(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월13일
(11) 등록번호 10-2099990
(24) 등록일자 2020년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7009572
(22) 출원일자(국제) 2012년09월14일
심사청구일자 2017년09월07일
(85) 번역문제출일자 2014년04월10일
(65) 공개번호 10-2014-0059859
(43) 공개일자 2014년05월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/068146
(87) 국제공개번호 WO 2013/037970
국제공개일자 2013년03월21일
(30) 우선권주장
11425234.9 2011년09월15일
유럽특허청(EPO)(EP)
61/576,556 2011년12월16일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
CA2520541 A1*
WO2008157394 A2*
Monteleone, 'TGF-β1 and Smad7 in the regulation of IBD', Mechanisms of intestinal inflammation(FALK WORKSHOP), 2007, pp. 1-45.*
US20090275496 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
노그라 파마 리미티드
아일랜드, 듀블린 2, 써 존 로저슨'즈 키 33
(72) 발명자
몬텔레오네, 지오반니
이탈리아 아이-00133 로마 비아 몬트펠리에 1
비티, 프란체스카
이탈리아 아이-20099 세스토 산 지오반니 비아 베네데토 크로체 44
벨린비아, 살바토레
이탈리아 아이-33170 포르데노네 비아 브루사피에라 12
(74) 대리인
양영준, 김영

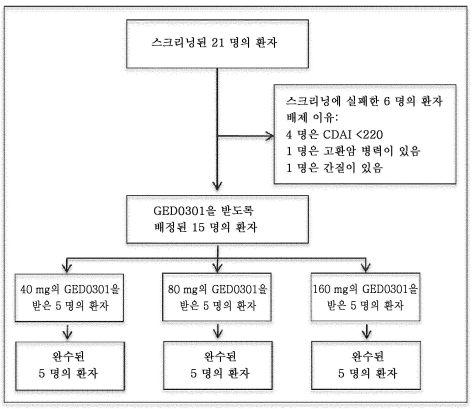
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 **항-SMAD7 요법의 반응성을 모니터링하는 방법**

(57) 요 약

대상체가 항-SMAD7 요법 치료에 민감성 또는 저항성이 있는지를 모니터링하는 방법이 개시된다. 본 방법은 대상체의 샘플에서 CCR9+ FOXP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FOXP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포, 및/또는 IL17A+ T 세포의 수를 결정하는 것에 기반한다. T 세포군의 측정은 플로우 사이토메트리, 면역조직화학, 및/또는 ELISA에 의해 결정될 수 있다.

대 표 도 - 도2



명 세 서

청구범위

청구항 1

염증성 장질환(IBD)을 갖는 대상체로부터 얻어진 하나 이상의 말초 혈액 샘플에서, C-C 케모카인 수용체 9+(CCR9+) 포크헤드 박스(Forkhead box) P3+(FoxP3+) T 세포, CCR9+ 인터페론-감마+(IFN-γ+) T 세포, CCR9+ 인터루킨-17A+(IL17A+) T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포, 및 IL17A+ T 세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 세포군의 양을 결정하는 단계를 포함하고,

여기에서 하나 이상의 세포군의 알려진 대조 레벨에 비하여 하나 이상의 말초 혈액 샘플에서의 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 세포군의 양 증가, 및/또는 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포, 및 IL17A+T 세포 중 적어도 하나의 세포군의 양 감소로부터 IBD를 갖는 대상체의 항-모친 데카펜타플레직 호몰로그 7(항-SMAD7) 요법에 대한 반응성을 예측하는, IBD를 갖는 대상체의 하나 이상의 항-SMAD7 요법 치료에 대한 반응성의 결정에서 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

염증성 장질환(IBD)을 갖는 대상체로부터의 하나 이상의 말초 혈액 샘플에서, C-C 케모카인 수용체 9+(CCR9+) 포크헤드 박스 P3+(FoxP3+) T 세포, CCR9+ 인터페론-감마+(IFN-γ+) T 세포, CCR9+ 인터루킨-17A+(IL17A+) T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포, 및 IL17A+ T 세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 세포군의 양을 결정하는 단계를 포함하고,

여기에서 상응하는 세포군의 알려진 대조 레벨에 비하여 하나 이상의 말초 혈액 샘플에서의 하나 이상의 세포군의 양의 조절로부터 IBD를 갖는 대상체의 항-모친 데카펜타플레직 호몰로그 7(항-SMAD7) 요법에 대한 반응성을 예측하는, IBD를 갖는 대상체의 하나 이상의 항-SMAD7 요법 치료에 대한 반응성의 결정에서 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 3

염증성 장질환(IBD)을 갖는 대상체로부터의 하나 이상의 말초 혈액 샘플에서, C-C 케모카인 수용체 9+(CCR9+) 포크헤드 박스 P3+(FoxP3+) T 세포, CCR9+ 인터페론-감마+(IFN-γ+) T 세포, CCR9+ 인터루킨-17A+(IL17A+) T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포, 및 IL17A+ T 세포로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 세포군의 양을 결정하는 단계를 포함하고,

여기에서 하나 이상의 세포군의 알려진 대조 레벨에 비하여 하나 이상의 말초 혈액 샘플에서의 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 세포군의 양 증가, 및/또는 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포, 및 IL17A+T 세포 중 적어도 하나의 세포군의 양 감소로부터 대상체의 항-모친 데카펜타플레직 호몰로그 7(항-SMAD7) 요법에 대한 반응성이 있을 가능성을 식별하는, 하나 이상의 항-SMAD7 요법으로의 치료에 반응성이 있을 가능성이 있는 IBD를 갖는 대상체를 식별하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 다음 중 2 개 이상의 조절이 대상체의 반응성을 결정하는 데에 도움을 주는 것으로 식별되는 것인 방법:

CCR9+ FoxP3+ T 세포 양의 증가는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사;

CCR9+ IFN-γ+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사;

CCR9+ IL17A+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사;

FoxP3+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사;

IFN-γ+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사;

IL17A+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 세포군의 양의 결정이 체외에서 수행되는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 말초 혈액 샘플이, 하나 이상의 말초 혈액 샘플이 얻어질 때 하나 이상의 항-SMAD7 요법을 받는 중인 대상체로부터의 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 염증성 장질환(IBD)이 크론병(CD) 및/또는 궤양성 대장염(UC)인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CCR9+ FoxP3+ T 세포 양의 증가, CCR9+ IFN-γ+ T 세포 양의 감소, CCR9+ IL17A+ T 세포 양의 감소, FoxP3+ T 세포 양의 감소, IFN-γ+ T 세포 양의 감소, 또는 IL17A+ T 세포 양의 감소 중 하나 이상이 대상체가 완화 단계에 접어들었을 가능성이 있음을 나타내는 것인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 세포군의 양이 플로우 사이토메트리 (cytometry)에 의해, 면역조직화학에 의해, 및/또는 RNA/DNA 분석에 의해 결정되는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 플로우 사이토메트리 및/또는 면역조직화학이 항-CCR9 항체, 항-FoxP3 항체, 항-IFN-γ 항체, 및 항-IL17A 항체로 구성된 군으로부터 선택된 항체를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 대조 레벨이 하나 이상의 항-SMAD7 요법의 시행에 앞서 환자에게서 얻거나 또는 하나 이상의 항-SMAD7 요법의 시행 직후에 얻은 하나 이상의 세포군의 기초 수준 레벨인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 항-SMAD7 요법이 항-SMAD7 안티센스 요법인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 항-SMAD7 안티센스 요법이 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 또는 SEQ ID NO: 9의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드인 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 유럽 특허출원 EP11425234.9 (2011년 9월 15일자 출원), 및 미국 특허출원 61/576,556 (2011년 12월 16일 출원)의 이익을 향유하며, 이들의 모든 개시사항은 본 특허출원에 모든 목적을 위해 참고문헌으로 포함된다.

배 경 기 술

[0002] 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease; IBD)은 위장관의 만성 염증성 장애로서, 미국 내에서 약 백 만 명의 환자가 이로 인해 고통받고 있다. IBD의 가장 흔한 두 가지 형태는 크론병(Crohn's disease; CD)과 궤양성 대장염(ulcerative colitis; UC)이다. CD는 전체 위장관에서 일어날 수 있지만, 기본적으로는 회장(소장의 말단 또는 하부 부분)과 대장에서 일어난다. UC는 기본적으로 결장과 직장에서 일어난다. 현재 CD와 UC의 치료

는 아미노살리실레이트 (예컨대, 5-아미노살리실산, 설파살라진, 및 메살아민), 항생제 (예컨대, 키프로플록사신 및 메트로니다졸), 코르티코스테로이드 (예컨대, 부데소니드 또는 프레드니손), 면역억제제 (예컨대, 아자티오프린 또는 메토트렉세이트) 및 종양괴사인자 (TNF) 길항제 (예컨대, 인플릭시맙(레미케이드(Remicade)®))을 포함한다. 이러한 요법들에 대한 환자의 반응은 질환의 경중에 따라 다르고, 활동적인 염증 및 완화의 사이클에 따라서도 다르다. 더욱이, 많은 현재의 IBD 치료요법은 바람직하지 않은 부작용이 수반된다.

[0003] CD와 UC의 병인 모두 알려져 있지 않지만, 모두 장점막의 염증성 질환이라 여겨진다. 최근의 연구에 따르면, TGF-β1이 장점막 염증을 통제하는 강력한 면역조절자로 작용함이 밝혀졌다. TGF-β1은 TGF-β1 R1과 TGF-β1 R2의 2 개의 서브 유닛을 함유하는 헤테로다이머 막관통 세린/트레오닌 키나아제 수용체에 결합한다. 리간드 결합시, TGF-β1 R1 수용체는 구성적으로 활성 TGF-β1 R2 수용체에 의해 인산화되어, SMAD 패밀리에 속하는 단백질들에 의해 세포핵으로 신호가 전달된다. 활성화된 TGF-β1 R1은 직접적으로 SMAD2와 SMAD3 단백질을 인산화시키고, 이들은 이후에 SMAD4와 상호작용한다. 이후 SMAD2/SMAD3/SMAD4 복합체는 핵으로 이동하여 특정 유전자의 전사를 조절한다.

[0004] 추가적 연구에 따르면, 또다른 SMAD 단백질인 SMAD7이 염증에 일정한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. 세포내 단백질인 SMAD7은 SMAD2/SMAD3가 TGF-β1 R1에 결합하는 것을 방해하여 이들 단백질의 인산화와 활성화를 방해한다. 더욱이, SMAD7 단백질 발현량의 증가는 TGF-β1 매개 신호전달의 억제에 관련되어 있다. IBD 환자 점막 샘플은 높은 레벨의 SMAD7과 감소된 레벨의 인산화된 SMAD3로 특징지울 수 있는데, 이는 TGF-β1 매개 신호전달 기능이 이들 환자에게서는 제대로 발휘되지 못함을 시사한다.

[0005] 최근의 연구들은 IBD 환자의 치료를 위해 SMAD7을 타겟으로 삼고있다. 이러한 치료요법은 항-SMAD7 안티센스 요법을 포함한다. 그러한 요법에서, 항-SMAD7 요법을 이용한 치료에 반응하기 쉬운 (또는 그렇지 않은) 환자들을 식별하는 데에 사용될 수 있는 예측가능한 바이오마커에 기반한 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 부분적으로, 염증성 장질환(IBD) (예컨대, 크론병 또는 궤양성 대장염)를 앓고 있는 대상체(예컨대, 사람 환자)의 생물학적 샘플 (예컨대, 혈액 또는 조직) 내의 특정 T 세포군의 조절 (예컨대, 증가된 CCR9+ FoxP3+ T 세포, 감소된 CCR9+ IFN-감마 양성(IFN-γ+) T 세포, 감소된 CCR9+ IL17A+ T 세포, 감소된 FoxP3+ T 세포, 감소된 IFN-γ+ T 세포, 및/또는 감소된 IL17A+ T 세포)이 항-SMAD7 요법을 이용한 치료에 대한 민감도와 연관되어 있다는 발견에 기반한다.

[0007] 치료를 시행하기 전후로 IBD 환자가 항-SMAD7 요법 치료에 반응성이 있는지 여부를 예측할 수 있으면 유용하다는 것에 수긍할 수 있을 것이다. 본원에 개시된 바와 같은 세포군의 조절은 IBD를 지닌 대상체의 항-SMAD7 요법 치료의 효율을 예측할 수 있다. 유용하게도, 본 발명의 방법은 궁극적으로 내과의사들이 효과적인 치료 요법을 선택하도록 돕고, 환자 질병 상태의 개선, 더 나은 의료, 및 전반적인 치료 비용 절감을 이끌어낼 것이다.

[0008] 따라서, 일 실시양태에서, 본 발명은 염증성 장질환 (IBD)를 가진 대상체에서, 하나 이상의 항-SMAD7 요법 치료의 반응성을 결정하는 방법을 제공하며, 본 방법은, 대상체로부터 얻어진 하나 이상의 샘플로부터, CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포군의 양을 결정하는 것을 포함하며, 여기에서 하나 이상의 세포군의 알려진 대조군 수준에 비하여 하나 이상의 샘플에서 세포군 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 양의 증가, 및/또는 세포군 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중의 적어도 하나의 양의 감소는 IBD를 갖는 대상체의 항-SMAD7 요법에 대한 반응성을 예측케 한다.

[0009] "대상체의 반응성을 결정한다"는 말은 IBD를 갖는 대상체에 하나 이상의 항-SMAD7 요법 치료를 하였을 때 그 효과나 반응성을 예상하거나 모니터링하는 것을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0010] 적절하게는, 샘플은 생물학적 샘플이다.

[0011] 본 발명의 발법의 선호되는 실시양태에서, 하기에 기술된 것 중 둘 이상의 조절을 식별하는 것은, 대상체의 치료 요법에 대한 반응성을 결정하는 데에 도움을 줄 수 있다:

[0012] CCR9+ FoxP3+ T 세포 양의 증가는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사하고;

[0013] CCR9+ IFN-γ+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사하고;

[0014] CCR9+ IL17A+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사하고;

[0015] FoxP3+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사하고;

[0016] IFN-γ+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사하고; 그리고

[0017] IL17A+ T 세포 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 수 있거나 반응성이 있음을 시사한다.

[0018] 선호되는 첫째 실시양태에서, 세포군은 CCR9+ FoxP3+ T 세포이다. 선호되는 둘째 실시양태에서, 세포군은 CCR9+ IFN-γ+ T 세포이다. 선호되는 셋째 실시양태에서, 세포군은 CCR9+ IL17A+ T 세포이다. 선호되는 넷째 실시양태에서, 바람직한 세포군은 FoxP3+ T 세포이다. 선호되는 다섯째 실시양태에서, 세포군은 IFN-γ+ T 세포이다. 선호되는 여섯째 실시양태에서, 세포군은 IL17A+ T 세포이다. 다른 선호되는 세포군은 FoxP3+ CD103+ T 세포, CD103+ T 세포, 또는 인테그린 α4β7+ T 세포를 들 수 있다.

[0019] 적절하게, 본 발명의 방법 체외에서 (in vitro) 수행될 수 있다.

[0020] 선호되기로는, 본 발명의 방법에서, 세포양의 결정 단계는 IBD를 앓는 대상체로부터 샘플을 얻는 단계에 앞설 수 있다. 이러한 샘플은 채혈이나 조직생검을 통해 통해 얻을 수 있다.

[0021] 적절하게, 하나 이상의 샘플이 대상체로부터 얻어진 후에, 대상체는 하나 이상의 항-SMAD7 요법을 받을 수 있다.

[0022] 선호되기로는, 본 발명의 방법에서, CCR9+ FoxP3+ T 세포 양의 증가, CCR9+ IFN-γ+ T 세포 양의 감소, CCR9+ IL17A+ T 세포 양의 감소, FoxP3+ T 세포 양의 감소, IFN-γ+ T 세포 양의 감소, 또는 IL17A+ T 세포 양의 감소를 식별한다는 것은 대상체가 완화 단계에 진입할 개연성이 있음을 시사한다.

[0023] 적절하게, 하나 이상의 세포군의 양은 플로우 사이토메트리(flow cytometry), 면역조직화학 (예컨대, ELISA)에 의해 및/또는 이 분야의 통상의 기술자에게 알려진 시약/방법을 사용하는 RNA/DNA 분석을 통해 결정될 수 있다.

[0024] 플로우 사이토메트리 및/또는 면역조직화학은 항-CCR9 항체, 항-FoxP3 항체, 항-IFN-γ 항체, 및 항-IL17A 항체로 구성된 군으로부터 선택된 항체를 사용하여 수행될 수 있음을 알 것이다.

[0025] 또는, 세포 양의 결정은 CCR9, FoxP3, IFN-γ, 및 IL17A로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 코딩하는 RNA의 양을 측정함으로써 수행될 수 있다.

[0026] 선호되기로, 대조(control)는 대조 레벨을 의미하며, 이는 하나 이상의 항-SMAD7 요법을 시행하기 이전에 IBD 환자의 샘플로부터 얻어지거나, 하나 이상의 항-SMAD7 요법을 시행한 바로 직후에 얻어진, 하나 이상의 세포군의 양의 기본 수준이다. 요법을 시행한 바로 직후라 함은 치료가 시행된 첫째/바로 그 날을 의미한다.

