少なくとも一の試薬、例えば、UC又はクローン病等の治療のための医薬、又はバイオマーカー遺伝子若しくはタンパク質等を特異的に検出するためのプローブを含む任意の製造品(例えば、パッケージ又は容器)である。特定の実施態様では、製造品は、本発明の方法を実施するためのユニットとして、奨励され、流通され、又は販売される。

【0115】

「ターゲット層」とは、とりわけ特定の使用、治療又は適応症について、マーケティング又は広告により特定の医薬が奨励される又は奨励されることが意図される対象である人々の集団又は組織であり、例えば個々の患者、患者集団、新聞、医学文献及び雑誌の読者、テレビ又はインターネットの視聴者、ラジオ又はインターネットの聴取者、医師、製薬会社等である。

20

【0116】

用語「血清試料」は、個人から得られる任意の血清試料を指す。哺乳動物から血清を得るための方法は、当該技術分野でよく知られている。

【0117】

用語「全血」は、個人から得られる任意の全血試料を指す。通常、全血は、例えば細胞成分や血漿等のすべての血液成分を含有する。哺乳動物から全血を得るための方法は、当該技術分野でよく知られている。

【0118】

「～に応答しない」、「非応答」なる表現及びその文法的変形は、以前投与された一又は複数の医薬(治療剤)に対する対象又は患者の反応に関する場合、医薬の投与で、治療される疾患の治療の十分な兆しを示さなかった又は全く示さなかった対象若しくは患者を記述し、或いは彼らが医薬に対して臨床的に許容できないほど高い毒性を示した、又は最初にそのような医薬を投与された後で治療の兆しを維持しなかったことを記述するものであり、治療なる単語は本明細書での定義通りに本文脈において使用される。「応答しない」なる句は、以前投与された薬物に対して耐性及び/又は不応性である対象の記述を含み、また、対象又は患者が与えられている薬物を摂取している間に増悪した状況、及び対象又は患者が、もはや応答性でなくなるまでの薬物を含むレジメンを終了してから12か月以内(例えば6か月以内)に増悪した状況を含む。したがって、一又は複数の医薬に対する非応答性とは、医薬を用いた以前又は現在の治療後に活動性疾患を持ち続ける対象を含む。例えば、患者は、非応答である医薬を用いた治療の約1から3ヶ月後に、又は3から6ヶ月後に、又は6から12ヶ月後に活動性疾患の活性を有することがある。そのような応答性は問題の疾患の治療に熟練した臨床医によって評価され得る。

30

40

【0119】

医薬に対する非応答の目的のために、一又は複数の医薬による以前又は現在の治療からの「臨床的に許容できない高レベルの毒性」を経験する対象は、経験のある臨床医により重大であると考えられる、該治療に関連する一又は複数の負の副作用又は有害事象、例えば、重篤な感染症、うっ血性心不全、脱髄(多発性硬化症につながる)、重大な過敏症、神経病理学的事象、高度の自己免疫、がん、例えば子宮内膜がん、非ホジキンリンパ腫、

50

乳がん、前立腺がん、肺がん、卵巣がん、メラノーマ等、及び結核（TB）などを経験する。

【0120】

特定の疾病又は障害に罹患している患者に対する臨床的利益の増大に関連した、又は特定の治療剤又は治療レジメンに対する応答を予測するバイオマーカーの「量」又は「レベル」とは、生体試料中で検出可能なレベルである。これらは、当業者に既知で、本明細書に開示の方法により測定され得る。評価されるバイオマーカーの発現レベル又は量は、治療又は治療剤に対する反応又は予測される反応を決定するために使用され得る。

【0121】

「発現のレベル」又は「発現レベル」なる用語は、通常互換的に使用され、一般に、生体試料中のポリヌクレオチド又はアミノ酸産物又はタンパク質の量を指す。「発現」は、一般に、遺伝子コード情報が、細胞中に存在し作動する構造に変換されるプロセスを指す。したがって、本明細書で使用される場合、遺伝子の「発現」は、ポリヌクレオチドへの転写、タンパク質への翻訳、又はタンパク質の翻訳後修飾を意味し得る。転写されたポリヌクレオチド、翻訳されたタンパク質、又は翻訳後修飾されたタンパク質の断片もまた、選択的スプライシングにより生成された転写物、又は分解された転写物に由来するか、又は例えばタンパク質分解によるタンパク質の翻訳後プロセッシングに由来しようが、発現したとみなされる。「発現した遺伝子」は、mRNAとしてポリヌクレオチドに転写され、ついでタンパク質に翻訳されたもの、及びRNAに転写はされたが、タンパク質には翻訳されていないもの（例えば、転移RNA及びリボソームRNA）を含む。

10

20

【0122】

「抗IL-1 抗体及び/又は抗IL-18抗体（単数又は複数）」なる句は、文脈により、（1）抗IL-1 抗体、又は（2）抗IL-18抗体、又は（3）抗IL-1 抗体と抗IL-18抗体の組み合わせ（すなわち、二つの抗体）、又は（4）IL-1 とIL-18の両方に結合する抗体を指す。

【0123】

用語「抗IL-1 抗体」及び「IL-1 に結合する抗体」は、抗体が、IL-1 を標的とする際に診断薬及び/又は治療剤として有用であるように、十分な親和性でIL-1 を結合可能な抗体を指す。一実施態様において、抗IL-1 抗体の、無関係な非IL-1 タンパク質への結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ（RIA）で測定される場合、該抗体のIL-1 への結合の約10%未満である。特定の実施態様では、抗IL-1 抗体は、異なる種由来のIL-1 間で保存されているIL-1 のエピトープに結合する。

30

【0124】

用語「抗IL-18抗体」及び「IL-18に結合する抗体」は、抗体が、IL-18 を標的とする際に診断薬及び/又は治療剤として有用であるように、十分な親和性でIL-18を結合可能な抗体を指す。一実施態様において、抗IL-18抗体の、無関係な非IL-18タンパク質への結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ（RIA）で測定される場合、該抗体のIL-18への結合の約10%未満である。特定の実施態様では、抗IL-18抗体は、異なる種由来のIL-18間で保存されているIL-18のエピトープに結合する。

40

【0125】

「インフラマソーム媒介性疾患」とは、正常な非炎症組織と比べてIL-1 及び/又はIL-18が上昇している任意の疾患を指す。一般的に、インフラマソーム媒介性疾患においては、非誘導コントロール細胞と比較してカスパーゼ1のプロセッシング及び/又は活性化が関与/上昇している。カスパーゼ1活性は、市販のアッセイキット、例えば、カスパーゼ1蛍光定量アッセイキット（（カタログ番号ab394120；AbCam, Cambridge, MA）、カスパーゼ1比色定量アッセイ（カタログ番号BF14100；R&D Systems）等を使用して測定され得る。

【0126】

50

一般的に、疾患又は症状が体液又は組織中でのIL-1のレベルの上昇に関連し、或いは、身体から採取された細胞又は組織が培養液中に上昇したレベルのIL-1を産生するならば、疾患又は症状はIL-1関連疾患と考えられる。同様に、疾患又は症状が体液又は組織中でのIL-18のレベルの上昇に関連し、或いは、身体から採取された細胞又は組織が培養液中に上昇したレベルのIL-18を産生するならば、疾患又は症状はIL-18関連疾患と考えられる。よって、或いは身体から採取された細胞又は組織が培養液中で上昇したレベルの両サイトカインを産生するならば、IL-1 / IL-18関連疾患又は症状は、体液又は組織中でのIL-1及びIL-18のレベルの上昇に関連する。

【0127】

IL-1関連疾患の例は、急性膵炎；ALS；AIDS誘導性悪液質を含む、悪液質 / 食欲不振；喘息及び他の肺疾患；自己免疫性脈管炎；CIAS1関連周期性症候群（CAPS）；新生児期発症多臓器性炎症性疾患（NOMID / CINCA）、全身型若年性特発性関節炎、スティルス病、マックル・ウェルズ症候群、慢性疲労症候群、クロストリジウム関連の下痢を含むクロストリジウム関連疾患；うっ血性心不全、冠状動脈再狭窄、心筋梗塞、心筋機能不全（例えば、敗血症に関連する）及び冠状動脈バイパス移植を含む冠状動脈症状及び徴候；がん、例えば、多発性骨髄腫及び骨髄性（例：AML及びCML）及び他の白血病、並びに腫瘍転移；糖尿病（例：インスリン性糖尿病）；子宮内膜症；家族性感冒自己炎症性症候群（FCAS）；家族性地中海熱（FMF）；発熱；線維筋痛症；糸球体腎炎；移植片対宿主病 / 移植片拒絶反応；出血性ショック；痛覚過敏；炎症性腸疾患；乾癬性関節炎（並びに骨関節症及び関節リウマチ）を含む関節の炎症性症状；例えば、角膜移植と関連し得る炎症性眼病；脳虚血（例えば、各々が神経変性に至り得る外傷、てんかん、出血又は脳卒中の結果としての脳損傷）を含む虚血；川崎病；学習障害；肺疾患（例：ARDS）；筋疾患（例：筋タンパク質代謝、特に敗血症における）；神経毒性（例えば、HIVによって誘導される）；骨粗鬆症；がん関連痛を含む疼痛；パーキンソン病；歯周病；早期分娩；乾癬；再灌流傷害；放射線療法の副作用；睡眠障害；顎関節症（temporal mandibular joint disease）；腫瘍壊死因子受容体関連周期性発熱症候群（TRAPS）；ブドウ膜炎；又は緊張、捻挫、軟骨損傷、外傷、整形外科手術、感染若しくは他の疾患プロセスから生じている炎症性症状を含む。

【0128】

インターロイキン18は、免疫及び炎症性の要素を伴う種々の疾患に関連する病理に重要な役割を果たしている。これらの疾患は、限定されないが、関節リウマチ、骨関節症、若年性慢性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、狼瘡（例えば、全身性紅斑性狼瘡及びループス腎炎）、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー疾患、乾癬、1型乾癬、2型乾癬、強皮症皮膚炎（dermatitis scleroderma）、移植片対宿主病、臓器移植拒絶反応、臓器移植に関連する急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内血液凝固、川崎病、グレーヴス病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ヴェゲナー肉芽腫症、ヘノッホシェーンライン紫斑病、腎臓の微視的脈管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒物ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染症、寄生虫病、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳卒中、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アディソン病、散発性多腺性欠乏症I型及び多腺性欠乏症II型、シュミット症候群、成人性呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸炎性関節症（lcerative colitic arthropathy）、腸炎性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネラ菌関連関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患1型動脈硬化症（atheromatous disease 1 arteriosclerosis）、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱症、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA病、自

10

20

30

40

50

己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血 (Coombs positive haemolytic anemia)、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎/ロイヤル・フリー病 (encephalitis/Royal Free Disease)、慢性皮膚粘膜カンジダ症、巨細胞動脈炎、原発性硬化性肝炎、特発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、C型肝炎、一般の様々な免疫不全、一般の不定低ガンマグロブリン血症、拡張型心筋症、女性の不妊症、卵巣機能不全、早発卵巣不全、線維症化肺疾患、特発性線維化性肺肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織病関連間質性肺疾患、混合性結合組織病関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎/多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、脈管性びまん性肺疾患、ヘモジデリン沈着症関連肺疾患、薬物誘発性間質性肺疾患、放射線線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、痛風性関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎、古典的な自己免疫性又はルポイド肝炎、2型自己免疫性肝炎、抗LKM抗体肝炎、自己免疫媒介低血糖症、黒色表皮腫を有するB型インスリン抵抗症、副甲状腺機能低下症、臓器移植関連急性免疫疾患、臓器移植関連慢性免疫疾患、骨関節炎、原発性硬化性胆管炎、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎疾患NOS、糸球体腎炎、腎臓の微視的脈管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性の不妊症の特発性又はNOS、精子自己免疫 (male infertility idiopathic or NOS, sperm autoimmunity)、多発性硬化症の全ての亜類型、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、ステイル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病/動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫性自己免疫性甲状腺機能低下症又は橋本病、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫、水晶体原性ブドウ膜炎 (phacogenic uveitis)、原発性脈管炎、白斑、急性肝疾患、慢性肝疾患、アレルギー及び喘息、精神障害、うつ、統合失調症、Th2型及びTh1型媒介性疾患 (Th2 Type and Th1 Type mediated diseases)慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、炎症性自己免疫性骨疾患を含む。

10

20

30

【0129】

「単離された」核酸分子は、抗体核酸の天然供給源に通常付随している少なくとも一の夾雑核酸分子から同定及び分離されている核酸分子である。単離された核酸分子は、それが天然で見出される形態又は状態以外のものである。したがって、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する場合の核酸分子とは区別される。しかし、単離された核酸分子は、通常抗体を発現する細胞中に含まれる核酸分子を含み、ここで、例えば、核酸分子は天然の細胞のものとは異なる染色体の位置にある。

【0130】

本明細書において言及される「ノブ・イントゥー・ホール (knob-into-hole)」又は「KnH」という用語は、インビトロ又はインビボで二つのポリペプチドの対合を選択的に導く技術であって、それらが相互作用する界面において一方のポリペプチドに突起 (ノブ) を、また他方のポリペプチドにキャビティ (ホール) を導入することによる技術を指す。例えば、KnHは、抗体のFc:Fc結合界面、CL:CH1界面又はVH/VL界面において導入される (例えば、米国特許出願公開第20007/0178552号、国際公開第96/027011号、国際公開第98/050431号及びZhu et al.(1997)Protein Science 6:781-788)。これは、多重特異性抗体の製造中に二つの異なる重鎖を対合させるのに特に有用である。例えば、Fc領域にKnHを有する多重特異性抗体は、各Fc領域に連結された単一可変ドメインを更に含み得、又は類似の若しくは異なる軽鎖可変ドメインと対合する異なる重鎖可変ドメインを更に含み得る。実際、KnH技術を用いて、二つの異なる受容体細胞外ドメインを対合させること、又は異なる標的認識配列を含む任意の他のポリペプチド配列 (例えばアフィボディ、ペプチボディ及び他

40

50

のFc融合体等)を対合させることもできる。

【0131】

用語「多特異性抗体」は最も広い意味で使用され、ポリエピトープ特異性を有する抗体を指す。このような多重特異性抗体は、限定されないが、重鎖可変ドメイン(VH)及び軽鎖可変ドメイン(VL)を含む抗体(この場合、VHVLユニットはポリエピトープ特異性を有する)、二以上のVLドメイン及びVHドメインを有し、各VHVLユニットが異なるエピトープに結合する抗体、二以上の単一可変ドメインを有し、少なくとも二の単一可変ドメインが異なるエピトープに結合する抗体、完全長抗体、例えばFab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ、タンデム抗体、直鎖状抗体及びトリアボディ等の抗体断片、共有結合的に連結しているか又は非共有結合的相互作用を介して互いに結合している抗体断片を含む。多重特異性抗体を作成するために使用されている又は使用され得る抗体フォーマットの他の例は、ダイボディのFc融合体、タンデム抗体、及び単鎖抗体(例えば、Db-Fc、tadb-Fc、tadb-CH3及び(scFV)4-Fc)、ノブ-N-ホール(KnH)抗体、オクトパス抗体及びDAF抗体を含むが、これらに限定されない。

10

【0132】

本明細書で使用される「多重特異性分子」は、ポリエピトープ特異性を有する分子を指す。「ポリエピトープ特異性」とは、一つの標的分子上又は異なる標的分子上の少なくとも二つの異なるエピトープに特異的に結合する能力を指す(例えば、抗IL-1/IL-18多重特異性抗体)。「単一特異性」は唯一のエピトープに結合する能力を指す。一実施態様によると、多重特異性分子は、5µMから0.001pM、3µMから0.001pM、1µMから0.001pM、0.5µMから0.001pM、又は0.1µMから0.001pMの親和性で各エピトープに結合する。本明細書で使用される「二重特異性」なる用語は、二つのエピトープに結合する能力を指す。例えば、ポリエピトープ特異性を保持する、又は保持するように操作され得る分子の例は、限定されないが、抗体、アフィボディ、イムノアドヘシン、ペプチボディ及び他のFc融合体を含む。

20

【0133】

本明細書で使用される用語「オクトパス」抗体は、Fc領域とFc領域のアミノ末端に二以上の抗原結合部位とを含む多価抗体を指す。(例えば、国際公開第01/77342号、Wu et al. (2007) Nature Biotechnology, 及び国際公開第2007/024715号)。一実施態様において、該抗体のポリペプチドの立体配置はVD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fcであり、ここで、VD1は第一の可変ドメインであり、VD2は第二の可変ドメインであり、FcはFc領域の一つのポリペプチド鎖であり、X1とX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。一実施態様において、X1又はX2はCH1ドメイン、CH1ドメインの一部、GSリンカー等の何らかの他のリンカー配列又はその何らかの組み合わせである(例えば、国際公開第2007/024715号の5頁を参照)。

30

【0134】

本明細書で使用されるように、核酸が他の核酸配列と機能的な関係に配置されている場合、「作動可能に結合」されている。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのDNAは、それが抗体の分泌に関与するプレタンパク質として発現されるならば、その抗体のDNAに作動可能に結合されており;プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作動可能に結合されており;又はリボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするような位置にあるならば、コード配列と作動可能に結合されている。通常、「作動可能に結合」とは、結合するDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には、近接しており且つ読み取り相(reading phase)にあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、慣行に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが使用される。

