

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-517279

(P2014-517279A)

(43) 公表日 平成26年7月17日 (2014.7.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	
	GO 1 N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 100 頁)

(21) 出願番号	特願2014-510475 (P2014-510475)	(71) 出願人	599132904
(86) (22) 出願日	平成24年5月10日 (2012.5.10)		ネステク ソシエテ アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月20日 (2013.12.20)		スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/037375		5 5
(87) 国際公開番号	W02012/154987	(74) 代理人	100088155
(87) 国際公開日	平成24年11月15日 (2012.11.15)		弁理士 長谷川 芳樹
(31) 優先権主張番号	61/484, 607	(74) 代理人	100114270
(32) 優先日	平成23年5月10日 (2011.5.10)		弁理士 黒川 朋也
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128381
(31) 優先権主張番号	61/505, 026		弁理士 清水 義憲
(32) 優先日	平成23年7月6日 (2011.7.6)	(74) 代理人	100107456
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 池田 成人
(31) 優先権主張番号	61/553, 909	(74) 代理人	100140453
(32) 優先日	平成23年10月31日 (2011.10.31)		弁理士 戸津 洋介
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

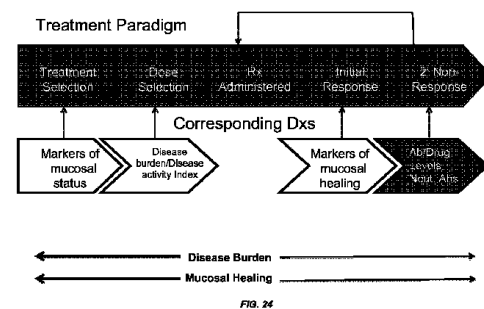
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 個別治療管理のための疾患活動性プロファイリングの方法

## (57) 【要約】

本発明は、治療の最適化及び／又は治療有効性のモニタリングを行うための疾患の個別治療管理のための方法を提供する。特に、本発明は、治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び／又は治療処置の有効性のモニタリングのための粘膜治癒指数を決定するために、治療剤を用いる治療過程にわたる複数の時点で1つ又は複数のバイオマーカーのアレイを測定することを含む。特定の場合では、治療剤は、TNF $\alpha$ 媒介性疾患又は障害の処置のためのTNF $\alpha$ 阻害剤である。

【選択図】 図24



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

治療レジメンを受けている炎症性腸疾患（I B D）と診断された個体における粘膜治癒を測定するための非侵襲的方法であって、

- （a）個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、
  - （b）個体中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを対照のレベルと比較して個体の粘膜治癒指数を計算するステップであり、粘膜治癒指数が粘膜治癒の程度の表示を含む、ステップと、
  - （c）粘膜治癒を起こしている個体が治療レジメンを維持すべきであるかどうかを決定するステップと
- を含む、方法。

10

## 【請求項 2】

治療を受けている炎症性腸疾患（I B D）を有する個体における治療効果をモニターする方法であって、

- （a）治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、
  - （b）ステップ（a）において決定された 1 つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、
  - （c）個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、
  - （d）治療が粘膜治癒を促進するために個体にとって適切であるかどうかを決定するステップと
- を含む、方法。

20

## 【請求項 3】

炎症性腸疾患（I B D）を有する個体のための治療レジメンを選択するための方法であって、

- （a）個体が治療抗体を受けている治療過程にわたる複数の時点で個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、
  - （b）ステップ（a）において決定された 1 つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、
  - （c）個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、
  - （d）個体のための適切な治療レジメンを選択するステップであり、治療レジメンが粘膜治癒を促進する、ステップと
- を含む、方法。

30

## 【請求項 4】

I B D がクローン病又は潰瘍性大腸炎を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

I B D がクローン病を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

粘膜治癒マーカーが、A R E G、E R E G、H B - E G F、H G F、N R G 1、N R G 2、N R G 3、N R G 4、B T C、E G F、I G F、T G F - 、V E G F - A、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、F G F 1、F G F 2、F G F 7、F G F 9、T W E A K 及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 7】

前記マーカーが、血清、血漿、全血、糞便、末梢血単核細胞（P B M C）、多形核（P M N）細胞、及び組織生検からなる群から選択される試料中で測定される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記治療が、T N F 阻害剤療法、免疫抑制剤、コルチコステロイド、異なる機構を標

50

的とする薬物、栄養療法、及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

TNF 阻害剤療法が抗 TNF 抗体を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

抗 TNF 抗体が、レミケード (REMICADE) (商標) (インフリキシマブ)、エンブレル (ENBREL) (商標) (エタネルセプト)、ヒュミラ (HUMIRA) (商標) (アダリムマブ)、シムジア (CIMZIA) (登録商標) (セルトリズマブペゴール)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

免疫抑制剤が、アザチオプリン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサート、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

異なる機構を標的とする薬物が、IL - 6 受容体阻害抗体、抗インテグリン分子、JAK - 2 阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

栄養療法が特殊炭水化物食を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

粘膜治癒マーカーのアレイが、抗 TNF 抗体、抗薬物抗体 (ADA)、炎症マーカー、抗炎症マーカー、粘膜治癒マーカー、及びそれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1 つのメンバーをさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 15】

抗 TNF 抗体が、レミケード (商標) (インフリキシマブ)、エンブレル (商標) (エタネルセプト)、ヒュミラ (商標) (アダリムマブ)、シムジア (登録商標) (セルトリズマブペゴール)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

抗薬物抗体 (ADA) が、ヒト抗キメラ抗体 (HACA)、ヒト抗ヒト化抗体 (HAA)、ヒト抗マウス抗体 (HAMA)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 17】

粘膜治癒マーカーが、AREG、EREG、HB - EGF、HGF、NRG1、NRG2、NRG3、NRG4、BTC、EGF、IGF、TGF - 、VEGF - A、VEGF - B、VEGF - C、VEGF - D、FGF1、FGF2、FGF7、FGF9、TW EAK 及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

炎症マーカーが、GM - CSF、IFN - 、IL - 1、IL - 2、IL - 6、IL - 8、TNF - 、sTNF RII、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 19】

抗炎症マーカーが、IL - 12 p70、IL - 10、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 20】

治療レジメンを施される炎症性腸疾患 (IBD) と診断された個体における外科手術のリスクを低減又は最小化する方法であって、

(a) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

50

(b) 経時的なそれぞれのマーカーの存在及び / 又は濃度レベルの表示を含む個体の粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c) 個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

(d) 適切な治療レジメンを選択して、外科手術のリスクを低減又は最小化するステップと

を含む、方法。

【請求項 2 1】

粘膜治癒マーカーが、A R E G、E R E G、H B - E G F、H G F、N R G 1、N R G 2、N R G 3、N R G 4、B T C、E G F、I G F、T G F - 、V E G F - A、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、F G F 1、F G F 2、F G F 7、F G F 9、T W E A K 及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 2 0 に記載の方法。

10

【請求項 2 2】

対照が健常な対照である、請求項 2 0 又は 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

治療抗体が抗 T N F 抗体を含む、請求項 2 0 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

抗 T N F 抗体が、レミケード (商標) (インフリキシマブ)、エンブレル (商標) (エタネルセプト)、ヒュミラ (商標) (アダリムマブ)、シムジア (登録商標) (セルトリズマブペゴール)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項 2 3 に記載の方法。

20

【請求項 2 5】

前記マーカーが、血清、血漿、全血、糞便、末梢血単核細胞 (P B M C)、多形核 (P M N) 細胞、及び組織生検からなる群から選択される試料中で測定される、請求項 2 0 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

複数の時点が、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50 以上の時点を含む、請求項 2 0 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

I B D がクローン病又は潰瘍性大腸炎を含む、請求項 2 0 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 8】

複数の時点における最初の時点が、治療抗体を用いる治療過程の前である、請求項 2 0 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

複数の時点における最初の時点が、治療抗体を用いる治療過程の間である、請求項 2 0 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

炎症性腸疾患 (I B D) と診断された個体における粘膜治癒を促進するための治療レジメンを選択する方法であって、

40

(a) 時点  $t_0$  で粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定して、 $t_0$  での粘膜治癒指数を生成するステップと、

(b) 時点  $t_1$  で粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定して、 $t_1$  での粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c)  $t_0$  から  $t_1$  までの粘膜治癒指数の変化を比較するステップと、

(d) 個体のための治療レジメンを選択して、粘膜治癒を促進するステップとを含む、方法。

【請求項 3 1】

粘膜治癒マーカーが、A R E G、E R E G、H B - E G F、H G F、N R G 1、N R G

50

2、NRG3、NRG4、BTC、EGF、IGF、TGF-、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、FGF1、FGF2、FGF7、FGF9、TWEAK及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

粘膜治癒指数が統計的アルゴリズムを用いて決定される、請求項30又は31に記載の方法。

【請求項33】

治療レジメンが抗TNF抗体を含む、請求項30～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

抗TNF抗体が、レミケード（商標）（インフリキシマブ）、エンブレル（商標）（エタネルセプト）、ヒュミラ（商標）（アダリムマブ）、シムジア（登録商標）（セルトリズマブペゴール）、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記マーカーが、血清、血漿、全血、糞便、末梢血単核細胞（PBMC）、多形核（PMN）細胞、及び組織生検からなる群から選択される試料中で測定される、請求項30～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

粘膜治癒マーカーのアレイのレベルが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50以上のさらなる時点で測定される、請求項30～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

IBDがクローン病又は潰瘍性大腸炎を含む、請求項30～36のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

[関連出願の相互参照]

[0001]本出願は、2011年5月10日に提出された米国特許仮出願第61/484,607号、2011年7月6日に提出された米国特許仮出願第61/505,026号、2011年10月31日に提出された米国特許仮出願第61/533,909号、2011年12月2日に提出された米国特許仮出願第61/566,509号、及び2012年4月20日に提出された米国特許仮出願第61/636,575号の優先権を主張し、その開示はあらゆる目的でその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