[0027] 관련된 실시양태로, IBD를 앓는 대상체에 항-SMAD7 요법 치료를 시행할 때에, 대상체가 당해 요법에 반응성이 있는지, 및/또는 당해 요법이 지속되어야 하는지를 결정하기 위해 대상체를 모니터링하는 방법이 본원에 개시된다. 본 방법은 (a) IBD를 앓는 대상체가 항-SMAD7 요법을 받고 있을 때에 대상체로부터 얻어진 샘플에서, CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중 하나 이상의 양을 결정하는 단계; 및 (b) 이 샘플 중의 양을 각각 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중 하나 이상에서 각각 대조 레벨과 세포 양을 비교하는 단계를 포함한다. 만약, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 양이 증가하거나, 또는 만약 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중 어느 하나의 양이 감소하면, 대상체는 치료 요법에 반응성이 있고 (예컨대, 민감하고) 및/또는 항-SMAD7 요법 치료에 반응을 지속할 것 같다고 식별할 수 있다. 다르게는, 만약, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ FoxP3+ T 세포 양이 감소하거나, 또는 만약 대조군에 비해 대상체 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중 적어도 하나의 양이 증가하면, 대상체는 치료 요법에 반응성이 없고 (예컨대, 저항성이 있고) 및/또는 항-SMAD7 요법 치료에 반응을 지속할 것 같지 않다고 식별할 수 있다.

[0028] 다른 실시양태에서, 항-SMAD7 요법 (예컨대, 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 반응할 것 같거나 반응성이 있는, IBD를 앓는 대상체를 식별하는 방법이 본원에 개시된다. 이러한 방법은 (a) IBD를 앓는 대상체로부터 얻어진 샘플에서, CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중 하나 이상에서 세포의 양을 결정하는 단계; 및 (b) 샘플 중의 이들 양을 각각 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중 적어도 하나의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함한다. 만약, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플

의 CCR9+ FoxP3+ T 세포 양이 증가하거나, 또는 만약 대조군에 의해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중 적어도 하나의 양이 감소하면, 대상체는 항-SMAD7 치료 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있다 (예컨대, 민감하다)고 식별할 수 있다. 다르게는, 만약, 대조군에 비해 대상에서 얻은 샘플의 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 양이 감소하거나 또는 만약 대조군에 의해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 중 적어도 하나의 양이 증가하면, 대상체는 항-SMAD7 요법 치료에 반응할 것 같지 않거나, 반응성이 없다 (예컨대, 저항성이 있다)고 식별할 수 있다.

[0029] 다시 말해, 염증성 장질환(IBD)을 앓고 있는 대상체의 하나 이상의 항-SMAD7 요법에 대한 반응성을 결정하기 위한 방법이 본원에 개시되며, 상기 방법은:

[0030] (a) IBD를 앓고 있는 대상체로부터 얻은 샘플에서, CCR9+ FoxP3+ T 세포의 양을 결정하는 단계;

[0031] (b) 샘플의 CCR9+ FoxP3+ T 세포 양을 CCR9+ FoxP3+ 세포의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함하고, 이때 상기 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 양의 증가는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있음을 시사하고; 및/또는

[0032] (a) IBD를 앓고 있는 대상체로부터 얻은 샘플에서, CCR9+ IFN-γ+ T 세포의 양을 결정하는 단계;

[0033] (b) 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포의 양을 CCR9+ IFN-γ+ 세포의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함하고, 이때 상기 CCR9+ IFN-γ+ T 세포의 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있음을 시사하고; 및/또는

[0034] (a) IBD를 앓고 있는 대상체로부터 얻은 샘플에서, CCR9+ IL17A+ T 세포의 양을 결정하는 단계;

[0035] (b) 샘플의 CCR9+ IL17A+ T 세포 양을 CCR9+ IL17A+ 세포의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함하고, 이때 상기 CCR9+ IL17A+ T 세포의 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있음을 시사하고; 및/또는

[0036] (a) IBD를 앓고 있는 대상체로부터 얻은 샘플에서, FoxP3+ T 세포의 양을 결정하는 단계;

[0037] (b) 샘플의 FoxP3+ T 세포의 양을 FoxP3+ T 세포의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함하고, 이때 상기 FoxP3+ T 세포의 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있음을 시사하고; 및/또는

[0038] (a) IBD를 앓고 있는 대상체로부터 얻은 샘플에서, IFN-γ+ T 세포의 양을 결정하는 단계;

[0039] (b) 샘플의 IFN-γ+ T 세포의 양을 IFN-γ+ 세포의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함하고, 이때 상기 IFN-γ+ T 세포의 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있음을 시사하고; 및/또는

[0040] (a) IBD를 앓고 있는 대상체로부터 얻은 샘플에서, IL17A+ T 세포의 양을 결정하는 단계;

[0041] (b) 샘플의 IL17A+ T 세포의 양을 IL17A+ 세포의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함하고, 이때 상기 IL17A+ T 세포의 양의 감소는 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있음을 시사한다.

[0042] 관련된 실시양태로, 사람이나 동물에서 시행되는 진단 방법에 사용하기 위한, CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+ T 세포 및 FoxP3+ CD103+ T 세포, CD103+ T 세포 및 인테그린 α4β7+ T 세포 중 적어도 하나에 대한 세포 마커에 대항하는 하나 이상의 항체가 본원에 제공된다.

[0043] 적절하게, 위의 진단 방법은 염증성 장질환(IBD)를 가진 대상체의 하나 이상의 항-SMAD7 요법 치료에 대한 반응성을 예측하거나 모니터하거나, 염증성 장질환(IBD)을 가진 대상체에 하나 이상의 항-SMAD7 요법 치료에의 적합성을 결정하거나, 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있는지를 결정하거나, 및/또는 대상체가 회복 단계에 접어들었는지를 결정하는 데에 사용될 수 있다.

[0044] 관련된 실시양태로, CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및 IL17A+T 세포 중 적어도 하나에 대한 단백질 세포 마커를 코딩하는 RNA의 발현을 검출하기 위한 시약, 세포군을 식별하기 위한 항-CCR9 항체, 항-FoxP3 항체, 항-IFN-γ 항체 및/또는 항-IL17A 항체 중 적어도 하나가 포함된 키트가 제공된다.

[0045] 적절하게, 키트는, 세포의 식별, FACS 기술을 사용한 세포의 식별, 분류, 및 카운팅을 위한 하나 이상의

완충제, 시약 및 상세한 설명서를 더 포함한다.

[0046] 바람직하게는, 본 발명의 키트에서, 항체는 CCR9 단백질에 대한 일차 항체, FoxP3 단백질에 대한 일차 항체, 및 리포터 효소에 접합되어 있는 이차 항체이며, 본 키트는 임의적으로 적어도 완충제, 시약 및 IHC 기술을 사용하여 세포군을 식별하기 위한 상세한 설명서를 더 포함한다.

[0047] 적절하게, 본 발명의 키트에서, CCR9 단백질에 대한 포획 항체 (capture antibody), FoxP3 단백질에 대한 검출 항체, 및/또는 리포터 효소에 접합된 이차 항체가 포함되며; 임의적으로 세포군 식별을 위한 완충제, 시약, 및 ELISA 기술을 사용하여 세포군을 식별하기 위한 상세한 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0048] 본원에 개시된 방법, 용도 및 키트는, 항-SMAD7 요법 치료에 반응할 것 같거나 반응성 있는 대상체에 대하여, 당해 요법 치료를 개개인에게 맞춰서 하는 데에 사용할 수 있다고 생각된다.

[0049] 본원에 개시된 방법, 용도 및 키트는 대상체가 IBD를 앓은 다음에 회복 단계에 접어들 것 같은지 여부를 결정하는 데에도 사용될 수 있다고 생각된다. 예컨대, 대조군에 비하여 대상체로부터 얻은 샘플 내 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 양 증가 및/또는 대조군에 비하여 대상체로부터 얻은 샘플 내 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양 감소가 있을 경우, 대상체는 회복 단계에 접어들었다고 식별될 수 있다.

[0050] 위에서 언급한 바와 같이, 대상체로부터 얻은 샘플은 분리된 말초 혈액 단핵구 샘플과 같은 혈액 샘플일 수 있다. 다르게는, 대상체로부터 얻은 이러한 샘플은 조직 샘플일 수 있다. 예컨대, 조직 샘플은 대상체의 위장관에서 유래된 (예컨대, 대상체의 소장에서 유래된) 것일 수 있다.

[0051] 대조 또는 대조 레벨 샘플은 항-SMAD7 요법 치료에 선행하여 대상체로부터 얻은 샘플(예를 들어, 혈액 또는 조직 샘플)을 포함할 수 있다. 이 대조 샘플은 치료에 앞서 본 발명에 기술된 세포군 중 적어도 하나의 기초 레벨 양을 제공하며, 이는 치료에 대한 대상체의 반응성을 모니터하는 데에 사용될 수 있다. 대조 또는 대조 레벨 샘플은 항-SMAD7 요법이 처음 시행된 같은 날 (예컨대, 치료 요법 1일째)에 대상체로부터 얻을 수 있다. 다른 실시양태에서, 대조 또는 대조 레벨 샘플은 항-SMAD7 요법을 시작하기 적어도 하루 전(예를 들어, 치료 요법 0일째)에 대상체로부터 얻을 수 있다.

[0052] 어떤 실시양태에서, 샘플 내 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포, 및 IL17A+ T 세포 중 적어도 하나의 양은 플로우 사이토메트리로 결정된다. 다른 실시양태에서, 결정은 면역조직화학에 의해 또는 ELISA 분석에 의해 수행된다. FACS, 면역조직화학, 및 ELISA 분석은, 하나 이상의 항-CCR9 항체, 항-FoxP3 항체, 항-IFN-γ 항체, 및 항-IL17A 항체로 구성된 군에서 선택된 항체를 사용하여 수행할 수 있다. 다른 실시양태에서, 세포군의 양은 CCR9, FoxP3, IFN-γ, 및 IL17A로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 코딩하는 RNA의 양을 측정하여 결정한다. 특정 실시양태에서, 항-SMAD7 요법은 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 요법은 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 및 SEQ ID NO: 9로 구성된 군으로부터 선택된 항-SMAD7 안티센트 뉴클레오티드일 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 이러한 SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드는 SEQ ID NO: 6을 포함한다.

[0053] 앞서 말한 본 발명의 측면 및 실시양태는 밑에서 기술할 도면, 상세한 설명, 및 청구항을 참고로 하여 더 완전하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1 (a)는 SMAD7의 핵산 서열 (SEQ ID NO: 1) 그리고 (b)는 SMAD7의 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 2)을 제공한다.

도 2는 지원자의 스크리닝 결과 및 등록 환자의 집단 분류를 보여주는 흐름도이다.

도 3은 본 실험에서 등록 환자와 관련된 통계적 및 임상적 특성을 보여준다.

도 4는 서로 다른 종류의 역효과, 실험 도중 이들의 빈도, 및 이들과 GED0301과의 연관성을 나타낸다.

도 5 (A 및 B)는 크론병에 걸린 대상체의 인간 장 소절(intestinal follicles) 및 파이어판(Peyer's Patches)에서 SMAD7이 발현됨을 보여주는 면역조직화학 분석 사진이다. B에서, 화살표는 세포핵 및 세포질에서 SMAD7의 발현을 보여준다. 패널 A, 100배 확대; 패널 B, 200배 확대.

도 6은 자극되지 않은 상태로 남아있거나(Unst), Smad7 센스 올리고뉴클레오티드로 처리되거나(Sense), 또는 GED0301 올리고뉴클레오티드 처리된(AS) CD 환자에서 단리된 PBMC의 (A) CCR9+ 또는 (B) β7+ 세포군 내에서의 IFN-γ 또는 IL-17A 세포에 대한 영향을 보여준다.

도 7은 임상 실험 베이스라인과 8일째 및 28일째에서 다양한 마커에 대하여 양성 시험결과를 나타내는 T 세포의 비율을 보여준다.

도 8은 0, 8, 28 및 84일 후 (A) IFN-γ+, (B) IFN-γ+ CCR9+, (C) IL-17A+, (D) CCR9+ IL-17A+, (E) FoxP3+, 및 (F) FoxP3+ CCR9+ T 세포의 퍼센트 비율을 보여주는 그래프를 나타낸다.

도 9는 각 분류 집단의 실험 시행 베이스라인, 8일째 및 28일째의 평균 CDAI 값 뿐만 아니라, 전체 환자군의 각 시간대의 평균 CDAI 값을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 대상체가 항-SMAD7 요법 치료에 반응성이 있을 것인지 (즉 민감할 것인지 또는 저항성이 있을 것인지)를 모니터링하는 방법이 본원에 개시된다. 본 발명은 부분적으로, IBD, 예컨대, 크론병 또는 궤양성 대장염을 앓고 있는 대상체의 혈액 샘플 내의 특정 T 세포군의 조절 (예컨대, 증가된 CCR9+ FoxP3+ T 세포, 감소된 CCR9+ IFN-감마 양성(IFN-γ+) T 세포, 감소된 CCR9+ IL17A+ T 세포, 감소된 FoxP3+ T 세포, 감소된 IFN-γ+ T 세포, 및/또는 감소된 IL17A+ T 세포)이 항-SMAD7 요법을 이용한 치료에 대한 민감도에 연관되어 있다는 발견에 기반한다.

[0056] 본원에 기술된 바와 같이, 항-SMAD7 요법 치료를 받거나 받은 IBD를 앓고 있는 대상체의 하나 이상의 T 세포군은, 대상체가 당해 요법에 반응성이 있는지 결정하기 위해 및/또는 당해 요법이 지속되어야 하는지 결정하기 위해 모니터링된다. 일 측면에서, 본 방법은 (a) IBD를 앓고 항-SMAD7 요법을 받고 있는 대상체로부터 얻어진 샘플에서, CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양을 결정하는 단계; 및 (b) 샘플 내 이들 양을 각각 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함한다. 만약, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ FoxP3+ T 세포 양이 증가하고/하거나, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양이 감소하면, 대상체는 치료 요법에 반응성이 있고 (예컨대, 민감하고) 및/또는 항-SMAD7 요법 치료에 반응을 지속할 것 같다고 식별할 수 있다.

[0057] 다르게는, 만약, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ FoxP3+ T 세포 양이 감소하거나, 또는 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양이 증가하면, 대상체는 치료 요법에 반응성이 없고 (예컨대, 저항성이 있고) 및/또는 항-SMAD7 요법 치료에 반응을 지속할 것 같지 않다고 식별할 수 있다.

[0058] 다른 측면에서, 대상체가 항-SMAD7 요법에 반응할 것 같은지를 식별하기 위해 IBD를 앓는 대상체의 하나 이상의 T 세포군이 모니터링된다. 이러한 방법은 (a) IBD를 앓는 대상체로부터 얻어진 샘플에서, CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양을 결정하는 단계; 및 (b) 샘플 내 이들 양을 각각 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 대조 레벨과 비교하는 단계를 포함한다. 만약, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ FoxP3+ T 세포 양이 증가하고/하거나, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양이 감소하면, 대상체는 항-SMAD7 치료 요법에 반응할 것 같거나, 반응성이 있다 (예컨대, 민감하다)고 식별할 수 있다.

[0059] 다르게는, 만약, 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ FoxP3+ T 세포 양이 감소하거나, 및/또는 대조군에 비해 대상체에서 얻은 샘플의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양이 증가하면, 대상체는 항-SMAD7 요법 치료에 반응할 것 같지 않거나, 반응성이 없다 (예컨대, 저항성이 있다)고 식별할 수 있다.

[0060] 특정 실시양태에서, FoxP3+ CD103+ T 세포, CD103+ T 세포 및/또는 인테그린 α4β7+ T 세포의 양도 측정될 수 있다. 요법에 반응성이 있는 대상체는, 요법 시행중에 치료 전 레벨에 비해 이들 세포군이 일관된 양으로 나타난다.

[0061] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 방법들은 대상체가 IBD를 앓은 이후 회복 단계로 접어들 것인지를 결정하는

데에 사용될 수 있다. 예컨대, 대상체는 대조군에 비하여 대상체로부터 얻은 샘플 내 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 양 증가 및/또는 대조군에 비하여 대상체로부터 얻은 샘플 내 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양 감소가 있을 경우, 회복 단계에 접어들었다고 식별될 수 있다.

[0062] 편의상, 본 명세서, 실시예, 및 청구항에의 특정 용어들이 다음에 언급된다.

[0063] 본원에 사용되기로, "CCR9" (CDw199, GPR-9-6, GPR28, C-C CKR-9, G-단백질 결합 수용체 28으로도 알려져 있는 케모카인 (C-C 모티프) 수용체 9는 Entrez GeneID No. 10803 및 그의 대립 유전자 변이체(allelic variants)로 식별되는 유전자에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.

[0064] 본원에 사용되기로, "FoxP3" (JM2, AIID, DIETER, IPEX, MGC141961, MGC141963, PIDX, XPID 로도 알려져 있는 포크헤드 박스(forkhead box) P3)는 Entrez GeneID No. 50943 및 그의 대립 유전자 변이체로 식별되는 유전자에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.

[0065] 본원에 사용되기로, "IFN-감마" 또는 "IFN-γ" (IFNG, IFG, IFI로도 알려져 있는 인터페론 감마)는 Entrez GeneID No. 3458 및 그의 대립 유전자 변이체로 식별되는 유전자에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.

[0066] 본원에 사용되기로, "IL17A" (CTLA8, IL-17, IL-17A, IL17, 세포독성 T 림프구-관련 항원 8 (세포독성 T 림프구-관련 단백질 8; 세포독성 T 림프구-관련 세린 에스테라제 8)으로도 알려져 있는 인터루킨-17A)는 Entrez GeneID No. 3605 및 그의 대립 유전자 변이체로 식별되는 유전자에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.

[0067] 본원에 사용되기로, "CD103" (인테그린, 알파 e; 점막 림프구 항원-1, 알파 폐티드; HUMINAE, 인테그린 알파-IEL; 인테그린 알파-E; HML-1 항원; 및 MGC141996으로도 알려져 있는 CD103 항원)은 Entrez GeneID No. 3682 및 그의 대립 유전자 변이체로 식별되는 유전자에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.