40

【0135】

50

「ペプチボディ」(単数及び複数)は、Fcドメインを有するペプチド配列の融合体を指す。2003年12月9日にFeigeらに発行された米国特許第6660843号を参照のこと(その全文は参照により援用される)。ペプチボディは、N末端、C末端、アミノ酸側鎖、又はこれらの部位の二つ以上に結合されている一又は複数のペプチドを含む。ペプチボディ技術は、一又は複数のリガンド又は受容体を標的にするペプチド、腫瘍ホーミングペプチド、膜輸送ペプチド等を組み込む治療剤の設計を可能にする。ペプチボディ技術は、ジスルフィドによって拘束された直鎖状ペプチドである「タンデムペプチド多量体」(すなわち、Fcドメインの単鎖上の二つ以上のペプチド)等、多数のこのような分子の設計において有用であることが判明している。例えば、米国特許第6660843号; 2003年10月16日に公開された米国特許出願公開第2003/0195156号(2002年11月21日に公開された国際公開第02/092620号に対応する); 2003年9月18日に公開された米国特許出願公開第2003/0176352号(2003年4月17日に公開された国際公開第03/031589号に対応する); 1999年10月22日に公開された米国特許出願第09/422838号(2000年5月4日に公開された国際公開第00/24770号に対応する); 2003年12月11日に公開された米国特許出願公開第2003/0229023号; 2003年7月17日に公開された国際公開第03/057134号; 2003年12月25日に公開された米国特許出願公開第2003/0236193号(2004年4月8日に公開されたPCT/US04/010989号に対応する); 2003年9月18日に公開された米国特許出願第10/666480号(2004年4月1日に公開された国際公開第04/026329号に対応する)を参照のこと。これらの各々は参照によりその全内容が本明細書に援用される。

【0136】

本明細書の目的のために、「医薬組成物」は、哺乳動物、特にヒトへの投与に適合し且つ適切なものである。したがって、該組成物は、哺乳動物において疾患又は障害を治療するために使用され得る。更に、組成物中のタンパク質は、組成物の治療的使用に支障を来し得る夾雑物(単数又は複数)がタンパク質から分離されているように、一又は複数の精製又は単離工程に供されている。通常、医薬組成物は治療用タンパク質及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含む。該組成物は通常滅菌であり、凍結乾燥されてもよい。医薬製剤の更なる詳細を以下に記載する。

【0137】

本明細書で互換的に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及び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、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体、或いはDNA若しくはRNAポリメラーゼにより、又は合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後に標識とのコンジュゲーションによるなどして更に修飾されてもよい。この他の修飾の種類は、例えば「キャップ(cap)」、天然の一又は複数のヌクレオチドの類似体での置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電結合(例:メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等)を有するもの及び荷電結合(例:ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等)を有するもの、ペンダント部分、例えばタンパク質(例:クラーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ply-L-リジン等)を含有するもの、インターカレーター(例:アクリジン、プソラレン等)を有するもの、キレート剤(例:金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属等)を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合(例:アルファアノマー核酸等)を有するもの、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態を含む。更に、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えば、ホスホン酸基、リン酸基で置き換えられてもよく、標準的な保護基により保護

されてもよく、又は更なるヌクレオチドへの更なる結合を作るように活性化されてもよく、又は固体若しくは半固体支持体にコンジュゲートされていてもよい。5'及び3'末端のOHはリン酸化され得、又はアミン若しくは1から20の炭素原子の有機キャッピング基部分で置換され得る。また他のヒドロキシル類は標準的な保護基に誘導体化されてもよい。またポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のもの、例えば2'-O-メチル-、2'-O-アシル、2'-フルオロ-又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、 α -アノマー糖類、エピマー糖類(例えばアラビノース)、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖類、フラノース糖類、セドヘプツロース類、非環式類似体、及び脱塩基性ヌクレオチド類似体(例えばメチルリボシド)も含有し得る。一又は複数のホスホジエステル結合は代替の結合基で置換され得る。こうした代替の結合基は、限定されはしないが、ホスファートがP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミダート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH₂(「ホルムアセタール」)で置換される実施態様のものを含み、ここで各R又はR'は独立にHであるか、又は、場合によってエーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換若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、シクロアルケニル又はアラリジル(aryl)である。ポリヌクレオチド中のすべての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA及びDNAを含めた、本明細書で言及されるすべてのポリヌクレオチドに適用される。

10

【0138】

20

「受容体結合ドメイン」なる用語は、細胞接着分子を含む受容体に対する任意の天然リガンド、或いは対応する天然リガンドの定性的受容体結合能力を少なくとも保持している該天然リガンドの任意の領域又は誘導体を指すために使用される。本定義は、中でも、上述の受容体に対するリガンドからの結合配列を特に含む。

【0139】

「分泌シグナル配列」又は「シグナル配列」とは、対象となる新しく合成されたタンパク質を細胞膜、通常は原核生物の内膜又は内膜と外膜の両方を通過するように方向付けるために使用され得る、短いシグナルペプチドをコードする核酸配列を指す。このようにして、対象となっているタンパク質、例えば免疫グロブリン軽鎖又は重鎖ポリペプチドは、原核宿主細胞の周辺質に、又は培地中に分泌される。分泌シグナル配列によってコードされるシグナルペプチドは、宿主細胞に対して内因性であっても又は外因性であってもよく、発現されるポリペプチドに本来あるシグナルペプチドを含む。分泌シグナル配列は、典型的には発現されるポリペプチドのアミノ末端に存在し、典型的にはポリペプチドの生合成から分泌までの間に細胞質から酵素的に取り除かれる。したがって、シグナルペプチドは、通常、成熟タンパク質産物には存在しない。

30

【0140】

「単一ドメイン抗体」(sdAb)又は「単一可変ドメイン(SVD)抗体」なる表現は、単一可変ドメイン(VH又はVL)が抗原結合を付与することができる抗体を一般に指す。言い換えると、単一可変ドメインは、標的抗原に結合するために別の可変ドメインと相互作用する必要がない。単一ドメイン抗体の例は、限定されないが、ラクダ科(ラマ及びラクダ)及び軟骨魚類(例えばコモリザメ)に由来するもの、並びにヒト及びマウス抗体に由来し、組換え法から得られるものを含む(Nature(1989)341:544-546;Dev Comp Immunol(2006)30:43-56;Trend Biochem Sci(2001)26:230-235;Trends Biotechnol(2003):21:484-490;国際公開第2005/035572号;国際公開第03/035694号;Febs Lett(1994)339:285-290;国際公開第00/29004号;国際公開第02/051870号)。

40

【0141】

本明細書で使用される「治療抗体」は、疾患若しくは障害を有する哺乳動物又は疾患若しくは障害にかかりやすい哺乳動物の疾患又は障害を治療する際に有効な抗体である。

【0142】

「標的分子」は、標的認識部位に結合することができる分子を指す。標的分子：標的認

50

識部位の相互作用の例は、抗原：抗体可変ドメイン相互作用、受容体：リガンド相互作用、リガンド：受容体相互作用、アドヘシン：アドヘシン相互作用、ビオチン：ストレプトアビジン相互作用等を含む。一実施態様において、標的分子は、生体分子である。

【0143】

本明細書で使用される用語「ベクター」は、それに結合されている別の核酸を運搬することができる核酸分子を指すことが意図される。ベクターの一つのタイプは「プラスミド」であり、これは付加的なDNAセグメントが結合され得る円形の二本鎖DNAループである。別のタイプのベクターはファージベクターである。また別のタイプのベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムへ結合させる。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自律複製することができる（例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソームの哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ得、それにより宿主ゲノムと共に複製される。更に、特定のベクターは、それらが作動可能に結合されている遺伝子の発現を指令することができる。このようなベクターは本明細書では「組換え発現ベクター」（又は単に「組み換えベクター」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形態である。プラスミドが最も一般的に使用されているベクターの形態であるので、本明細書では「プラスミド」と「ベクター」は互換的に使用され得る。

10

【0144】

標的分子でない他の分子に結合するよりも有意に優れた親和性で標的分子に「選択的に結合する」抗体。相対的結合及び/又は結合親和性は、限定されないが、酵素結合免疫吸着法（ELISA）及び蛍光活性化セルソーティング（FACS）を含む当該分野で受け入れられている様々な方法で実証され得る。幾つかの実施態様において、抗体は、ELISAで決定される場合、非標的分子に結合するよりも少なくともおよそ1対数高い濃度反応性で標的分子に結合する。

20

【0145】

本明細書において、更なる種々の用語が定義されており、又、そうでない場合には特性が明らかにされている。

【0146】

例示的な抗体

他の分子と場合によってはコンジュゲートしている可溶性ヒトIL-1又はヒトIL-18若しくはその断片は、抗体を産生するために免疫原として使用され得る。代替的にまたは追加的に、ヒトIL-1又はヒトIL-18を発現する細胞を免疫原として使用することができる。そのような細胞は天然源に由来し得、或いはヒトIL-1又はヒトIL-18を発現するように組換え技術によって形質転換された細胞であってもよい。抗体を調製するために有用なヒトIL-1又はヒトIL-18の他の形態は、当業者には明らかであろう。

30

【0147】

a. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、通常、関連する抗原及びアジュバントの複数回の皮下（s.c）又は腹腔内（i.p）注射により動物において産生される。関連抗原を、免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又はダイズトリブシン阻害因子に、二官能性剤又は誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介したコンジュゲーション）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介した）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOC12、又はR1N=C=NR（式中、RとR1は異なるアルキル基である）を用いてコンジュゲートさせることが有益である。

40

【0148】

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100µg又は5µg（それぞれウサギ又はマウスについて）を3容量の完全フロイントアジュバントと併せ、この溶液を複数部

50

位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。およそ1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバント中の初回量の1/5から1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7から14日後に該動物を出血させ、抗体価について血清をアッセイする。動物を、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。通常、動物は、同じ抗原のコンジュゲートで追加免疫するが、異なるタンパク質に、及び/又は異なる架橋試薬を介してコンジュゲートされる。また、コンジュゲートは、タンパク質融合体として組換え細胞培養物中で作製され得る。また、ミョウバンのような凝集剤が、免疫応答を亢進するために適切に使用される。

【0149】

10

b. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohlerら, 1975, Nature, 256:495により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(例として米国特許第4816567号を参照)によって作製され得る。

【0150】

ハイブリドーマ法では、マウス又は他の適切な宿主動物、例えばハムスター又はマカクザルを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するか又は産生可能なリンパ球を誘発する。或いは、リンパ球はインビトロで免疫化されてもよい。次いで、リンパ球をポリエチレングリコールのような適切な融剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, 1986, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press))。

20

【0151】

このように調製されたハイブリドーマ細胞を、非融合の親骨髓腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を通常含有する培地中に播種し、増殖させる。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠くならば、ハイブリドーマの培養培地は、通常、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン(HAT培地)を含むことになり、これらの物質はHGPRT欠損細胞の増殖を妨げる。

【0152】

特定の実施態様では、骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの産生を助け、HAT培地等の培地に対して感受性な細胞である。これらの中でも、例示的な骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫細胞株、例えば、米国カリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍並びに米国メリーランド州ロックビルにあるAmerican Type Culture Collectionから入手可能なSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために記載されている(Kozbor, 1984, J. Immunol., 133:3001; Brodeur et al., 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York))。

30

40

【0153】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。特定の実施態様では、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法又はインビトロ結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着法(ELISA)によって決定される。

【0154】

ハイブリドーマ細胞が所望の特異性、親和性及び/又は活性の抗体を産生するとして同定された後、該クローンは、限定希釈手順によりサブクローニングされ得、標準的な方法により培養されてもよい(上掲のGoding)。この目的のための好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を含む。加えて、ハイブリドーマ細胞は、動物の腹

50

水腫瘍としてインビボで増殖させてもよい。

【 0 1 5 5 】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテイン A - セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティクロマトグラフィーのような従来の免疫グロブリン精製手順によって、培地、腹水又は血清から適切に分離される。

【 0 1 5 6 】

モノクローナル抗体をコードする DNA は容易に分離され、従来手順を用いて（例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより）配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このような DNA の典型的な供給源として役立つ。単離したら、DNA を発現ベクター中に配置し、次いで、そうしなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞中、例えば、大腸菌細胞、シミアン COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞又は骨髓腫細胞にトランスフェクトし、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得ることができる。抗体の組換え産生を以下により詳細に記載する。

【 0 1 5 7 】

更なる実施態様では、抗体又は抗体断片は、McCaffertyら、1990、Nature、348:552-554に記載の技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離され得る。Clacksonら、1991、Nature、352:624-628及びMarksら、J.Mol.Biol.、222:581-597は、ファージライブラリーを使用した、それぞれ、マウス抗体及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャッフリングによる高親和性（nM範囲）のヒト抗体の生成（Marksら、1992、Bio/Technology、10:779-783）、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換えを記述している（Waterhouseら、Nuc.Acids.Res.、21:2265-2266(1993)）。したがって、これらの技術はモノクローナル抗体の単離に関する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法の実行可能な別法である。

【 0 1 5 8 】

また、DNA は、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を、相同マウス配列に代えて置換することによって（米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号；Morrison, et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851）、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリン材料（例えばタンパク質ドメイン）のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾され得る。

【 0 1 5 9 】

典型的には、このような非免疫グロブリン材料は、抗体の定常ドメインに置換されるか、又は抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換され、抗原に対する特異性を有する一つの抗原結合部位と、異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作り出す。

【 0 1 6 0 】

c. ヒト化及びヒト抗体

ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からの一又は複数のアミノ酸残基を有する。非ヒトアミノ酸残基は、通常、「移入」残基と呼ばれ、典型的には「移入」可変ドメインから得られる。ヒト化は一般的に Winter と共同研究者の方法（Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536）に従って、げっ歯類の CDR 又は CDR 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施され得る。よって、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されているキメラ抗体（米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号）である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には幾つかの CDR 残基、及び場合によっては幾つかの FR 残基が、非ヒト、例えばげっ歯類の抗体の類似部位からの残基で置換されたヒト抗体である。

【 0 1 6 1 】

抗原性を低下させるには、ヒト化抗体を作製する際に使用する軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」法によれば、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次いで、げっ歯類のものとも最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク (FR) として受け入れる (Sims et al., 1987, J. Immunol., 151:2296; Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol., 196:901)。別の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークを幾つかの異なるヒト化抗体に使用してもよい (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623)。

10

【0162】

抗体が、抗原に対する高親和性及び他の望ましい生物学的特性を保持した状態でヒト化されることが更に重要である。この目標を達成するべく、一つの方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析のプロセスによってヒト化抗体が調製される。三次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元立体配座構造を図解及び表示するコンピュータープログラムが、入手可能である。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能な役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンのその抗原へ結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、FR残基がレシピエント配列及び移入配列から選択され、組み合わせられ得ることで、所望の抗体特性 (例えば、標的抗原に対する親和性の向上が達成される。一般的に、CDR残基は、直接且つ最も実質的に抗原結合性に関与している。

20

【0163】

或いは、現在では、免疫化によって、内因性免疫グロブリンの産生なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを生成する能力があるトランスジェニック動物 (例えばマウス) を作製することが可能である。例えば、キメラマウス及び生殖細胞系変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域 (JH) 遺伝子のホモ接合型欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。こうした生殖細胞系変異体マウスにおけるヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの導入は、抗原チャレンジの際にヒト抗体の産生をもたらす。例えば、Jakobovitsら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551; Jakobovitsら, 1993, Nature, 362:255-258; Bruggermannら, 1993, Year in Immunol., 7:33; 及び Duchosalら, 1992, Nature 355:258を参照のこと。また、ヒト抗体はファージディスプレイライブラリーからも得られる (Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222:581-597; Vaughan et al., 1996, Nature Biotech 14:309)。

30

【0164】

i. キメラ及びヒト化抗体

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗体はキメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4816567号、及びMorrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。一例において、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又はサル等の非ヒト霊長類由来の可変領域) とヒト定常領域とを含む。更なる例において、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のものから変更されている「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

40

【0165】

特定の実施態様において、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減するために、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持したままヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR (例えばCDR) (又はその一部) が非ヒト抗体に由来し、FR (又はその一部) がヒト抗体配列に由来する、一又は複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、場合によってヒト定常領域の少なくとも一部を含

50

む。幾つかの実施態様において、ヒト化抗体の幾つかのFR残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

【0166】

ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)に概説されており、更に、例えば、Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); 米国特許第5821337号、同第7527791号、同第6982321号及び同第7087409号; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (SDR(a-CDR) グラフティングを記述); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (「リサーチフェイシング」を記述); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記述); 並びにOsbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005)及びKlimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (FRシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記述)に記載されている。

10

【0167】

ヒト化に用いられ得るヒトフレームワーク領域は、限定されないが、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)を参照; 軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); 及びPresta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)を参照); ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域又はヒトの生殖細胞系フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)を参照); 及びFRライブラリースクリーニング由来のフレームワーク領域（例えば、Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997)及びRosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)を参照)を含む。

20

【0168】

ヒト抗体

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の様々な技術を用いて生産され得る。ヒト抗体は一般的にvan Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001)及びLonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)に記載されている。

30

【0169】

ヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してインタクテナヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクテナ抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することにより作製され得る。このような動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換するか、又は染色体外に存在するか若しくは動物の染色体にランダムに組み込まれた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべて又は一部を含む。このようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、通常、不活性化される。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005)を参照のこと。また、例えば、XENOMOUSETM技術を記載している、米国特許第6075181号及び同第6150584号; HUMAB（登録商標）技術を記載している米国特許第5770429号; K-M MOUSE（登録商標）技術を記載している米国特許第7041870号、及びVELOCIMOUSE（登録商標）技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号も参照されたし。このような動物により生成されるインタクテナ抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に改変され得る。