[発明の背景]

[0002]クローン病（CD）及び潰瘍性大腸炎（UC）を含む炎症性腸疾患（IBD）は、胃腸管を侵す慢性特発性炎症障害である。CD及びUCの疾患進行は、腸の炎症及び潰瘍形成の反復的エピソードを含み、入院、外科手術及び治療の拡大を要する合併症をもたらす（Peyrin-Birouletら、Am. J. Gastroenterol.、105:289～297（2010）；Langholz E.、Dan. Med. Bull.、46:400～415（1999））。抗腫瘍壊死因子-アルファ（TNF-）生物製剤（例えば、インフリキシマブ（IFX）、エタネルセプト、アダリムマブ（ADL）及びセルトリズマブペゴール）、チオプリン薬（例えば、アザチオプリン（AZA）、6-メルカプトプリン（6-MP））、抗炎症薬（例えば、メサラジン）、及びステロイド（例えば、コルチコステロイド）等の現在の処置は、疾患活動性を低減させることが示されている。CDのいくつかの臨床試験において、腸潰瘍の非存在として記載される粘膜治癒が、コルチコステロイド、IFX及びADLの組合せ療法上の患者において誘導

10

20

30

40

50

された。さらに、IFXを受けている患者においてMHが維持された。

【0003】

[0003]他の研究によって、粘膜治癒が腸炎症の抑制の特質であり、長期的な疾患寛解を予測することができることが示された(Frosliera, Gastroenterology, 133:412~422(2007); Baertら, Gastroenterology, (2010))。長期的な粘膜治癒は、UC患者における結腸切除及び結腸直腸癌のリスクの低下、CD患者におけるコルチコステロイド処置の必要性の低下、並びにおそらく入院の必要性の低下と関連していた(Daveira, Gastroenterology & Hepatology, 8(1):29~38(2012))。

【0004】

[0004]炎症性腸疾患研究のための国際機関(International Organization for the Study of Inflammatory Bowel Disease)は、UCにおける粘膜治癒を、腸粘膜の全ての見える部分における脆さ、血液、びらん及び潰瘍の非存在と定義することを提唱した(D'Haensら, Gastroenterology, 132:763~786(2007))。CDにおけるMHは、潰瘍の非存在であると提唱された。クローン病の活動性の測定のための至適基準は、クローン病の内視鏡的活動性指数(Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity(CDEIS))である。この疾患指数スコアは、表在性及び深部潰瘍、潰瘍化及び非潰瘍化狭窄、並びに潰瘍化及び疾患部分の表面積等のいくつかの変数から確立される。単純化された型の指数は、クローン病の単純内視鏡的スコア(Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease)であり、これは潰瘍の大きさ、潰瘍化された表面、罹患した表面及び狭窄の存在等の疾患変数を考慮に入れたものである。両指数は、CDの臨床症状を評価するものであるが、疾患の根本的な原因(例えば、炎症)又は疾患の消散(例えば、粘膜治癒)を測定することはできない。粘膜治癒の測定を実施して、疾患誘導並びに疾患進行及び消散を評価することができる。

【0005】

[0005]粘膜治癒のプロセスは、出血(例えば、血管の内皮層の分解)及び炎症から始まり、次いで、細胞及び組織の増殖に進行し、最終的には組織再モデリングへと進行する。炎症段階では、限定されるものではないが、IL-1、IL-2、IL-6、IL-14、IL-17、TGF及びTNF等の炎症マーカー及び抗炎症マーカーが発現される。再モデリング中には、限定されるものではないが、AREG、EREG、HBBEGF、HGF、NRG1~4、BTC、EGF、IGF、TGF-、VEGF、FGF及びTWEAK等の組織修復及び再モデリング増殖因子が発現される。腸上皮の修復には、細胞の生存、増殖及び移動に必要である複数のシグナル伝達経路が必要である。本発明者らは、疾患の再燃のリスク及び疾患の寛解を予測する粘膜治癒の新規マーカーを特定した。粘膜治癒の測定を用いて、治療レジメンを受けている患者における疾患状態を定期的に評価することができる。

【0006】

[0006]粘膜治癒は、典型的には内視鏡により評価される。侵襲的手順は低リスクであると考えられるが、その費用並びに患者の不快感及びコンプライアンスは、粘膜治癒を評価するための頻繁な規則的内視鏡検査にとっては依然として障害になる。患者における粘膜治癒を決定する非侵襲的方法の満たされていない必要性が当技術分野に存在する。

【0007】

[0007]治療を最適化し、有効性をモニターするための個別化された手法を用いて自己免疫障害等の疾患の治療管理の方法が当技術分野で必要である。その方法は、疾患経過並びに薬物動態、疾患活動性指数、疾患負荷、及び粘膜状態等の臨床パラメータの評価を含むことが必要である。本発明は、この必要性を満たし、その上関連する利点を提供する。

【0008】

[発明の簡単な概要]

10

20

30

40

50

[0008]本発明は、治療の最適化及び／又は治療有効性のモニタリングを行うための疾患の個別治療管理のための方法を提供する。特に、本発明は、治療剤を用いる治療過程にわたる１つ又は複数の時点で、１つ又は複数の粘膜治癒バイオマーカーのアレイを測定して、治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び／又は治療処置の有効性のモニタリングのための粘膜治癒指数を決定するステップを含む。いくつかの実施形態では、治療は、抗ＴＮＦ療法、免疫抑制剤、コルチコステロイド、異なる機構を標的とする薬物、栄養療法及びそれらの組合せである。特定の場合では、抗ＴＮＦ療法は、ＴＮＦにより媒介される疾患又は障害の処置のためのＴＮＦ阻害剤（例えば、抗ＴＮＦ薬、抗ＴＮＦ抗体）である。

【０００９】

10

[0009]ＴＮＦは、炎症性疾患、自己免疫疾患、ウイルス、細菌及び寄生虫感染、悪性腫瘍、並びに／又は神経変性疾患に関与しており、慢性関節リウマチ及びクローン病等の疾患における特異的生物療法のための有用な標的である。抗ＴＮＦ抗体等のＴＮＦ阻害剤は、重要なクラスの治療剤である。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、治療の最適化及び／又は抗ＴＮＦ治療抗体等の抗ＴＮＦ薬に対する治療有効性のモニタリングを行うことによって、ＴＮＦによって媒介される疾患又は障害を有する患者の治療管理を有利に改善する。

【００１０】

20

[0010]したがって、一態様では、本発明は、治療レジメンを受けている炎症性腸疾患（ＩＢＤ）と診断された個体における粘膜治癒を測定するための非侵襲的方法であって、

（ａ）個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、  
（ｂ）個体中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを、対照のレベルと比較して、個体の粘膜治癒指数を計算するステップであり、粘膜治癒指数が粘膜治癒の程度の表示を含むステップと、

（ｃ）粘膜治癒を起こしている個体が治療レジメンを維持すべきであるかどうかを決定するステップと  
を含む、方法を提供する。

【００１１】

30

[0011]したがって、一態様では、本発明は、治療を受けているＩＢＤを有する個体における治療効果をモニターする方法であって、

（ａ）治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、

（ｂ）ステップ（ａ）において決定された１つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、

（ｃ）個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

（ｄ）治療が粘膜治癒を促進するために個体にとって適切であるかどうかを決定するステップと  
を含む、方法を提供する。

【００１２】

40

[0012]別の態様では、本発明は、ＩＢＤを有する個体のための治療レジメンを選択するための方法であって、

（ａ）個体が治療抗体を受けている治療過程にわたる複数の時点で、個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、

（ｂ）ステップ（ａ）において決定された１つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、

（ｃ）個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

（ｄ）個体のための適切な治療レジメンを選択するステップであり、治療レジメンが粘膜治癒を促進する、ステップと  
を含む、方法を提供する。

【００１３】

50

[0013]したがって、別の態様では、本発明は、治療レジメンを施されるIBDと診断された個体における外科手術のリスクを低減又は最小化する方法であって、

(a) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

(b) 経時的なそれぞれのマーカーの存在及び/又は濃度レベルの表示を含む個体の粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c) 個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

(d) 適切な治療レジメンを選択して、外科手術のリスクを低減又は最小化するステップと

を含む、方法を提供する。

10

#### 【0014】

[0014]したがって、別の態様では、本発明は、IBDと診断された個体における粘膜治癒を促進するための治療レジメンを選択する方法であって、

(a) 時点 $t_0$ で粘膜治癒マーカーのパネルのレベルを測定して、 $t_0$ での粘膜治癒指数を生成するステップと、

(b) 時点 $t_1$ で粘膜治癒マーカーのパネルのレベルを測定して、 $t_1$ での粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c)  $t_0$ から $t_1$ までの粘膜治癒指数の変化を比較するステップと、

(d) 個体のための治療レジメンを選択して、粘膜治癒を促進するステップとを含む、方法を提供する。

20

#### 【0015】

[0015]したがって、一態様では、本発明は、抗TNF治療レジメンを受けているクローン病と診断された個体における粘膜治癒を測定するための非侵襲的方法であって、

(a) 個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、

(b) 個体中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを対照のレベルと比較して個体の粘膜治癒指数を計算するステップであり、粘膜治癒指数が粘膜治癒の程度の表示を含む、ステップと、

(c) 粘膜治癒を起こしている個体が抗TNF治療レジメンを維持すべきであるかどうかを決定するステップと

を含む、方法を提供する。

30

#### 【0016】

[0016]したがって、別の態様では、本発明は、抗TNF療法を受けているクローン病を有する個体における治療有効性をモニターする方法であって、

(a) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、

(b) ステップ(a)において決定された1つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c) 個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