[0068] 본원에 사용되기로, "α4β7" (소화관 회귀 수용체 베타 서브유닛 및 ITGB7 로도 알려져 있는 인테그린, 알파-4 베타-7)은 Entrez GeneID No. 3695 및 그의 대립 유전자 변이체로 식별되는 유전자에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.

[0069] 본원에 사용되기로, "SMAD7" (CRCS3, FLJ16482, MADH7, MADH8, MAD(모친 데카펜타플레직, 초파리(mothers against decapentaplegic, Drosophila)) 호몰로그-7, MAD 호몰로그-8, SMAD, 모친 DPP(mothers against DPP) 호몰로그-7, 모친 DPP 호몰로그-8)는 Entrez GeneID No. 4092 및 그의 대립 유전자 변이체로 식별되는 유전자에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.

[0070] 본원에 사용되기로, "크론병 활성 지수" 또는 "CDAI"는, 문헌[Best et al, GASTROENTEROLOGY, 70:439-44 (1976)]에서 언급된 바와 같이, CD를 앓고 있는 환자의 진행 정도를 평가하기 위해 사용되는 측정 또는 지수를 나타낸다. CDAI 점수가 150 이하일 경우, 일반적으로 질병의 비활성화와 관련되고, 더 높은 점수대에 비해 더 좋은 예후임을 나타낸다. 값이 150 점을 초과하면 일반적으로 질병의 활성화를 나타내고, 450 점을 초과하면 극히 중증임을 나타낸다. CDAI 점수는 환자가 요법에 얼마나 잘 반응하는지를 결정하는 데에 사용될 수 있고, 또한 회복 단계에 접어든 환자를 식별하는 데에도 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 기준 임상 반응(benchmark clinical response)은 대상체가 최소 100 점까지 CDAI 점수의 하락을 보여주는 것을 의미한다. 임상시험에서, 150 점 이하의 CDAI 점수는 일반적으로 완화(remission)와 관련되어 있다.

[0071] 본원에 사용되기로, "궤양성 대장염 질병 활성 지수" 또는 "UCDAI"는, 문헌[Sutherland et al, Gastroenterology, 92: 1894-98 (1987)]에 언급된 바와 같이, UC를 앓고 있는 환자의 진행을 평가하기 위해 사용된 측정 또는 지수를 나타낸다. UCDAI란 배변 회수, 직장 출혈, 결장 라인의 나타남, 및 내과의의 질병 활성도 평가를 포함한 UC 증상들에 관한 일련의 자격지수(qualifier)이다. 각각의 이들 자격지수는 0에서 3까지의 숫자이며, 여기에서 3은 최대의 질병 활성도가 된다. 임상시험에서, 완화는 종종 1 이하의 UCDAI 점수로 정의되며, 임상시험 개시때의 점수보다 3 이상의 하락이 있을 경우 차도가 있다고 볼 수 있다. UCDAI는 임상시험에서 환자가 얼마나 요법에 잘 반응하는지를 결정하기 위해 사용될 수 있고, 완화된 환자를 식별하기 위해서도 사용될 수 있다. UC 환자의 질병의 경중을 측정하기 위해 흔히 사용되는 다른 지수로는, 트루러브(Truelove) 및 위츠(Witts) 지수, 세인트 마크(St. Mark's) 지수, 단순 임상 대장염 활성 지수(Simple Clinical Colitis Activity Index; SCCAI), 리치타이거(Lichtiger) 지수, 궤양성 대장염 증상 점수 (Ulcerative Colitis Symptom Score; UCSS), 및 마요(Mayo) 임상 점수를 들 수 있다.

[0072] 본원에 사용되기로, 치료에 "반응하다" 또는 "반응성 있다"라 함은 크론병 대상체가 (a) CDAI 점수의 하락, 예

컨대, 20 점, 30 점, 40 점, 50 점, 60 점, 70 점, 80 점, 90 점, 100 점, 또는 그 이상의 CDAI 점수 하락을 보여주고; (b) 150 점 미만의 CDAI 점수를 보여주고; 및/또는 (c) 완화의 유도를 보여주는 것을 의미한다. UC 대상체의 관점에서, 치료에 "반응하다" 또는 "반응성 있다"라 함은 대상체가 (a) UCDAI 점수, 예컨대, 1 점, 2 점, 또는 그 이상의 UCDAI 점수의 하락; (b) 1 점 미만의 UCDAI 점수; 및/또는 (c) 완화의 유도를 보여주는 것을 의미한다.

[0073] 항-SMAD7 요법

[0074] 항-SMAD7 요법은 SMAD7에 대한 타겟 요법(예컨대, 항-SMAD7 안티센스 요법 및 SMAD7에 대한 항체)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 타겟 단백질(예컨대, SMAD7)을 코딩하는 메신저 RNA(mRNA)와 상보적인 짧은 합성 올리고 뉴클레오티드 서열이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열은 mRNA에 하이브리드화 하여, RNase H와 같이 DNA/RNA 하이브리드 가닥을 분해하는 상시 발현된 촉매 효소를 활성화시켜, 단백질 변역을 막을 수 있는 이중 가닥 하이브리드를 생성한다.

[0075] 특정 실시양태에서, 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드는 인간 SMAD7 mRNA (예컨대, SEQ ID NO: 1)의 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299, 및/또는 533 번 부위(예컨대, 각각 뉴클레오티드 403, 233, 294, 295, 296, 298, 299, 및 533번 각각)를 타겟팅할 수 있다.

[0076] 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 다음의 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 5'-GTCGCCCCTTCTCCCCGCAGC-3' (SEQ ID NO: 3)에서 유래될 수 있다.

[0077] SMAD7을 타겟팅하는 안티센스 올리고뉴클레오티드는 CpG 쌍의 시토신 잔기가 5'-메틸시토신 (약칭하여 Me-dC)으로 대체된 혼합-골격을 포함할 수 있다고 고려된다. 메틸포스포네이트 연결은 당해 안티센스 올리고뉴클레오티드의 5' 및/또는 3' 말단에 위치할 수 있다. (약칭하여 MeP) SMAD7을 타겟팅하는 예시적인 안티센스 올리고뉴클레오티드 요법은, 5'-GTXYCCCCTTCTCCCXYCAG-3' (SEQ ID NO: 4) (여기서 X는 시토신 및 5-메틸시토신 또는 2'-O-메틸시토신 뉴클레오시드로 구성된 군에서 선택된 질소 염기를 포함하는 뉴클레오티드이고, Y는 구아닌 및 5-메틸구아닌 또는 2'-O-메틸구아닌 뉴클레오시드로 구성된 군에서 선택된 질소 염기를 포함하는 뉴클레오티드이며, 단 뉴클레오티드 X 또는 Y 중 하나는 메틸화된 질소 염기를 포함한다);

[0078] 5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAG-3' (SEQ ID NO: 5) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트);

[0079] 5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAGC-3' (SEQ ID NO: 6) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트);

[0080] 5'-ZTXGCCCCTTCTCCCXGCAZ-3' (SEQ ID NO: 7) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트이고 Z는 2'-데옥시구아노신 메틸포스포네이트);

[0081] 5'-ZTXGCCCCTTCTCCCXGCAZ-3' (SEQ ID NO: 8) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트이고 Z는 2'-데옥시구아노신 메틸포스포네이트);

[0082] 5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAG-3' (SEQ ID NO: 9) (여기서 X는 5-메틸 2'-데옥시시티딘 5'-모노포스페이트)을 포함하나, 이들에 제한되지 아니한다(예를 들면, 참조문헌으로 포함된 미국 특허 7,807,818 호 및 6,159,697 호를 참조).

[0083] 예시적 실시양태에서, 항-SMAD7 안티센스 요법은 약학적으로 수용가능한 운반체에 제형화되어 IBD를 앓는 대상체에게 경구 투여 될 수 있다.

[0084] 혈액 샘플

[0085] 대상체의 혈액 샘플은 당해 분야의 통상의 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 혈액 샘플은 말초 혈액 단핵구(peripheral blood mononuclear cells; PBMC) 또는 RBC-제거 전혈을 포함할 수 있다. PBMC는 상이한 밀도 구배 (예컨대, 피콜(Ficoll) 밀도 구배) 원심분리 과정을 통해 전혈 샘플로부터 분리할 수 있다. 예컨대, 전혈(예컨대, 항응고 처리된 전혈)은 분리 매체에서 층분리되고 원심분리된다. 원심분리 단계 마지막에, 위에서부터 아래로 혈장/혈소판, PBMC, 분리 매체 및 적혈구/과립구의 층들이 시각적으로 분명히 관찰된다. 여기서 PBMC 층을 수집하고 세척하여 오염물질을 제거할 수 있다.

[0086] 조직 샘플

[0087] 대상체의 조직 샘플 (예컨대, 대상체, 예를 들어, CD나 UC를 앓는 대상체의 소장 및/또는 대장에서 얻은 조직 샘플)은 샘플 내 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+

T 세포, 및/또는 IL17A+ T 세포의 양을 측정하기 위해 세포 공급원, RNA 공급원, 단백질 공급원, 또는 면역조직화학(IHC)을 위한 얇은 절편의 공급원으로 사용될 수 있다.

[0088] 조직 샘플은 통상의 생검 기구 및 처치를 통해 얻을 수 있다. 내시경 생검, 절제생검, 및 절개생검은 위장 조직 샘플을 얻기 위해 통상의 기술자가 이용할 수 있는 알려진 의학적 처치의 예이다. 조직 샘플은, 마커 유전자 (예컨대, CCR9, FoxP3, IFN-γ, 및/또는 IL17A) 발현량을 측정하거나, 개개의 세포 (예컨대, CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포)를 위한 플로우 사이토메트리, IHC, 또는 ELISA를 사용하여 가시화(visualization)하기 위하여 충분한 양의 세포, RNA, 단백질, 및 얇은 절편을 제공하도록 충분히 커야 한다.

[0089] 조직 샘플은 세포 분류, RNA 추출, 단백질 추출, 또는 얇은 절편 제작을 위해 충분한 모든 형태가 될 수 있다. 따라서, 조직 샘플은 신선하거나, 적절한 냉동(cryogenic) 기술을 통해 보존되거나, 비냉동 기술을 통해 보존될 수 있다. 임상 생검 검체를 다루기 위한 표준 과정은 포르말린으로 조직 샘플을 고정시킨 후 파라핀에 매립하는 것이다. 이러한 형태의 샘플은 흔히 포르말린 고정 파라핀 매립 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) 조직이라 알려져 있다. 추후 분석을 위해 조직 표본을 제작하는 적당한 기술은 이 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0090] 플로우 사이토메트리

[0091] 세포군은 플로우 사이토메트리(예컨대, 형광 활성화 세포 분류 (fluorescence activated cell sorting; FACS) 분석)에 의해 세포 표면 마커에 따라 분류할 수 있다. FACS 분석을 통해 세포들을 분류하고 카운팅하는 방법은 이 분야의 통상의 기술자에게는 잘 확립되어 있다. 예컨대, 문헌[로빈슨 "Current Protocols in Cytometry" John Wiley & Sons Inc., New York.] 을 참조하라. 일반적으로, 혈액 샘플이나 조직 샘플에서 얻은 세포들은 단세포부유액으로 준비될 수 있다. 이후 세포들은 형광 표지(예컨대, 식별할 세포군에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 형광 라벨링된 항체)로 라벨링된다. 형광은 직접 또는 간접으로 나타날 수 있다. 직접 형광의 경우, 형광 표지 (즉, 플루오레신(fluorescein), 로다민(rhodamine), 또는 다른 형광색소)가 일차 항체에 공유결합한다. 간접 형광의 경우, 세포 표면에 존재하는 마커에 결합하는 일차 항체는 형광 표지로 라벨링되지 않는다. 먼저, 일차 항체는 타겟 세포군의 세포 표면에 결합한다. 결합되지 않은 항체는 세척 단계에서 제거된다. 이후 일차 항체에 결합하는 형광 표지된 이차 항체가 첨가되고, 임의의 결합되지 않은 항체는 세척 단계에서 제거된다.

[0092] FACS 분석은 살아있거나 고정된 세포로 수행될 수 있다. FACS 기기는 이 분야의 통상의 기술자가 사용할 수 있으며, FACScan, FACStar Plus, 및 FACSCalibur (벡톤-디킨슨(Becton-Dickinson))를 들 수 있다. FACS 분석 소프트웨어는 이 분야의 통상의 기술자가 사용할 수 있으며, FlowJo, CellQuest Pro (벡톤-디킨슨), 및 WinMDI (플로우 사이토메트리용 윈도우 멀티플 도큐멘트 인터페이스(Windows Multiple Document Interface))를 들 수 있다.

[0093] 이 분야의 통상의 기술자는 서로 구별되는 세포군의 식별, 카운팅, 및 분류를 위해 단일 항체 또는 다수의 항체를 통해 FACS 분석을 수행할 수 있음을 이해할 것이다. 예컨대, 단일 항체로 세포군을 라벨링하면 명시된 마커를 발현하지 않는 세포들로부터 검출하고 분류할 수 있다(예컨대, FoxP3+ T 세포군은 FoxP3 특이적 항체에 의해 식별될 수 있고; IFN-γ+ T 세포군은 IFN-γ 특이적 항체에 의해 식별될 수 있고; IL17A+ T 세포군은 IL17A 특이적 항체에 의해 식별될 수 있다).

[0094] 다수의 레이저 및 형광 검출기를 갖춘 FACS 기기는, 다수의 항체 라벨링의 사용을 가능하게 하고, 타겟 세포군을 정밀하게 식별할 수 있다. 검출을 수행하기 위하여, 세포들은 다수의 항체로 라벨링될 수 있고, 여기서 각각의 항체는 서로 다른 형광 라벨로 표지되어 있다. 예컨대, 혈액 샘플은, CCR9+ FoxP3+ T 세포군의 검출을 위해, APC-라벨링된 마우스 항-인간 CCR9 항체 및 PE-라벨링된 항-인간 FoxP3 항체로 동시에 라벨링될 수 있다. 다른 실시양태에서, 조직 샘플은, CCR9+ IL17A+ T 세포군의 검출을 위해, APC-라벨링된 마우스 항-인간 CCR9 항체 및 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 647 마우스 항-인간 IL17A 항체로 라벨링될 수 있다.

[0095] FACS 분석을 통해 CCR9+ FoxP3+ T 세포군, CCR9+ IFN-γ+ T 세포군, 및/또는 CCR9+ IL17A+ T 세포군을 결정하는 데에 사용될 수 있는 예시적 항체들은, 알로피코시아닌(allophycocyanin; APC) 라벨링된 마우스 항-인간 CCR9 항체(R&D 시스템스, 키탈로그 넘버 FAB 179A 및 FAB 1791 A), 알렉사 플루오르® 647 마우스 항-인간 CCR9 항체 (BD 파르미젠(Pharmigen), 카탈로그 넘버 557975), 플루오레신 라벨링된 마우스 항-인간 CCR9 항체 (R&D 시스템스, 카탈로그 넘버 FAB 179F), 및 피코에리쓰린(PE) 라벨링된 마우스 항-인간 CCR9 항체 (R&D 시스

텝스, 카탈로그 넘버 FAB179P)와 같은, 인간 CCR9에 대한 형광 라벨링된 항체를 포함한다.

[0096] FACS 분석을 통해 FoxP3+ T 세포군 및 CCR9+ FoxP3+ T 세포군을 결정하는 데에 사용될 수 있는 예시적인 항체들은, 피코에리쓰린 (PE) 라벨링된 항-인간 FoxP3 항체 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec), 카탈로그 넘버 130-093-014), 알로피코시아닌(APC) 라벨링된 항-인간 FoxP3 항체 (밀테니 바이오텍, 카탈로그 넘버 130-093-013), 알렉사 플루오르® 647 마우스 항-인간 FoxP3 항체 (BD 파르미젠, 카탈로그 넘버 560045), 알렉사 플루오르® 488 마우스 항-인간 FoxP3 항체 (AbD 세로텍(Serotec), 카탈로그 넘버 MCA2376A488), 및 FITC 라벨링된 마우스 항-인간 FoxP3 항체 (아빔(Abeam), 카탈로그 넘버 ab93512)와 같은, 인간 FoxP3에 대한 형광 라벨링된 항체를 포함한다.

[0097] FACS 분석을 통해 IFN-γ+ T 세포군 및 CCR9+ IFN-γ+ T 세포군을 결정하는 데에 사용될 수 있는 예시적 항체들은, FITC 라벨링된 마우스 항-인간 IFN-γ 항체 (아빔, 카탈로그 넘버 ab47344), 피코에리쓰린(PE) 라벨링된 마우스 항-인간 IFN-γ 항체 (아빔, 카탈로그 넘버 ab47345, 및 R&D 시스템스, 카탈로그 넘버 IC285P), 및 플루오레신 라벨링된 마우스 항-인간 IFN-γ 항체 (R&D 시스템스 카탈로그 넘버 IC285F)와 같은, 인간 IFN-γ에 대한 형광 라벨링된 항체를 포함한다.

[0098] FACS 분석을 통해 IL17A+ T 세포군 및 CCR9+ IL17A+ T 세포군을 결정하는 데에 사용될 수 있는 예시적 항체들은, 알렉사 플루오르 647 마우스 항-인간 IL17A 항체 (이바이오사이언스(eBioscience), 카탈로그 넘버 51-7179-42), 피코데리쓰린(PE) 라벨링된 마우스 항-인간 IL17A 항체 (R&D 시스템스, 카탈로그 넘버 IC3171P), 및 알로피코시아닌(APC) 라벨링된 마우스 항-인간 IL17A 항체 (R&D 시스템스, 카탈로그 넘버IC3171 A)와 같은, 인간 IL17A에 대한 형광 라벨링된 항체를 포함한다.