40

【0170】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベースの方法によっても作製され得る。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株が記述されている。（例えば、Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Ant*

50

ibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及び Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)を参照)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体もLi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)に記載されている。更なる方法は、例えば、米国特許第7189826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載し)及びNi, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマを記載)に記載のものを含む。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)もまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 及びVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)に記載されている。

10

【0171】

ヒト抗体は、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成され得る。このような可変ドメイン配列は、次いで、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術は、下記に記載する。

【0172】

d. 多重特異性抗体

多重特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗体に対して結合特異性を有する。このような分子は二つの抗原のみに結合し得るが(例えば、二重特異性抗体、BsAb)、本明細書で使用される場合、更なる特異性を有する抗体、例えば三重特異性抗体もこの表現に包含される。BsAbの例は、一つの抗原結合部位がIL-1に対して方向づけられ、もう一つの抗原結合部位がIL-18に対して方向づけられるものを含む。幾つかの実施態様において、BsAbは、IL-1又はIL-18に対する第一の結合特異性及び細胞質ITAMモチーフを有する活性化受容体に対する第二の結合特異性を含む。ITAMモチーフ構造は、9-11のアミノ酸スペーサーによって分離された二のチロシンを有する。一般的コンセンサス配列は、YxxL/I(x)6-8YxxL(Isakov, N., 1997, J. Leukoc. Biol., 61:6-16)である。例示的な活性化受容体は、FcRI、FcRII、FcRII、FcRIIA及びFcRIICを含む。他の活性化受容体は、例えば、CD3、CD2、CD10、CD161、DAP-12、KAR、KARAP、FcRII、Trem-1、Trem-2、CD28、p44、p46、B細胞受容体、LMP2A、STAM、STAM-2、GPVI及びCD40(例えば、Azzoni, et al., 1998, J. Immunol. 161:3493; Kita, et al., 1999, J. Immunol. 162:6901; Merchant, et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:9115; Pandey, et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:38633; Zheng, et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:12999; Propst, et al., 2000, J. Immunol. 165:2214を参照)を含む。

20

30

【0173】

一実施態様において、多重特異性は、IL-1に対する第一の結合特異性及びIL-18に対する第二の結合特異性を含む。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)として作製され得る。更に、二重特異性抗体はノブ・イン・ホール又はヒンジレス抗体として作製され得る。二重特異性抗体は、Segalら、2001, J. Immunol. Methods 248:1-6に概説されている。

40

【0174】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該技術分野で知られている。完全長二重特異性抗体の伝統的な製造は、二本の鎖が異なる特異性を有する、二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の共発現に基づいている(Millstein et al., 1983, Nature, 305:537-539)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖がランダムな取り合わせゆえに、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10種類の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、そのうちの一つのみが正しい二重特異性構造を持つ。正しい分子の精製は通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われるが、かなり面倒であり、生成物収率は低い。類似の手順が、国際公開第93/08829号、及びTraunckerら、EMBO J., 10:3655-3659に開示され

50

ている。

【0175】

異なるアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体 - 抗原結合部位）が免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。融合は、少なくともヒンジ、CH2、及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合であり得る。特定の実施態様において、軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域（CH1）が、融合体のうち少なくとも一つに存在する。免疫グロブリン重鎖融合体をコードするDNA、及び、必要に応じて免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、それぞれ別々の発現ベクターに挿入し、好適な宿主生物に同時形質移入する。これにより、組立に使用される三つの抗体鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす実施態様において、三つの抗体断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つの抗体鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、二つ又は三つすべての抗体鎖のコード配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

10

【0176】

このアプローチ法の別の実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を一方のアームに、ハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対（第二の結合特異性を提供する）を他方のアームに有する、ハイブリッド免疫グロブリン重鎖から構成される。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を生成するための方法の更なる詳細については、例えば、Sureshら、1986、Methods in Enzymology, 121:210を参照のこと。

20

【0177】

国際公開第96/27011号に記載の別のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体のパーセンテージを最大にすることが可能である。一実施態様では、界面は抗体定常ドメインのうちCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第一の抗体分子の界面由来の一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）で置き換えられる。大きい側鎖（単数又は複数）と同じか又は類似の大きさの代償的な「キャピティー」が、大きいアミノ酸側鎖を小さいアミノ酸側鎖（例えばアラニン又はスレオニン）と置き換えることにより、第二の抗体分子の界面上に形成される。これは、ヘテロ二量体の収率をホモ二量体等の他の所望しない最終生成物を超えて高める機構を提供する。

30

【0178】

二重特異性抗体は、架橋抗体又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体のうち一方はアビジンと、他方はビオチンと、カップリングされ得る。そのような抗体は、例えば、不要な細胞に対して免疫系細胞を標的化するため（米国特許第4676980号）、及びHIV感染症の治療のために（国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号及びEP03089）提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を使用して作製され得る。好適な架橋剤は当該技術分野では周知であり、例えば、米国特許第4676980号において、多数の架橋法と共に開示されている。

40

【0179】

二価より多い抗体も企図されている。例えば、三重特異性抗体はTuttら、1991、J. Immunol. 147: 60に従って調製され得る。

【0180】

「オクトパス抗体（Octopus antibody）」を含む三又はそれ以上の機能的抗原結合部位を有する操作抗体も本明細書に含まれる（例えば、米国特許第2006/0025576号を参照）。

【0181】

50

本明細書中の抗体又は断片は、二つの標的、例えばIL-1及びIL-18に結合する抗原結合部位を含む「二重作用性Fab」又は「DAF」も含む（例えば、米国特許第2008/0069820号参照）。

【0182】

e. 変異体ヒンジ領域を有する抗体

また、本明細書に記載の抗体は、2003年10月30日出願の米国特許出願第10/697995号に記載されているような変異体重鎖も含み得る。変異体重鎖を含む抗体は、システイン残基がジスルフィド結合を形成できないような、少なくとも一のジスルフィド形成システイン残基の改変を含む。一態様では、前記システイン（単数及び複数）は重鎖のヒンジ領域のものである（それゆえ、このようなヒンジ領域は、本明細書では「変異体ヒンジ領域」と称され、更には「ヒンジレス」と称されてもよい）。

10

【0183】

幾つかの態様において、このような免疫グロブリンは、分子間で（例えば二本の重鎖間で）又は分子内で（例えば単一ポリペプチド鎖内の二つのシステイン残基間で）、通常はジスルフィド結合を形成することができる重鎖システイン残基の完全なレパートリーを欠いている。一般に、改変されるシステイン残基（すなわち、ジスルフィド結合形成不能にされる）によって形成されるジスルフィド結合は、抗体内に存在していない場合、免疫グロブリンの通常の物理化学的及び/又は生物学的特性の実質的な損失をもたらさないものである。特定の実施態様では、ジスルフィド結合形成不能にされるシステイン残基は、重鎖のヒンジ領域のシステインである。

20

【0184】

変異体重鎖又は変異体ヒンジ領域を有する抗体は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、又は2から11の重鎖間ジスルフィド結合が取り除かれている抗体を、宿主細胞内に発現させ、宿主細胞から前記抗体を回収することによって、一般に作製される。前記抗体の発現は、ジスルフィド結合能力が低減された変異体重鎖を含む抗体をコードするポリヌクレオチドからであり得、続いて、該ポリヌクレオチドを含む宿主細胞から前記抗体を回収する。一実施態様では、重鎖は免疫グロブリン重鎖の変異体ヒンジ領域を含み、前記変異体ヒンジ領域の少なくとも一のシステインはジスルフィド結合形成不能にされている。

30

【0185】

免疫グロブリン重鎖の任意のシステインが、本明細書に記載されたヒンジシステインと同様にジスルフィド結合形成不能にされ得ることが、このような改変が免疫グロブリンの生物学的機能を実質的に減少させないという条件で、更に予想される。例えば、IgM及びIgEはヒンジ領域を欠いているが、各々が余分の重鎖ドメインを含有し、重鎖及び/又は重鎖を含む抗体の生物学的機能を実質的に減少させない限り、該重鎖システインの少なくとも一（幾つかの実施形態においてはすべて）が、ジスルフィド結合形成不能にされ得る。

40

【0186】

例えば、上掲のKabatt、1991年、「Sequences of proteins of immunological interest」に記載されているように、重鎖ヒンジシステインは当該技術分野で周知である。当該技術分野で知られているように、ヒンジシステインの数は、免疫グロブリンのクラス及びサブクラスに依って変わる。例えば、Janeway, 1999, Immunobiology, 4th Ed., (Garland Publishing, NY)を参照のこと。例えば、ヒトIgG I類においては2のヒンジシステインが2のプロリンによって分離されており、これらは通常、分子間ジスルフィド結合において、隣接する重鎖上の相手側と対になっている。他の例は、4のヒンジシステインを含有するヒトIgG 2、11のヒンジシステインを含有するIgG 3、及び2のヒンジシステインを含有するIgG 4を含む。

【0187】

したがって、特定の実施態様では、方法は、変異体ヒンジ領域の少なくとも一のシステインがジスルフィド結合形成不能にされている変異体ヒンジ領域を含む免疫グロブリン重

50

鎖を宿主細胞内に発現させること、該重鎖を軽鎖と複合体化させて、生物学的に活性な抗体を形成すること、及び宿主細胞から抗体を回収することを含む。

【0188】

代替的实施態様は、少なくとも2、3、又は4のシステインがジスルフィド結合形成不能にされているもの；約2から約11のシステインが不能にされているもの；及び変異体ヒンジ領域のすべてのシステインが不能にされているものを含む。

【0189】

本明細書に記載の方法に従って作製された抗体を構成する軽鎖及び重鎖は、単一のポリヌクレオチドによって、又は別々のポリヌクレオチドによってコードされ得る。

【0190】

通常、ジスルフィド結合形成に關与するシステインは、当該技術分野で既知であるか又は本明細書に記載された基準を考慮して当業者に明らかである任意の種々の方法により、ジスルフィド結合形成不能にされ得る。例えば、ヒンジシステインは、ジスルフィド結合ができないセリン等の他のアミノ酸で置換され得る。アミノ酸置換は、修飾されるヒンジ領域をコードする核酸配列の部位特異的突然変異誘発等の標準的な分子生物学的方法によって達成され得る。好適な技術は、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版に記載されたものを含む。変異体ヒンジ領域を有する免疫グロブリンを生成するための他の技術は、ヒンジ領域をコードするオリゴヌクレオチドの合成を含み、この場合、置換されるシステインのコドンが置換アミノ酸のコドンと置き換えられる。次いで、このオリゴヌクレオチドは、適宜、可変領域及びFc配列等の他の適切な抗体配列を含むベクター主鎖内に結合され得る。

【0191】

別の実施形態において、ヒンジシステインは欠失され得る。アミノ酸欠失は、修飾されるヒンジ領域をコードする核酸配列の部位特異的突然変異誘発等の標準的な分子生物学的方法によって達成され得る。好適な技術は、上掲のSambrookらに記載のものを含む。変異体ヒンジ領域を有する免疫グロブリンを生成するための他の技術は、修飾されるシステインのコドンが欠失しているヒンジ領域をコードする配列を含むオリゴヌクレオチドの合成を含む。次いで、このオリゴヌクレオチドは、適宜、可変領域及びFc配列等の他の適切な抗体配列を含むベクター主鎖内に結合され得る。

【0192】

f. 「キャビティー内突起 (Protuberance - Into - Cavity)」法を用いて形成される二重特異性抗体

幾つかの実施態様において、二重特異性抗体は、ヘテロオリゴマー化のために、第一のポリペプチドと第二のポリペプチドとの間の界面を操作するのに役立つ「キャビティー内突起」法（「ノブ・イントゥー・ホール」とも称される）を用いて形成される。一実施態様において、界面は、抗体定常ドメインのうちCH3ドメインの少なくとも一部を含む。Fc配列のCH3ドメインにおける「ノブ・イントゥー・ホール」突然変異は、ホモ二量体の形成を大幅に減少させるという報告がある（例えば、Merchant et al., 1998, Nature Biotechnology, 16:677-681を参照）。「突起」は、第一のポリペプチド界面の小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）と置き換えることにより構築される。該突起と同じか又は同様のサイズの代償的な「キャビティー」が、大きなアミノ酸側鎖をより小さな側鎖と置き換えることにより第二のポリペプチドの界面に任意選択的に創出される。第一又は第二のポリペプチドのいずれかの界面に、好適に配置され、形成された突起又はキャビティーが存在する場合、隣接する界面において、それぞれ対応するキャビティー又は突起を操作するだけでよい。該突起及びキャビティーは、ポリペプチドをコードする核酸の改変等の合成的手段により、又はペプチド合成により作成され得る。ノブ・イントゥー・ホールの更なる詳細は、米国特許第5731168号；同第5807706号；同第5821333号を参照。

【0193】

幾つかの実施態様において、「ノブ・イントゥー・ホール」法は、ヘテロ二量体化を促

10

20

30

40

50

進して、完全長二重特異性抗Fc R I I B及び抗「活性化受容体」（例えばIgE R）抗体を生成するために用いられる。一実施態様において、「ノブ」突然変異（T 3 6 6 W）をFc領域に導入することにより、抗Fc R I I B成分（例えばp 5 A 6 . 1 1 . ノブ）のための、また、「ホール」突然変異（T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V）を導入することにより、抗IgE R成分（例えばp 2 2 E 7 . 1 1 . ホール）のためのコンストラクトが作成された。別の実施態様において、本明細書に開示の方法、又は上掲のMerchantら（1998）、若しくは米国特許第5 7 3 1 1 6 8号；同第5 8 0 7 7 0 6号；同第5 8 2 1 3 3 3号に開示の方法等により、「ホール」突然変異をそのFc領域に導入することによって、抗Fc R I I B成分（例えばp 5 A 6 . 1 1 . ホール）のための、また、「ノブ」突然変異をそのFc領域に導入することによって、抗IgE R成分（例えばp 2 2 E 7 . 1 1 . ノブ）のためのコンストラクトが作成される。

10

【0194】

「キャピティー内突起」法を用いてヘテロ多量体を作製する一般的な方法は、一つ又は別々の宿主細胞内で、突起をコードするように元のポリヌクレオチドから改変されている第一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びキャピティーをコードするように元のポリヌクレオチドから改変されている第二のポリペプチドをコードする第二のポリヌクレオチドを発現させることを含む。該ポリペプチドは、共通の宿主細胞に発現させて、宿主細胞培養物からヘテロ多量体を回収するか、別々の宿主細胞に発現させて、回収及び精製後、ヘテロ多量体を形成するかのいずれかである。幾つかの実施態様において、形成されたヘテロ多量体は、多量体抗体、例えば二重特異性抗体である。2011年4月22日出願の米国特許出願第13/092708号も参照されたし。

20

【0195】

いくつかの実施態様において、抗体は、ノブ・イントゥー・ホール法と変異体ヒンジ領域コンストラクトとを組み合わせ、ヒンジレス二重特異性抗体を作製する。

【0196】

ベクター、宿主細胞、及び組換え法

また本発明は、本明細書に開示の抗体をコードする単離ポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター及び宿主細胞、並びに該抗体を生産するための組換え法を提供する。

【0197】

本発明の抗体の組換え生産の場合、該抗体をコードする核酸が単離され、更なるクローニング（DNAの増幅）のため、又は発現のために複製可能なベクターに挿入される。本発明の抗体をコードするDNAは、通常の方法を用いて、例えば、該抗体をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより、容易に単離され、配列決定される。多くのベクターが入手可能である。ベクターの構成要素は、次のうちの一又は複数を通常含むがそれらに限定されない：シグナル配列、複製開始点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列。

30

【0198】

(i) シグナル配列成分

本明細書に記載の抗体は、直接的にのみならず、異種抗体との融合抗体として組換えでも生産され得る。一実施態様において、異種抗体は、成熟タンパク質若しくは抗体のN末端に特異的切断部位を有するシグナル配列又は他の抗体である。通常、選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものである。天然抗体シグナル配列を認識及びプロセッシングしない原核生物宿主細胞の場合、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p p、又は熱安定性エンテロトキシンI Iリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置き換えられる。酵母分泌の場合、天然シグナル配列は、例えば、酵母インペルターゼリーダー、因子リーダー（サッカロミセス及びクルイペロミセス 因子リーダー）、又は酸ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルピカンズグルコアミラーゼリーダー、又は国際公開第90/13646号に記載のシグナルによって置き

40

50

換えられる。哺乳動物の細胞発現では、哺乳動物シグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス g Dシグナルが利用可能である。このような前駆体領域の DNA を、リーディングフレーム内で、本発明の抗体をコードする DNA に結合する。

【0199】

別の実施態様において、抗体の産生は宿主細胞の細胞質内で生じ得、したがって、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在を必要としない。就いては、免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖が発現され、折りたたまれ、組み立てられて、細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。特定の宿主株（例えば、大腸菌 *trxB* 株）はジスルフィド結合形成に有利な細胞質条件を提供し、それにより、発現されたタンパク質サブユニットの適切な折りたたみと組み立てが可能となる (Proba and Plukthun, 1995, Gene, 159:203)。