(d) 抗TNF療法が粘膜治癒を促進するために個体にとって適切であるかどうかを決定するステップと

を含む、方法を提供する。

40

#### 【0017】

[0017]したがって、別の態様では、本発明は、クローン病を有する個体における抗TNF治療レジメンを選択するための方法であって、

(a) 個体が治療抗体を受けている治療過程にわたる複数の時点で個体からの試料中の粘膜治癒マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、

(b) ステップ(a)において決定された1つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c) 個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

(d) 個体のための適切な抗TNF治療レジメンを選択するステップであり、抗TNF

50



療法が粘膜治癒を促進する、ステップとを含む、方法を提供する。

【0018】

[0018]したがって、別の態様では、本発明は、抗TNF抗体治療レジメンを施されるクローン病と診断された個体における外科手術のリスクを低減又は最小化する方法であって、

(a) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

(b) 経時的なそれぞれのマーカーの存在及び/又は濃度レベルの表示を含む個体の粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c) 個体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

(d) 適切な抗TNF抗体治療レジメンを選択して、外科手術のリスクを低減又は最小化するステップと

を含む、方法を提供する。

【0019】

[0019]したがって、別の態様では、本発明は、クローン病と診断された個体における粘膜治癒を促進するための抗TNF抗体治療レジメンを選択する方法であって、

(a) 時点 $t_0$ で粘膜治癒マーカーのパネルのレベルを測定して、 $t_0$ での粘膜治癒指数を生成するステップと、

(b) 時点 $t_1$ で粘膜治癒マーカーのパネルのレベルを測定して、 $t_1$ での粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c)  $t_0$ から $t_1$ までの粘膜治癒指数の変化を比較するステップと、

(d) 個体のための抗TNF抗体治療レジメンを選択して、粘膜治癒を促進するステップと

を含む、方法を提供する。

【0020】

[0020]いくつかの実施形態では、疾患は胃腸疾患又は自己免疫疾患である。特定の場合では、被験体はクローン病(CD)又は慢性関節リウマチ(RA)を有する。他の実施形態では、治療抗体は、抗TNF抗体である。いくつかの実施形態では、抗TNF抗体は、レミケード(REMICADE)(商標)(インフリキシマブ)、エンブレル(ENBREL)(商標)(エタネルセプト)、ヒュミラ(HUMIRA)(商標)(アダリムマブ)、シムジア(CIMZIA)(登録商標)(セルトリズマブペゴール)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

【0021】

[0021]いくつかの実施形態では、マーカーのアレイは、粘膜治癒マーカーを含む。いくつかの実施形態では、粘膜マーカーは、AREG、EREG、HB-EGF、HGF、NRG1、NRG2、NRG3、NRG4、BTC、EGF、IGF、TGF- $\alpha$ 、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、FGF1、FGF2、FGF7、FGF9、TWEAK及びそれらの組合せを含む。

【0022】

[0022]他の実施形態では、マーカーのアレイは、抗TNF抗体、抗薬物抗体(ADA)、炎症マーカー、抗炎症マーカー、組織修復マーカー(例えば、増殖因子)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーをさらに含む。特定の場合では、抗TNF抗体は、レミケード(商標)(インフリキシマブ)、エンブレル(商標)(エタネルセプト)、ヒュミラ(商標)(アダリムマブ)、シムジア(登録商標)(セルトリズマブペゴール)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。他の特定の場合では、抗薬物抗体(ADA)は、ヒト抗キメラ抗体(HACA)、ヒト抗ヒト化抗体(HAHA)、ヒト抗マウス抗体(HAMA)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。さらに他の場合では、炎症マーカーは、GM-CSF、IFN-

10

20

30

40

50

、IL - 1、IL - 2、IL - 6、IL - 8、TNF - 、sTNF RII、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。さらなる場合では、抗炎症マーカーは、IL - 12 p70、IL - 10、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。

【0023】

[0023] 特定の実施形態では、アレイは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50以上のマーカーを含む。いくつかの実施形態では、マーカーは、血清、血漿、全血、糞便、末梢血単核細胞(PBMC)、多形核(PMN)細胞、及び組織生検(例えば、胃腸管又は滑液組織の一部等の炎症部位に由来する)からなる群から選択される生物試料中で測定される。

10

【0024】

[0024] 特定の実施形態では、複数の時点は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50以上の時点を含む。いくつかの場合では、複数の時点における最初の時点は、治療抗体を用いる治療過程の前である。他の場合では、複数の時点における最初の時点は、治療抗体を用いる治療過程の間である。非限定的な例として、それぞれのマーカーを、治療抗体を用いる治療の前及び/又は1つ若しくは複数の(例えば、複数の)の下記週数: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、80、90、100週等の治療過程の間に測定することができる。

20

【0025】

[0025] いくつかの実施形態では、適切な治療の選択は、被験体のための治療過程のその後の用量を維持する、増加させる、又は減少させるステップを含む。他の実施形態では、前記方法は、被験体のための異なる治療過程を決定するステップをさらに含む。特定の場合では、異なる治療過程は、異なる抗TNF抗体を用いる処置を含む。他の場合では、異なる治療過程は、限定されるものではないが、抗TNF療法、免疫抑制剤、コルチコステロイド、異なる機構を標的とする薬物、栄養療法及び他の組合せ処置等の別の治療剤と共に、現在の治療過程を含む。

30

【0026】

[0026] いくつかの実施形態では、好適な治療の選択は、初期処置のための適切な治療を選択するステップを含む。いくつかの場合では、治療は抗TNF抗体治療を含む。

【0027】

[0027] 特定の実施形態では、本明細書に開示される方法は、提唱される新規薬物を「バイオシミラー」治療剤として用いることができるように、提唱される新規薬物又は治療剤が認可された製剤と同じであるか、又は十分に類似することの確認として用いることができる。例えば、提唱される新規薬物が商標を有する製剤と比較してわずかに異なる疾患活動性プロファイルしか有さない場合、これは本明細書に開示される方法を用いて明らかとなるであろう。提唱される新規薬物が商標を有する製剤と比較して有意に異なる疾患活動性プロファイルを有する場合、新規薬物はバイオシミラーではないであろう。本明細書で開示される方法を提唱される新規薬物の臨床試験において用いて、薬物の有効な治療有効性又は価値を評価することができることが有利である。

40

【0028】

[0028] したがって、いくつかの態様では、本発明の方法は、例えば、初期処置のための適切な抗TNF療法を選択すること、抗TNF薬のその後の用量をいつ、若しくはどのように調整若しくは改変する(例えば、増加させるか、若しくは減少させる)かを決定すること、抗TNF薬(例えば、初期用量、増加した用量、減少した用量、若しくは同じ用量の)と、メトトレキサート(MTX)若しくはアザチオプリン(AZA)等の1つ若しく

50

は複数の免疫抑制剤とをいつ、若しくはどのように組み合わせるかを決定すること、及び／又は現在の治療過程をいつ、若しくはどのように変化させる（例えば、異なる抗TNF薬又はIL-6受容体阻害モノクローナル抗体、抗インテグリン分子（例えば、タイサブリ（Ty s a b r i）、ベダルザマブ（V e d a l u z a m a b））、JAK-2阻害剤、及びチロシンキナーゼ阻害剤等の異なる機構を標的とする薬物、又は栄養療法（例えば、特殊炭水化物食）に切り替える）かを決定することにより、抗TNF薬物療法を受けているか、又は受けようとしている患者の処置決定をガイドするのに有用な情報を提供する。

【0029】

[0029]他の実施形態では、本発明の方法を用いて、自己免疫障害（例えば、慢性関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎等）を有する被験体におけるTNF阻害剤、特に、抗TNF抗体に対する応答性を予測することができる。この方法においては、抗TNF抗体の正確な、又は治療用量、すなわち、治療濃度レベルについて被験体をアッセイすることにより、個体が治療に対して応答するかどうかを予測することができる。

10

【0030】

[0030]別の実施形態では、本発明は、IBD障害を有する被験体においてIBD（例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎）をモニターする方法であって、抗TNF抗体の正確な、又は治療用量、すなわち、治療濃度レベルについて経時的に被験体をアッセイするステップを含む、方法を提供する。この様式で、個体が所与の期間にわたって治療に応答するかどうかを予測することができる。

20

【0031】

[0031]本発明の他の課題、特徴、及び利点は、以下の詳細な説明及び図面から当業者には明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】[0032]実施例1に記載の個別化されたIBD活動性プロファイルを示す図である。

【図2A-1】[0033]処置時間の関数としての様々な患者のインフリキシマブ濃度を示す図である。

【図2A-2】[0033]処置時間の関数としての様々な患者のインフリキシマブ濃度を示す図である。

30

【図2B-1】[0033]注記された事象（インフリキシマブが閾値濃度より下に低下する）と共に処置過程にわたる患者のランクを示す図である。

【図2B-2】[0033]注記された事象（インフリキシマブが閾値濃度より下に低下する）と共に処置過程にわたる患者のランクを示す図である。

【図2B-3】[0033]注記された事象（インフリキシマブが閾値濃度より下に低下する）と共に処置過程にわたる患者のランクを示す図である。

【図3A-1】[0034]処置時間の関数としての様々な患者のHACA（ATI）濃度を示す図である。

【図3A-2】[0034]処置時間の関数としての様々な患者のHACA（ATI）濃度を示す図である。

40

【図3B-1】[0034]注記された事象（HACA検出又は出現）と共に処置過程にわたる患者のランクを示す図である。

【図3B-2】[0034]注記された事象（HACA検出又は出現）と共に処置過程にわたる患者のランクを示す図である。

【図3B-3】[0034]注記された事象（HACA検出又は出現）と共に処置過程にわたる患者のランクを示す図である。

【図4】[0035]図4Aは、患者試料中のATIの存在とIFXのレベルとの関係を示す図である。検出可能なレベルのATIを含まない試料は、検出可能なATIを含む試料と比較して、有意により高いIFX中央濃度を有する。図4Bは、ATIの存在がより高いC