[0099] FACS 분석 통해 CD103+ T 세포군 및 FoxP3+ CD103+ T 세포군을 결정하는 데에 사용될 수 있는 예시적 항체들은, 피코에리쓰린 라벨링된 마우스 항-인간 인테그린 알파 E 모노클론 항체 (아빔, 카탈로그 넘버 ab33267) 및 FITC 라벨링된 마우스 항-인간 CD103 모노클론 항체 (AbD 세로텍, 카탈로그 넘버 MCA1416FT)와 같은, 인간 CD103에 대한 형광 라벨링된 항체를 포함한다.

[0100] FACS 분석을 통해 α4β7+ T 세포군을 결정하는 데에 사용될 수 있는 항체는, 예컨대, 인간 α4β7에 대한 형광 라벨링된 항체를 포함하며, 이는 BD 바이오사이언스를 통해 이용가능하다.

[0101] 다른 실시양태에서, 세포군의 양은 플로우 사이토메트리로 세포들을 분류하고, 이후 분류된 세포군으로부터 CCR9, FoxP3, IFN-γ, 및 IL17A로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 코딩하는 RNA의 양을 측정하여 결정된다. RNA 단리 및 정량화 방법은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0102] 면역조직화학

[0103] 구분되는 세포군들은 면역조직화학(IHC)을 통해서도 결정할 수 있다. 구체적으로, 주어진 세포군에서 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 숫자가 IHC에 의해 결정될 수 있다(예컨대, 가시화될 수 있다). 예컨대, CCR9+ FoxP3+ T 세포군을 IHC로 분석하기 위해서는, 예를 들어 하나 이상의 CCR9 단백질에 대한 항체, 예컨대 하나 이상의 항-CCR9 항체, 및 하나 이상의 FoxP3 항체에 대한 항체, 예컨대 하나 이상의 항-FoxP3 항체가 필요하다. 예시적 실시양태에서, 항-CCR9 항체 및 항-FoxP3 항체는 서로 다른 라벨, 예컨대, 서로 다른 형광 라벨로 라벨링된다. 특정 실시양태에서, 항-CCR9 항체 및 항-FoxP3 항체는 서로 다른 종의 항체, 예컨대, 마우스, 집쥐(rat), 토끼 항체이며, 따라서, 라벨링된 (예컨대, 형광 라벨링된) 이차 항체들에 의해 서로 구별되는 검출이 가능하다.

[0104] IHC 연구를 위해, 예컨대, 파라핀 매립 포르말린 고정 조직 샘플은 절편으로 (예컨대, 5 마이크로미터 절편으로) 슬라이스될 수 있다. 통상적으로, 조직 절편들은 먼저, 조직 재료의 수집 및 보존의 초기 과정 중 고정된 단백질의 항원 구조를 재생(retrieve)하기 위한 처리를 하게 된다. 슬라이드는 이후 검출용 항체에 의한 비특이적 결합을 방지하기 위해 블록(block) 된다. 예컨대, CCR9, FoxP3, IFN-γ, 및/또는 IL17A 단백질의 존재는, 각각의 단백질에 항-CCR9, 항-FoxP3, 항-IFN-γ, 및/또는 항-IL17A 항체가 결합함으로써 검출된다. 검출용 (일차) 항체는 직접 또는 간접으로, 예컨대, 검출용 (일차) 항체를 특이적으로 인식하는 이차 항체 또는 중합체를 통해, 형광 라벨에 연결된다. 통상적으로, 매 단계 사이에 조직 절편은 세척되고, 소 혈청 알부민과 같은 비특이적 단백질로 블록된다. 당해 샘플은 헤마톡실린(hematoxylin) 및/또는 에오신(eosin)으로 대비염색될 수 있다.

[0105] IHC에 적당한 항-CCR9 항체는, 예를 들면 염소 항-인간 CCR9 폴리클론 항체 (엔조 라이프 사이언스(Enzo Life Sciences), 카탈로그 넘버 ALX-210-847-C200), 토끼 항-인간 CCR9 폴리클론 항체 (젠웨이 바이오텍(GenWay

Biotech), 카탈로그 넘버 18-461 -10269-0.05 ml), CCR9 항체 (노부스 바이올로지칼스(Novus Biologicals), 카탈로그 넘버 NBP 1 -44201), 및 마우스 항-인간 CCR9 모노클론 항체 (R&D 시스템스, 카탈로그 넘버 MAB179)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0106] IHC에 적당한 항-FoxP3 항체는, 토끼 항-FoxP3 폴리클론 항체 (애비오텍(Abbiotec), 카탈로그 넘버 250655), 염소 항-인간 FoxP3 폴리클론 항체 (앱젠(Abgent), 카탈로그 넘버 AF1438a), 마우스 항-인간 FoxP3 모노클론 항체(라이프스팬 바이오사이언스(LifeSpan BioSciences), 카탈로그 넘버 LS-C51576-40), 및 마우스 항-인간 FoxP3 모노클론 항체 (MBL 인터내셔날, 카탈로그 넘버 M120-3)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0107] IHC에 적당한 항-IFN-γ 항체는, 예컨대, 토끼 항-IFN-γ 폴리클론 항체 (애비오텍, 카탈로그 넘버 250707), 마우스 항-인간 IFN-γ 모노클론 항체 (바이오레전드(BioLegend), 카탈로그 넘버 506512), 염소 항-인간 IFN-γ 모노클론 항체 (R&D 시스템스, 카탈로그 넘버 AF-285-NA), 및 토끼 항-인간 IFN-γ 폴리클론 항체 (셀 사이언스, 카탈로그 넘버 CP2008)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0108] IHC에 적당한 항-IL17A 항체는, 예컨대, 토끼 항-인간 IL17A 폴리클론 항체 (프로테인텍 그룹(Proteintech Group), 카탈로그 넘버 13082-1-AP) 및 염소 항-인간 IL17 폴리클론 항체 (R&D 시스템스, 카탈로그 넘버 AF-317-NA)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0109] IHC에 적당한 항-CD103 항체는, 예컨대, 마우스 항-인간 인테그린-알파 E 모노클론 항체 (아빔, 카탈로그 넘버 ab33266) 및 마우스 항-인간 CD103 모노클론 항체 (AbD 세로텍, 카탈로그 넘버 P38570)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0110] 항-인테그린 α4β7 항체는 BD 바이오사이언스에서 이용가능하다.

[0111] 세포 기반 효소결합 면역흡착 측정법

[0112] 일부 실시양태에서, 세포군은 효소결합 면역흡착 측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)으로 식별될 수 있다. 구체적으로, 주어진 세포군에서 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포가 예컨대, 세포 기반 ELISA를 통해 결정될 수 있다. 예컨대, ELISA로 CCR9+ FoxP3+ 세포군을 분석하려면 하나 이상의 CCR9 단백질에 대한 항체, 예컨대 하나 이상의 항-CCR9 항체, 하나 이상의 FoxP3 단백질에 대한 항체, 예컨대 하나 이상의 항-FoxP3 항체, 및/또는 하나 이상의 이차 항체, 예컨대 하나 이상의 라벨링된 이차 항체가 필요하다. 예시적인 실시양태에서, 항-CCR9 항체와 항-FoxP3 항체는 모두 라벨링 되어있지 않거나, 서로 다르게 라벨링, 예컨대 상이한 형광 라벨로 라벨링 되어 있다. 특정 실시양태에서, 항-CCR9 항체 및 항-FoxP3 항체는 서로 종이 다른 항체, 예컨대, 마우스, 집쥐, 토끼 등의 항체이며, 따라서, 라벨링된, 예컨대 형광 또는 효소 결합된 이차 항체에 의해 서로 구별하여 검출될 수 있다.

[0113] ELISA, 예컨대, 세포 기반 ELISA의 수행을 위해서는, 하나 이상의 포획 항체, 하나 이상의 검출 항체, 및/또는 하나 이상의 효소 결합 또는 형광 라벨링된 이차 항체가 필요하다. 예컨대, 세포 기반 ELISA에 의해 CCR9+ FoxP3+ 세포군을 분석하려면 포획 항체로써 폴리클론 항-CCR9 항체가 필요하다. 폴리클론 항-CCR9 항체는 폴리스티렌 미량 역가판(microtiter plate)와 같은 고체 지지체에 부동화(immobilized)된다. 이후 혈액 샘플이나 조직 샘플에서 얻은 세포들이 첨가되어 결합된 항체와 결착화하게 된다. 결합하지 못한 세포들은 세척을 통해 제거한다. 검출 항체, 예컨대, 모노클론 항-FoxP3 항체가 첨가되어 세포에 결합한다. 검출 항체는 직접 또는 간접으로, 예컨대, 검출 항체를 특이적으로 인식하는 이차 항체를 통해, 효소에 결합한다. 통상적으로 각 단계 사이에, 세포가 결합된 판은 세척 완충제, 예컨대, 순한 세제 용액으로 세척한다. 통상적인 ELISA 프로토콜은 하나 이상의 블로킹 단계를 포함하는데, 이는 원하지 않는 단백질 시약들이 판에 비특이적으로 결합하는 것을 블로킹하기 위해 소 혈청 알부민과 같은 비특이적 결합 단백질을 사용한다. 최종 세척 단계 이후, 판은 적절한 효소 기질의 첨가에 의해 현상(develop)되어, 가시적인 신호를 생성하는데, 이는 샘플 내 CCR9+ FoxP3+ 세포의 양을 나타낸다. 이러한 기질은 예컨대, 발색(chromogenic) 기질이나 형광 기질이 될 수 있다.

[0114] ELISA 방법, 시약 및 기기는 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있고 상업적으로 이용가능하다.

[0115] ELISA에 적합한 많은 항-CCR9 항체는, 예컨대, 항-CCR9 폴리클론 항체 (아빔, 카탈로그 넘버 ab38567), 염소 항-인간 CCR9 폴리클론 항체 (엔조 라이프사이언스, 카탈로그 넘버 ALX-210-847-C200), 및 토끼 항-인간 CCR9 폴리클론 항체 (노부스 바이올로지칼스, 카탈로그 넘버 H00010803-D01P)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0116] ELISA에 적합한 많은 항-FoxP3 항체는, 예컨대, 토끼 항-FoxP3 폴리클론 항체 (애비오텍, 카탈로그 넘버

250655), 염소 항-인간 FoxP3 폴리클론 항체 (앱젠, 카탈로그 넘버 AF1438a), 및 마우스 항-인간 FoxP3 모노클론 항체 (라이프스팬 바이오사이언스, 카탈로그 넘버 LS-C82119-100)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0117] ELISA에 적합한 많은 항-IFN-γ 항체는, 예컨대, 토끼 항-IFN-γ 폴리클론 항체 (애비오텍, 카탈로그 넘버 250707), 마우스 항-인간 IFN-γ 모노클론 항체 (바이오레전드, 카탈로그 넘버 507502), 및 토끼 항-인간 IFN-γ 폴리클론 항체 (셀 사이언스, 카탈로그 넘버 CP2008)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0118] ELISA에 적합한 항-IL17A 항체는, 예컨대, 토끼 항-인간 IL17A 폴리클론 항체 (프로테인텍 그룹, 카탈로그 넘버 13082-1-AP) 및 염소 항-인간 IL17 모노클론 항체 (R&D 시스템스, 카탈로그 넘버 MAB317)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0119] ELISA에 적합한 항-CD103 항체는, 예컨대, 토끼 항-인간 인테그린 알파 E 항체 (노부스 바이올로지칼스, 카탈로그 넘버 36520002)와 같이, 상업적으로 이용가능하다.

[0120] 항-인테그린 α4β7 항체는 BD 바이오사이언스에서 상업적으로 이용가능하다.

[0121] 다른 실시양태에서, 세포군의 양은 플로우 사이토메트리로 세포들을 분류하고, 그 다음 분류된 세포군에서 CCR9, FoxP3, IFN-γ, 및 IL17A으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 코딩하는 RNA의 양을 측정하여 결정한다. RNA 단리 및 정량화 방법은 해당 기술 분야에서 잘 알려져 있다.

[0122] 대조 샘플

[0123] 대조 샘플은, 항-SMAD7 요법 치료에 앞서 대상체로부터 얻은 샘플 (예컨대, 혈액이나 조직 샘플)을 포함할 수 있다. 대조 샘플은 대상체의 치료 진행을 모니터링하는 데에 있어서 기초 수준을 제공한다. 대조 샘플은 항-SMAD7 요법이 처음 시행된 날 (예컨대, 치료 요법 1일째), 대상체로부터 얻을 수 있다. 다른 실시양태에서, 대조 샘플은 항-SMAD7 요법의 시작 하루 전날 (예컨대, 치료 요법 0일째), 대상체로부터 얻을 수 있다. 다른게는 대조 샘플은 항-SMAD7 요법 시작 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 또는 그 이상의 일 전에, 대상체로부터 얻을 수 있다. 예컨대, 특정 세포 샘플의 상향조절이나 하향조절은 치료 전 (예컨대, 대조 샘플), 치료 도중, 및/또는 치료 이후 측정되어 대상체의 요법 (예컨대, 항-SMAD7 요법)에 대한 반응을 모니터링할 수 있다.

[0124] 일부 실시양태에서, 대조 레벨은 대상체 내 특정 세포군의 장기 모니터링에 기반하여 대상체에 대해 확립될 수 있다. 이러한 실시예에서, 대상체는 수 회의 항-SMAD7 요법 치료를 경험할 수 있다고 생각된다. 수 회의 치료 이후 검출된 특정 세포군의 양은 대상체의 이전의 대조 레벨과 비교되어, 대상체가 요법에 반응했는지 및/또는 추가적 항-SMAD7 요법 치료에 반응할 것인지 결정할 수 있다. 다른 실시양태에서, 대상체의 대조 또는 기초 레벨은 일정에 걸쳐 얻어진 (예컨대, 수 주, 수 개월, 또는 수 년의 과정에 걸쳐 얻어진) 다수의 기초 수준 샘플로부터 결정된 특정 세포군의 평균 측정량을 기반으로 확립될 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 모든 시험 또는 분석은 과거의 또는 확립된 대조 레벨과 비교될 수 있고, 예컨대, 대상체가 한 회 초과의 항-SMAD7 요법 치료를 받을 때, 비교를 위해 대상체로부터 새로운 대조 샘플을 얻을 필요가 없다.

[0125] 데이터 해석

[0126] 항-SMAD7 요법 치료에 대한 대상체의 반응성은 치료에 앞서 대상체로부터 얻은 대조 샘플과 비교하여 해석된다. 만일 대조 샘플과 비교할 때, 대상체에서 얻은 샘플 중의 CCR9+ FoxP3+ T 세포의 양이 증가하거나, 또는 대상체에서 얻은 샘플 중의 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포 및/또는 IL17A+ T 세포의 양이 감소한다면, 대상체는 항-SMAD7 요법 치료에 대해 민감성(예컨대, 반응성이 있거나 반응할 것 같다)이라고 식별될 수 있다. 샘플은, 치료에 대한 민감도를 결정하기 위해, 요법의 시행 8일째 또는 그 이후에 얻을 수 있다. 어떤 실시양태에서, 샘플은 28일째, 56일째, 및/또는 84일째 및/또는 그보다 더 나중에 얻을 수 있다. 다른 실시양태에서, 샘플은, 치료에 대한 민감도를 모니터링하기 위해, 요법 시행 이후 8일째 예컨대, 일주일째, 이주일째, 1 개월째, 2 개월째, 3 개월째, 6 개월째, 및/또는 1 년 또는 더 나중에 얻을 수 있다.

[0127] 다르게는, 만일 대조 샘플과 비교하여 대상체에서 얻은 샘플에서 CCR9+ FoxP3+ T 세포 양이 감소하거나 또는 대상체에서 얻은 샘플에서 CCR9+ IFN-γ+ T 세포, 및/또는 CCR9+ IL17A+ T 세포 양이 증가하면, 대상체는 항-SMAD7 요법 치료에 저항성이 있다(예컨대, 반응성이 없거나 반응할 것 같지 않다)고 식별될 수 있다. 샘플은 치료에 대하여 저항성 여부를 결정하기 위해 요법 시행 8일 또는 그 이후에 얻을 수 있다. 어떤 실시양태에서, 샘플은 초기 치료 이후 28일째, 56일째, 84일째 얻을 수 있다. 다른 실시양태에서, 샘플은, 치료에 대한 민감도를 모니터링하기 위해 요법의 시행 이후 8일째, 예컨대, 일 주일째, 이 주일째, 한 달째, 두 달째, 세 달째,

6 개월째, 및/또는 1 년째 또는 그보다 더 나중에 얻을 수 있다.

[0128] 테스트 키트

[0129] 본원 발명은 본원에 개시된 방법을 수행하기 위한 특정 요소들을 포함하는 테스트 키트를 포함한다. 테스트 키트는 본원에 개시된 분석법의 수행에서 편의성, 속도 및 재현가능성을 강화할 수 있다. 예컨대, 예시적인 FACS 기반 테스트 키트는, 세포를 식별, 분류, 및 카운팅하기 위한 항체, 예컨대, 항-CCR9 항체, 항-FoxP3 항체, 항-IFN-γ 항체 및/또는 항-IL17A 항체를 포함한다. 다른 실시양태에서, 테스트 키트는 항체 뿐 아니라 FACS 기술을 사용하여, 세포를 식별, 분류 및 카운팅하기 위한 상세 설명서, 시약, 및 완충제를 포함한다. 어떤 실시양태에서, 키트는 테스트 프로토콜과, 세포 및/또는 조직 샘플을 제외하고, 테스트에 필요한 모든 소모성 요소를 포함한다.