10

【0200】

g. (ii) 複製開始点成分

発現ベクターとクローニングベクターの両方が、一又は複数の選択された宿主細胞内でベクターが複製することを可能にする核酸配列を含有する。一般に、クローニングベクターにおいて、この配列は、宿主の染色体 DNA から独立してベクターが複製することを可能にする配列であり、複製開始点又は自律複製配列を含む。このような配列は、種々の細菌、酵母及びウイルスについてよく知られている。プラスミド pBR322 からの複製開始点は、大部分のグラム陰性細菌に適しており、2 μ プラスミドの開始点は酵母に適しており、種々のウイルスの開始点 (SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV 又は BPV) は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製開始点の成分は哺乳動物の発現ベクターには不要である (早期プロモーターを含むという理由のみで SV40 開始点が通常使用される)。

20

【0201】

h. (iii) 選択遺伝子成分

発現ベクター及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含み得る。代表的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質又は他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート又はテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、(b) 栄養要求性欠陥を補うタンパク質、又は (c) 天然培地からは得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする (例えば、桿菌の D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子)。

30

【0202】

選択方式の一例は、宿主細胞の増殖を停止させる薬物を利用する。異種遺伝子により首尾よく形質転換されている細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生成し、それゆえ選択レジメを生き延びる。このような優性選択の例は、薬物のネオマイシン、ミコフェノール酸及びヒグロマイシンを使用する。

【0203】

哺乳動物細胞に好適な選択可能マーカーの別の例は、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン I 及び II 等、抗体核酸を取り出すことのできる細胞の同定を可能にするもの、例えば、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等である。

40

【0204】

例えば、DHFR 選択遺伝子によって形質転換された細胞は、DHFR の競合アンタゴニストであるメトトレキサート (Mtx) を含有する培地ですべての形質転換体を培養することにより、先ず同定される。野生型 DHFR を用いた場合の好適な宿主細胞は、DHFR 活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株である。

【0205】

或いは、抗体をコードする DNA 配列、野生型 DHFR タンパク質、及びアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ (APH) 等の他の選択可能マーカーで形質転換又は同時形質転換された宿主細胞 (特に、内因性 DHFR を含有する野生型宿主) は、例えばカナマイシン、ネオマイシン又は G418 等のアミノグリコシド抗生物質の如き選択可

50

能マーカーに対する選択剤を含有する培地中での細胞増殖により選択され得る。米国特許第4965199号を参照のこと。

【0206】

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcomb et al., Nature, 282:39(1979))。trp1遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異株、例えばATCC番号44076又はPEP4-1に対する選択マーカーを提供する。Jones, 1977, Genetics, 85:12.次いで、酵母宿主細胞ゲノムにおけるtrp1破壊の存在により、トリプトファンの非存在下での増殖により形質転換を検出するための効果的な環境が提供される。同様に、Leu2欠損酵母株(例えば、ATCC寄託番号20622又は38626の株)が、Leu2遺伝子を有する既知のプラスミドにより補完される。

10

【0207】

加えて、1.6 μmの環状プラスミドpKD1由来のベクターが、クルイペロミセス酵母の形質転換に使用され得る。或いは、組換え仔牛キモシンの大規模生産用の発現系が、クルイペロミセス・ラクチスに関して報告されている。Van den Berg, 1990, Bio/Technology, 8:135を参照のこと。クルイペロミセスの産業用菌株による成熟した組換えヒト血清アルブミンの分泌に適した多コピー発現ベクターも開示されている。Fleerら, 1991, Bio/Technology, 9:968-975参照。

【0208】

i. (iv) プロモーター成分

発現ベクター及びクローニングベクターは、宿主生物によって認識され、抗体核酸に作動可能に結合されたプロモーターを、通常は含有する。原核生物宿主との使用に適したプロモーターは、phoAプロモーター、 λ -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系、及びtacプロモーターのようなハイブリッドプロモーターを含む。しかし、他の既知の細菌プロモーターも適している。細菌系に使用されるプロモーターは、抗体をコードするDNAに作動可能に結合されたシャイン・ダルガノ(S.D.)配列も含有する。

20

【0209】

真核生物に関するプロモーター配列が知られている。実質的にすべての真核生物遺伝子は、転写が開始される部位からおよそ25から30塩基上流に位置するATリッチ領域を有している。多くの遺伝子の転写の開始から70から80塩基上流に見出されるもう一つの配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNCAAT領域である。ほとんどの真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端にポリAテイルを付加するためのシグナルであり得るAATAAA配列がある。これらの配列はすべて、真核生物発現ベクターに適切に挿入される。

30

【0210】

酵母宿主と共に使用するための適切なプロモーター配列の例は、3-ホスホグリセレートキナーゼ、又はエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルベ-トデカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルベ-トキナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼ等の他の解糖酵素のプロモーターを含む。

40

【0211】

他の酵母プロモーターは、増殖条件によって制御される転写という更なる利点を有する誘導性プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、並びにマルトース及びガラクトースの利用を担う酵素のプロモーター領域である。酵母の発現に用いられる適切なベクター及びプロモーターは、EP73657号に更に記載されている。酵母エンハンサーもまた、酵母プロモーターと共に有利に用いられる。

50

【0212】

哺乳動物宿主細胞中のベクターからの抗体転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えばアデノウイルス2）、ウシバピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、サルウイルス40（SV40）等のウイルスのゲノムから得られるプロモーター、又はアクチンプロモーター若しくは免疫グロブリンプロモーター等の異種哺乳動物プロモーターから得られるプロモーター、又は熱ショックプロモーターから得られるプロモーターにより制御される。ただし、そのようなプロモーターが宿主細胞系と適合性であることを条件とする。

【0213】

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルスの複製開始点をも含有するSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII-E制限断片として簡便に得られる。ウシバピローマウイルスをベクターとして用いて哺乳動物宿主にDNAを発現する系は、米国特許第4419446号に開示されている。この系の修飾は、米国特許第4601978号に記載されている。単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒトB-インターフェロンcDNAの発現について、Reyesら、1982、Nature 297:598-601も参照されたい。或いは、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復がプロモーターとして使用され得る。

【0214】

j. (v) エンハンサーエレメント成分

より高等な真核生物による抗体をコードするDNAの転写は、ベクター内にエンハンサー配列を挿入することによって増加することが多い。哺乳動物遺伝子（グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン及びインスリン）の多数のエンハンサー配列が、現在知られている。しかし、典型的には、真核細胞ウイルスのエンハンサーが用いられる。例は、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー（bp 100-270）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーを含む。真核性プロモーター活性化のための強化要素については、Yaniv、1982、Nature 297:17-18も参照されたい。エンハンサーは、抗体コード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、典型的には、プロモーターから5'位に位置している。

【0215】

k. (vi) 転写終結成分

真核生物宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞）中で用いられる発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含んでいる。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAsの非翻訳領域である、通常は5'、場合によっては3'から取得できる。これら領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。一つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号及びそこに開示の発現ベクターを参照のこと。

【0216】

l. (vii) 翻訳強度の調整

また、本明細書に記載の免疫グロブリンは、発現された軽鎖及び重鎖の量比を、分泌されて適切に組み立てられた完全長抗体の収率を最大化するために調整することができる発現系から発現され得る。このような調整は、軽鎖と重鎖の翻訳強度を同時に調整することによって達成される。

【0217】

翻訳強度を調整するための一つの技術はSimmonsら米国特許第5840523号及びSimmonsら、2002、J. Immunol. Methods, 263: 133-147に開示されている。該技術は、シストロン内の翻訳開始領域（TIR）の変異体を利用する。所定のTIRに関して、連続し

10

20

30

40

50

たアミノ酸又は核酸配列変異体は様々な翻訳強度で作成され得、これにより特定の鎖の望ましい発現レベルのためにこの因子を調節する好都合な手段が提供される。T I R 変異体は、ヌクレオチド配列のサイレント改変が代表的であるが、アミノ酸配列を変えることのできるコドン変化をもたらす通常の突然変異誘発技術により生成され得る。T I R の改変は例えば、シグナル配列の改変と共に、シャイン・ダルガノ配列の数又はスペーシングの改変を含み得る。突然変異体シグナル配列を生成するための一つの例示的な方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変化させない（すなわち、この変化はサイレントである）コード配列の始めに「コドンバンク (codon bank)」を生成することである。このことは、各コドンの第三のヌクレオチドの位置を変更することによって達成され得、加えて、ロイシン、セリン、及びアルギニン等の幾つかのアミノ酸は、コドンバンクの作製に複雑さを加え得る複数の第一及び第二の位置を有する。突然変異誘発のこの方法は、Yansuraら 1992, METHODS: A Companion to Methods in Enzymol., 4:151-158に詳細に記載されている。

10

【0218】

幾つかの実施態様において、一組のベクターが、その中の各シストロンについて様々なT I R 強度で生成される。この限られた組が、様々なT I R 強度組み合わせでの各鎖の発現レベル及び完全長産物の収量の比較を提供する。T I R 強度は、Simmonsら、米国特許第5840523号及びSimmonsら、2002, J. Immunol. Methods, 263: 133-147に詳細に記載されているように、レポーター遺伝子の発現レベルを定量することによって決定され得る。特定の実施態様では、ベクター内のT I R の特定の対に関する翻訳強度の組み合わせは、(N - 軽、M - 重)によって表され、ここで、Nは、軽鎖の相対的T I R 強度であり、Mは、重鎖の相対的T I R 強度である。例えば、(3 - 軽、7 - 重)は、ベクターが、軽鎖発現に関しては約3の相対的T I R 強度、重鎖発現に関しては約7の相対的T I R 強度を提供することを意味する。翻訳強度の比較に基づき、本発明の発現ベクターコンストラクトに組み合わせるべき所望の個々のT I R が選択される。

20

【0219】

m. (viii) 宿主細胞の選択及び形質転換

本明細書のベクターにおけるDNAのクローニング又は発現に適切な宿主細胞は、上記の原核生物、酵母又は高等真核生物の細胞である。この目的のための適切な原核生物は、グラム陰性又はグラム陽性生物体等の古細菌及び真正細菌、例えば、大腸菌属（大腸菌等）、エンテロバクター属、エルウイニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属（ネズミチフス菌等）、セラチア属（霊菌等）及び赤痢菌属といった腸内細菌科、並びに枯草菌及びバチルス・リケニフォルミス（例えば、1989年4月12日公開のDD266710に開示されたバチルス・リケニフォルミス41P）といったバチルス属、シュードモナス属（緑膿菌等）及びストレプトミセス属を含む。大腸菌クローニング宿主の一つは大腸菌294 (ATCC31446)であるが、大腸菌B、大腸菌X1776 (ATCC31537)及び大腸菌W3110 (ATCC27325)といった他の菌株も好適である。これらの例は、限定ではなく例示である。また、宿主細胞が最少量のタンパク質分解酵素を分泌することが有用であり、追加のプロテアーゼ阻害剤が細胞培養物中に組み込まれることが望ましい場合がある。また、原核宿主細胞は、チオレドキシソ経路及びノ又はグルタチオン経路における突然変異を含み得る。

30

40

【0220】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母等の有用真核微生物は、抗体をコードするベクターにとって好適なクローニング宿主又は発現宿主である。低級真核宿主微生物の中では、サッカロマイセス・セレビシエ、すなわち一般的なパン酵母が最も一般的に用いられる。しかしながら、例えば分裂酵母；例えば、クルイペロミセス・ラクチス、クルイペロミセス・フラジリス (ATCC12424)、クルイペロミセス・ブルガリカス (ATCC16045)、クルイペロミセス・ウィッカーラミ (wickerhamii) (ATCC24178)、クルイペロミセス・ワルティー (waltii) (ATCC56500)、クルイペロミセス・ドロソフィラルム (drosophilum) (ATCC3690

50

6)、クルイベロミセス・サーモトレランス(thermotolerans)及びクルイベロミセス・マルキシアナス(marxianus)等のクルイベロミセス宿主;ヤロウシア属(EP402226);ピキア・パストリス(EP183070);カンジダ属;トリコデルマ・リージア(Trichoderma reesia)(EP244234);アカパンカビ;シュワンニオミセス・オクシデンタリス(Schwanniomyces occidentalis)等のシュワンニオミセス(Schwanniomyces)属;及び、例えばアカパンカビ属、アオカビ属、トリボクラディウム属(Tolytocyclus)等の糸状菌、及び為巢性麹菌及びクロカビ等のアスペルギルス宿主といった他の多数の属、種、及び株が一般的に入手可能であり、本明細書において有用である。

10

【0221】

グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物から得られる。無脊椎動物細胞の例は、植物細胞及び昆虫細胞を含む。多数のバキュロウイルス株及び変異体と、ヨトウガ(毛虫)、ネタイシマカ(蚊)、ヒトスジシマカ(蚊)、キイロショウジョウバエ(ショウジョウバエ)及びカイコガ等の宿主からの対応する許容昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、キンウワバ科NPVのL-1変異体及びカイコガNPVのBm-5株が公的に入手可能であり、このようなウイルスは本明細書におけるウイルスとして、特にヨトウガ細胞のトランスフェクションのために使用され得る。綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト及びタバコの植物細胞培養物も宿主として利用され得る。

20

【0222】

脊椎動物宿主細胞は広く用いられており、培養物における脊椎動物細胞の増殖(組織培養)は常套法となっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1系(COS-7、ATCC CRL 1651);ヒト胎児腎臓系(293細胞又は懸濁培養にて増殖用にサブクローン化した293細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59(1977));ベビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/DFHR(CHO、Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216);マウスセルトリ細胞(TM4、Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251);サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CRL 2);イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL 34);バッファローラット肝臓細胞(BRL3A、ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75);ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB 8065);マウス乳房腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL 51);TRI細胞(Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68);MRC 5細胞;FS4細胞;NSO(例えば、RCB0213、1992、Bio/Technology 10:169)及びSP2/0細胞(例えば、SP2/0-Ag14細胞、ATCC CRL 1581)等のマウス骨髄腫細胞;YB2/0細胞(例えば、YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞、ATCC CRL 1662)等のラット骨髄腫細胞;及びヒト肝癌系(Hep G2)である。CHO細胞は、本明細書に記載の方法の実施のための代表的な細胞系であり、CHO-K1、DUK-B11、CHO-DP12、CHO-DG44(Somatic Cell and Molecular Genetics 12:555(1986))及びLec13は代表的な宿主細胞系である。CHO-K1、DUK-B11、DG44又はCHO-DP12宿主細胞の場合、これらは、その中で発現されたタンパク質をフコシル化する能力を欠失するように改変され得る。

30

40

【0223】

ハイブリドーマ細胞も使用され得る。用語「ハイブリドーマ」は、免疫源の不死細胞株と抗体産生細胞との融合によって生産されたハイブリッド細胞株を指す。この用語は、ヒト細胞と、マウス骨髄腫細胞系との融合、その後のプラズマ細胞との融合の結果である、一般にトリオーマ細胞系として知られている異種ハイブリッド骨髄腫融合体の後代を包含

50

する。更に、該用語は、例えばクアドローマ等の抗体を産生する任意の不死化ハイブリッド細胞系を含むことが意図されている（例えば、Milstein et al., 1983, Nature, 537:3053を参照）。ハイブリッド細胞系は、ヒトやマウスを含む任意の種のものであり得る。

【0224】

幾つかの実施態様において、哺乳動物細胞は、対象となっている抗体をコードする外来性単離核酸で形質転換された非ハイブリドーマ哺乳動物細胞である。「外来性核酸」又は「異種核酸」は、該細胞にとって外来であるか、又は該細胞と相同ではあるが宿主細胞核酸内で該核酸が通常では見られない位置にある核酸配列を意味する。

【0225】

n. (ix) 宿主細胞の培養

宿主細胞は、抗体生産のための上述の発現ベクター又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適宜改善された通常の栄養培地中で培養される。

【0226】

抗体を生産するために用いられる宿主細胞は、種々の培地中で培養され得る。HamのF10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 及びDulbeccoの改良Eagle培地 (DMEM)、Sigma) 等の市販の培地は、宿主細胞の培養に適している。加えて、Hamら, 1979, Meth. Enz. 58:44、Barnesら., 1980, Anal. Biochem. 102:255、米国特許第4767704号；同第4657866号；同第4927762号；同第4560655号；又は同第5122469号；国際公開第90/03430号；国際公開第87/00195号；又は米国再発行特許第30985号に記載の何れの培地も宿主細胞用の培地として使用され得る。これらの培地の何れにも、ホルモン及び/又は他の増殖因子（例えばインスリン、トランスフェリン、又は上皮増殖因子）、塩（例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩）、緩衝剤（例えばHEPES）、ヌクレオチド（例えばアデノシン及びチミジン）、抗生物質（例えばゲンタマイシン^{T M}薬）、微量元素（最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される）、及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物も、当業者に既知の適切な濃度で含められ得る。温度、pH等の培養条件は、発現用に選択された宿主細胞で先に用いられたものであり、当業者には明らかであろう。

【0227】

培養培地はすべて、以下のカテゴリーの一又は複数から少なくとも一つの成分を通常提供する：

- 1) 通常はグルコース等の糖（炭水化物）の形態のエネルギー源；
- 2) 全必須アミノ酸、及び通常20種類のアミノ酸の基本セット+シスチン；
- 3) ビタミン類及び/又は低濃度で必要とされる他の有機化合物；
- 4) 遊離脂肪酸；及び
- 5) 微量元素、ここで微量元素は、通常マイクロモル範囲の極めて低濃度で典型的に必要とされる無機化合物又は天然元素として定義される。