50

D A I と相関することを示す図である。図 4 C は、同時的免疫抑制療法（例えば、M T X）が A T I の存在を抑制する可能性がより高いことを示す図である。

【図 5】[0036]図 5 A は、A T I を有する患者が処置に対する弱い応答を生じる可能性がより高いことを示す図である。図 5 B は、炎症マーカー C R P が A T I レベルの増加と関連することを示す図である。

【図 6】[0037]1 つ又は複数の炎症及び組織修復マーカーのアレイのタンパク質レベルが I F X に対する抗体の形成と相関することを示す図である。

【図 7】[0038]図 7 A は、炎症マーカーのアレイを用いて、A T I の存在及び / 又は疾患進行と相関する炎症指数を確立することができることを示す図である。図 7 B は、A T I が存在する試料中の P I I 濃度と I F X 濃度との関係を示す図である。図 7 C は、例示的な P R O 炎症指数が、C O M M I T 試験の患者試料中の I F X のレベルと相関する（ $p < 0.0001$  及び  $R^2 = -0.129$ ）ことを示す図である。

【図 8】[0039]図 8 A は、臨床研究番号 1 における、数人の患者のクローン病活動性指数（C D A I）スコアと、血清中のインフリキシマブ濃度との相関を示す図である。図 8 B は、試料中の I F X の存在がより高い C D A I と相関したことを示す図である。

【図 9】[0040]図 9 A は、分析した試料中の I F X 濃度と、インフリキシマブに対する抗薬物抗体の存在との関係を示す図である。図 9 B は、高濃度の A T I が中和抗体及び検出不可能なレベルの I F X を誘導し得ることを示す図である。図 9 C は、初期の時点で決定された A T I 陽性試料が、A T I 陰性試料からのより低い C D A I レベルと比較して、より後の時点でより高い C D A I を誘導することを示す図である。「V 1」= 訪問 1；「V 3」= 訪問 3 である。図 9 D は、臨床研究番号 1 において、患者がインフリキシマブと免疫抑制剤（例えば、M T X 及び A Z A）との組合せ療法を受けている場合、A T I を生じる確率がより低いことを示す図である。

【図 10】[0041]図 10 A は、臨床研究番号 2 A の試料中の I F X 濃度と、A T I の存在との相関を示す図である。図 10 B は、前記研究における I S A 治療と A T I の存在との関係を示す図である。図 10 C は、C R P 濃度と A T I の存在（A T I 及び / 又は中和 A T I）との関係を示す図である。図 10 D は、前記研究における I F X 治療に対する応答性の喪失と A T I の存在との関係を示す図である。

【図 11 - 1】[0042]A T I 及び中和抗体のレベルを、様々な患者からの一連の試料中で経時的に決定することができることを示す図である。

【図 11 - 2】[0042]A T I 及び中和抗体のレベルを、様々な患者からの一連の試料中で経時的に決定することができることを示す図である。

【図 12】[0043]図 12 A は、C R P レベルと I F X の存在との比較を示す図である。図 12 B は、A T I の存在と注入反応との関係を示す図である。図 12 C は、臨床研究番号 2 B における I F X 濃度と A T I の存在との関係を示す図である。図 12 D は、特定の所与の日付での A T I の存在と I S A 治療の離脱との相関を示す図である。

【図 13】[0044]図 13 A は、A T I と炎症マーカー C R P との関係を示す図である。本発明者らの分析によって、I F X に対する応答の喪失を経験する確率は、任意の時点で A T I 陽性であると決定された患者においてより高いことが示された。図 13 B は、任意の時点での A T I の存在と、I F X 処置に対する応答性との相関を示す図である。図 13 C は、応答の喪失が C R P の増加と関連し得ることを示す。図 13 D は、I F X の存在と C R P レベルとの関連を示す図である。

【図 14】[0045]図 14 A は、臨床研究番号 2 C において、より低い I F X レベルが A T I の存在と関連することを示す図である。図 14 B は、臨床研究番号 3 において、より低い I F X レベルが A T I の存在と関連することを示す図である。図 14 C は、I F X レベルと A T I との同じ相関が、試験データ、フォローアップ試験及び薬物動態試験にも存在していたことを示す図である。

【図 15】[0046]図 15 A は、A T I レベルと I F X との関係を示す図である。高濃度の A T I を含む試料が I F X に対して中和的であることが決定され、かくして、I F X 濃度は  $0 \mu\text{g}/\text{ml}$  であると決定された。図 15 B は、患者試料中の A D L 濃度と A T A の存

10

20

30

40

50

在との関連を示す図である。

【図 1 6】[0047]図 1 6 A は、例示的な P R O 炎症指数の詳細を説明する図である。図 1 6 B は、A D L のみ、又は他の薬物と組み合わせた A D L を含む試料のアレイにおいて、P I I と A D L 濃度との間には明らかな関係が存在しないことを示す図である。

【図 1 7】[0048]ヒュミラ並びにレミケード、シムジア、アザチオプリン及びメトトレキサート等の他の薬物と組み合わせたヒュミラを受けている患者の P I I スコアのプロットを示す図である。

【図 1 8】[0049]C D 及び / 又は U C の改善された患者管理のための方法の詳細を示す図である。

【図 1 9】[0050]異なる細胞型、細胞機構及び疾患（例えば、クローン病（C D）、慢性関節リウマチ（R A）及び乾癬（P s））に対する T N F - 経路及び関連経路の効果を示す図である。

【図 2 0】[0051]例示的な C E E R 多重増殖因子アレイを示す図である。

【図 2 1 A】[0052]C E E R 増殖因子アレイを用いる患者試料の多重化増殖因子プロファイリングを示す図である。

【図 2 1 B】[0052]C E E R 増殖因子アレイを用いる患者試料の多重化増殖因子プロファイリングを示す図である。

【図 2 1 C】[0052]C E E R 増殖因子アレイを用いる患者試料の多重化増殖因子プロファイリングを示す図である。

【図 2 1 D】[0052]C E E R 増殖因子アレイを用いる患者試料の多重化増殖因子プロファイリングを示す図である。

【図 2 1 E】[0052]C E E R 増殖因子アレイを用いる患者試料の多重化増殖因子プロファイリングを示す図である。

【図 2 1 F】[0052]C E E R 増殖因子アレイを用いる患者試料の多重化増殖因子プロファイリングを示す図である。

【図 2 1 G】[0052]C E E R 増殖因子アレイを用いる患者試料の多重化増殖因子プロファイリングを示す図である。

【図 2 2】[0053]疾患寛解の決定における C R P レベルと増殖因子指数スコアとの関連を示す図である。

【図 2 3】[0054]軽度、中程度、又は重篤な疾患活動性を有する I B D 患者のための個別患者処置の開発を援助する本発明の実施形態を示す図である。

【図 2 4】[0055]患者処置を個別化するための処置パラダイムを示す図である。疾患負荷及び粘膜治癒のモニタリングは、処置選択、用量選択、及び初期薬物応答の決定を援助することができる。

【図 2 5】[0056]C R P 及び I F X トラフ閾値の R O C 分析を示す図である。

【図 2 6】[0057]連続的時点での C R P、血清 I F X 濃度及び A T I の関係を示す図である。図 2 6 A は、対になった最初のデータ点における I F X 及び A T I の存在並びにその後の測定における C R P を示す。図 2 6 B は、試料における、C R P レベル、I F X 血清濃度及び連続的時点での A T I の状態を示す。この試料においては、C R P レベルは、患者が A T I - であり、閾値よりも高い血清 I F X 濃度を有する場合に最も低い。

【図 2 7】[0058]A T I + 患者における閾値よりも高い I F X レベルと C R P とには関連がないことを示す図である。しかし、A T I - 患者においては、C R P レベルは、閾値よりも低い I F X レベル（ $3 \mu\text{g} / \text{ml}$ ）を有する患者において有意に高かった。

【0033】

[発明の詳細な説明]

I . はじめに

[0059]本発明は、I B D、C D 及び / 又は U C を有する患者における粘膜治癒を測定するための方法を提供する。特に、本発明は、マーカーが腸組織修復、及び疾患の消散又は寛解を示す粘膜治癒マーカーを測定する方法を提供する。

【0034】

10

20

30

40

50

[0060]本発明は、IBD（例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎）を有する患者における粘膜治癒のモニタリングと関連する現在の制限に取り組み、これを克服するので、有利である。本発明は、抗TNF療法を受けている粘膜治癒患者をモニターするための非侵襲的方法を提供する。さらに、本発明は、IBD（例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎）を有する患者における治療応答、再発のリスク、及び外科手術のリスクを予測する方法を提供する。特に、本発明の方法は、初期処置のための適切な抗TNF療法の選択、治療有効性の最適化及び／若しくは毒性の低減のために抗TNF薬のその後の用量をいつ、若しくはどのように調整若しくは改変する（例えば、増加させるか、若しくは減少させる）かの決定、抗TNF薬（例えば、初期用量、増加した用量、減少した用量、若しくは同じ用量）と、メトトレキサート（MTX）若しくはアザチオプリン（AZA）等の1つ若しくは複数の免疫抑制剤とをいつ、若しくはどのように組み合わせるかの決定、並びに／又は現在の治療過程をいつ、若しくはどのように変化させる（例えば、異なる抗TNF薬若しくは異なる機構を標的とする薬物に切り替える）かの決定にとって有用である。本発明はまた、治療が粘膜治癒を促進する、CDと診断された患者のための適切な治療を選択するための方法も提供する。