[0130] 예시적인 IHC 기반 테스트 키트는 IHC에 의해 세포군을 결정하기 위한 재료를 포함할 수 있다. IHC 키트는, 예를 들어, CCR9 단백질에 대한 일차 항체, 예컨대, 마우스 항-인간 CCR9 항체, 및 FoxP3 단백질에 대한 일차 항체, 예컨대, 마우스 항-인간 FoxP3 항체, 및 리포터 효소, 예컨대, 서양고추냉이과산화효소(horseradish peroxidase)에 결합된 이차 항체를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 테스트 키트는 항체 뿐 아니라, IHC 기술을 사용하여 세포군을 식별하기 위한 상세 사항, 시약, 및 완충제를 포함한다.

[0131] 예시적인 ELISA 기반 테스트 키트는 ELISA에 의한 세포군의 결정을 위한 재료를 포함할 수 있다. 세포 기반 ELISA 키트는, 예컨대, CCR9 단백질에 대한 포획 항체, 예컨대, 토끼 항-인간 CCR9 폴리클론 항체, 및 FoxP3 단백질에 대한 검출 항체, 예컨대, 마우스 항-인간 FoxP3 모노클론 항체, 및/또는 리포터 효소, 예컨대, 서양고추냉이과산화효소에 결합된 이차 항체를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 테스트 키트는 항체 뿐 아니라, ELISA 기술을 사용하여 세포군을 식별하기 위한 상세 상세 사항, 시약, 및 완충제를 포함한다.

[0132] 실시예

[0133] 본원 발명은 아래의 실시예에 의해 더 분명하게 나타난다. 본 실시예는 실례를 보여주는 목적으로만 제공될 뿐, 어떤 식으로든 본원 발명의 범위나 내용을 제한하는 것으로 해석되어져서는 아니 된다.

[0134] 실시예 1: CD 환자에서 항-SMAD7 안티센스 치료의 안전성 및 효율성을 평가하기 위한 제1 상 임상실험

[0135] 활성 CD를 갖는 15 명의 환자가 CD 치료를 위한 항-SMAD7 안티센스 요법의 안전성 및 효율성을 평가하기 위한 제1 상 임상실험에 등록되었다. 환자들은 먼저 21 명의 지원자 그룹으로부터 스크리닝되고, 등록자들은 3 개의 동일한 크기의 집단 중 하나로 배정되었다 (도 2). 등록된 환자들간에는 통계적 또는 임상적 특성에 있어서 어떠한 유의미한 차이도 없었다. 그러나, 집단 1의 환자들은 다른 두 집단의 환자들에 비하여 더 긴 질병 지속시간을 가졌고, 집단 1과 2의 환자들은 집단 3에 비해 더 빈번하게 장 절제를 받아왔다 (도 3). 위 환자들은 40 mg/일 (N=5; 집단 1); 80 mg/일 (N=5; 집단 2); 또는 160 mg/일 (N=5; 집단 3)의 GED-0301, 즉 Smad7 안티센스 올리고뉴클레오티드 (GTXGCCCCTTCTCCCXGCAGC, 여기서 X는 5-메틸-2'-데옥시시티딘 5' 모노포스페이트 (5-Me-dC) (SEQ ID NO: 6))을 7 일 동안 받았다.

[0136] 다음의 기준을 모두 만족시키는 환자만이 선별되었다:

[0137] 1) 모든 연구 관련 절차에 앞서 서면 고지에 입각한 동의, 개인적 서명, 날짜 예약이 있을 것;

[0138] 2) 18에서 45 세 사이의 남성 또는 여성 환자;

[0139] 3) 비가임 여성 환자; 스크리닝에서 음성의 임신 테스트가 나오고 연구 기간 동안 효과적인 피임 방법을 사용하는 가임 여성 환자;

[0140] 4) 적어도 등록 일주일 전 220 점 초과 400 점 이하의 CDAI 점수를 갖는 것으로 정의되는, 스크리닝을 위한 방문때 활성 CD를 갖는 환자;

[0141] 5) 말단 회장 및/또는 중심부 결장 (right colon)에 제한되는 CD;

[0142] 6) 등록 90 일에 전 항-TNF-α, 다른 생물제제, 면역억제제 (예컨대, 아자티오프린, 메르캅토퓨린, 메토트렉세이트) 치료 경력이 없을 것;

[0143] 7) 스테로이드 저항성 또는 스테로이드 의존성 환자; 및

[0144] 8) 연구 절차와 제한을 이해하고 준수할 능력이 있을 것.

[0145] 대상체는 만일 다음의 조건 중 하나에라도 속하면 연구에서 배제되었다:

[0146] 1) 임신한 여성 또는 수유중인 여성;

[0147] 2) 위 및/또는 근위(proximal) 소장에 관한 CD 환자 또는 횡행(transverse) 결장 및/또는 좌측 결장에 국한된 병변을 가진 환자;

[0148] 3) 면역조절제 및 생물제제 (예컨대, 아자티오프린, 메르캅토퓨린, 메토트렉세이트, 인플릭시맙(infliximab), 아달리뮤맙(adalimumab), 나탈리주맙(natalizumab))의 첫 투여 이전 90일 내 사용;

[0149] 4) 국소 합병증 (즉, 습종, 협착증, 및 누관) 형성 이상 및 악성 종양, 및 장외(extra-intestinal) 징후의 존재;

[0150] 5) 과거 CD 협착의 외과 절제, 내시경 풍선 확장, 또는 협착 형성;

[0151] 6) 직결장 절제(proctocolectomy) 경력이 있는 환자;

[0152] 7) APTT > 1.5 정상치상한(upper limit of normality; ULN), 혈소판 카운트 ≤100,000/mm^3, 혈청 크레아티닌 >1.5 ULN, 총 빌리루빈 >1.5 ULN (질베르 증후군 배제), AST 및 ALT >1.5 ULN, QTc 간격 >450 밀리초 (남성) 및 >470 밀리초 (여성) 중에서 하나 이상의 실험실적 변이가 있을 것;

[0153] 8) 현재나 적절한 과거에 심각한, 중증의, 또는 불안정한 (급성 또는 진행성) 신체적 또는 정신적 질환의 경력이 있을 것 (치료를 요하거나 (예컨대, 신장이나 간 손상) 대상체가 연구를 완수하기 힘들게 만드는 감염, 악성 종양, 의학적 장애를 비롯하여, 연구용 약물이나 과정상 지나친 위험을 보여주는 모든 조건을 포함한다);

[0154] 9) 흡연이나 다른 방식으로 담배 제품을 소비하는 환자;

[0155] 10) 지난 1 년 동안 알코올 또는 다른 약물 남용 병력이 있을 것;

[0156] 11) 잠재적으로 낮은 신뢰성을 보여주는 환자 (예컨대, 나쁜 정신 조건);

[0157] 12) 올리고뉴클레오티드나 연구 제품의 모든 성분에 알려진 과민증이 있을 것;

[0158] 13) 무작위화 이전 지난 12 개월 이내에 다른 조사 기관을 이용했거나 임상 실험에 참여한 환자.

[0159] GED-0301의 안전성은, 신체검사, 체중(kg), 바이탈 사인 (수축기와 이완기의 혈압, 심박수, 호흡율, 체온), ECG (12 리드), AE와 SAE의 수집을 고려하여 매일 평가하였다. 혈액 샘플은 헤모글로빈, 헤마토크리트, 평균 세포 부피, 적혈구 카운트, 전체 백혈구 수/백혈구 백분율, MCH, 혈소판 카운트, 프로트롬빈 시간, 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간, 크레아티닌, BUN, 포도당, 요산, 단백질, 빌리루빈, 알칼라인 포스파타아제, CPK, AST, ALT, γ-GT, 나트륨, 칼륨, 콜레스테롤 및 트리글리세리드, 보체 활성화 (Bb, C5a, 및 C3a의 모니터링을 통한)을 체크하였다. 소변검사 (pH, 케톤, 백혈구, 단백질, 포도당, 세포-박테리아 검사)도 수행되었다.

[0160] 바이탈 사인에서 일관성 있는 실험실적 비정상이나 변화는 연구 도중 어떠한 환자에게서도 감지되지 않았다. 보체 인자의 혈청 레벨의 유의미한 증가도 기록되지 않았다. 집단 1의 환자 한 명 (5번 환자, 7 일째, 6 시간)의 샘플이 11.2 나노그램/밀리리터의 GED0301을 갖는 것을 제외하면, 세 집단의 모든 샘플은 정량화의 하한 이하 값을 나타냈다.

[0161] 심각한 부작용은 기록되지 않았다. 25 건의 부작용(AE)은 11 명의 환자에게서 기록되었는데, 대부분 가벼운 정도의 흔한 부작용으로 보고되었다(도 4). 연구자들은 이중 14 건 (56%)은 본 치료와 연관되지 않은 AE로 계산하였다. 이러한 14 건의 AE 중 실험실 부작용을 포함한 11건은 약물 투여 이전에 8 명의 환자에게서 기록되었다. AE는 12 건 (48%)에서 연구 약물과 무관하고, 아마도 단 1 건 (4% 미만) 만이 연구 약물과 관련된다고 생각된다. 이는 연구 약물의 투여 도중 혈청 트리글리세리드의 증가에 해당했다. 치료에서 나타나는 AE에서 뚜렷한 용량 의존적 관계는 나타나지 않았다. 집단 2의 한 환자는 84 일째 질환의 가벼운 재발이 있었고, 집단 3의 다른 환자는 매일 스테로이드 치료를 요하는 복통과 구토의 두 중증 에피소드를 경험했다. 80 밀리그램/일의 치료를 받은 한 환자는 1 일 째 GED0301 투여 수 분 이후 높은 확장기 혈압을 보였고, 84 일 째 T파 역전(명치 리드)을 경험했다. 심장전문의의 세심한 조사 끝에, 이러한 AE는 모두 지난 수 개월 동안 환자가 받은 부데소니드 치료의 2차적 효과라고 생각된다. 알레르기성 비염의 에피소드는 알레르기성 질환력이 있는 한 명의 환자에게서 31일 째 기록되었다. 이 AE는 항히스타민 화합물을 한 번 투여하면 빠르게 회복되었다.

[0162] 독성학, 약물감시 및 임상적 염증성 장질환 분야의 전문가들로 구성된 독립 안전성 위원회 (Independent Safety

Committee)가 안전성 파라미터를 모니터링하고 평가하기 위해 명명되었다. 1 일째와 7 일째, 혈액 샘플은 약물 동력학 분석 및 말초혈액단핵구(peripheral blood mononuclear cell; PBMC) 단리를 위해 투여 후 0, 2, 6, 12, 및 24 시간 시점에 채취하였다. 치료의 효율성은 다른 시점 (예컨대, 8, 28, 60, 및 90 일째)에 완화 기준(CDAI <150)을 만족하거나, 기초 수준에서 70 점 이상의 CDAI 점수의 감소로 정의되는 임상적 반응을 보이는 환자의 수를 측정하는 것으로 평가하였다.

[0163] 실시예 2: SMAD7은 인간 장 소절(intestinal follicles) 및 파이어판(Peyer's Patches)에서 발현된다.

[0164] 장 샘플은 의료적 치료에 반응이 둔감하고 만성적으로 활성화된 질환에 대한 외과 절제술을 행한 4 명의 CD 환자로부터 이용가능했다. 이러한 샘플은 면역조직화학에 의한 SMAD7의 분석을 위해 사용되었다.

[0165] CD 환자로부터 조직 절편을 잘라내고 자일렌 및 에탄올을 통해 탈파라핀화, 및 탈수과정을 거쳤다. 항원 재생(retrieval)을 위해, 슬라이드는 0.01 M 구연산염 완충제(pH 6) 내에서 전자레인지 오븐에서 10 분 동안 인큐베이션 되었다. 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)를 블록하기 위해, 이후 슬라이드는 2% 과산화수소에서 상온에서 20 분 동안 인큐베이션 되었다. 이후 상온에서 마우스 항-인간 SMAD7 항체로 1 시간 동안 인큐베이션 하였다. 트리스-완충제 식염수(Tris-buffered saline)으로 헹군 후에, 슬라이드를 서양고추냉이과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 토끼 항-마우스 항체로 상온에서 30 분 동안 인큐베이션 하였다. 면역반응성 세포는 디아미노벤자딘(diaminobenzadine)을 기질로 첨가하여, 그리고 헤마톡실린으로 약하게 대비염색하여 가시화되었다. 음성 대조물(negative control)로서, 조직 절편은 일차 SMAD7 항체 대신에 정제된, 정상의 토끼 항-혈청을 사용하여 처리되었다.

[0166] 이들 연구는 SMAD7이 인간 장 소절(intestinal follicles) 및 파이어판에서 발현됨을 보여준다(도 5). 이러한 관찰 결과를 통해, SEQ ID NO: 6을 통한 SMAD7의 하향조절이나 녹다운은 TGF-β1이 이들 조직 내에서 작용하도록 허용할 것인바, 염증성 시토카인 (예컨대, IFN-γ)를 발현하는 T 세포의 분율을 낮추고, 조절 T 세포(본원에서 T_{reg}이라 언급함)의분율을 높일 것으로 생각된다.

[0167] 실시예 3: 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 치료는 배양된 T 세포에서 염증성 시토카인의 발현을 조절한다.

[0168] 배양된 CCR9-양성 세포의 염증성 시토카인 발현에 있어서 GED0301의 영향을 조사하였다. CCR9-양성 세포에서 GED0301 노출의 영향을 결정하기 위해, 본 실험에는 등록되지 않은 5 명의 활성 스테로이드-의존적 CD 환자에게서 단리된 PBMC는 X-vivo 무혈청 배양액 (Lonza, Verviers, Belgium)에 재부유되고(resuspend), 페니실린(100 U/밀리리터)과 스트렙토마이신(100 U/밀리리터)가 보충되어, Smad7 안티센스 (GED0301) 또는 센스 올리고뉴클레오티드 (2 μg/ml)의 존재 또는 부재 하에 48 시간 동안 배양되었다. Smad7 안티센스와 센스 올리고뉴클레오티드 모두, 배양 세포에 효율적인 트랜스펙션을 촉진하기 위해, 리포펙타민 2000 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아 칼스배드(Carlsbad, CA))과 결합되었다. 이후 세포들은, 각 처리 조건 하에서 CCR9+ 또는 β7+ 세포군 내에 IFN-γ나 IL17A을 발현하는 T 세포의 비율을 결정하기 위해, CCR9, β7, IFN-γ, 및 IL17A에 대한 항체를 사용한 플로우 사이토메트리를 이용하여 염색되고 분석되었다.

[0169] GED0301가 CCR9+ 세포에서 직접적으로 염증성 시토카인의 발현을 억제하는지 결정하기 위해, 위에서 배양된 PBMC의 CCR9+ 및 β7+ 세포군에서 IFN-γ 및 IL17A 의 발현이 분석되었다. CD PBMC에 GED0301 (Smad7 안티센스)를 처리하면 IFN-γ 및 IL-17A를 발현하는 CCR9+ 세포의 %가 유의미하게 감소했으나 (도 6a), 시토카인을 발현하는 β7+ 세포의 비율은 변하지 않고 유지되었다(도 6b). 예컨대, IFN-γ을 발현하는 CCR9+ 세포의 %는 비처리된 세포에서는 78.9 ± 7.3이었으나; 센스 가닥을 처리한 세포에서는 78.3 ± 7.3이었고; GED0301를 처리한 세포에서는 54 ± 7.2이었다. 유사하게, IL-17A를 발현하는 CCR9+ 세포의 %는 비처리된 세포에서는 77.4 ± 7.3이었으나; 센스 가닥을 처리한 세포에서는 74.3 ± 6.4 이었고; GED0301를 처리한 세포에서는 53.9 ± 5.7이었다. 반대로, 비처리, 센스-처리, 및 GED0301 처리된 IFN- γ을 발현하는 β7+ 세포의 비율은 각각 13.1 ± 1.2; 11.7 ± 0.7, 및 11 ± 0.8 이었고, 비처리, 센스-처리, 및 GED0301 처리된 IL-17A를 발현하는 β7+ 세포의 %는 각각 12.1 ± 1.5; 10.4 ± 1.2, 및 10.6 ± 1.1이었다. 따라서, 배양된 CCR9+ CD PBMC에 GED0301의 직접적인 노출은 염증성 시토카인의 발현을 감소시킨다.

[0170] 실시예 4: 항-SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 처리는 T 세포군의 발현을 조절한다.

[0171] 본 실시예는 순환하는 CCR9+ FoxP3+ T 세포, CCR9+ IFN-γ+ T 세포, CCR9+ IL17A+ T 세포, FoxP3+ T 세포, IFN-γ+ T 세포, IL17A+ T 세포, FoxP3+ CD103+ T 세포, 및 인테그린 α4β7+ T 세포의 비율에 대한 연구 결과

를 보여주는데, 이들 T_{reg} 세포군의 활성화 상태는 장 소절 및 파이어판에서 나타나는 면역 반응을 반영한다. 아래에 기술된 연구에서, 각 실험 집단에서, 0 일째에, T 세포군은 각 환자의 기초 수준 측정량을 결정하기 위해 측정되었다. GED-0301은 위 실시예 1에서 기술된 것과 같이 7 일 동안 투여되었고, T 세포군은 8 일째, 28 일째, 그리고 일부 세포군에 대해서는 84 일째 재측정되었다.

[0172] T_{reg}의 말초혈에서의 조작 면역-매개 질환 치료 및 이식에 있어서 특별한 주목을 받아왔다. 이전의 연구 결과, 말초 혈액 T_{reg} 세포의 수는 항-TNFα 항체에 의해 증가될 수 있고, 이러한 증가는 항-TNFα 요법에 반응하는 환자에게서만 나타난다는 것이 알려졌다. T_{reg}에서의 항-TNFα 요법의 효과는 TGF-β1에 의해 매개될 수 있다.