【0228】

特定の実施態様では、培養培地は無血清であり（例えば、約5%未満、又は1%未満、又は0%から0.1%の血清）、また他の動物由来タンパク質も含まない。しかし、それらは所望ならば使用してもよい。一実施態様では、細胞培養培地は過剰のアミノ酸を含む。過剰に提供されるアミノ酸は、例えば、Asn、Asp、Gly、Ile、Leu、Lys、Met、Ser、Thr、Trp、Tyr及びValから選択され得る。一実施態様では、Asn、Asp、Lys、Met、Ser及びTrpが過剰に提供される。例えば、欧州特許第307247号又は米国特許第6180401号に指定された範囲の1倍又は2倍で、アミノ酸、ビタミン類、微量元素及び他の培地成分が使用され得る。これら2つの文書は、参照により本明細書に援用される。

【0229】

10

20

30

40

50

所望のタンパク質を発現し、特定の位置に所望の糖（炭水化物）を付加することのできる哺乳動物細胞の培養のために、培養される宿主細胞に特に注意を払って、多数の培養条件が使用され得る。哺乳動物細胞のための好適な培養条件は、当該技術分野でよく知られている（W. Louis Cleveland et al., 1983, J. Immunol. Methods 56:221-234）か、又は当業者により容易に決定され得（例えば、Animal Cell Culture: A Practical Approach 2nd Ed., Rickwood, D. and Hames, B. D., eds. Oxford University Press, New York (1992)参照）、選択された具体的な宿主細胞によって変わる。

【0230】

o. (x) 抗体精製

組換え法を用いる場合、本発明の抗体は、細胞内、細胞周辺腔内で生成されるか、又は培地中に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、最初の工程として、宿主細胞か又は溶解断片の何れかである微粒子状デブリは、例えば遠心分離又は限外濾過により除去される。Carterら、1992, Bio/Technology 10: 163-167は、大腸菌の細胞周辺腔に分泌される抗体を単離する方法を記載している。手短に述べると、酢酸ナトリウム（pH 3.5）、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）の存在下、細胞ペーストを約30分にわたって解かす。細胞デブリは、遠心分離により除去され得る。抗体が培地中に分泌される場合、このような発現系の上澄み液は、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amicon又はMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて、一般的には先ず濃縮される。PMSF等のプロテアーゼ阻害剤は、タンパク質分解を阻害するために前述の工程の何れかに含まれ得、また、抗生物質は、偶発的夾雑物の増殖を防ぐために含まれ得る。

【0231】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製され得るが、アフィニティークロマトグラフィーが代表的な精製法である。親和性リガンドとしてのタンパク質Aの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。タンパク質Aは、ヒト 1、2、又は4重鎖に基づく抗体の精製に用いられ得る（Lindmark et al., 1983, J. Immunol. Meth. 62:1-13）。タンパク質Gは、すべてのマウスアイソタイプとヒト 3に対して推奨される（Guss et al., 1986, EMBO J. 5:15671575）。親和性リガンドが結合するマトリックスは、多くの場合アガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。細孔制御ガラス又はポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定なマトリックスによって、アガロースで達成され得るよりも速い流速及び短い処理時間が可能になる。抗体がCH3ドメインを含む場合、精製には、Bakerbond ABXTM樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.）が有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えばイオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースTMでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂でのクロマトグラフィー（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE及び硫酸アンモニウム沈殿も、回収する抗体に応じて利用可能である。

【0232】

一実施形態において、糖タンパク質は、調製物からフコース含有糖タンパク質を除去するために、レクチン基質上への吸着を用いて精製され得、それによって、フコースのない糖タンパク質を濃縮できる。

【0233】

p. (xi) 抗体活性アッセイ

本発明の免疫グロブリンは、当該技術分野で周知の種々のアッセイによって、それらの物理的/化学的特性及び生物学的機能に関して特徴付けされ得る。一態様において、免疫原に結合する抗体の選択性を他の結合標的に対するものと比較することが重要である。

【0234】

特定の実施態様において、本明細書で生産される免疫グロブリンを、その生物活性に関

して分析する。幾つかの実施形態において、本発明の免疫グロブリンを、その抗原結合活性に関して試験する。当該技術分野で周知であり、本明細書で用いられ得る抗原結合アッセイとは、限定されないが、ウェスタンブロット、放射免疫アッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫アッセイ及びタンパク質A免疫アッセイ等の方法を用いた任意の直接的又は競合結合アッセイを含む。具体的な抗原結合アッセイは、下記の実施例の項に提供されている。

【0235】

精製免疫グロブリンは、限定されないが、N末端配列決定、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、質量分析法、イオン交換クロマトグラフィー及びパイン消化を含む一連のアッセイによって更に特徴付けることができる。タンパク質定量化の方法は当該技術分野でよく知られている。例えば、発現タンパク質の試料は、それらの量的強度に関して、クーマシー染色SDS-PAGEで比較され得る。或いは、対象となっている特異的バンド（例えば完全長バンド）は、例えば、ウェスタンブロットゲル分析及び/又はAME5-RPアッセイによって検出され得る。

【0236】

医薬製剤

本発明の抗体の治療製剤は、所望の純度を有する抗体を、任意選択的な生理学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定剤と混合することによって（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で調製され得る。許容可能な担体、賦形剤又は安定剤は、用いられる投与量及び濃度にてレシピエントに対して非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のような緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチオルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）抗体；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む、単糖類、二糖類及び他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又はTWEENTM、PLURONICSTM若しくはポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。本明細書における例示的な薬学的に許容可能な担体は、介在性（inserterstital）薬物分散剤、例えば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLENE X（登録商標）、Baxter International, Inc.）のようなヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。rHuPH20を含む特定の典型的なsHASEGP及び使用法は、米国特許出願公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様では、sHASEGPは、コンドロイチナーゼ等の一又は複数の追加的グルコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0237】

例示的な凍結乾燥抗体製剤が米国特許第6267958号に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第6171586号及び国際公開第2006/044908号に記載されているものを含み、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0238】

また、本明細書中の製剤は治療される特定の適応症に必要な一を超える活性化合物も含有し得、例えば、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものである。例えば、本発明の製剤は別の抗体又は化学療法剤、を更に含んでもよい。そのような分子は、好まし

10

20

30

40

50

くは、意図される目的に有効な量の組み合わせで存在する。

【0239】

また、活性成分は、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）において、又はマクロエマルジョンにおいて、例えば、コアセルベーション法により、又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル、及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに封入されてもよい。これらの技術は、RemingtonのPharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0240】

インピボ投与に用いられる製剤は滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【0241】

徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、該マトリックスは、例えばフィルム又はマイクロカプセル等の成形品の形態である。徐放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸と-D-エチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOTTM（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射用マイクロスフェア）のような分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは100日間以上の分子放出を可能にするが、特定のヒドロゲルはより短い時間タンパク質を放出する。カプセル化抗体が体内に長時間残留する場合、37℃で水分に晒される結果、変性又は凝集して、生物活性を消失させ、場合によっては免疫原性を変化させ得る。関与する機構に依って、安定化のための合理的な方策が考案され得る。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合形成であることが分かれば、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、含水量の制御、適切な添加剤の使用、及び特定のポリマーマトリックス組成物の開発によって安定化が達成され得る。

【0242】

抗体の非治療的使用

抗体はアフィニティー精製剤として使用され得る。この方法においては、当該技術分野で周知の方法を用いて、セファデックスTM樹脂又は濾紙等の固相上に抗体が固定化される。固定化された抗体を、精製される抗原を含有する試料に接触させ、その後、試料中の精製される抗原以外の実質的にすべての物質を除去する好適な溶媒で支持体を洗浄し、これを固定化抗体に結合させる。最後に、抗体から抗原を遊離させるグリシン緩衝液（pH 5.0）等の別の好適な溶媒で支持体を洗浄する。

【0243】

また、該抗体は、例えば特定の細胞、組織又は血清中の対象となっている抗原の発現を検出するための、診断的アッセイにおいても有用であり得る。診断用途では抗体は通常、検出可能部分で標識される。多数の標識が入手可能であり、一般に以下のカテゴリーに分類される：

(a) ³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H及び¹³¹I等の放射性アイソトープ。抗体は、例えば、Current Protocols in Immunology、第1巻及び第2巻、Coligenら編、Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)に記載の方法を用いて、放射性アイソトープで標識され得、放射性はシンチレーション測定を用いて測定され得る。

(b) 希土キレート類（ユーロピウムキレート類）又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリスリン及びテキサスレッド等の蛍光標識。該蛍光標識は、例えば、上掲のCurrent Protocols in Immunologyに開示の方法を用いて抗体にコンジュゲートされ得る。蛍光は蛍光光度計を用いて定量され得

10

20

30

40

50

る。

(c) 種々の酵素 - 基質標識が入手可能であり、米国特許第 4 2 7 5 1 4 9 号はこれらの一部についての概説を提供している。酵素は一般に、種々の方法を用いて測定され得る発色性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は基質における色変化を触媒でき、これは分光測定で測定され得る。或いは、酵素は基質の蛍光又は化学発光を変化させ得る。蛍光の変化を定量するための方法は、上に記載されている。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、次いで、測定することができる(例えば化学ルミノメーターを用いて)か、又はエネルギーを蛍光受容基に与える光を発生し得る。酵素標識の例は、ルシフェラーゼ類(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ; 米国特許第 4 7 3 7 4 5 6 号)、ルシフェリン、2, 3 - ジヒドロフタラジンジオン類、マレートデヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、βガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ類(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ)複素環式オキシダーゼ(ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ等)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等を含む。酵素を抗体にコンジュゲートするための方法は、O' Sullivanら、Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, Methods in Enzym. (ed J. Langone and H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

10

20

30

40

50

【0244】

酵素 - 基質の組み合わせの例は、例えば：

1) セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)は、過酸化水素を利用して色素前駆体を酸化する(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)又は塩酸 3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン(TMB));

2) アルカリホスファターゼ(AP)と、発色性基質としてのパラニトロフェニルホスフェート; 及び

3) β-D - ガラクトシダーゼ(β-D - Gal)と発色性基質(例えば、p - ニトロフェニル - β-D - ガラクトシダーゼ)又は蛍光発生基質の 4 - メチルウンベリフェリル - β-D - ガラクトシダーゼ

を含む。

【0245】

多数の他の酵素 - 基質の組み合わせが当業者に入手可能である。これらの総説に関しては、米国特許第 4 2 7 5 1 4 9 号及び同第 4 3 1 8 9 8 0 号を参照されたい。

【0246】

場合によっては、標識を抗体に間接的にコンジュゲートさせる。これを達成するための種々の方法が当業者に知られている。例えば、抗体はビオチンとコンジュゲートされ得、また、上記の三つの広いカテゴリーの標識の何れかはアビジンとコンジュゲートされ得、或いはその逆も可能である。ビオチンは選択的にアビジンに結合し、したがって、標識はこの間接的な方式で抗体にコンジュゲートされ得る。或いは、標識と抗体との間接的コンジュゲーションを達成するために、抗体を小さなハプテン(例えばジゴキシン)とコンジュゲートさせ、上記の種々のタイプの標識の何れか一つを、抗ハプテン抗体(例えば抗ジゴキシン抗体)とコンジュゲートさせる。このようにして、標識と抗体との間接的コンジュゲーションが達成され得る。

【0247】

別の実施態様において、抗体は標識化される必要はなく、その存在は、該抗体に結合する標識抗体を用いて検出され得る。

【0248】

本発明の抗体は、競合結合アッセイ、直接的及び間接的サンドイッチアッセイ、並びに免疫沈降アッセイ等の任意の知られているアッセイ法で用いられ得る。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 47-158頁 (CRC Press, Inc. 1987)。

【0249】

本発明の抗体はインビボ診断アッセイにも使用され得る。一般に、本発明の抗体を放射性核種 (^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 又は ^{35}S 等)で標識し、免疫シンチグラフィーを使用して抗原又はそれを発現する細胞が局在化できるようにする。

【0250】

抗体のインビボ(治療的)使用

種々な疾患の治療用に治療抗体が開発され、承認されている。特定の実施態様において、治療剤の機能を高めるために、抗IL-1抗体及び/又は抗IL-18抗体が治療剤とともに共投与される。

10

【0251】

疾病の予防又は治療のための抗体の適切な用量は、治療される疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体が予防的目的の投与か治療的目的の投与か、治療歴、患者の病歴及び抗体に対する応答、並びに主治医の判断に依拠するであろう。抗体は、患者に対して、単回、又は一連の治療にわたって適切に投与される。

【0252】

疾患のタイプ及び重症度に応じて、例えば一回又は複数回の別個の投与によるか又は連続注入によるかに関わらず、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1-20\text{mg}/\text{kg}$)の抗体が患者への投与のための初期候補用量である。典型的な1日用量は、上記要因に応じて約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 又はそれ以上の範囲である。数日間以上にわたる反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで維持される。しかしながら、他の投薬レジメンも有用であり得る。本療法の進捗は一般的な手法及びアッセイにより容易にモニターされる。

20

【0253】

本発明の抗体組成物は、医学実施基準に合致する方法で処方され、調剤され、投与されなければならない。これに関連して考慮すべき要因は、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与計画及び医療従事者が知る他の要因を含む。投与される抗体の「治療的有効量」は、このような考慮事項によって決まり、疾病若しくは疾患を予防、改善又は治療するために必要な最小量である。本発明の抗体は、必ずしも必須ではないが任意選択的に、当該問題の疾患を予防若しくは治療するのに目下使用されている一又は複数の薬剤と共に製剤化される。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、疾患又は治療の種類、及び上記以外の要因によって決まる。このような他の薬剤は通常、上文で用いられたのと同じ用量及び投与経路で、又は従来用量の約1から99%が使用される。

30

【0254】

例えば、関節リウマチ及び狼瘡のように炎症細胞(例えば、白血球)接着、遊走及び活性化を伴う自己免疫疾患を治療するため、本明細書中の抗体は、例えば、抗LFA-1抗体(抗CD11a又は抗CD18抗体等)とともに、又は抗ICAM-1、-2若しくは-3等の抗ICAM抗体とともに共投与され得る。本明細書の抗体と併用で関節リウマチを治療するための追加の薬剤は、エンブレルTM、メトトレキサート等の疾患修飾性抗リウマチ薬、及びNSAID(非ステロイド性抗炎症薬)を含む。本明細書の抗体以外のこのような他の複数の活性剤も用いられてよい。加えて、インスリンが糖尿病、抗IgEが喘息、抗CD11aが乾癬、抗アルファ4ベータ7と成長ホルモン(GH)が炎症性腸疾患の治療に使用され得る。

40

【0255】

製造品

別の実施態様では、上述した疾患の治療、予防、及び/又は診断に有用な材料を含有する製造品が提供される。製造品は、容器、及び容器表面の若しくは容器に付随するラベル又は添付文書を含む。好適な容器は、例えばビン、バイアル、シリンジ、IV輸液バッグ等を含む。該容器はガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は、

50

症状の治療、予防、及び/又は診断に有効な、単独の又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有することができる（例えば、容器は皮下注射針により穿孔可能なストッパーを有する静脈内溶液のバッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも一の活性剤は抗体である。ラベル又は添付文書は、組成物が選択された病態を治療するために使用されることを示している。更に、製造品は、(a)抗体を含む組成物の中に収容する第一の容器；及び(b)更なる細胞傷害性剤又はその他の治療剤を含む組成物の中に収容する第二の容器を含み得る。本実施態様における製造品は、組成物が特定の病態を治療するために使用され得ることを示す添付文書を更に含んでもよい。或いは、又は加えて、製造品は、薬学的に許容可能な緩衝液、例えば注射用静菌水(BWF I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロース溶液を含む第二(又は第三)の容器を更に含んでもよい。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む、商業的及び使用者の観点から望まれる他の材料を更に含んでもよい。

10

【0256】

治療用抗体組成物は、通常、滅菌のアクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有するバイアル）内に配置される。

【0257】

また、例えばCD又はUC等の炎症性腸疾患の治療に有用な材料を含有するキット及び製造品が提供される。製造品はラベル付きの容器を含む。好適な容器は、例えば、ビン、バイアル及び試験管を含む。容器は、例えば、ガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は本明細書に記載の抗体を含む組成物を収容する。組成物中の活性剤は特定の抗体である。容器上のラベルは、組成物が特定の疾患又は障害の治療又は予防のために使用されることを示し、また上記のもののようなインビボのための用法も示す。

20

【0258】

特定の実施態様では、キットは、上記の容器及び緩衝液を含む第二の容器を含む。キットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び使用説明が書かれた添付文書を含む、商業的及び使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでもよい。

【0259】

一般的なバイオマーカー技術

特に断りのない限り、本発明の実施は、当技術分野の技術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、生化学及び免疫学の通常の技術を用いる。このような技術は、例えば「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版 (Sambrook et al., 1989)；「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait, ed., 1984)；「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney, ed., 1987)；「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.)；「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubel et al., eds., 1987, 及び定期的更新版)；「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullis et al., eds., 1994)等の文献に十分に説明されている。

30

【0260】

本発明で用いられるプライマー、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドは当該技術分野で知られている標準的な技術を使用して生成され得る。

40

【0261】

UC又はクローン病に罹患している患者を含むIBD患者の特定の治療剤に対する応答性を予測することに関連する遺伝子発現バイオマーカーが本明細書において提供される。mRNA又は遺伝子によりコードされる個々のタンパク質のこうした発現レベルは、IBD治療剤、UC治療剤及び/又はクローン病の治療剤に対する応答を予測するためのバイオマーカーを構成する。したがって本明細書に開示されている発明は、例えば炎症性腸疾患の診断及び治療に関連する方法並びに組成物等の様々な設定において有用である。