10

#### 【0035】

##### II. 定義

[0061]本明細書で用いられる以下の用語は、別途特定しない限り、それらに帰する意味を有する。

20

#### 【0036】

[0062]語句「粘膜治癒指数」は、複数の粘膜治癒マーカーの分析に基づく経験的に誘導された指数を含む。一態様では、マーカーの濃度又はそれらの測定された濃度値は、コンピュータ内にあるアルゴリズムによって指数に変換される。特定の態様では、指数は合成若しくはヒトによって誘導された出力、スコア、又はカットオフ値（複数可）であり、生物学的データを数字で表すものである。前記指数を用いて、臨床決定を決定するか、又は行うか、又は行うのを援助することができる。粘膜治癒指数を、経時的に複数の時点で測定することができる。一態様では、アルゴリズムを既知の試料を用いて訓練した後、既知の同一性の試料を用いて実証することができる。

#### 【0037】

[0063]語句「粘膜治癒指数対照」は、健康な（健常な）個体、又は疾患状態から健康状態に進行した個体から誘導された粘膜治癒指数を含む。或いは、対照は、より重い疾患状態から、より軽い疾患状態又は健康な状態への時間経過を表す指数であってもよい。

30

#### 【0038】

[0064]語句「治療過程の決定」等は、例えば、薬物の用量の選択、適切な薬物、又は治療の過程若しくは長さ、治療レジメンの選択、又は存在する薬物若しくは用量の維持管理のために選択する経験的に誘導された指数、スコア又は分析の使用を含む。特定の態様では、誘導されたか、又は測定された指数を用いて、治療過程を決定することができる。

#### 【0039】

[0065]本明細書で用いられる用語「TNF阻害剤」、「TNF-阻害剤」及び「TNF阻害剤」は、被験体においてTNF-と、TNF-のための細胞表面受容体との相互作用を阻害すること、TNF-タンパク質生成を阻害すること、TNF-遺伝子発現を阻害すること、細胞からのTNF分泌を阻害すること、TNF-受容体シグナル伝達を阻害すること、又はTNF-活性の減少をもたらす任意の他の手段等により、TNF活性を直接又は間接に阻害する、タンパク質、抗体、抗体断片、融合タンパク質（例えば、Ig融合タンパク質若しくはFc融合タンパク質）、多価結合タンパク質（例えば、DVD Ig）、小分子TNF-アンタゴニスト及び類似する天然若しくは非天然分子、並びに／又はその組換え及び／若しくは遺伝子操作形態を含む薬剤を包含することが意図される。用語「TNF阻害剤」は、TNF-活性を妨害する薬剤を含むことが好ましい。TNF-阻害剤の例としては、エタネルセプト（エンブレル（商標）、Amgen）、インフリキシマブ（レミケード（商標）、Johnson and Joh

40

50

nson)、ヒト抗TNFモノクローナル抗体アダリムマブ(D2E7/ヒュミラ(商標)、Abbott Laboratories)、CDP571(Celltech)、及びCDP870(Celltech)、並びにTNF-活性が有害である障害(例えば、RA)に罹患しているか、又は罹患するリスクがある被験体に投与された場合にその障害が処置されるように、TNF-活性を阻害する他の化合物が挙げられる。

#### 【0040】

[0066]本明細書で用いられる用語「TNF阻害剤に対する応答性の予測」は、TNF阻害剤を用いる被験体の処置がその被験体において有効である(例えば、測定可能な利益を提供する)か、又はそうではない可能性を評価する能力を指すことが意図される。特に、処置が有効であるか、又はそうではない可能性を評価するそのような能力は、典型的には、処置が始まった後に行使され、有効性の指示因子(例えば、測定可能な利益の指示因子)は被験体において観察されている。特に好ましいTNF阻害剤は、慢性関節リウマチの処置においてヒトにおける使用のためにFDAによって認可された生物薬剤であり、それらの薬剤としては、アダリムマブ(ヒュミラ(商標))、インフリキシマブ(レミケード(商標))及びエタネルセプト(エンブレル(商標))が挙げられ、アダリムマブ(ヒュミラ(商標))が最も好ましい。

10

#### 【0041】

[0067]用語「治療過程」は、TNF媒介性疾患又は障害と関連する1つ又は複数の症状を軽減するか、又は防止するために取られる任意の治療手法を含む。この用語は、TNF-媒介性疾患又は障害を有する個体の健康を改善するのに有用な任意の化合物、薬物、手順、及び/又はレジメンを施すことを包含し、本明細書に記載の任意の治療剤を含む。当業者であれば、治療過程又は現在の治療過程の用量を、本発明の方法を用いて、TNF、抗TNF薬、及び/又は抗薬物抗体の存在又は濃度レベルに基づいて変化させる(例えば、増加させるか、又は減少させる)ことができることを理解するであろう。

20

#### 【0042】

[0068]用語「免疫抑制剤」は、照射によるか、又は代謝拮抗物質、抗リンパ球血清、抗体等の薬物の投与によって、免疫抑制効果、例えば、免疫応答の防止又は縮小をもたらすことができる任意の物質を含む。好適な免疫抑制剤の例としては、限定されるものではないが、アザチオプリン(AZA)及びその代謝物等のチオプリン薬；メトトレキサート(MTX)等の代謝拮抗物質；シロリムス(ラパマイシン)；テムシロリムス；エベロリムス；タクロリムス(FK-506)；FK-778；抗リンパ球グロブリン抗体、抗胸腺細胞グロブリン抗体、抗CD3抗体、抗CD4抗体、及び抗体-毒素コンジュゲート；シクロスポリン；ミコフェノレート(mycophenolate)；ミゾリビン-リン酸；スコパロン；酢酸グラチラマー；それらの代謝物；それらの薬学的に許容される塩；それらの誘導体；それらのプロドラッグ；並びにそれらの組合せが挙げられる。

30

#### 【0043】

[0069]用語「チオプリン薬」は、アザチオプリン(AZA)、6-メルカプトプリン(6-MP)、又は治療有効性を有するそれらの任意の代謝物を含み、限定されるものではないが、6-チオグアニン(6-TG)、6-メチルメルカプトプリンリボシド、6-チオイノシンヌクレオチド(例えば、6-チオイノシン-リン酸、6-チオイノシンニリン酸、6-チオイノシン三リン酸)、6-チオグアニンヌクレオチド(例えば、6-チオグアニン-リン酸、6-チオグアニンニリン酸、6-チオグアニン三リン酸)、6-チオキサントシンヌクレオチド(例えば、6-チオキサントシン-リン酸、6-チオキサントシンニリン酸、6-チオキサントシン三リン酸)、それらの誘導体、それらの類似体、並びにそれらの組合せが挙げられる。

40

#### 【0044】

[0070]本明細書で用いられる用語「試料」は、患者から得られた任意の生物学的標本を含む。試料としては、限定されるものではないが、全血、血漿、血清、赤血球、白血球(例えば、末梢血単核細胞(PBMC)、多形核(PMN)細胞)、管洗浄液、乳頭吸引液、リンパ液(例えば、リンパ節の播種性腫瘍細胞)、骨髓吸引液、唾液、尿、糞便(すな

50

わち、糞）、痰、気管支洗浄液、涙、微細針吸引液（例えば、非選択的穿刺微細針吸引により収穫される）、任意の他の体液、炎症部位の生検（例えば、針生検）等の組織試料、及びそれらの細胞抽出物が挙げられる。いくつかの実施形態では、試料は全血又は血漿、血清、若しくは細胞ペレット等の血液の分画成分である。他の実施形態では、試料は、当技術分野で公知の任意の技術を用いて P B M C 及び / 又は P M N 細胞を単離することによって取得される。さらに他の実施形態では、試料は、例えば、胃腸管又は滑液組織の一部等の炎症部位からの組織生検である。

#### 【 0 0 4 5 】

[0071]用語「クローン病活動性指数」又は「C D A I」は、クローン病（C D）を有する患者の症状を定量化するために用いられる研究手段を含む。C D A I は、C D の応答又は寛解を定義するために一般的に用いられる。C D A I は、8つの因子からなり、それぞれ重み係数を用いた調整後に合計される。C D A I の成分及び重み係数は以下の通りである。

#### 【表 1】

臨床又は実験変数	重み係数
7日間にわたる各日での液状便又は軟便の数	x 2
7日間にわたる各日での腹痛(重篤度に関して0~3まで等級付けされる)	x 5
7日間にわたる各日での0(良い)から4(悪い)までで主観的に評価される一般健康状態	x 7
合併症の存在	x 20
下痢のためにロミチル又は鎮静剤を摂取する	x 30
腹部腫瘍の存在(0=なし、2=疑わしい、5=明確)	x 10
男性では0.47未満及び女性では0.42未満のヘマトクリット	x 6
標準体重からのパーセント偏差	x 1

#### 【 0 0 4 6 】

それぞれ 1 点が各合併症セットに加えられる：

- 関節疼痛（関節痛）若しくは明確な関節炎の存在；
- 虹彩の炎症若しくはブドウ膜炎；
- 結節性紅斑、壊疽性膿皮症、若しくはアフタ性潰瘍の存在；
- 裂肛、痔瘻若しくは膿瘍；
- 他の瘻孔；及び / 又は
- 前週の間の発熱。

#### 【 0 0 4 7 】

[0072]クローン病の寛解は、典型的には、1 5 0 点未満の C D A I への下落と定義される。重篤な疾患は、典型的には、4 5 0 点を超える値と定義される。特定の態様では、クローン病患者における特定の医薬に対する応答は、7 0 点を超える C D A I の下落と定義される。