[0173] SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 요법이, 강화된 TGF-β1 활성의 결과로서, T_{reg}의 수를 상향 조절하는지 아닌지를 결정하기 위해 SMAD7 안티센스 올리고뉴클레오티드 요법의 효과를 연구하였다. 또한, 이러한 처리가 순환하는 FoxP3+ T_{reg} 의 수를 변화시키는지, 또한 이러한 효과가 이펙터(effector) T_h1/T_h17 세포의 비율 변화와 연관되는지를 결정하기 위해 SMAD7 안티센스 요법의 효과를 연구하였다.

[0174] 추가적으로, CCR9+ T 세포는 크론병 환자의 말초 순환에서 증가되고, 점막 T 세포 특성을 나타내는데, 이는 이는 활성화 표현형, CD2 활성화에 대한 반응성, 및 염증성 시토카인 (예컨대, IFN-γ) 및 조절성 시토카인 (예컨대, IL10) 모두를 만들어내는 능력을 포함한다. 이러한 처리가 순환 CCR9+ 세포의 수에 변화를 일으키는지를 결정하기 위해 SMAD7 안티센스 요법의 효과 연구도 수행했다.

[0175] PBMC 단리와 플로우 사이토메트리 분석을 위해, 혈액 샘플 (10 mg)을 RPMI1640으로 1 : 1 로 희석하여 헤파린-함유 튜브에 수집하고, 피콜-파크(Ficoll-Paque)를 사용한 밀도 구배 원심분리기를 통해 분리했다. 이러한 목적에서, 튜브를 1800 rpm에서 30 분 동안 원심분리한 후, PBMC를 수집하여 RPMI1640으로 2 회 세척했다.

[0176] PBMC는 10% 비활성화 FBS, 페니실린 (100 U/ml), 및 스트렙토마이신 (100 mg/ml)으로 보충된 RPMI1640에 재부유되었다. 세포들은, APC-라벨링된 항-인간 CCR9 항체 및 PE-라벨링된 항-인간 FoxP3 항체를 사용한 플로우 사이토메트리에 의해 표현형에 따라 특성화(characterize) 되었다. 모든 항체는 1 : 50 로 최종 희석되어 사용했다.

[0177] PBMC을 96-웰 U-바닥 배양 접시에 심고, 포볼(Phorbol) 12-미리스테이트(myristate) 13-아세테이트 (PMA, 10 ng/ml), 이오노마이신 (1 mg/ml), 및 브레펠딘 (10 mg/ml)으로 자극했다. 5 시간 후에, 위에서 언급한 항체들을 사용하여 CCR9 발현에 대해, 뿐 아니라, FITC 항-인간 IFN-γ 항체, 알렉사 플루오르 647 항-인간 IL-17A 항체, 및 PE-항-인간 IL17A 항체를 사용하여 IFN-γ 및 IL-17A에 대해 세포를 염색했다. 모든 항체는 1 : 50으로 최종 희석하여 사용했다. 적절한 동형(isotype)에 해당하는 대조군이 모든 실험에 포함되었다. 본원에 사용된 FITC 항-인간 IFN-γ 항체는 벡톤 디킨슨(Beckton Dickinson)에서 얻었고 다른 모든 항체는 이바이오사이언스(EBiosciences)에서 얻었다.

[0178] 값은 중간값으로 표현했고 그룹 간의 차이는 만 휘트니 U 테스트 (Mann Whitney U test)를 사용하여 비교하였다. 통계적 유의성 ($p < 0.05$)는 윌콕손 매치 페어 테스트(Wilcoxon matched pairs test)를 사용하여 결정했다.

[0179] 염증성/반(counter)-조절 림프구의 비율에 미치는 GED0301 처리의 효과를 연구했다. GED0301 처리는 본 실험에서 8 일째 및 28 일째 모니터링 했을 때, 순환성 CD3+, CD4+, CD8+, CD25+, CD161+, CD62L+, α4β7+, 또는 CCR9+ 세포의 %를 유의미하게 변경시키지 않았다(도 7). 유사하게, GED0301 처리 이후, 인터루킨(IL)-17A+ 세포, IL-10+ 세포, FoxP3+ 세포, 인터페론(IFN)-γ 및 IL-17A 발현 α4β7+ 세포, 또는 FoxP3 발현 CD103+ 세포의 비율의 유의미한 변화는 관찰되지 않았다.

[0180] 표 1과 1a는 집단 1의 결과를 보여주는데, 이 집단은 하루 40 mg의 GED-0301를 7 일 동안 받았다. 표 1은 0, 8, 28 일째에서, 모든 세포군에 대해 주어진 T 세포군의 %를 보여준다. 표 1a은 0, 8, 28 및 84 일째에서, 모든 세포군에 대해 CCR9+ FoxP3+ T 세포, FoxP3+ T 세포 및 CD103+ FoxP3+ T 세포의 %를 보여준다.

[0181] 표 2는 집단 2의 결과를 보여주는데, 이 집단은 하루 80 mg의 GED-0301을 7 일 동안 받았다. 표 2은 0, 8, 28 일째에서, 모든 세포군에 대해 주어진 T 세포군의 %를 보여준다. 표 2a은 0, 8, 28 및 84 일째에서, 모든 세포군에 대해 CCR9+ FoxP3+ T 세포, FoxP3+ T 세포 및 CD103+ FoxP3+ T 세포의 %를 보여준다.

[0182] 표 3은 집단 3의 결과를 보여주는데, 이 집단은 하루 160 mg의 GED-0301을 7 일 동안 받았다. 표 3은 0, 8, 28 일째에서, 모든 세포군에 대해 주어진 T 세포군의 %를 보여준다. 표 3a은 0, 8, 28 및 84 일째에서, 모든

세포군에 대해 CCR9+ FoxP3+ T 세포, FoxP3+ T 세포 및 CD103+ FoxP3+ T 세포의 %를 보여준다.

[0183] 표 4는 집단 1에서 3까지 모든 환자의 결과를 결합한 것을 보여준다. 표 4는 0, 8, 28 일째에서, 모든 세포군에 대해 주어진 T 세포군의 %를 보여준다. 표 4a은 0, 8, 28 및 84 일째에서, 모든 세포군에 대해 CCR9+ FoxP3+ T 세포, FoxP3+ T 세포 및 CD103+ FoxP3+ T 세포의 %를 보여준다.

[0184] 표 1

	0 일째			8 일째			28 일째		
세포군	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값
CCR9+IFN-γ+	**1.5%**	3.25%	0.70%	**0.3%**	1.6%	0.13%	**0.80%**	0.85%	0.40%
CCR9+IL-17A+	**0.28%**	2.8%	0.02%	**0.44%**	2.7%	0.05%	**0.15%**	0.90%	0.00%
CCR9+FoxP3+	**0.07%**	0.20%	0.01%	**0.25%**	0.70%	0.02%	**0.18%**	0.21%	0.10%
IFN-γ+	**14.5%**	22.99%	6.29%	**7.97%**	13.82%	3.5%	**11.00%**	27.00%	4.95%
IL-17A+	**1.4%**	2.50%	0.4%	**1.2%**	2.80%	0.64%	**1.02%**	4.70%	0.30%
FoxP3+	**0.80%**	2.20%	0.19%	**0.90%**	2.50%	0.21%	**1.50%**	3.20%	0.20%
FoxP3+ CD103+	**0.18%**	4.60%	0.03%	**0.30%**	0.40%	0.07%	**0.28%**	0.80%	0.10%
인테그린 α4β7+	**2.70%**	2.90%	2.30%	**1.35%**	2.40%	0.51%	**0.99%**	2.60%	0.73%

[0185]

[0186] 표 1a

	0 일째			8 일째			28 일째			84 일째		
세포군	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값
CCR9+ FoxP3+	**0.07%**	0.20%	0.01%	**0.25%**	0.70%	0.02%	**0.18%**	0.21%	0.10%	0.46%	2.50%	0.01%
FoxP3+	**0.80%**	2.20%	0.19%	**0.90%**	2.50%	0.21%	**1.50%**	3.20%	0.20%	1.06%	2.8%	0.05%
FoxP3+ CD103+	**0.18%**	4.60%	0.03%	**0.30%**	0.40%	0.07%	**0.28%**	0.80%	0.10%	0.28%	1.2%	0.05%

[0187]

[0188] 표 2

	0 일째			8 일째			28 일째		
세포군	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값
CCR9+IFN-g+	**1.40%**	14.00%	0.40%	**1.00%**	5.20%	0.50%	**9.40%**	20.00%	0.56%
CCR9+IL-17A+	**0.80%**	9.80%	0.28%	**0.3%**	5.20%	0.09%	**1.21%**	4.50%	0.40%
CCR9+FoxP3+	**0.50%**	0.60%	0.20%	**0.40%**	0.50%	0.20%	**0.40%**	0.50%	0.16%
IFN-γ+	**9.80%**	20.90%	4.80%	**5.70%**	34.00%	1.70%	**14.95%**	34.00%	4.50%
IL-17A+	**0.70%**	5.80%	0.20%	**0.19%**	4.60%	0.00%	**1.00%**	4.60%	0.22%
FoxP3+	**1.70%**	2.30%	0.60%	**1.10%**	1.60%	0.80%	**0.80%**	1.60%	0.60%
FoxP3+ CD103+	**0.20%**	0.40%	0.12%	**0.23%**	0.34%	0.14%	**0.34%**	0.06%	0.07%
인테그린 α4β7+	**2.40%**	4.20%	0.92%	**3.29%**	7.00%	1.40%	**3.38%**	4.80%	1.10%

[0189]

[0190] 표 2a

	0 일째			8 일째			28 일째			84 일째		
세포군	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값
CCR9+ FoxP3+	**0.50%**	0.60%	0.20%	**0.40%**	0.50%	0.20%	**0.40%**	0.50%	0.16%	**0.60%**	5.00%	0.10%
FoxP3+	**1.70%**	2.30%	0.60%	**1.10%**	1.60%	0.80%	**0.80%**	1.60%	0.60%	**1.80%**	4.00%	0.15%
FoxP3+ CD103+	**0.20%**	0.40%	0.12%	**0.23%**	0.34%	0.14%	**0.34%**	0.06%	0.07%	**0.20%**	1.10%	0.10%

[0191]

[0192] 표 3

	0 일째			8 일째			28 일째		
세포군	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값
CCR9+IFN-γ+	**14.00%**	35.00%	2.80%	**8.00%**	16.00%	0.40%	**10.30%**	31.00%	1.30%
CCR9+IL-17A+	**4.40%**	7.80%	3.50%	**4.00%**	8.00%	0.30%	**1.50%**	280.00%	1.00%
CCR9+FoxP3+	**0.80%**	1.20%	0.10%	**1.30%**	1.90%	0.70%	**0.70%**	1.5%	0.28%
IFN-γ+	**10.80%**	26.00%	3.60%	**8.50%**	15.00%	1.70%	**13.00%**	29.00%	3.40%
IL-17A+	**2.10%**	3.60%	1.00%	**1.20%**	5.30%	1.10%	**1.50%**	5.60%	0.80%
FoxP3+	**2.80%**	3.30%	1.70%	**2.10%**	4.60%	1.60%	**1.50%**	4.40%	0.80%
FoxP3+ CD103+	**0.80%**	1.20%	0.20%	**0.70%**	1.80%	0.50%	**0.70%**	1.40%	0.24%
인테그린 α4β7+	**2.80%**	6.30%	2.50%	**1.10%**	6.80%	0.60%	**3.50%**	5.20%	0.90%

[0193]

[0194] 표 3a

	0 일째			8 일째			28 일째			84 일째		
세포군	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값
CCR9+ FoxP3+	**0.80%**	1.20%	0.10%	**1.30%**	1.90%	0.70%	**0.70%**	1.5%	0.28%	**0.40%**	0.8%	0.12%
FoxP3+	**2.80%**	3.30%	1.70%	**2.10%**	4.60%	1.60%	**1.50%**	4.40%	0.80%	**0.40%**	8.49%	0.23%
FoxP3+ CD103+	**0.80%**	1.20%	0.20%	**0.70%**	1.80%	0.50%	**0.70%**	1.40%	0.24%	**0.20%**	1.40%	0.10%

[0195]

[0196] 표 4

	0 일째			8 일째			28 일째		
세포군	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값
CCR9+IFN-γ+	**2.8%**	35.00%	0.40%	**1.0%**	16.00%	0.13%	**5.05%**	31.00%	0.40%
CCR9+IL-17A+	**2.8%**	9.8%	0.02%	**0.44%**	8.00%	0.05%	**1.00%**	280.00%	0.00%
CCR9+FoxP3+	**0.20%**	1.20%	0.01%	**0.50%**	1.90%	0.02%	**0.40%**	4.00%	0.10%
IFN-γ+	**10.60%**	26.00%	3.60%	**7.2%**	34.00%	1.70%	**13.00%**	34.00%	3.40%
IL-17A+	**1.4%**	5.80%	0.20%	**1.10%**	5.30%	0.00%	**1.06%**	5.60%	0.22%
FoxP3+	**1.70%**	3.30%	0.19%	**1.23%**	4.60%	0.21%	**1.25%**	4.40%	0.20%
FoxP3+ CD103+	**0.20%**	4.60%	0.03%	**0.34%**	1.80%	0.07%	**0.34%**	1.40%	0.07%
인테그린 α4β7+	**2.70%**	6.30%	0.92%	**2.00%**	7.00%	0.51%	**2.60%**	5.2%	0.073%

[0197]

[0198] 표 4a

	0 일째			8 일째			28 일째			84 일째		
세포군	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값	중간값	최대값	최소값
CCR9+ FoxP3+	**0.20%**	1.20%	0.01%	**0.50%**	1.90%	0.02%	**0.40%**	4.00%	0.10%	**0.46%**	5.00%	0.01%
FoxP3+	**1.70%**	3.30%	0.19%	**1.23%**	4.60%	0.21%	**1.25%**	4.40%	0.20%	**1.06%**	8.49%	0.50%
FoxP3+ CD103+	**0.20%**	4.60%	0.03%	**0.34%**	1.80%	0.07%	**0.34%**	1.40%	0.07%	**0.20%**	1.40%	0.02%

[0199]

[0200] 위 각각의 표에서 볼 수 있듯이, CCR9+ IFN-γ+ 발현 T 세포군은 8 일째 유의하게 감소한다(예컨대, 표 4는 0 일째 2.8 % 발현을, 8 일째 1.0 % 발현을 보여준다; 도 8b 참조).

[0201] CCR9+ IL17A+ T 세포군의 감소 역시 관찰되었다 (예컨대, 표 4는 0 일째 2.8 % 발현을, 8 일째 0.44 % 발현을 보여준다; 도 8d 참조). 0 일째의 유의미한 감소는 CCR9+ IL17A+ T 세포군에서 28 일째 역시 관찰되었다(예컨대, 표 4는 28 일째 1.00 % 발현을 보여준다; 도 8d 참조). 이러한 감소는 84 일째 여전히 나타났다. (중간값으로 1 % 발현; 0.08-4.8 % 범위)

[0202] 8 일째에서 84 일째에 CCR9+ FoxP3+ T 세포군의 증가 역시 관찰되었다 (예컨대, 표 4는 0 일째 0.2% 발현을, 8 일째 0.5 % 발현을 보여준다; 도 8f 참조).

[0203] 8 일째 IFN-γ+ T 세포군에서 유의미한 감소가 관찰되었다(예컨대, 표 4는 0 일째 10.6 % 발현을, 8 일째 7.2 % 발현을 보여준다; 도 8a 참조).

[0204] IL17A+ T 세포군에서 감소 역시 관찰되었다(예컨대, 표 4는 0 일째 1.4 % 발현을, 8 일째 1.1 % 발현을 보여준다; 도 8c 참조).

[0205] 8 일째 FoxP3+ T 세포군에서 감소가 역시 관찰되었다(예컨대, 표 4는 0 일째 1.7 % 발현을, 8 일째 1.23 % 발현을 보여준다; 도 8e 참조).

[0206] FoxP3+ CD103+ T 세포군의 변화는 관찰되지 않았고 (예컨대, 표 4는 0 일째 0.2 % 발현을, 8 일째 0.34 % 발현을 보여준다), 인테그린 α4β7 T 세포군의 변화 또한 관찰되지 않았다 (예컨대, 표 4는 0 일째 2.7 % 발현을, 8 일째 2 % 발현을 보여준다).

[0207] 표 1-4의 결과는 CD 환자에서 GED-0301로 SMAD7를 억제하면 특정 T 세포군의 발현을 조절할 수 있음을 설명한다. 구체적으로, 우리는 GED-0301 처리 8 일째에 CCR9+ IFN-γ+ T 세포군, CCR9+ IL17A+ T 세포군, FoxP3+ T 세포군, IFN-γ+ T 세포군, 및 IL17A+ T 세포군의 하향 조절과, GED-0301 처리 8 일째에 CCR9+

FoxP3+ T 세포군의 상향 조절을 관찰했다. CCR9+ IL17A+ T 세포군은 28 일째 GED-0301 처리 이후 역시 하향 조절되었다(예컨대, 0 일째에 비교할 때). 표 1-4는 CD 환자에서 GED-0301로 SMAD7을 억제하면 T_h1 시토카인의 합성을 낮추고 조절 T 세포(T_{reg})-매개 면역억제에 비해 이펙터 T 세포의 민감도를 회복시킨다. TGF-β1이 T_h1 세포 반응의 강력한 억제제이자, 조절 T 세포의 말초 분화와 활성에 핵심 매개자라는 설명과 잘 맞아떨어진다.

[0208] CDAI 점수는 위에서 논의된 각각의 세 집단의 환자에게서 측정되었다.