【0262】

遺伝子発現量の検出

核酸は、本明細書に記載の任意の方法によれば、ゲノムDNAから転写されたRNA、

50

又はRNA若しくはmRNAから生成されたcDNAであり得る。核酸は、脊椎動物、例えば哺乳動物由来であってもよい。核酸は、その供給源から直接得られる場合、又はその供給源に見出される核酸のコピーである場合に、特定の供給源に「由来」と言われる。

【0263】

核酸は核酸のコピー、例えば、増幅から生じるコピーを含む。増幅は、幾つかの例において、例えば変異を検出するための材料の所望の量を得るために望ましいものであり得る。アンプリコンは、特定の遺伝子の発現を決定するための下記のような変異体検出方法に供され得る。

【0264】

mRNAのレベルは、市販のキット及び試薬の使用を含む当業者に周知の様々な方法によって測定され、定量され得る。そのような方法の一つがポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。定量的な使用のためのもう一つの方法は、リアルタイム定量PCR(すなわち、qPCR)である。例えば、「PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications」,(M.A. Innis et al., eds., Academic Press, Inc., 1990); 「Current Protocols in Molecular Biology」 (F. M. Ausubel et al., eds., 1987及び定期的更新版);及び「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullis et al., eds., 1994)参照。

【0265】

マイクロアレイは、例えば、高ストリンジェンシー条件下でcDNA又はcRNA試料とハイブリダイズする数千の整列された一連の核酸プローブを通常使用す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、通常、蛍光体標識、銀標識又は化学発光標識された標的の検出により検出及び定量され、標的における核酸配列の相対存在度を決定する。典型的なマイクロアレイでは、プローブは、(エポキシ-シラン、アミノ-シラン、リジン、ポリアクリルアミド等を介して)化学的マトリックスへの共有結合によって固体表面に付着する。固体表面とは、例えば、ガラス、シリコンチップ又は超小型ビーズである。例えばAffymetrix, Inc.及びIllumina, Inc.製を含む種々のマイクロアレイが市販されている。

【0266】

生体試料は、当業者に既知の幾つかの方法を用いて得ることができる。生体試料は脊椎動物、特に哺乳類から得ることができる。幾つかの例では、生体試料は滑膜組織、血清又は末梢血単核細胞(PBMC)である。このような生体試料をスクリーニングすることによって、潰瘍性大腸炎及びクローン病等の疾患に対する簡単な早期診断が達成できる。その上、このような生体試料の標的核酸(又はコードされたポリペプチド)の発現レベルの変化を試験することによって、治療の進捗がより容易にモニターされ得る。

【0267】

対象又は組織若しくは細胞試料が遺伝子発現署名又は相対レベルの本明細書に開示の特定のバイオマーカーを含むことが判明した後、有効量の適切な治療剤が、対象における特定の疾患、例えばUC又はクローン病を治療するために対象に投与され得ることが企図されている。本明細書に記載の様々な病的状態の哺乳動物の臨床診断は、当業者によって行われ得る。例えば、哺乳動物における炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎及びクローン病等)の診断又は検出を可能にする臨床診断技術が当該技術分野で利用される。

【0268】

診断アッセイキット

本明細書中に記載又は示唆された用途での使用のための、診断アッセイキット又は製品も提供される。そのようなキットは、例えばバイアル、チューブ等の一又は複数の容器手段を厳重に封じ込めて受け取るように区画化されている担体手段を含んでよく、容器手段は各々本方法で用いられる別々の要素のうちの一つを含む。例えば、容器手段のうちの一つは、検出可能に標識されているか又は標識され得るプローブを含んでもよい。そのようなプローブは、遺伝子発現署名の一又は複数の遺伝子を含むポリヌクレオチドに対して特異的なポリヌクレオチドであり得る。標的核酸を検出するためにキットが核酸ハイブリ

10

20

30

40

50

ダイゼーションを利用する場合、キットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチド（単数又は複数）を収容する容器、及び／又は酵素標識、蛍光標識若しくは放射性同位体標識等のレポーター分子に結合させたアビジン又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等のレポーター手段を含む容器も有し得る。

【0269】

診断アッセイキットは、典型的には、上記の容器並びに緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び使用指示書付きの添付文書を含む商業的及び使用者の観点から望ましい材料を含む一又は複数の他の容器を含む。組成物が特定の治療的又は非治療的用途に使用されることを示すラベルが容器上に存在していてもよく、また、ラベルは上記の指示等のインビボ使用又はインビトロ使用のための指示を示していてもよい。キットの他の任意選択の成分は、一又は複数の緩衝剤（例えば、ブロック緩衝剤、洗浄緩衝剤、基質緩衝剤等）、酵素標識によって化学的に改変される基質（例えば色素原）等の他の試薬、エピトープ回収溶液、コントロール試料（ポジティブ及び／又はネガティブコントロール）、コントロールスライド（単数及び複数）を含む。

10

【0270】

マーケティング方法

本明細書の発明はまた、治療剤又はその薬学的に許容可能な組成物のマーケティング方法であって、ターゲット層に対し、特定の疾患、例えばUC又はクローン病を有する患者又は患者集団を治療するための薬剤又はその医薬組成物の使用を奨励、指示及び／又は明示することを含む方法をも包含し、該患者又は患者集団から採取された試料は、遺伝子発現署名、又は血清バイオマーカー若しくは末梢血バイオマーカーのレベル、又は本明細書に記載の組織バイオマーカーの検出を示す。

20

【0271】

マーケティングは、一般的に、スポンサーが特定されてメッセージが管理される、非個人的媒体を通じた有料のコミュニケーションである。本明細書の目的のためのマーケティングは、宣伝、広報、プロダクト・プレイスメント、スポンサーシップ、アンダーライティング及び販売促進を含む。本用語はまた、大衆にアピールして説得し、情報を与え、奨励し、動機付け、そうでなければ本明細書の発明の購入、支持、承認の好意的な行動パターンに向けて修正するために作られた任意の紙媒体に掲載されるスポンサー付き情報公告も含む。

30

【0272】

本明細書の診断方法のマーケティングは任意の手段により達成され得る。こうしたメッセージを発信するために使用されるマーケティング媒体の例は、放送媒体に登場するメッセージであるコマーシャルを含む、テレビ、ラジオ、映画、雑誌、新聞、インターネット、看板を含む。

【0273】

使用されるマーケティングの種類は、多くの要因、例えば、コストの考慮並びに医薬品及び診断薬の販売に関する準拠法のみならず、病院、保険会社、病院、医師、看護師、患者等のターゲット層の性質に依拠する。マーケティングは、双方向サービス及び／又はユーザ・属性や地理的位置等の他のデータによって定義されるユーザ特性に基づいて個別化又はカスタマイズされ得る。

40

【0274】

上記の明細書及び以下の実施例は、当業者が本発明を実施するのに十分なものと考えられる。本明細書に示され記載されているものに加え、本発明の様々な変更が、上記説明及び以下の実施例から当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲に含まれる。

【0275】

特定の問題又は状況への本発明の教示の適用は、本明細書に含まれる教示に照らし、当業者の能力の範囲内である。

【0276】

本発明の更なる詳細は、以下の非限定的な実施例により説明される。本明細書中のすべ

50

での引用文献の開示内容は、出典明示により本明細書に援用される。

【実施例】

【0277】

実施例において言及されている市販の試薬は、特に示さない限りは製造者の指示に従って使用された。

【0278】

材料及び方法

ヒトの切除組織標本

潰瘍性大腸炎、クローン病、憩室炎又は結腸がんのために腸切除を受けた患者が、インフォームドコンセントを提出して研究に参加した。手術に先立ち血液試料が入手され、終夜便で新鮮なうちにジェネンテックに輸送されるか、又は標準的な臨床手順に従って処理されて血清又は血漿として保存された。手術後、臨床分析のために必要な分を超える組織が採取された。小さな部分は、タンパク質分析のために急速凍結され、残りの組織は終夜便でジェネンテックに輸送された。

10

【0279】

一次腸上皮筋線維芽細胞(MF)が、患者の腸切除標本から単離された。簡潔には、表面上皮細胞が1ミリモルのEDTAを用いる3つの連続処理により粘膜試料から分離され、上皮細胞を剥離された組織標本が10%ウシ胎児血清(FCS)-RPMI(Gibco-Invitrogen, Calsbad, US)中で培養された(37、5%CO₂)。MFが粘膜固有層の上皮下領域から遊走し、組織培養皿中でコロニーを確立した。組織標本の除去後、一次MFが増殖し、数継代にわたって維持され得る単層を確立した。培養物はフローサイトメトリーによる一次MFと確認された(アルファ-平滑筋アクチン陽性、ビメンチン陽性、デスミン陰性)。一次MFは、10%のFBS、1%の非必須アミノ酸及び抗生物質カクテル(100ug/mlのペニシリン/連鎖球菌、20ug/mlのゲンタマイシン、2.5ug/mlのアムホテリシン(Amphotericin) B及び1ug/mlのメトロニダゾール)で高グルコースを補充したDMEM中で培養され、3から5継代3で実験に使用された。

20

【0280】

MF(3人の異なる患者由来)を一晩、ウェル(6ウェルプレート)当たり65000細胞で播種し、IL-1(10ng/ml)(カタログ番号201-LB-CF、R&D systems, Minneapolis, MN)又はTNF(10ng/ml)(カタログ#210-TA-CF、R&D systems, Minneapolis, MN)の添加有り若しくは無しで上記のように補充されたDMEMを用い、実験に応じて6時間又は24時間37で刺激し、その後、RNA単離のために収集した。RNAは、オンカラムDNAse消化工程を含む製造業者のプロトコールに従ってRNeasyカラム(Qiagen)を用いて単離され、マイクロアレイ(Agilent, Santa Clara, CA)用に準備された。

30

【0281】

急速凍結された切除組織標本は、液体窒素で予冷されたBessman組織粉碎器(Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA;カタログ#189475)中で処理された。組織片を、FastPrep(登録商標)-24 Instrument内で45秒間2回振盪させながら1mlの溶解用緩衝液(1xTBS、1%トリトン-X100、2x完全プロテアーゼ阻害剤カクテル)を用いてホモジナイズした。次いで、ホモジナイズした組織を、冷やされた微量遠心管内で14000gで10分間遠心分離した。上清をアリコートに分割し、-80で保存した。

40

【0282】

マイクロアレイ解析

RNAを増幅し、Quick Amp labeling kit(Agilent, Santa Clara, CA)を使用して標識し、合計1ugのRNAから標識されたcRNAを生成した。実験試料はCy5で標識され、参照チャンネル用にユニバーサルヒト

50

参照RNA (Stratagene, La Jolla, CA) が用いられ、それから Cy3 で標識された。Cy5 及び Cy3 で標識された cRNA は、二色のヒトゲノム全体 4 × 44 K 遺伝子発現マイクロアレイプラットフォームに競合的にハイブリダイズされた。ハイブリダイズされたマイクロアレイを製造業者のプロトコール (Agilent, Santa Clara, CA) に従って洗浄し、Agilent マイクロアレイスキャナーを使用してすべての特徴強度を収集した。スキャンされたスライドの TIF 画像是、特徴抽出ソフトウェア (Agilent, Santa Clara, CA)、プロトコール GE2-v5_95 (Agilent, Santa Clara, CA) を使用して解析された。すべてのデータは、色素で正規化された Cy5 : Cy3 比の log₂ 値として報告された。

10

【0283】

IL1 及び TNF に誘導された遺伝子の同定

線形モデルを、IL-1、TNF、並びに媒体制御処理及び時間点のそれぞれに適合させた。ベースラインからの変化と、少なくとも 1.5 倍の治療間の差の両方を示した遺伝子を同定した (偽陽性率、すなわち FDR = 0.001)。IL-1 及び TNF により独自にアップレギュレートされた遺伝子の重複を評価した。

【0284】

線維症に関連する遺伝子の同定

RNA は、切除組織標本から採取された全層パンチ生検から単離され、マイクロアレイ解析に供された。線維症関連遺伝子は、線維性狭窄のために切除を受けた患者対他のすべての患者からの生検間での遺伝子発現を比較することにより同定された。クローン病では線維症と炎症が同時に起こるため、線維狭窄性生検の多くは様々なレベルの免疫浸潤を示した。免疫細胞浸潤の量を推定するために、細胞型特異的遺伝子セットのパネルについて遺伝子発現値の最初の固有ベクトルを算出した (Abbas et al., Genes Immun. 6(4):319-31 (2005) 参照)。この固有ベクトルは、その試料内のその細胞型の浸潤の程度の推定値として使用された。こうした推定値は、診断、線維症及び生検の場所でも説明される線形モデルにおける共変量として使用された。遺伝子は、0.1 の FDR で、このモデルに基づいて選択された。

20

【0285】

qRT-PCR

RNA は、組織切除標本からの生検であるインビトロ MF 刺激実験から、また、qPCR 試験に使用するための組織学的分析のために使用されるものに隣接した OCT 切片から単離された。第一鎖 cDNA が、iScript (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて 200 ng の全 RNA から生成された。12.5 ng の cDNA を、製造業者の忠告に従い、希釈した Taqman assays (Life Technologies, Carlsbad, CA) と共に Taqman Pre Amp Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) を使用してプレ増幅させた。qPCR は、Biomark HD システム (Fluidigm 96.96 形式) と、幾つかのハウスキーピング遺伝子及びマイクロアレイデータから同定された遺伝子から成る 48 TaqMan アッセイのパネルとを用いて実施された。結果のデータは、Ct の値を得るために、GAPDH に対して正規化された。

30

40

【0286】

ELISA

刺激から上清を回収し、製造業者のプロトコール及びガイドラインに従って ELISA により GCSF (カタログ # HSTCS0、R&D systems, Minneapolis, MN) 及びアンフィレグリン (ab99975、Abcam, Cambridge, MA) についてアッセイした。

【0287】

IL-11 (ab100551, Abcam, Cambridge, MA)、IL1Ra (DRA00B, R&D systems, Minneapolis, MN)、IL1

50

8BP (DY119, R&D systems, Minneapolis, MN)、アンフィレグリン (ab99975, Abcam, Cambridge, MA) 及び GCSF (HSTCS0, R&D systems, Minneapolis, MN) を製造業者のプロトコール及びガイドラインに従って患者の血清試料において測定した。

【0288】

IL-1 (HSLB00C, R&D systems, Minneapolis, MN)、IL1Ra (DRA00B, R&D systems, Minneapolis, MN)、IL18 (7620, R&D systems, Minneapolis, MN) 及び IL18BP (DY119, R&D systems, Minneapolis, MN) を製造業者のプロトコール及びガイドラインに従って組織ライセートにおいて測定した。

10

【0289】

実施例1：ヒト一次腸筋線維芽細胞におけるIL-1 誘導性線維症関連遺伝子の発現

腸上皮筋線維芽細胞 (MF) の活性化は、コラーゲン及び細胞外マトリックスタンパク質の沈着の増加を通して、腸線維症において重要な役割を果たし得る。本プロセスにおけるIL-1 のような炎症性サイトカインの役割が十分に理解されていないため、本出願人らは腸切除術を受けた患者からの組織標本における遺伝子の発現を調査し、一次のMFにおけるIL-1 遺伝子誘導を試験した。試験した患者の特性を表1に示す。

表1 患者特性

	手術の理由	手術歴(有/無)	生物療法(有/無)
非IBD (n=10)	憩室炎(n=4)	1/3	0/4
	結腸がん(n=6)	2/4	0/6
CD (n=15)	非閉塞性炎症 (n=5)	4/1	2/3
	線維性狭窄(n=10)	5/5	7/3
UC (n=18)	異形成(n=2)	0/2	0/2
	難治性疾患(n=16)	0/16	13/3

20

30

【0290】

腸切除を受けた、IBD患者と非IBD患者からの組織においてIL-1 mRNA レベルに差があったかどうかを最初に検討した。図1Aに示すように、CD患者からとUC患者からの組織標本中のIL-1 mRNAのレベルは、非IBD患者からの標本中のIL-1 mRNAのレベルよりも有意に高かった(CD患者及びUC患者における相対的発現レベルの中央値は、非IBD患者における約0.001に比べ、約0.01であり、それぞれ、 $P = 0.0222$ 及び $p = 0.0409$ であった)。また、線維狭窄性疾患の手術を受けたCD患者におけるIL-1 mRNAのレベルは、炎症性疾患の手術を受けたCD患者よりも高い傾向を見せた。本出願人らは、図1Bに示すように、非IBD患者の組織と比較してIL-1 mRNAのレベルの差が更に大きくなることを見出した(CD患者からの線維性組織における相対的発現レベルの中央値は、非IBD CD患者からの組織における約0.001と比較して約0.015、 $P = 0.0012$)。加えて、本出願人らは、切除CD組織において免疫組織化学法によりIL-1 タンパク質発現の増加を観察した(図1C)。

40

【0291】

また、本出願人らは、非IBD患者、UC患者、又はCD患者から得られた切除組織のイムノプロット分析を実施した。図2に示すように、この分析により、インフラマソームの活性化に関連するタンパク質であるCASP1及びP20は、プロIL1 及び成熟IL-1 とともに、特にCD患者、及びUC患者由来の組織において高度に発現したが、