#### 【 0 0 4 8 】

[0073]用語「粘膜傷害」又は「粘膜損傷」は、内視鏡検査の間に検出可能な、肉眼で見える腸の粘膜病変の形成、顕微鏡的組織レベルでの肉芽腫形成及び筋層の崩壊、細胞レベルでの上皮アポトーシス並びに活性化炎症細胞及びリンパ球細胞の浸潤、細胞内レベルでの上皮透過性の増加、並びに分子レベルでのギャップ結合崩壊を含む。クローン病等の I B D においては、腸上皮は炎症環境によって損傷され、難治性の潰瘍及び病変の形成をもたらす。

#### 【 0 0 4 9 】

[0074]用語「粘膜治癒」とは、以前に炎症を起こした領域の正常な粘膜の外見の回復、並びに内視鏡及び顕微鏡レベルでの潰瘍形成及び炎症の完全な非存在を指す。粘膜治癒は、粘膜、粘膜下層、及び筋層の修復及び回復を含む。それはまた、腸壁の神経エレメント及びリンパ管形成エレメントを含んでもよい。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 5 0 】

[0075]用語「栄養に基づく治療」は、ブチレート、プロバイオティクス（例えば、V S L # 3、大腸菌 N i s s l e 1 9 1 7、バチルス・ポリファーメンティクス細菌）、ビタミン、タンパク質、大分子、及び / 又は腸粘膜の増殖及び代謝回転等の粘膜治癒を促進する化学物質を含む。

## 【 0 0 5 1 】

## I I I . 実施形態の説明

[0076]本発明は、治療の最適化及び / 又は治療有効性のモニタリングを行うための疾患の個別治療管理のための方法を提供する。特に、本発明は、治療剤を用いる治療過程にわたる 1 つ又は複数の時点で 1 つ又は複数の粘膜治癒バイオマーカーのアレイを測定して、治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び / 又は治療処置の有効性のモニタリングのための粘膜治癒指数を決定するステップを含む。特定の場合では、治療剤は、T N F 媒介性疾患又は障害の処置のための T N F 阻害剤である。いくつかの実施形態では、本発明の方法は、抗 T N F 治療抗体等の抗 T N F 薬に対する治療の最適化及び / 又は治療有効性のモニタリングを行うことによって、T N F 媒介性疾患又は障害を有する患者の治療管理を有利に改善する。

10

## 【 0 0 5 2 】

[0077]したがって、一態様では、本発明は、被験体における治療を最適化するか、又は治療有効性をモニターするための疾患の個別治療管理のための方法であって、

( a ) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

20

( b ) 経時的なそれぞれのマーカーの存在及び / 又は濃度レベルの表示を含む被験体の粘膜治癒指数を生成するステップと、

( c ) 被験体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

( d ) 被験体のための適切な治療を選択し、それによって被験体における疾患の個別治療管理を達成するステップとを含む、方法を提供する。

## 【 0 0 5 3 】

[0078]したがって、別の態様では、本発明は、被験体における治療を選択するための疾患の個別治療管理のための方法であって、

30

( a ) 粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

( b ) それぞれのマーカーの存在及び / 又は濃度レベルの表示を含む被験体の粘膜治癒指数を生成するステップと、

( c ) 被験体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

( d ) 被験体のための適切な治療を選択し、それによって被験体における疾患の個別治療管理を達成するステップとを含む、方法を提供する。

## 【 0 0 5 4 】

[0079]したがって、一態様では、本発明は、被験体における治療を最適化するための方法であって、

40

( a ) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

( b ) ステップ ( a ) において決定された 1 つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、

( c ) 被験体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

( d ) 被験体のための治療過程のその後の用量又は粘膜治癒指数に基づいて異なる治療過程が被験体に施されるべきかどうかを決定するステップとを含む、方法を提供する。

## 【 0 0 5 5 】

[0080]したがって、一態様では、本発明は、被験体における治療を選択するための方法

50

であって、

(a) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

(b) ステップ(a)において決定された1つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c) 被験体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

(d) 粘膜治癒指数に基づいて被験体のための適切な治療過程を選択するステップとを含む、方法を提供する。

【0056】

[0081]したがって、別の態様では、本発明は、治療レジメン(例えば、抗TNF抗体治療レジメン)を施されるIBD(例えば、クローン病)と診断された被験体における外科手術のリスクを低減させるための方法であって、

(a) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

(b) ステップ(a)において決定された1つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c) 被験体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

(d) 治療レジメンが被験体の外科手術のリスクを低減させるかどうかを決定するステップと

を含む、方法を提供する。

【0057】

[0082]したがって、一態様では、本発明は、治療(例えば、抗TNF療法)を受けている被験体における治療効果をモニターするための方法であって、

(a) 治療抗体を用いる治療過程にわたる複数の時点で粘膜治癒マーカーのアレイを測定するステップと、

(b) ステップ(a)において決定された1つ又は複数のマーカーのレベルに統計的アルゴリズムを適用して、粘膜治癒指数を生成するステップと、

(c) 被験体の粘膜治癒指数を対照の指数と比較するステップと、

(d) 粘膜治癒指数に基づいて現在の治療過程が被験体にとって適切であるかどうかを決定するステップと

を含む、方法を提供する。

【0058】

[0083]いくつかの実施形態では、疾患は胃腸疾患又は自己免疫疾患である。特定の場合では、被験体は炎症性腸疾患(IBD、例えば、クローン病(CD)又は潰瘍性大腸炎(UC))を有する。他の場合では、被験体は慢性関節リウマチ(RA)を有する。好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

【0059】

[0084]いくつかの実施形態では、治療は、抗TNF療法、免疫抑制剤、コルチコステロイド、異なる機構を標的とする薬物、栄養療法又はそれらの組合せを含む群より選択される。特定の場合では、抗TNF療法は、TNF阻害剤(例えば、抗TNF薬、抗TNF抗体)である。

【0060】

[0085]他の実施形態では、抗TNF療法は、抗TNF抗体である。いくつかの実施形態では、抗TNF抗体は、レミケード(商標)(インフリキシマブ)、エンブレル(商標)(エタネルセプト)、ヒュミラ(商標)(アダリムマブ)、シムジア(登録商標)(セルトリズマブペゴール)、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

【0061】

[0086]いくつかの実施形態では、治療は免疫抑制剤である。免疫抑制剤の非限定的な例としては、アザチオプリン(AZA)、6-メルカプトプリン(6-MP)等のチオプリ

10

20

30

40

50

ン薬、及び／又は治療有効性を有するそれらの任意の代謝物が挙げられ、限定されるものではないが、6 - チオグアニン ( 6 - T G )、6 - メチルメルカプトプリンリボシド、6 - チオイノシンヌクレオチド ( 例えば、6 - チオイノシンーリン酸、6 - チオイノシンニリン酸、6 - チオイノシン三リン酸 )、6 - チオグアニンヌクレオチド ( 例えば、6 - チオグアノシンーリン酸、6 - チオグアノシンニリン酸、6 - チオグアノシン三リン酸 )、6 - チオキサントシンヌクレオチド ( 例えば、6 - チオキサントシンーリン酸、6 - チオキサントシンニリン酸、6 - チオキサントシン三リン酸 )、それらの誘導体、それらの類似体、及びそれらの組合せ；メトトレキサート ( M T X ) 等の代謝拮抗物質；シロリムス ( ラパマイシン )；テムシロリムス；エベロリムス；タクロリムス ( F K - 5 0 6 )；F K - 7 7 8；抗リンパ球グロブリン抗体、抗胸腺細胞グロブリン抗体、抗 C D 3 抗体、抗 C D 4 抗体、及び抗体 - 毒素コンジュゲート；シクロスポリン；ミコフェノール酸；ミゾリビンーリン酸；スコパロン；酢酸グラチラマー；それらの代謝物；それらの薬学的に許容される塩；それらの誘導体；それらのプロドラッグ；及びそれらの組合せが挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 6 2 】

[0087]他の実施形態では、治療はコルチコステロイドである。さらに他の実施形態では、治療は、異なる機構 ( 例えば、T N F 経路により媒介されない機構 ) を標的とする薬物である。異なる機構を標的とする薬物の非限定的な例としては、I L - 6 受容体阻害モノクローナル抗体、抗インテグリン分子 ( 例えば、ナタリズマブ ( タイサブリ )、ベドルザマブ )、J A K - 2 阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、及びそれらの組合せが挙げられる。

#### 【 0 0 6 3 】

[0088]他の実施形態では、治療は栄養療法である。特定の実施形態では、栄養療法は、特殊炭水化物食である。特殊炭水化物食 ( S C D ) は、クローン病及び潰瘍性大腸炎等の I B D の症状を低減させるように設計された、厳密な穀類非含有、ラクトース非含有、及びスクロース非含有の栄養レジメンである。S C D は I B D ( 例えば、クローン病又は潰瘍性大腸炎 ) を有する患者における粘膜治癒を促進及び／又は維持することができることが示されている。典型的には、S C D は、複合炭水化物の使用を制限し、食事から精製された糖、穀物及びデンプンを除去する。I B D を有する患者の微絨毛は、特定の型の複合炭水化物を破壊する能力を持たず、有害細菌の過増殖及び腸粘膜の刺激をもたらすことが記載されている。S C D は腸が粘膜治癒を起こすことを可能にするため、I B D ( 例えば、クローン病又は潰瘍性大腸炎 ) のための治療であることが推奨されている。

#### 【 0 0 6 4 】

[0089]いくつかの実施形態では、マーカーのアレイは、粘膜治癒マーカーを含む。いくつかの実施形態では、粘膜マーカーは、A R E G、E R E G、H B - E G F、H G F、N R G 1、N R G 2、N R G 3、N R G 4、B T C、E G F、I G F、T G F - 、V E G F、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、F G F 1、F G F 2、F G F 7、F G F 9、T W E A K 及びそれらの組合せを含む。