[0209] 기초 수준의 CDAI 점수는 처리 0 일째 측정되었고, 1, 4, 8, 28, 및 84 일째 재측정되었다. 표 5-7은 집단 1-3 각각에서 대표적인 환자의 CDAI 점수를 보여준다.

[0210] X. 아래 표 5에서 볼 수 있듯이, 7 일 동안 GED-0301 40 mg을 받은 집단 1의 환자들은 처리 4 일째까지 CDAI 점수의 감소를 보여주었고, 이는 모니터링 기간 (84 일째까지) 전반에 걸쳐 유지되었다.

[0211] 표 5

환자 (집단 1)	기초 수준	1 일째	4 일째	8 일째	28 일째	84 일째
환자1-01	289	278	154	42	119	89
환자 1-02	253	257	181	86	93	154.4
환자 1-03	221	204	138	89	45	35
환자 1-04	302	294	203	41	18	81
환자 1-05	306	331	275	163	144	167

[0212]

[0213] 아래 표 6에서 볼 수 있듯이, 7 일 동안 GED-0301 80 mg을 받은 집단 2의 환자들은 처리 4 일째까지 CDAI 점수의 감소를 보여주었고, 이는 모니터링 기간 (84 일째까지) 전반에 걸쳐 유지되었다.

[0214] 표6

환자 (집단 2)	기초 수준	1 일째	4 일째	8 일째	28 일째	84 일째
환자 2-08	299	293	224	70	119.4	73
환자 2-09	400	401	322.2	215	301	339
환자 2-10	268	330	213	126	213.5	225
환자 2-11	287	299.8	207	95.6	52	46
환자 2-12	252	226	194	154	133	185

[0215]

[0216] 아래 표 7에서 볼 수 있듯이, 7 일 동안 GED-0301 160 mg을 받은 집단 3의 환자들은 처리 4 일째까지 CDAI 점수의 감소를 보여주었고, 이는 모니터링 기간 (84 일째까지) 전반에 걸쳐 유지되었다.

[0217] 표7

환자 (집단 3)	기초 수준	1 일째	4 일째	8 일째	28 일째	84 일째
환자 3-15	230	210	168.6	44	31	145
환자 3-16	260	217	133	53	71	94
환자 3-17	292	279	219	113	88	184
환자 3-18	290	280	242	95	71	118
환자 3-19	257	240	155	37	49	134

[0218]

[0219] 표 5-7의 결과는 GED-0301의 처리는 크론병으로 고통받는 환자의 CDAI 점수를 낮춘다는 것을 설명한다. 등록시에, 모든 환자의 크론병 활성지수 (CDAI) 점수 중간값은 287 (221에서 400까지)이었다 (도 9). 집단 1 환자들은 289 (221에서 306까지), 집단 2 환자들은 287 (252에서 400), 집단 3 환자들은 287 (221-400)의 CDAI 점수 중간값을 가졌다. 모든 세 집단에서, 환자들은 처리에 반응하여 (예컨대, 기초 수준 CDAI 점수로부터 70 점 이상의 감소가 각 환자에게서 관찰되었다), 8일째에 모든 15 명의 환자들이 CDAI 점수의 감소를 보여주었고 이중 집단 1-3의 12 명의 환자들은 완화 단계에 진입하였다. (예컨대, CDAI 점수 < 150) (표 5-7) 구체적으로, 집단 1의 4 명(5 명 중), 집단 2의 3 명(5 명 중), 및 집단 3의 5 명(5 명 중)은 150 점 미만의 CDAI 점수를 나타냈다(표 5-7). 28 일째 임상 반응은 모든 15 명의 환자에게서 분명할 뿐 아니라 (표 5-7) 기초 수준에 비해 유의미한 CDAI 점수의 감소가 있었다($p < 0.0001$). 28 일 째 임상적 완화는 15 명 중 13 명의 환자(86%)에게서 기록되었다 (집단 1의 5 명(5 명 중), 집단 2의 3 명(5 명 중), 및 집단 3의 5 명(5 명 중)) (표 5-7). 84 일째, 총 CDAI 점수는 기초 수준보다 유의미하게 낮아졌고 (표 5-7, $p < 0.0001$) 15 명 중 9 명의 환자(60%)들은 아직 회복기에 있었다. 구체적으로, 이는 집단 1의 3 명의 환자, 집단 2의 2 명의 환자, 및 집단 3의 4 명의 환자에게서 나타났다 (표 5-7). 분석을 각 집단에서 수행하였을 때에도 8, 28, 및 84 일째에 기초 수준으로부터 유의미한 CDAI 점수의 하락이 나타났다 (도 9). 이 결과는 회복단계 진입 및/또는 개선된 결과와 T 세포 아군(subpopulation)간에 상관관계가 있음을 제안한다. 추가적으로, 84 일째 관찰된 CDAI 점수는 더 이른 시점 (예컨대, 8 일째와 28 일째)에서보다 점수가 증가했는데, 이는 84 일째 특정 T 세포군에서 이에 상응하는 변동(fluctuation)이 있었음을 말해준다 (예컨대, CCR9+ FoxP3+ T 세포군은 0 일째에서 8 일째 사이에 증가했으나, 84 일째에는 감소하는 것으로 보였다).

[0220] 참조문헌 인용

[0221] 본원에 인용된 각각의 특허 자료 및 과학적 문헌의 전체 공개 내용은 모든 목적으로 참조문헌으로 포함된다.

[0222] 동등물

[0223] 본원 발명은, 본원 발명의 본질적 특징에서 출발한 다른 특정 형태에 구현될 수 있다. 상기 구현은 그러므로 이제까지 기술된 발명을 제한하는 것이 아니라, 실례로 보여주는 것이라고 여겨져야 한다. 본원 발명의 범위는 이제까지 상세한 설명에 의한 것보다는 첨부된 청구항에 의해 나타나는 것이며, 모든 청구항의 의미와 동등물의 범위에 있어서의 변경은 이 안에 포함되는 것으로 의도된 것이다.

도면

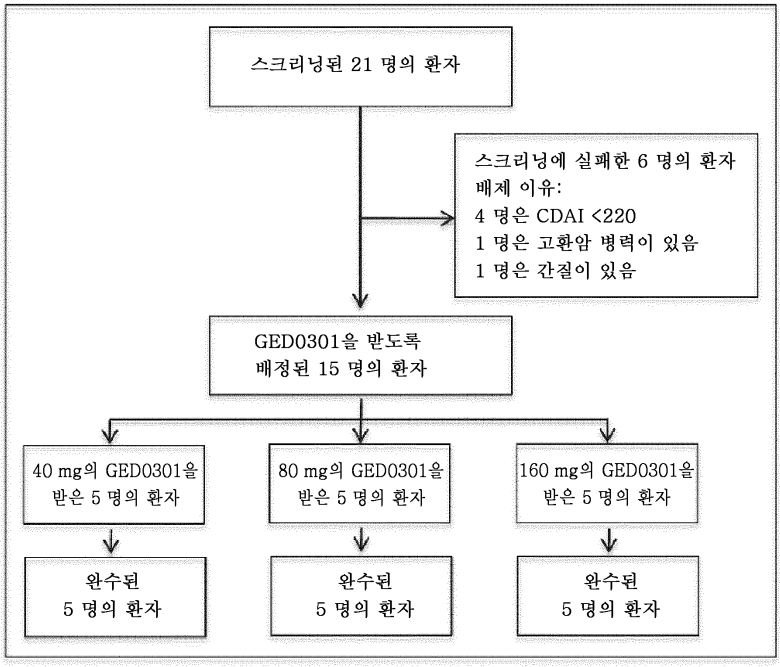
도면1a

```
       1 ggcacgagcg gagagccgcg cagggcgcgg gccgcgcggg gtggggcagc cggagcgcag
      61 gcccccgatc cccggcgggc gccccgggc ccccgcgcgc gccccggcct ccgggagact
     121 ggcgcatgcc acggagcgcc cctcgggccg ccgccgctcc tgcccgggcc cctgctgctg
     181 ctgctgtcgc ctgcgcctgc tgccccaact cggcgcccga cttcttcatg gtgtgcggag
     241 gtcatgttcg ctccttagca ggcaaacgac ttttctcctc gcctcctcgc cccgcatgtt
     301 caggaccaaa cgatctgcgc tcgtccggcg tctctggagg agccgtgcgc ccggcggcga
     361 ggacgaggag gagggcgcag ggggaggtgg aggaggaggc gagctgcggg gagaaggggc
     421 gacggacagc cgagcgcatg gggccggtgg cggcggcccg ggcagggctg gatgctgcct
     481 gggcaaggcg gtgcgaggtg ccaaaggtca ccaccatccc cacccgccag ccgcgggcgc
     541 cggcgcggcc gggggcgccg aggcggatct gaaggcgctc acgcactcgg tgctcaagaa
     601 actgaaggag cggcagctgg agctgctgct ccaggccgtg gagtcccgcg gcgggacgcg
     661 caccgcgtgc ctcctgctgc ccggccgcct ggactgcagg ctgggcccgg gggcgcccgc
     721 cggcgcgcag cctgcgcagc cgccctcgtc ctactcgctc cccctcctgc tgtgcaaagt
     781 gttcaggtgg ccggatctca ggcattcctc ggaagtcaag aggctgtgtt gctgtgaatc
     841 ttacgggaag atcaaccccg agctggtgtg ctgcaacccc catcacctta gccgactctg
     901 cgaactagag tctccccccc ctccttactc cagatacccg atggattttc tcaaaccaac
     961 tgcagactgt ccagatgctg tgccttcctc cgctgaaaca gggggaacga attatctggc
    1021 ccctgggggg ctttcagatt cccaacttct tctggagcct ggggatcggt cacactggtg
    1081 cgtggtggca tactgggagg agaagacgag agtggggagg ctctactgtg tccaggagcc
    1141 ctctctggat atcttctatg atctacctca ggggaatggc ttttgcctcg gacagctcaa
    1201 ttcggacaac aagagtcagc tggtgcagaa ggtgcggagc aaaatcggct gcggcatcca
    1261 gctgacgcgg gaggtggatg gtgtgtgggt gtacaaccgc agcagttacc ccatcttcat
    1321 caagtccgcc acactggaca acccggactc caggacgctg ttggtacaca aggtgttccc
    1381 cggtttctcc atcaaggctt tcgactacga gaaggcgtac agcctgcagc ggcccaatga
    1441 ccacgagttt atgcagcagc cgtggacggg ctttaccgtg cagatcagct ttgtgaaggg
    1501 ctggggtcag tgctacaccc gccagttcat cagcagctgc ccgtgctggc tagaggtcat
    1561 cttcaacagc cggtagccgc gtgcggaggg gacagagcgt gagctgagca ggccacactt
    1621 caaactactt tgctgctaat attttcctcc tgagtgcttg cttttcatgc aaactctttg
    1681 gtcgtttttt ttttgtttgt tggttggttt tcttcttctc gtcctcgttt gtgttctgtt
    1741 ttgtttcgct ctttgagaaa tagcttatga aaagaattgt tgggggtttt tttggaagaa
    1801 ggggcaggta tgatcggcag gacaccctga taggaagagg ggaagcagaa atccaagcac
    1861 caccaaacac agtgtatgaa ggggggcggt catcatttca cttgtcagga gtgtgtgtga
    1921 gtgtgagtgt gcggctgtgt gtgcacgcgt gtgcaggagc ggcagatggg gagacaacgt
    1981 gctctttgtt ttgtgtctct tatggatgtc cccagcagag aggtttgcag tcccaagcgg
    2041 tgtctctcct gccccttgga cacgctcagt ggggcagagg cagtacctgg gcaagctggc
    2101 ggctggggtc ccagcagctg ccaggagcac ggctctgtcc ccagcctggg aaagcccctg
    2161 cccctcctct ccctcatcaa ggacacgggc ctgtccacag gcttctgagc agcgagcctg
    2221 ctagtggccg aaccagaacc aattattttc atccttgtct tattcccttc ctgccagccc
    2281 ctgccattgt agcgtctttc ttttttggcc atctgctcct ggatctccct gagatgggct
    2341 tcccaagggc tgccggggca gccccctcac agtattgctc acccagtgcc ctctcccctc
    2401 agcctctccc ctgcctgccc tggtgacatc aggtttttcc cggacttaga aaaccagctc
    2461 agcactgcct gctcccatcc tgtgtgttaa gctctgctat taggccagca agcggggatg
    2521 tccctgggag ggacatgctt agcagtcccc ttccctccaa gaaggatttg gtccgtcata
    2581 acccaaggta ccatcctagg ctgacaccta actcttcttt catttcttct acaactcata
    2641 cactcgtatg atacttcgac actgttctta gctcaatgag catgtttaga ctttaacata
    2701 agctattttt ctaactacaa aggtttaaat gaacaagaga agcattctca ttggaaattt
    2761 agcattgtag tgctttgaga gagaaaggac tcctgaaaaa aaacctgaga tttattaaag
    2821 aaaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac ttgtaaatat aaagacgttt
    2881 tataagcatc attatttatg tattgtgcaa tgtgtataaa caagaaaaat aaagaaaaga
    2941 tgcactttgc tttaatataa atgcaaataa caaatgccaa attaaaaaag ataaacacaa
    3001 gattggtgtt ttttcctatg ggtgttatca cctagctgaa tgtttttcta aaggagttta
    3061 tgttccatta aacgattttt aaaatgtaca cttgaaaaaa aaaaaaaaaa a
(SEQ ID NO:1)
```

도면1b

```
MFRTKRSALVRRLWRSRAPGGEDEEEGAGGGGGGGELRGEGATD
SRAHGAGGGGPGRAGCCLGKAVRGAKGHHHPHPPAAGAGAAGGAEADLKALTHSVLKK
LKERQLELLLQAVESRGGTRTACLLLPGRLDCRLGPGAPAGAQPAQPPSSYSLPLLLC
KVFRWPDLRHSSEVKRLCCCESYGKINPELVCCNPHHLSRLCELESPPPPYSRYPMDF
LKPTADCPDAVPSSAETGGTNYLAPGGLSDSQLLLEPGDRSHWCVVAYWEEKTRVGRL
YCVQEPSLDIFYDLPQGNGFCLGQLNSDNKSQLVQKVRSKIGCGIQLTREVDGVWVYN
RSSYPIFIKSATLDNPDSRTLLVHKVFPGFSIKAFDYEKAYSLQRPNDHEFMQQPWTG
FTVQISFVKGWGQCYTRQFISSCPCWLEVIFNSR
(SEQ ID NO:2)
```

도면2



도면3

	40 mg	80 mg	160 mg	전체
	N = 5	*N* = 5	*N* = 5	*N* = 15
	집단 1	집단 2	집단 3	
성별, 남성; n (%)	3 (60)	4 (80)	4 (80)	11 (73)
나이: 중간값 (범위)	38 (32–41)	34 (31–42)	39 (24–45)	37 (24–45)
CD 지속 기간: 연도 중간값 (범위)	6 (1–29)	2 (1–5)	1 (1–9)	4 (1–29)
이전 I-C 절제: n (%)	4 (80)	4 (80)	1 (20)	9 (60)
CD 발병 부위: n (%)				
말단 회장	1 (20)	1 (20)	4 (80)	6 (40)
전(前)연결부(preanastomotic)	4 (80)	4 (80)	1 (20)	9 (60)
CD 거동: n (%)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	15 (100)
염증				
수반된 약물치치: n (%)				
전신 코르티코스테로이드	0 (0)	0 (0)	1 (20)	1 (6.6)
부데소니드	4 (80)	2 (40)	3 (60)	9 (60)
메살라민	3 (60)	4 (80)	5 (100)	12 (80)
비반응에 대한 불내성: n (%)				
면역억제 약물	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5 (33.3)
항-TNF	1 (20)	2 (40)	2 (40)	5 (33.3)

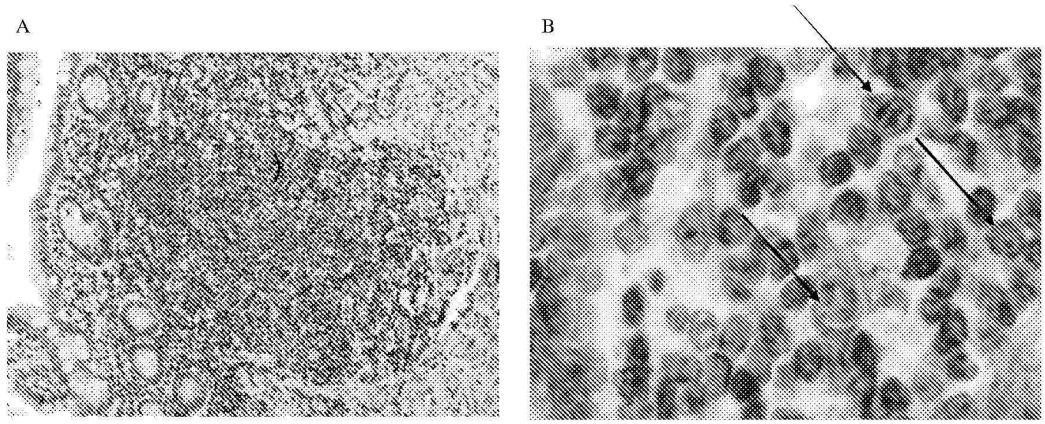
약어: CD는 크론병; TNF는 종양괴사인자

도면4

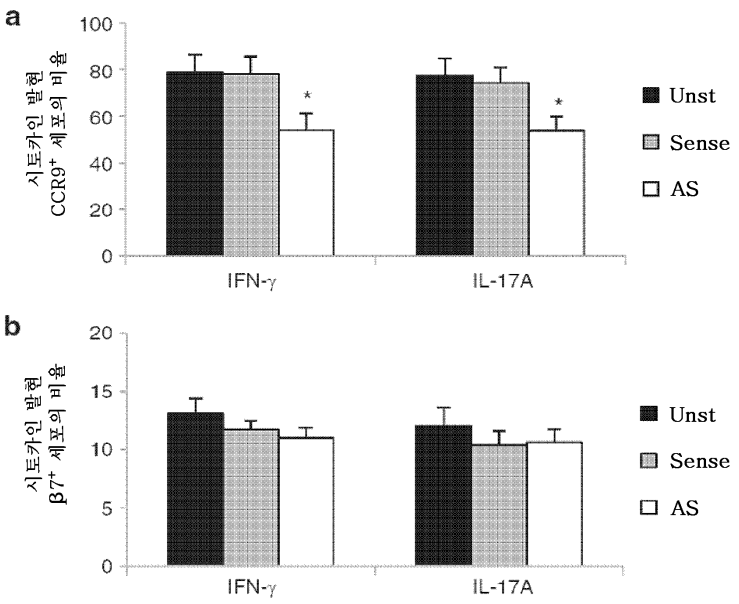
	집단 1	집단 2	집단 3		연구용 약물과의
	횟수	횟수	횟수	경증도	관련성
CD 재발	0	1	0	경증	UN (1)
복통	0	0	2	중증	UN (2)
구토	0	0	2	중증	UN (2)
트리글리세리드	0	0	3	경증	NT (3)
및/또는 콜레스테롤 증가	2	0	0	경증	UN (2)
	1	0	0	경증	PR (1)
빌리루빈 증가	3	0	0	경증	NT (3)
림프구 수 증가	0	0	1	경증	NT (1)
혈청 칼륨 감소	1	0	0	경증	NT (1)
소변 림프구 수 증가	1	0	0	경증	NT (1)
	0	0	1	경증	UN (1)
소변 림프구 에스테라제 수 증가	1	0	0	경증	NT (1)
요로 감염	1	2	0	경증	NT (3)
고혈압	0	1	0	경증	NT (1)
ECG 변형 (T파 역전)	0	1	0	경증	UN (1)
비염	1	0	0	경증	UN (1)

위 데이터는 적어도 하나 이상의 부작용(기록된환자수)을 갖는 환자의 수를 나타낸다.
약어: CD는 크론병; ECG는 심전도; NT는 연구용 약물과 관련되지 않음;
PR은 연구용 약물과 아마도 관련됨; UN은 연구용 약물과 연관되지 않은 듯함.