50

非 I B D 組織においてはほとんど検出不可能であったことが明らかとなった。これらのデータは、C D 患者からの非線維性若しくは炎症性の組織又は非 I B D 結腸組織の何れかと比較して、C D 患者における線維性組織の I L - 1 の発現増加のエビデンスを提供した。フローサイトメトリー及び q R T - P C R 分析は、I L 1 R 1 及び T N F R 1 が、切除組織から単離された一次腸上皮下の M F 上に存在することを実証した（データは示されていない）。

【 0 2 9 2 】

次に、本出願人らは上記した方法を用いて、一次 M F において T N F によってではなく I L - 1 によって制御されている遺伝子を調べた。本出願人らは、M F において T N F によってではなく I L - 1 によって特異的に誘導される、コラーゲンを含む遺伝子の群を見出した。マイクロアレイ解析によって評価した場合、I L - 1 療法による誘導を最も示し、且つ T N F 療法による誘導を全く示さなかった遺伝子を表 2 に示す。遺伝子発現は図 3 に示すように、刺激された M F の q R T - P C R により確認された。T N F 療法ではなく I L - 1 療法は、G C S F（図 3 A）、T M E M 1 5 8（図 3 B）、C O L 1 7 A 1（図 3 C）、C o l 1 6 A 1（図 3 D）、アンフィレグリン（図 3 E）及び I L - 1 1（図 3 F）の発現を刺激し、それによりマイクロアレイの結果を実証した。

表 2 M F のマイクロアレイ解析

記号	IL1b による誘導	TNFα による誘導
CSF3	12.38	No
IL24	4.50	No
SERPINB3	3.43	No
IL11	3.03	No
SERPINB4	2.75	No
AMIGO2	2.58	No
SERPINB7	2.46	No
ABAT	2.46	No
PF4	2.19	No
STEAP2	2.03	No
ELN	2.00	No
CCL4	1.99	No
VEGFA	1.96	No
TMEM158	1.95	No
DACT1	1.92	No
KCNMB4	1.88	No
COL16A1	1.85	No
PDLIM4	1.85	No
TGFBR1	1.62	No
KCNE1L	1.57	No
HIF1A	1.56	No
SLC25A45	1.55	No
OSMR	1.51	No
P4HA2	1.51	No
ELF3	1.48	No
TGIF1	1.32	No
AREG	1.16	No

【 0 2 9 3 】

培地で刺激された M F 培養物からの上清、I L - 1 又は T N F を、G C S F 及びアンフィレグリンについて E L I S A により分析した。図 4 A - B に示すように、G C S F 及びアンフィレグリンタンパク質は、q R T - P C R の結果と一致して、T N F 療法又は培地処理ではなく I L - 1 療法の後には上清中で増加した。

【 0 2 9 4 】

以上の結果は、本出願人らが E L I S A によって細胞上清中の G C S F 及びアンフィレグリンのレベルを測定及び定量できたこと、また、I L - 1 刺激後のタンパク質のレベルにおいて、R N A 発現の測定により観察されたのと同様の増加を観察することができた

ことを実証しているため、本出願人らはヒト血清中の G C S F を測定することの実現可能性を試験した。図 5 A は、血清 G C S F レベルが C D 患者と U C 患者の両方において、健常なコントロールと比較してアップレギュレートされたことを示す。本出願人らは、如何なるがんの患者又は健常なコントロール患者においても血清 G C S F を検出することができなかったものの、多くの f C D 患者と i C D 患者において血清 G C S F を容易に検出することができた。2 人の D V T 患者のみ、血清中の G C S F が検出可能なレベルを示した。同じ試料を用いて、本出願人らは腸組織ライセートにおける I L - 1 のレベルと血清 G C S F を相関させ、また、腸組織ライセートにおけるより高い I L - 1 発現を有する患者は、血清 G C S F のより高い検出可能なレベルを有することを見出した (図 5 B、スピアマン $r = 0.500$ 、 $P = 0.1777$)。これらのデータは、血清 G C S F が腸組織における I L - 1 タンパク質レベルの有用な代用バイオマーカーであることを示唆している。

10

【0295】

本出願人らは、複数の間質遺伝子及び筋肉遺伝子が、例えば I N H B A や L M C D 1 のような非線維性組織と比較して、線維性組織においてアップレギュレートされたことを見出した。加えて、細胞外マトリックスの代謝回転及び組織修復遺伝子 (例えば、M M P 3、P X D N)、コラーゲン遺伝子 (例えば、C O L 7 A 1、C O L 5 A 2、C o l 1 2 A 1、C o l 1 8 A 1) 及び W n t シグナル伝達標的遺伝子 (例えば、T M E M 1 5 8、C H N 1) は、線維性組織において、非線維性組織と比較してアップレギュレートされていた。以下の表 3 に、マイクロアレイ解析により決定された線維症遺伝子の同定を示す；タンパク質の位置もこの表に示す。本出願人らは更に、M F 中のサイトカイン (例えば、I L 2 4、I L 1 1)、コラーゲン (例えば、C O L 7 A 1、C o l 1 6 A 1) 及び W N T シグナル伝達遺伝子 (例えば、T M E M 1 5 8、D A C T 1) を含む幾つかの経路由来の、I L - 1 に調節される遺伝子を見出した、M F 中の T N F - に誘導される遺伝子は、ケモカイン (例えば、I L - 8、C X C L 3) 及び接着分子遺伝子 (例えば、I C A M 1) を含んだ。M F 中の I L - 1 刺激は、腸線維形成中にアップレギュレートされる遺伝子 (例えば、T M E M 1 5 8、C O L 7 A 1) と重複するコラーゲン及び W N T シグナル伝達遺伝子を誘導することが観察された。これとは対照的に、腸線維症に関連する遺伝子は、M F 中の T N F - により独自にアップレギュレートされることが見出されなかった。

20

30

表 3 : 線維症遺伝子

記号	倍率変化	機能	タンパク質位置
MMP3	7.41	タンパク質関連マトリックス	分泌
INHBA	3.25	間質細胞	分泌
COL5A2	2.73	コラーゲン	分泌
CHN1	2.50	WNTシグナル伝達	シトソール
LMCD1	2.48	筋肉細胞	不明
COL12A1	2.45	コラーゲン	分泌
COL7A1	2.43	コラーゲン	分泌
COL18A1	2.38	コラーゲン	分泌
TMEM158	2.38	WNTシグナル伝達	膜たんぱく質
FAM65C	2.30	間質細胞	不明
IGFBP5	2.28	成長	分泌
THY1	2.28	筋線維芽細胞	膜たんぱく質
TMEM132A	2.28	WNTシグナル伝達	膜たんぱく質
PXDN	2.13	マトリックス関連タンパク質	分泌
GPR68	2.08	筋肉細胞	膜たんぱく質
TWIST1	2.08	EMT	核、転写因子
COL4A1	2.07	コラーゲン	分泌
SERPINH1	2.03	WNTシグナル伝達	分泌
AEBP1	2.00	筋肉細胞	分泌、転写因子
NAB2	1.99	成長	核、転写因子
TMEM45A	1.81	WNTシグナル伝達	膜たんぱく質
TMEM121	1.72	WNTシグナル伝達	膜たんぱく質
VIM	1.68	線維	シトソール
NOTCH4	1.68	成長	膜たんぱく質
TIMP2	1.67	メタロプロテイナーゼの阻害物質	分泌

10

20

30

40

【0296】

マイクロアレイの結果を確認するために、IHCにより、SMA染色用に使用されるものに隣接したOCT切片を分析した。切片は、SMA用に病理学者によりスコア化された；通常、SMA+の試料は線維症のエビデンスを有すると考えられる。qRT-PCRの結果を図6A-Fに示す。本出願人は、CD SMA-の切片又はコントロール切片と比較して、CD SMA+切片で、アンフィレグリンとともにコラーゲンのサブタイプ7A1及び16A1、IL-11、AEBP1及びIL1R1の発現が増加したことを見出し、これらのIL-1に誘導される遺伝子が線維性組織においてアップレギュレートされていることを実証した。

【0297】

50

実施例 2 : 追加的バイオマーカー

表 4 に記載した患者コホートを用い、コンパレータとして UC 及び D V T を使用して、線維性 / 線維狭窄性 (f C D) 及び炎症性 C D (i C D) を区別するために有用であり得る追加のバイオマーカーを調べた。対応する腸組織ライセートと血清試料を用いて、I L 1 8 及び I L - 1 8 B P のレベルについて各試料を E L I S A によりアッセイした。f C D 患者は、i C D 患者と比較して、腸組織中の I L 1 8 の発現レベルがやや高かったが (図 7 A 、 クラスカル・ウォリスの検定で $p < 0 . 0 5$) 、血清レベルに有意な差はないことが見出された (図 7 B) 。何れの患者群においても組織と血清の間で I L - 1 8 B P のレベルに有意差は認められなかった (図 7 C 及び 7 D) 。また、腸組織ライセート中の I L - 1 8 B 対 I L 1 8 P の比を調べた。図 7 E に示された通り、I L 1 8 対 I L 1 8 B P 比は、i C D 患者に比べて f C D 患者においてやや高かった (クラスカル・ウォリスの検定で $p < 0 . 0 5$) 。加えて、図 7 F は、f C D 患者と i C D 患者の血清 I L 1 8 B P に対して腸 I L 1 8 レベルをプロットしたものを示す。

表 4 : 患者特性

	手術の理由	手術歴(有/無)	生物療法(有/無)
非IBD (n=6)	憩室炎(n=4)	1/3	0/4
	結腸がん(n=2)	1/1	0/2
CD (n=15)	非閉塞性炎症(n=7)	5/2	5/2
	線維性狭窄(n=9)	4/5	8/1
UC	難治性疾患(n=10)	5/5	8/2

【 0 2 9 8 】

参考文献

Arend, W.P., G. Palmer, and C. Gabay. 2008. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev.* 223:20-38.

Baldassano, R.N., J.P. Bradfield, D.S. Monos, C.E. Kim, J.T. Glessner, T. Casaluovo, E.C. Frackelton, F.G. Otieno, S. Kanterakis, J.L. Shaner, R.M. Smith, A.W. Eckert, L.J. Robinson, C.C. Onyiah, D.J. Abrams, R.M. Chiavacci, R. Skraban, M. Devoto, S.F. Grant, and H. Hakonarson. 2007. Association of the T300A non-synonymous variant of the ATG16L1 gene with susceptibility to paediatric Crohn's disease. *Gut.* 56:1171-3.

Cadwell, K., J.Y. Liu, S.L. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J.K. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J.A. Carrero, S. Hunt, C.D. Stone, E.M. Brunt, R.J. Xavier, B.P. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T.S. Stappenbeck, and H.W.t. Virgin. 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* 456:259-63.

Carter, K.W., J. Hung, B.L. Powell, S. Wiltshire, B.T. Foo, Y.C. Leow, B.M. McQuillan, M. Jennens, P.A. McCaskie, P.L. Thompson, J.P. Beilby, and L.J. Palmer. 2008. Association of Interleukin-1 gene polymorphisms with central obesity and metabolic syndrome in a coronary heart disease population. *Hum Genet.* 124:199-206.

Cassel, S.L., S. Joly, and F.S. Sutterwala. 2009. The NLRP3 inflammasome: A sensor of immune danger signals. *Semin Immunol.*

Ferrero-Miliani, L., O.H. Nielsen, P.S. Andersen, and S.E. Girardin. 2007. Chron

10

20

30

40

50

ic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clin Exp Immunol.* 147:227-35.

Kowluru, R.A., and S. Odenbach. 2004. Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 88:1343-7.

Kuballa, P., A. Huett, J.D. Rioux, M.J. Daly, and R.J. Xavier. 2008. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One.* 3:e3391.

Larsen, C.M., M. Faulenbach, A. Vaag, A. Volund, J.A. Ehses, B. Seifert, T. Mandrup-Poulsen, and M.Y. Donath. 2007. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 356:1517-26. 10

Lewis, E.C., and C.A. Dinarello. 2006. Responses of IL-18- and IL-18 receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and negative signals for the IL-18 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:16852-7.

Ludwiczek, O., A. Kaser, D. Novick, C.A. Dinarello, M. Rubinstein, and H. Tilg. 2005. Elevated systemic levels of free interleukin-18 (IL-18) in patients with Crohn's disease. *Eur Cytokine Netw.* 16:27-33. 20

Ludwiczek, O., E. Vannier, I. Borggraefe, A. Kaser, B. Siegmund, C.A. Dinarello, and H. Tilg. 2004. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 138:323-9.

Monteleone, G., F. Trapasso, T. Parrello, L. Biancone, A. Stella, R. Iuliano, F. Lizza, A. Fusco, and F. Pallone. 1999. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol.* 163:143-7. 30

Perrier, S., F. Darakhshan, and E. Hajduch. 2006. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Lett.* 580:6289-94.

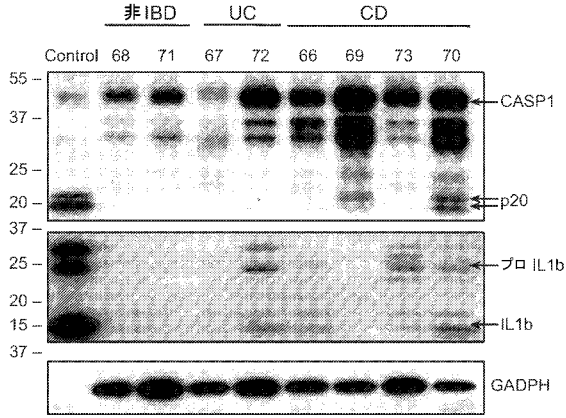
Saitoh, T., N. Fujita, M.H. Jang, S. Uematsu, B.G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, and S. Akira. 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature.* 456:264-8.

Sandberg, J.O., A. Andersson, D.L. Eizirik, and S. Sandler. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist prevents low dose streptozotocin induced diabetes in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 202:543-8. 40

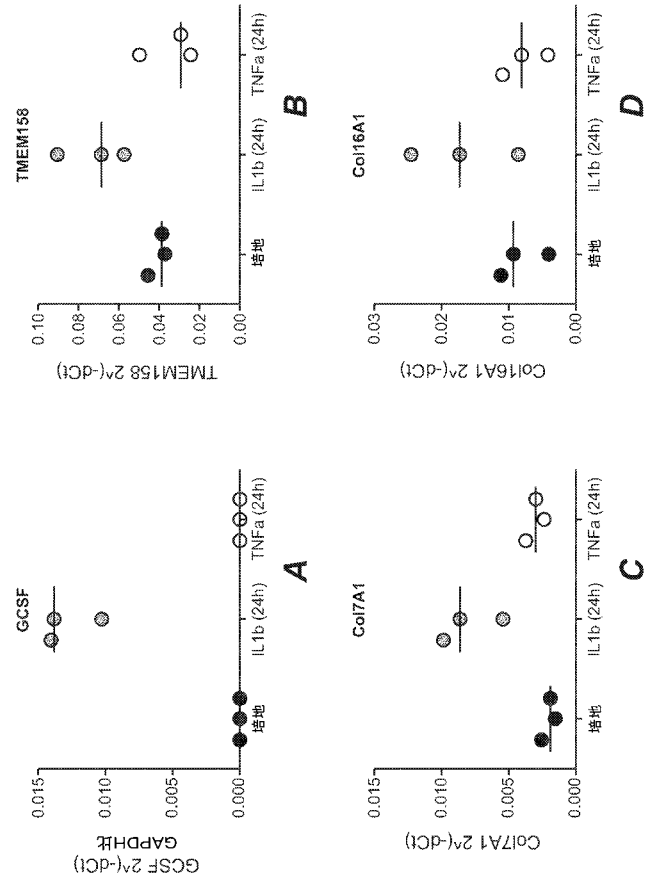
Sidhu, S.S., B. Li, Y. Chen, F.A. Fellouse, C. Eigenbrot, and G. Fuh. 2004. Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol.* 338:299-310.