#### 【 0 0 6 5 】

[0090]他の実施形態では、マーカーのアレイは、抗 T N F 抗体、抗薬物抗体 ( A D A )、炎症マーカー、抗炎症マーカー、組織修復マーカー ( 例えば、増殖因子 )、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーをさらに含む。特定の場合では、抗 T N F 抗体は、レミケード ( 商標 ) ( インフリキシマブ )、エンブレル ( 商標 ) ( エタネルセプト )、ヒュミラ ( 商標 ) ( アダリムマブ )、シムジア ( 登録商標 ) ( セルトリズマブペゴール )、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。他の特定の場合では、抗薬物抗体 ( A D A ) は、ヒト抗キメラ抗体 ( H A C A )、ヒト抗ヒト化抗体 ( H A H A )、ヒト抗マウス抗体 ( H A M A )、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。さらに他の場合では、炎症マーカーは、G M - C S F、I F N - 、I L - 1、I L - 2、I L - 6、I L - 8、T N F - 、s T N F R I I、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。さらなる場合では、抗炎症マ-

カーは、IL - 12 p70、IL - 10、及びそれらの組合せからなる群から選択されるメンバーである。

【0066】

[0091]特定の実施形態では、アレイは、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50以上のマーカーを含む。いくつかの実施形態では、マーカーは、血清、血漿、全血、糞便、末梢血単核細胞(PBMC)、多形核(PMN)細胞、及び組織生検(例えば、胃腸管又は滑液組織の一部等の炎症部位に由来する)からなる群から選択される生物試料中で測定される。

【0067】

[0092]特定の実施形態では、複数の時点は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50以上の時点を含む。いくつかの場合では、複数の時点における最初の時点は、治療抗体を用いる治療過程の前である。他の場合では、複数の時点における最初の時点は、治療抗体を用いる治療過程の間である。非限定的な例として、それぞれのマーカーを、治療抗体を用いる治療の前及び/又は1つ若しくは複数の(例えば、複数の)の下記週数: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、80、90、100週等の治療過程の間に測定することができる。

【0068】

[0093]さらなる実施形態では、粘膜治癒を評価するか、又は測定するための方法は、試料中に存在する粘膜治癒マーカーの決定されたレベルを、指数値又はカットオフ値又は参照値又は閾値と比較することをさらに含み、その値より高いか、又は低い粘膜治癒マーカーのレベルが、被験体が粘膜治癒を起こすか、又は粘膜治癒を起こさない可能性が増加するか、又はより高いことを予測するか、又は示す。当業者であれば、前記指数値又はカットオフ値又は参照値又は閾値が、測定される対象のマーカーに応じて、mg/ml、µg/ml、ng/ml、pg/ml、fg/ml、EU/ml、又はU/ml等の単位であることを理解できる。

【0069】

[0094]いくつかの実施形態では、粘膜治癒指数は、複数の粘膜治癒マーカーの分析に基づく経験的に誘導される指数を含む。一態様では、マーカーの濃度又はその測定された濃度値は、コンピュータ内のアルゴリズムによって指数に変換される。特定の態様では、前記指数は、合成若しくはヒトによって誘導された出力、スコア、又はカットオフ値(複数可)であり、生物学的データを数字で表すものである。前記指数を用いて、臨床決定を決定するか、又は行うか、又は行うのを援助することができる。粘膜治癒指数を、経時的に複数の時点で測定することができる。一態様では、アルゴリズムを既知の試料を用いて訓練した後、既知の同一性の試料を用いて実証することができる。

【0070】

[0095]いくつかの実施形態では、粘膜治癒指数対照は、健康な個体、又は疾患状態から健康な状態に進行した個体から誘導された粘膜治癒指数である。或いは、対照は、より重い疾患状態又は健康状態から疾患への時間経過を表す指数であってもよい。

【0071】

[0096]いくつかの実施形態では、治療過程等を決定する方法は、例えば、薬物の用量の選択、適切な薬物、又は治療の過程若しくは長さ、治療レジメンの選択、又は存在する薬物若しくは用量の維持のために選択する経験的に誘導された指数、スコア又は分析の使用を含む。特定の態様では、誘導されたか、又は測定された指数を用いて、治療過程を決定することができる。

【0072】

10

20

30

40

50

[0097]いくつかの実施形態では、粘膜治癒を内視鏡検査によって評価又はモニターすることができる。内視鏡検査の非限定的な例としては、ビデオカプセル内視鏡検査（カプセル内視鏡検査）、使い捨て内視鏡検査、及び３Ｄ内視鏡検査が挙げられる。他の実施形態では、粘膜治癒指数は、内視鏡検査によってモニター又は確認される。

【 0 0 7 3 】

[0098]いくつかの実施形態では、適切な治療の選択は、被験体のための治療過程のその後の用量を維持する、増加させる、又は減少させることを含む。他の実施形態では、前記方法は、被験体のための異なる治療過程を決定することをさらに含む。特定の場合では、異なる治療過程は、異なる抗ＴＮＦ抗体を用いる処置を含む。他の場合では、異なる治療過程は、現在の治療過程と共に、限定されるものではないが、免疫抑制剤、コルチコステロイド、異なる機構を標的とする薬物、栄養療法、及びそれらの組合せ等の別の治療剤を含む。

【 0 0 7 4 】

[0099]いくつかの実施形態では、適切な治療の選択は、初期処置のための適切な治療を選択することを含む。いくつかの場合では、治療は、抗ＴＮＦ抗体治療を含む。

【 0 0 7 5 】

[0100]特定の実施形態では、本明細書に開示される方法を、提唱される新規薬物を「バイオシミラー」治療剤として用いることができるように、提唱される新規薬物又は治療剤が認可された製剤と同じであるか、又は十分に類似することの確認として用いることができる。例えば、提唱される新規薬物が商標を有する製剤と比較してわずかに異なる疾患活動性プロファイルしか有さない場合、これは本明細書に開示される方法を用いて明らかとなるであろう。提唱される新規薬物が商標を有する製剤と比較して有意に異なる疾患活動性プロファイルを有する場合、新規薬物はバイオシミラーではないであろう。本明細書で開示される方法を提唱される新規薬物の臨床試験において用いて、薬物の有効な治療価値を評価することができることが有利である。

【 0 0 7 6 】

[0101]したがって、いくつかの態様では、本発明の方法は、例えば、初期処置のための適切な抗ＴＮＦ療法を選択すること、抗ＴＮＦ薬のその後の用量をいつ、若しくはどのように調整若しくは改変する（例えば、増加させるか、若しくは減少させる）かを決定すること、抗ＴＮＦ薬（例えば、初期用量、増加した用量、減少した用量、若しくは同じ用量の）と、メトトレキサート（ＭＴＸ）若しくはアザチオプリン（ＡＺＡ）等の１つ若しくは複数の免疫抑制剤とをいつ、若しくはどのように組み合わせるかを決定すること、及び／又は現在の治療過程をいつ、若しくはどのように変化させる（例えば、異なる抗ＴＮＦ薬又はＩＬ－６受容体阻害モノクローナル抗体、抗インテグリン分子（例えば、タイサブリ、ベダルザマブ）、ＪＡＫ－２阻害剤、及びチロシンキナーゼ阻害剤等の異なる機構を標的とする薬物、又は栄養療法（例えば、特殊炭水化物食）に切り替える）かを決定することによって、抗ＴＮＦ薬物療法を受けているか、又は受けようとしている患者の処置決定をガイドするのに有用な情報を提供する。

【 0 0 7 7 】

[0102]他の実施形態では、本発明の方法を用いて、自己免疫障害（例えば、慢性関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎等）を有する被験体におけるＴＮＦ阻害剤、特に、抗ＴＮＦ抗体に対する応答性を予測することができる。この方法においては、抗ＴＮＦ抗体の正確な、又は治療用量、すなわち、治療濃度レベルについて被験体をアッセイすることによって、個体が治療に対して応答するかどうかを予測することができる。

【 0 0 7 8 】

[0103]別の実施形態では、本発明は、抗ＴＮＦ抗体の正確な、又は治療用量、すなわち、治療濃度レベルについて経時的に被験体をアッセイするステップを含む、ＩＢＤ障害を有する被験体においてＩＢＤ（例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎）をモニターする方法を提供する。この様式で、個体が所与の期間にわたって治療に応答するかどうかを予測することができる。

10

20

30

40

50

## 【0079】

[0104] 特定の実施形態では、ステップ (a) は、試料中の少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50 以上のマーカーの存在及び / 又はレベルを決定するステップを含む。

## 【0080】

[0105] 他の実施形態では、前記アルゴリズムは、学習統計分類子システムを含む。いくつかの場合では、学習統計分類子システムは、ランダムフォレスト、分類ツリー及び回帰ツリー、増幅ツリー (boosted tree)、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、一般カイ二乗自動相互作用検出モデル、相互作用ツリー、多変量回帰スプライン、マシン学習分類子、並びにそれらの組合せからなる群から選択される。特定の場合では、統計的アルゴリズムは、単一の学習統計分類子システムを含む。特定の場合では、統計的アルゴリズムは、少なくとも 2 つの学習統計分類子システムの組合せを含む。いくつかの場合では、少なくとも 2 つの学習統計分類子システムは、直列に適用される。本発明における使用にとって好適な統計的アルゴリズム及び分析の非限定的な例は、2011 年 10 月 18 日に出版された国際出願 PCT/US2011/056777 に記載されており、その開示はあらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

## 【0081】

[0106] 他の実施形態では、ステップ (b) は、治療過程の間のより早い時間に決定された 1 つ又は複数の粘膜治癒マーカーの存在及び / 又はレベルに統計的アルゴリズムを適用して、より早期の粘膜治癒指数を生成するステップをさらに含む。いくつかの場合では、より早期の粘膜治癒指数を、ステップ (b) において生成された粘膜治癒指数と比較して、治療過程のその後の用量を決定するか、又は異なる治療過程が施されるべきかどうかを決定する。特定の実施形態では、治療過程のその後の用量を、ステップ (b) において生成された粘膜治癒指数に基づいて増加させる、減少させる、又は維持する。いくつかの場合では、異なる治療過程は、異なる抗 TNF 抗体を含む。他の場合では、異なる治療過程は、現在の治療過程と共に、免疫抑制剤を含む。