도면5



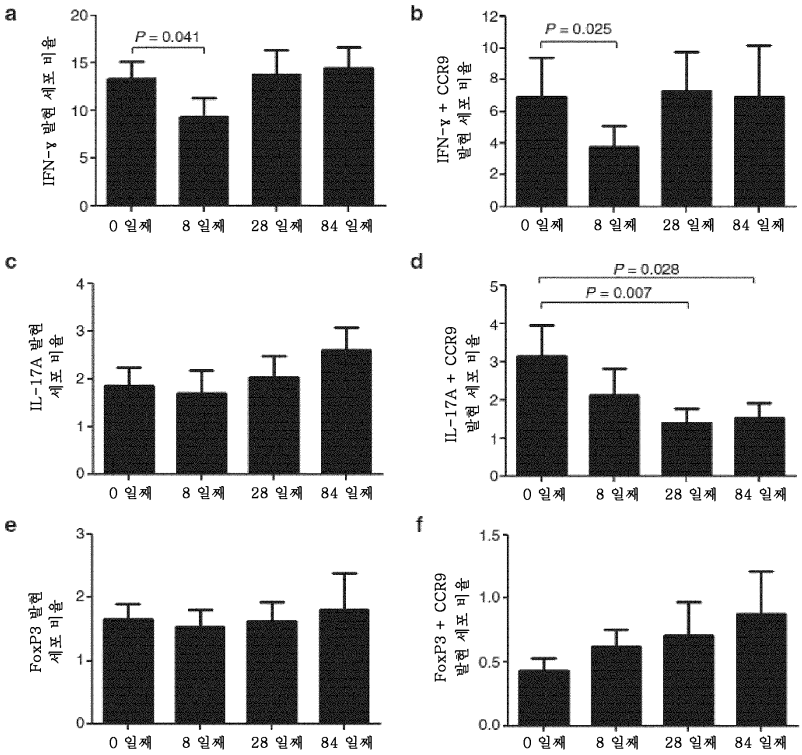
도면6



도면7

	기초 수준	8 일째	28 일째
세포			
$CD3^+$	66.8% ± 12.5%	70.8% ± 12.5%	70.4% ± 10.3%
$CD4^+$	44.8% ± 14.2%	50.4% ± 12.8%	50.7% ± 12.6%
$CD8^+$	16.6% ± 6.6%	20.0% ± 6.2%	19.8% ± 5.4%
$CD25^+$	44.2% ± 15.5%	39.2% ± 11.6%	39.4% ± 13.8%
$CD161^+$	4.9% ± 2.8%	4.3% ± 2.7%	4.7% ± 4.6%
$CD62L^+$	50.3% ± 13.7%	54.9% ± 11.6%	54.9% ± 12.9%
$CCR9^+$	2.9% ± 1.6%	3.8% ± 3.1%	3.6% ± 2.8%
$\alpha4\beta7^+$	3.0% ± 1.5%	2.7% ± 2.1%	2.4% ± 1.3%

도면8



도면9

	40 mg	80 mg	160 mg	전체
	N = 5	*N* = 5	*N* = 5	*N* = 15
	집단	집단 2	집단 3	
CDAI				
기초 수준	289 (221–306)	287 (252–400)	287 (221–400)	287 (221–400)
8 일째	86 (41–163)	126 (70–215)	53 (37–113)	89 (37–215)
28 일째	93 (18–144)	133 (52–301)	71 (31–88)	88 (18–301)

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Giuliani International Limited

<120> Methods for Monitoring Responsiveness to Anti-SMAD7 Therapy

<130> PS631PCT

<140> PCT/EP2012/068146

<141> 2012-09-15

<150> EP11425234.9

<151> 2011-09-15

<150> US61/576,556

<151> 2011-12-16

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3111

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggcacgagcg gagagccgcg cagggcgcgg gccgcgcggg gtggggcagc cggagcgcag 60

gcccccgatc cccggcgggc gcccccgggc ccccgcgcgc gccccggcct ccgggagact 120

ggcgcatgcc acggagcgcc cctcgggccg ccgccgctcc tgcccgggcc cctgctgctg 180

ctgctgtcgc ctgcgcctgc tgccccaact cggcgcccga cttcttcatg gtgtgcggag 240

gtcatgttcg ctccttagca ggcaaacgac ttttctcctc gcctcctcgc cccgcatgtt 300

caggaccaaa cgatctgcgc tcgtccggcg tctctggagg agccgtgcgc ccggcggcga 360

ggacgaggag gagggcgcag ggggaggtgg aggaggaggc gagctgcggg gagaaggggc 420

gacggacagc cgagcgcatg gggccggtgg cggcggcccg ggcagggctg gatgctgcct 480

gggcaaggcg gtgcgaggtg ccaaaggtca ccaccatccc cacccgccag ccgcgggcgc 540

cggcgcggcc gggggcgccg aggcggatct gaaggcgctc acgcactcgg tgctcaagaa 600

actgaaggag cggcagctgg agctgctgct ccaggccgtg gagtcccgcg gcgggacgcg 660

caccgcgtgc ctcctgctgc ccggccgcct ggactgcagg ctgggcccgg gggcgcccgc 720

cggcgcgcag cctgcgcagc cgccctcgtc ctactcgctc cccctcctgc tgtgcaaagt 780

gttcaggtgg ccggatctca ggcattcctc ggaagtcaag aggctgtgtt gctgtgaatc 840

ttacgggaag atcaaccccg agctggtgtg ctgcaacccc catcacctta gccgactctg 900

cgaactagag tctccccccc ctccttactc cagatacccg atggattttc tcaaaccaac 960

tgcagactgt ccagatgctg tgccttcctc cgctgaaaca gggggaacga attatctggc 1020

ccctgggggg ctttcagatt cccaacttct tctggagcct ggggatcggt cacactggtg 1080

cgtggtggca tactgggagg agaagacgag agtggggagg ctctactgtg tccaggagcc 1140

ctctctggat atcttctatg atctacctca ggggaatggc ttttgcctcg gacagctcaa 1200

ttcggacaac aagagtcagc tggtgcagaa ggtgcggagc aaaatcggct gcggcatcca 1260

gctgacgcgg gaggtggatg gtgtgtgggt gtacaaccgc agcagttacc ccatcttcat 1320

caagtccgcc acactggaca acccggactc caggacgctg ttggtacaca aggtgttccc 1380

cggtttctcc atcaaggctt tcgactacga gaaggcgtac agcctgcagc ggcccaatga 1440

ccacgagttt atgcagcagc cgtggacggg ctttaccgtg cagatcagct ttgtgaaggg 1500

ctggggtcag tgctacaccc gccagttcat cagcagctgc ccgtgctggc tagaggtcat 1560

cttcaacagc cggtagccgc gtgcggaggg gacagagcgt gagctgagca ggccacactt 1620

caaactactt tgctgctaat attttcctcc tgagtgcttg cttttcatgc aaactctttg 1680

gtcgtttttt ttttgtttgt tggttggttt tcttcttctc gtcctcgttt gtgttctgtt 1740

ttgtttcgct ctttgagaaa tagcttatga aaagaattgt tgggggtttt tttggaagaa 1800

ggggcaggta tgatcggcag gacaccctga taggaagagg ggaagcagaa atccaagcac 1860

caccaaacac agtgtatgaa ggggggcggt catcatttca cttgtcagga gtgtgtgtga 1920

gtgtgagtgt gcggctgtgt gtgcacgcgt gtgcaggagc ggcagatggg gagacaacgt 1980

gctctttgtt ttgtgtctct tatggatgtc cccagcagag aggtttgcag tcccaagcgg 2040

tgtctctcct gccccttgga cacgctcagt ggggcagagg cagtacctgg gcaagctggc 2100

ggctggggtc ccagcagctg ccaggagcac ggctctgtcc ccagcctggg aaagcccctg 2160

cccctcctct ccctcatcaa ggacacgggc ctgtccacag gcttctgagc agcgagcctg 2220

ctagtggccg aaccagaacc aattattttc atccttgtct tattcccttc ctgccagccc 2280

ctgccattgt agcgtctttc ttttttggcc atctgctcct ggatctccct gagatgggct 2340

tcccaagggc tgccggggca gccccctcac agtattgctc acccagtgcc ctctcccctc 2400

agcctctccc ctgcctgccc tggtgacatc aggtttttcc cggacttaga aaaccagctc 2460

agcactgcct gctcccatcc tgtgtgttaa gctctgctat taggccagca agcggggatg 2520

tccctgggag ggacatgctt agcagtcccc ttccctccaa gaaggatttg gtccgtcata 2580

acccaaggta ccatcctagg ctgacaccta actcttcttt catttcttct acaactcata 2640

cactcgtatg atacttcgac actgttctta gctcaatgag catgtttaga ctttaacata 2700

agctattttt ctaactacaa aggtttaaat gaacaagaga agcattctca ttggaaattt 2760

agcattgtag tgctttgaga gagaaaggac tcctgaaaaa aaacctgaga tttattaaag 2820

aaaaaaatgt attttatgtt atatataaat atattattac ttgtaaatat aaagacgttt 2880

tataagcatc attatttatg tattgtgcaa tgtgtataaa caagaaaaat aaagaaaaga 2940

tgcactttgc tttaatataa atgcaaataa caaatgccaa attaaaaaag ataaacacaa 3000

gattggtgtt ttttcctatg ggtgttatca cctagctgaa tgtttttcta aaggagttta 3060

tgttccatta aacgattttt aaaatgtaca cttgaaaaaa aaaaaaaaaa a 3111

<210> 2

<211> 427

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Phe Arg Thr Lys Arg Ser Ala Leu Val Arg Arg Leu Trp Arg Ser
1               5                  10                  15
Arg Ala Pro Gly Gly Glu Asp Glu Glu Glu Gly Ala Gly Gly Gly Gly
            20                  25                  30
Cys Gly Gly Glu Leu Arg Gly Glu Gly Ala Thr Asp Ser Arg Ala His
        35                  40                  45

Gly Ala Gly Gly Gly Gly Pro Gly Arg Ala Gly Cys Cys Leu Gly Lys
    50                  55                  60
Ala Val Arg Gly Ala Lys Gly His His His Pro His Pro Pro Ala Ala
65                  70                  75                  80
Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Glu Ala Asp Leu Lys Ala Leu Thr
                85                  90                  95
His Ser Val Leu Lys Lys Leu Lys Glu Arg Gln Leu Glu Leu Leu Leu
            100                 105                 110

Gln Ala Val Glu Ser Arg Gly Gly Thr Arg Thr Ala Cys Leu Leu Leu
        115                 120                 125
Pro Gly Arg Leu Asp Cys Arg Leu Gly Pro Gly Ala Pro Ala Gly Ala
    130                 135                 140
Gln Pro Ala Gln Pro Pro Ser Ser Tyr Ser Leu Pro Leu Leu Leu Cys
145                 150                 155                 160
Lys Val Phe Arg Trp Pro Asp Leu Arg His Ser Ser Glu Val Lys Arg
                165                 170                 175

Ile Leu Cys Cys Cys Glu Ser Tyr Gly Lys Ile Asn Pro Glu Leu Val
            180                 185                 190
Cys Cys Asn Pro His His Leu Ser Arg Leu Cys Glu Leu Glu Ser Pro
        195                 200                 205
Pro Pro Pro Tyr Ser Arg Tyr Pro Met Asp Phe Leu Lys Pro Thr Ala
    210                 215                 220
Asp Cys Pro Asp Ala Val Pro Ser Ser Ala Glu Thr Gly Gly Ile Asn
```

225 230 235 240

Tyr Leu Ala Pro Gly Gly Leu Ser Asp Ser Gln Leu Leu Leu Glu Pro
245 250 255
Gly Asp Arg Ser His Trp Cys Val Val Ala Tyr Trp Glu Glu Lys Thr
260 265 270
Arg Val Gly Arg Leu Tyr Cys Val Gln Glu Pro Ser Leu Asp Ile Phe
275 280 285
Tyr Asp Leu Pro Gln Gly Asn Gly Phe Cys Leu Gly Gln Leu Asn Ser
290 295 300

Asp Asn Lys Ser Gln Leu Val Gln Lys Val Arg Ser Lys Ile Gly Cys
305 310 315 320
Gly Ile Gln Leu Thr Arg Glu Val Asp Gly Val Trp Val Tyr Asn Arg
325 330 335
Ser Ser Tyr Pro Ile Phe Ile Lys Ser Ala Thr Leu Asp Asn Pro Asp
340 345 350
Ser Arg Thr Leu Leu Val His Lys Val Phe Pro Gly Phe Ser Ile Lys
355 360 365

Ala Phe Asp Tyr Glu Lys Ala Tyr Ser Leu Gln Arg Pro Asn Asp His
370 375 380
Glu Phe Met Gln Gln Pro Trp Thr Gly Phe Thr Val Gln Ile Ser Phe
385 390 395 400
Val Lys Gly Trp Gly Gln Cys Tyr Thr Arg Gln Phe Ile Ser Ser Cys
405 410 415
Pro Cys Trp Leu Glu Val Ile Phe Asn Ser Arg
420 425

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-SMAD7 oligonucleotide

<400> 3

gtcgcccctt ctccccgcag c 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-SMAD7 oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> c

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> m5c

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> cm

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> wherein n3 and n16 (X) is cytosine and 5-methylcytosine or a

2'-O-methylcytosine nucleoside, and n4 and n17(Y) is guanine and

5-methylguanine or a 2'-O-methylguanine nucleoside, provided that

at least one of the nucleotides X or Y is a methylated base

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> g

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> m5g

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> gm

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> wherein n3 and n16 (X) is cytosine and 5-methylcytosine or a

2'-O-methylcytosine nucleoside, and n4 and n17(Y) is guanine and

5-methylguanine or a 2'-O-methylguanine nucleoside, provided that at least one of the nucleotides X or Y is a methylated base

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> c

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> m5c

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> cm

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> wherein n3 and n16 (X) is cytosine and 5-methylcytosine or a 2'-O-methylcytosine nucleoside, and n4 and n17(Y) is guanine and

5-methylguanine or a 2'-O-methylguanine nucleoside, provided that at least one of the nucleotides X or Y is a methylated base

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> g

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> m5g

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> gm

<220><221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> wherein n3 and n16 (X) is cytosine and 5-methylcytosine or a 2'-O-methylcytosine nucleoside, and n4 and n17(Y) is guanine and

5-methylguanine or a 2'-O-methylguanine nucleoside, provided that

at least one of the nucleotides X or Y is a methylated base

<400> 4

gtnnccccctt ctcccnncag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-SMAD7 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<400> 5

gtngcccctt ctcccngcag 20

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-SMAD7 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> 5-methyl 2'-deoxyxytidine 5'-monophosphate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> 5-methyl 2'-deoxyxytidine 5'-monophosphate

<400> 6

gtngcccctt ctcccngcag c 21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-SMAD7 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is 2'-deoxyguanosine methylphosphonate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxyguanosine methylphosphonate

<400> 7

ntngcccctt ctcccngcan 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-SMAD7 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxyguanosine methylphosphonate

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxyguanosine methylphosphonate

<400> 8

ntngcccctt ctcccngcan 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-SMAD7 oligonucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<220><221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> n is 5-methyl 2'-deoxycytidine 5'-monophosphate

<400> 9

gtngcccctt ctcccngcag 20