Ten Hove, T., A. Corbaz, H. Amitai, S. Aloni, I. Belzer, P. Graber, P. Driltenburg, S.J. van Deventer, Y. Chvatchko, and A.A. Te Velde. 2001. Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology.* 121:1372-9. 50

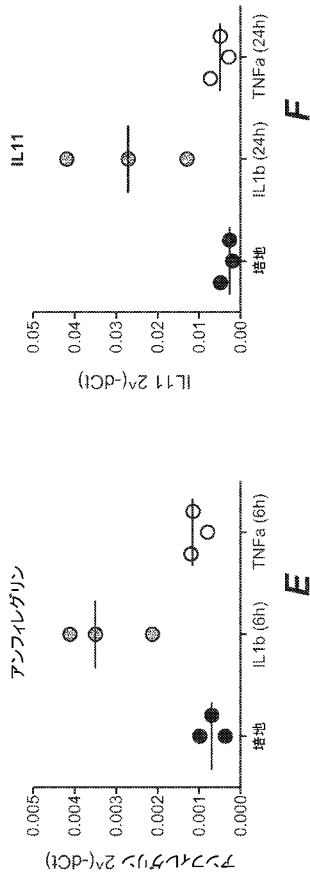
【 図 2 】



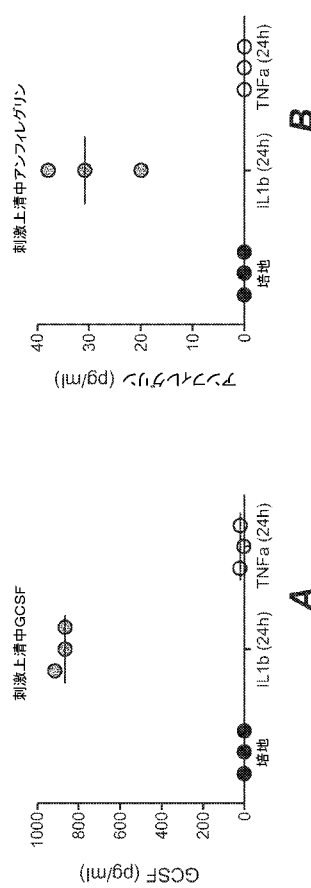
【 図 3 A - D 】



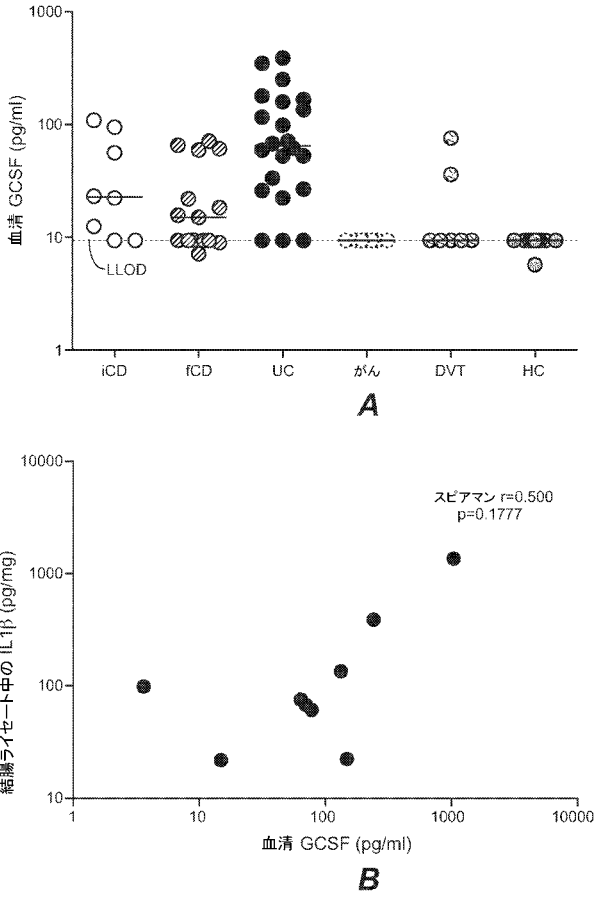
【 図 3 E - F 】



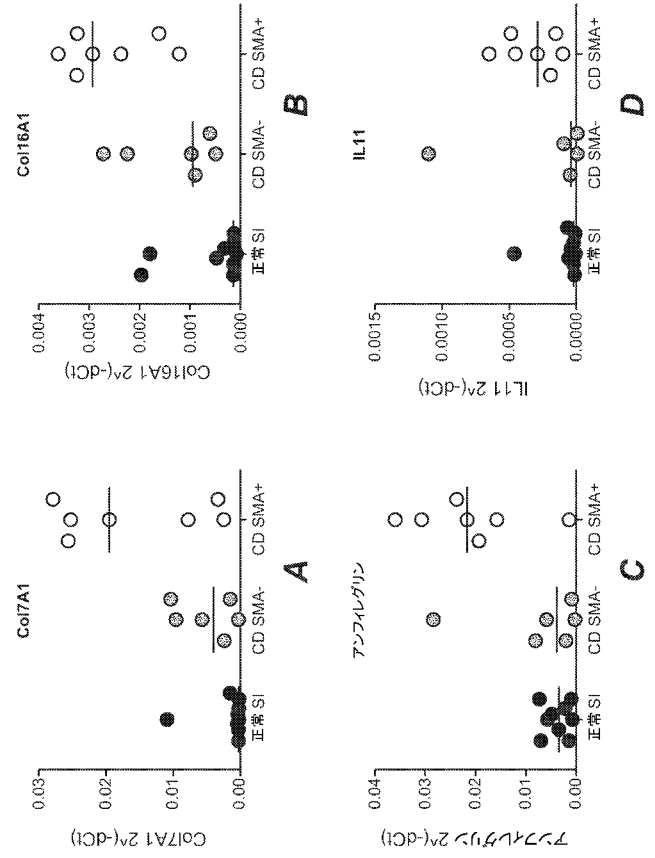
【 図 4 A - B 】



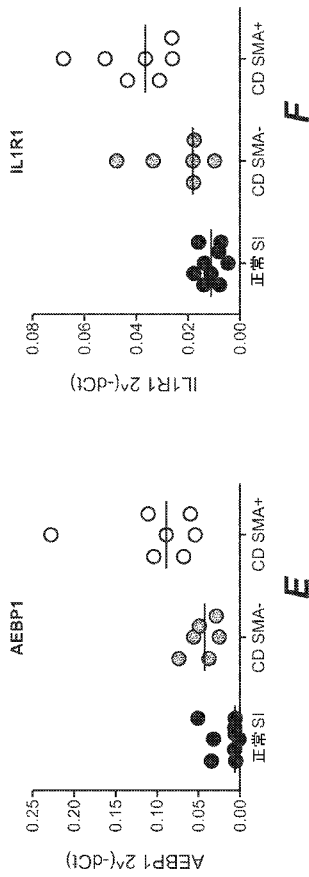
【図 5 A - B】



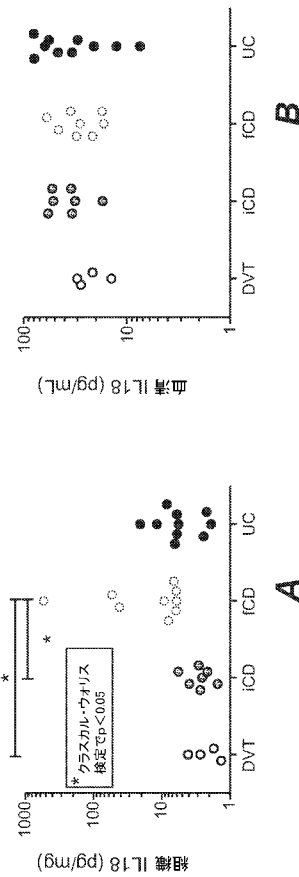
【図 6 A - D】



【図 6 E - F】



【図 7 A - B】



【 国際調査報告 】

PCT/US2014/038434 20.11.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/38434

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 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:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 9-14 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>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.</p> <p>Group I: Claims 1-3, 5-6, 7-8 (in part), 20-28, 30, 32, 33-37 (in part), drawn to a diagnostic and treatment methods comprising measuring the expression level of one or a combination of genes, or the expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combinations of genes, selected from a list of genes that include the genes CSF3 (GCSF) and COL7A1, in a biological sample</p> <p>Group II: Claims 4, 7 (in part), 29, 33-37 (in part), drawn to diagnostic and treatment methods comprising measuring the expression level of one or a combination of genes, or the expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combinations of genes, selected from IL-1.beta., CASP1, and p20 in a biological sample</p> <p>---please see continuation on extra sheet---</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> 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.: 1-3, 5-6, 7-8 (in part), 20-28, 30, 32, 33-37 (in part)</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2009)

PCT/US2014/038434 20.11.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/38434

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68, G01N 33/53, C07K 16/24 (2014.01) CPC - C12Q 1/68, G01N 33/53, C07K 16/244 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 (8): C12Q 1/68, G01N 33/53, C07K 16/24 (2014.01) CPC: C12Q 1/68, G01N 33/53, C07K 16/244 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8): G01N 33/68, A61K 39/395, A61P 1/00 (2014.01) CPC: G01N 33/50, C12Q 2600/156, C12Q 2600/158, C12Q 1/6883, G01N 33/6883, A61K 2039/505 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Google patents, Google scholar, Google web, PatBase, Proquest Dialog Biomarkers; diagnose/detect/determine; inflammatory bowel disease/Crohn's disease/ulcerative colitis; expression; level/amount; treat/therapy; IL-1 beta/IL-18; antibody/antagonist; CSF3/GCSF/COL7A1/IL24/SERPINB3/SERPINB4/AMIG02/SERPINB7/ABAT/PF4		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/009339 A2 (SATYARAJ et al.) 03 February 2005 (03.02.2005) para [14]; para [16]; para [32]; para [40]; para [49]; para [22]; para [54]	1-3, 7/(1-3), 20-21, 23/(20-21), 24/23/(20-21), 25
Y		22, 23/22, 24/23/22, 26-28, 32, 33/(26-28, 32), 34/33/(26-28, 32), 35/(26-28), 36/(26-28, 32), 37/36/(26-28, 32)
Y	US 2010/0093552 A1 (PANJA) 15 April 2010 (15.04.2010) para [0052]; para [0187] para [0192]; Table 5; para [0045]; para [0271]; para [0075]	5, 8/5, 30, 33/30, 34/33/30, 35/30, 36/30, 37/36/30
Y	US 2011/0045476 A1 (BARKEN et al.) 24 February 2011 (24.02.2011) para [0325]; para [0083]; para [0206-207]; para [0210]; para [0208]; para [0234]	5, 6, 8, 22, 23/22, 24/23/22, 34/33/(26-28,30,32)
Y	US 2011/0033486 A1 (Abbas et al.) 10 February 2011 (10.02.2011) para [0024], [0025], [0027], Table 6	6, 8/8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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		Date of mailing of the international search report
06 November 2014 (06.11.2014)		20 NOV 2014
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

PCT/US2014/038434 20.11.2014**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 14/38434

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/021773 A1 (VAN LOOKEREN CAMPAGNE) 16 February 2012 (16.02.2012) para [0006]; para [0014]; para [0012]; claim 15; claim 17	26-28, 30, 32, 33/(26-28,30,32), 34/33/(26-28,30,32), 35/(26-28,30), 36/(26-28,30,32), 37/36/(26-28,30,32)
A	McKaig et al 'Differential expression of TGF- β isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts' Am J Physiol Cell Physiol 282: C172-C182, 2002. abstract	1

PCT/US2014/038434 20.11.2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/38434

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

Group III: Claims 15-19, 31, 33-34 (in part), 36-37 (in part), drawn to diagnostic and treatment methods comprising measuring the from intestinal tissue of the subject the expression level of IL 18

The inventions listed as Groups I-III 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 requires the measurement of the expression level of a list of markers, including GCSF or COL7A1, not required by Groups II-III.

Group II requires the measurement of the expression level of markers selected from IL-1.beta., CASP1, and p20, not required by Groups I and III.

Group III requires the measurement of the expression level of IL 18 in intestinal tissue sample, not required by Groups I-II.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I-III is a method of diagnosing, or aiding in diagnosing, an inflammatory bowel disease in a subject, the method comprising:

- (a) measuring in a biological sample obtained from the subject the expression level of one or a combination of genes, or the expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combinations of genes;
- (b) comparing the expression level of the one or the combination of genes, or the one or the combination of proteins, measured in (a) to a reference level; and
- (c) providing a diagnosis of inflammatory bowel disease when the level of the one or the combination of genes, or the one or the combination of proteins, measured in (a) is above the reference level.

Another feature shared by Groups I-III is a method of treating inflammatory bowel disease in a patient comprising:

- (a) measuring in a biological sample obtained from the patient the expression level of one or a combination of genes, or the expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combinations of genes;
- (b) comparing the expression level of the one or the combination of genes, or the one or the combination of proteins, measured in (a) to a reference level; and
- (c) administering an anti-IL-1.beta. antibody, an anti-IL-18 antibody, or a multispecific anti-IL-1.beta./anti-IL-18 antibody to the patient when the level of the one or the combination of genes, or the one or the combination of proteins, measured in (a) is above the reference level.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2011/0212104 A1 to Beaumont et al. (hereinafter 'Beaumont') and US 2003/0157094 A1 to Chvatchko et al. (hereinafter 'Chvatchko').

Beaumont discloses a method of diagnosing, or aiding in diagnosing, an inflammatory bowel disease in a subject (para [0002]), the method comprising:

- (a) measuring in a biological sample obtained from the subject the expression level of one or a combination of genes, or the expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combinations of genes (para [0132] - "the invention involves determining whether a sample from a subject exhibits increased or decreased levels of one or more biomarkers compared with control levels");
- (b) comparing the expression level of the one or the combination of genes, or the one or the combination of proteins, measured in (a) to a reference level (para [0132]); and
- (c) providing a diagnosis of inflammatory bowel disease when the level of the one or the combination of genes, or the one or the combination of proteins, measured in (a) is above the reference level (para [0132]; para [0147] - "For the biomarkers of the present invention, higher levels correlate with disease, or more severe disease status").

Beaumont also discloses a method of treating inflammatory bowel disease in a patient (para [0002]) comprising:

- (a) measuring in a biological sample obtained from the patient the expression level of one or a combination of genes, or the expression of one or a combination of proteins encoded by the one or the combinations of genes (para [0132]);
- (b) comparing the expression level of the one or the combination of genes, or the one or the combination of proteins, measured in (a) to a reference level (para [0132]); and
- (c) administering a treatment to the patient when the level of the one or the combination of genes, or the one or the combination of proteins, measured in (a) is above the reference level (para [0132] - "Comparison of biomarker levels may be used ... [to] select patients for treatment ... or evaluate the effectiveness of therapy"; para [0147] - "Expression levels of the biomarkers of the present invention may be used, depending on the samples being compared, for various purposes, including but not limited to, diagnosing disease, staging patients, monitoring disease status, selecting patients for treatment with an IL-23 antagonist, confirming target engagement, and monitoring therapeutic efficacy ... For the biomarkers of the present invention, higher levels correlate with disease, or more severe disease status").

Beaumont does not specifically teach that the treatment is an anti-IL-1.beta. antibody, an anti-IL-18 antibody, or a multispecific anti-IL-1.beta./anti-IL-18 antibody. However, Chvatchko discloses that anti-IL-18 antibody is a therapeutic for inflammatory bowel disease (para [0058] - "It is a third object of the present invention to provide for a novel means for treating and/or preventing inflammatory bowel disease (IBD), in particular Crohn's disease and ulcerative colitis. The invention therefore also relates to the use of an IL-18 inhibitor for the manufacture of a medicament for treatment and/or prevention of IBD"; para [0083] - "Inhibitors of IL-18 action may be ... IL-18 antibodies, such as polyclonal or monoclonal antibodies, or any other agent or molecule preventing the binding of IL-18 to its targets, thus diminishing or preventing triggering of the intra- or extracellular reactions mediated by IL-18"). One of ordinary skill in the art would have found it obvious that the treatment for inflammatory bowel disease in the method of Beaumont can be the anti-IL-18 antibody of Chvatchko, since Beaumont teaches that the treatment can be an anti-IL antibody (para [0091]), and Chvatchko teaches that anti-IL-18 antibody therapy is effective at treating inflammatory bowel disease. As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

---continued on next extra sheet---

PCT/US2014/038434 20.11.2014**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 14/38434

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

Another feature shared by Groups I and II is wherein the inflammatory bowel disease is fibrotic Crohn's disease. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because Beaumont as above discloses that the inflammatory bowel disease that can be diagnosed by analyzing the expression level of biomarkers is Crohn's disease (para [0025], claim 4). Furthermore, the article entitled "Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts" by McKaig et al. (Am J Physiol Cell Physiol, January 2002, Vol 282, No 1, pp C172-82) (hereinafter 'McKaig') discloses that fibrotic Crohn's disease can be diagnosed by analyzing the expression level of biomarkers (abstract - "in myofibroblast cultures from fibrotic Crohn's disease tissue, there was significantly lower expression of TGF-b3 but enhanced release of TGF-b2" "Proliferation of Crohn's disease myofibroblasts was significantly greater than that of myofibroblasts derived from normal and ulcerative colitis tissue). Thus, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the method of diagnosing Crohn's disease by analyzing biomarkers, as taught by Beaumont, can be used to diagnose fibrotic Crohn's disease, as taught by McKaig. As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I-III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

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)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 29/00	

(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, KM, 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, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 キア, メアリー

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, ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72) 発明者 ライト, リリアン イー ティエン

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, 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 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QQ79 QR55 QS25 QS33 QS34
QX02

4C085 AA13 AA14 EE01

专利名称(译)	诊断和治疗炎性肠病的方法		
公开(公告)号	JP2016521540A	公开(公告)日	2016-07-25
申请号	JP2016514135	申请日	2014-05-16
[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	ハックニージェイソンエー キアメアリー ライトリリアンイーティエン		
发明人	ハックニー, ジェイソン エー. キア, メアリー ライト, リリアン イー ティエン		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 C12N15/09 C12Q1/02 A61K39/395 A61P1/04 A61P37/02 A61P29/00		
CPC分类号	A61P1/04 A61P29/00 A61P37/02 C12Q1/6883 C12Q2600/158 C07K16/244 G01N33/6893 G01N2800/065		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/50.Z C12N15/00.F C12Q1/02 A61K39/395.D A61K39/395.U A61P1/04 A61P37/02 A61P29/00		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE01		
优先权	61/824661 2013-05-17 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于诊断包括克罗恩氏病 (包括纤维化或纤维狭窄性克罗恩病) 和溃疡性结肠炎在内的炎症性肠病的生物标志物, 以及使用这些生物标志物的方法。另外, 提供了用于治疗胃肠道炎症性疾病例如炎症性肠病例如溃疡性结肠炎和克罗恩氏病 (包括纤维化或纤维狭窄性克罗恩氏病) 的方法。[选型图]图1A