20

## 【0082】

[0107] いくつかの実施形態では、ステップ (b) は、より早い時間に決定された 1 つ又は複数の粘膜治癒マーカーの存在及び / 又はレベルに統計的アルゴリズムを適用して、より早期の疾患活動性 / 重篤度指数を生成するステップをさらに含む。特定の場合では、粘膜治癒指数を、ステップ (b) において生成された粘膜治癒指数と比較して、TNF 媒介性疾患又は障害の経過を予測する。

30

## 【0083】

[0108] いくつかの実施形態では、前記方法は、ステップ (d) の選択又は決定からの結果を医師に送信するステップをさらに含む。他の実施形態では、ステップ (d) は、被験体のための初期治療過程を選択するステップを含む。

## 【0084】

[0109] 一度、本明細書に記載の方法に従って、抗 TNF 薬物療法を受ける被験体の診断若しくは予後が決定されたか、又は TNF が病態生理、例えば、限定されるものではないが、ショック、敗血症、感染、自己免疫疾患、RA、クローン病、移植片拒絶及び移植片対宿主疾患に関与する疾患及び傷害と診断された被験体において抗 TNF 薬に応答する可能性が予測されたら、本発明は、診断、予後、又は予測に基づいて治療過程を推奨するステップをさらに含んでもよい。特定の場合では、本発明は、TNF 媒介性疾患又は障害と関連する 1 つ又は複数の症状を処置するのに有用な抗 TNF 薬の治療上有効量を被験体に投与するステップをさらに含んでもよい。治療適用のために、抗 TNF 薬を単独で投与するか、又は 1 つ若しくは複数のさらなる抗 TNF 薬及び / 若しくは抗 TNF 薬と関連する副作用を低減する 1 つ若しくは複数の薬物 (例えば、免疫抑制剤) と組み合わせて同時投与することができる。したがって、本発明によって、正しい薬物が正しい時間に正しい患者に与えられるように、処置決定をガイドし、抗 TNF 薬について治療選択及び最適

40

50

化を通知することによって、医師が「個別医療」を有利に実施することができる。

【0085】

[0110]本発明は、部分的には、抗TNF薬物療法を受けているか、又は受けようとする患者のための処置決定をガイドするのに有用な情報を提供することによって、インフリキシマブ等の抗TNF薬の投与に伴う現在の制限に取り組み、これを克服するので、有利である。特に、本発明の方法は、初期処置のための適切な抗TNF療法の選択、治療有効性の最適化及び/若しくは毒性の低減のために抗TNF薬のその後の用量をいつ、若しくはどのように調整若しくは改変する(例えば、増加させるか、若しくは減少させる)かの決定、抗TNF薬(例えば、初期用量、増加した用量、減少した用量、若しくは同じ用量)と、メトトレキサート(MTX)若しくはアザチオプリン(AZA)等の1つ若しくは複数の免疫抑制剤とをいつ、若しくはどのように組み合わせるかの決定、並びに/又は現在の治療過程をいつ、若しくはどのように変化させる(例えば、異なる抗TNF薬若しくは異なる機構を標的とする薬物に切り替える)かの決定にとって有用である。

10

【0086】

[0111]したがって、本発明は、処置決定をガイドすることにより患者管理を改善する下記方法:

1. クローン病予後診断: 治療から利益を得る可能性が最も高い患者を処置する
  2. 抗治療抗体モニタリング(ATM) + バイオマーカーに基づく疾患活動性プロファイリング
  3. ATM二段層化
  4. 薬物動態モデリングを用いるATM
  5. 応答をモニターし、再発のリスクを予測する:
    - a. 再発のリスクが低い患者において慢性維持療法を回避する
    - b. 粘膜治癒のマーカー
    - c. 治療選択: 抗TNF薬物療法と、MTX又はAZA等の免疫抑制剤とを組み合わせるか、又は組み合わせないかどうか
  6. 生物製剤のための患者選択
- において特に有用である。

20

【0087】

[0112]いくつかの実施形態では、本発明は、個体に関するクローン病管理のための炎症指数を測定して、治療を最適化し、抗TNF治療剤に対する応答を予測するための方法であって、

30

- (a) 個体からの試料中の抗TNF治療剤及び自己抗体をクロマトグラフィーにより測定して、それらの濃度レベルを決定するステップと、
  - (b) 個体からの試料中の抗TNF治療剤及び自己抗体をクロマトグラフィーにより測定して、それらの濃度レベルを決定するステップと、
  - (c) 測定された値を、有効性スケールと比較して、治療を最適化し、抗TNF治療剤に対する応答を予測するステップと
- を含む、方法を提供する。

40

【0088】

[0113]いくつかの実施形態では、本発明は、処置過程の間に抗TNF治療剤の濃度が閾値より下落する可能性を予測するための方法であって、

- (a) 1) GM-CSF; 2) IL-2; 3) TNF- $\alpha$ ; 4) sTNFR II; 及び
  - 5) 小腸にある疾患からなる群から選択されるマーカーのパネルを測定するステップと、
  - (b) 抗TNF治療剤の濃度が、マーカーの濃度に基づいて、閾値より下落する可能性を予測するステップと
- を含む、方法を提供する。

【0089】

[0114]例示のみを目的として、実施例5は、本発明の例示的な実施形態、特に、抗TNF処置の濃度が閾値より下落する可能性を予測する方法を示す。

50

## 【0090】

[0115]いくつかの実施形態では、本発明は、処置過程の間に抗TNF治療剤の濃度が閾値より下落する可能性を予測するための方法であって、

(a) 1) GM-CSF; 2) IL-2; 3) TNF- $\alpha$ ; 4) sTNFR II; 及び 5) 小腸にある疾患からなる群から選択されるマーカーのパネルを測定するステップと、

(b) 抗TNF治療剤の濃度が、マーカーの濃度に基づいて、閾値より下落する可能性を予測するステップとを含む、方法を提供する。

## 【0091】

[0116]他の実施形態では、本発明は、抗薬物抗体が抗TNF療法に対して個体中に生じる可能性を予測するための方法であって、

(a) tEGF、VEGF、IL-8、CRP及びVCAM-1からなる群から選択されるマーカーのパネルを測定するステップと、

(b) マーカーレベルの濃度に基づいて、抗薬物抗体が抗TNF療法に対して個体中に生じる可能性を予測するステップとを含む、方法を提供する。

## 【0092】

[0117]例示のみを目的として、実施例4は、本発明の例示的な実施形態であり、インフリキシマブに対する抗薬物抗体(ATI)の検出を証明する。

## 【0093】

[0118]他の実施形態では、本発明は、インフリキシマブ処置レジメンをモニターする方法であって、

(a) インフリキシマブ及びインフリキシマブに対する抗薬物抗体(ATI)を測定するステップと、

(b) 炎症マーカーCRP、SAA、ICAM、VCAMを測定するステップと、

(c) 組織修復マーカーVEGFを測定するステップと、

(d) 前記測定値を治療有効性と関連させるステップと

を含む、方法を提供する。

## 【0094】

[0119]例示のみを目的として、実施例5は、本発明の例示的な実施形態であり、IFX処置レジメンをモニターする方法を示す。

## 【0095】

[0120]他の実施形態では、本発明は、個体が、インフリキシマブを投与される組合せ療法のための候補であるかどうかを決定するための方法であって、

(a) 前記個体におけるATIの存在又は非存在を測定するステップと、

(b) 有意なレベルのATIを有する前記個体に免疫抑制剤(例えば、MTX)を投与するステップとを含む、方法を提供する。

## 【0096】

[0121]さらに他の実施形態では、前記方法は、ATIの存在を示すCRPの濃度レベルを測定するステップも含む。例示のみを目的として、実施例6及び7は、ATIの存在及び非存在が、レミケード療法のレスポnder及びノンレスポnderを予測することを示す。実施例6及び7は、例示的な実施形態である。

## 【0097】

[0122]さらに他の実施形態では、本発明は、クローン病の活動性をモニターする方法であって、

(a) pg/mlのVEGF、ng/mlのCRP、ng/mlのSAA、ng/mlのICAM及びng/mlのVCAMを含むマーカーのパネルの測定を含む炎症指数を決定するステップと、

(b) 前記指数を有効性スケールと比較して、疾患をモニターし、管理する(managing)

10

20

30

40

50



e) ステップと

を含む、方法を提供する。

【0098】

[0123] 例示のみを目的として、実施例 9 は例示的な実施形態であり、炎症指数の使用を示す。

【0099】

[0124] 特定の実施形態では、本発明は、C 反応性タンパク質 (CRP) レベルによって測定された場合に疾患活動性を最良に識別することができる IFX 等の抗 TNF 薬の閾値を決定するための方法を提供する。例示のみを目的として、実施例 12 は、 $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  の閾値で二分された IFX を CRP によって区別することができることを示す。特定の場合では、無作為の IFX  $< 3$  及び IFX  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  の血清試料は、74% の比率で IFX  $< 3 \mu\text{g}/\text{ml}$  においてより高い CRP を有する (ROC AUC)。図 12 はまた、ATI + 試料対においては、IFX 群 ( $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  より高い及び低い) 間で CRP の有意差が観察されなかったことを示す。特に、ATI + 試料対においては、CRP レベルは全体的により高く、ATI - 試料については IFX  $< 3 \mu\text{g}/\text{ml}$  において CRP レベルがより高かった。回帰によって、CRP が ATI と正相関し、IFX と逆相関することが確認された。したがって、相互作用は、ATI + と ATI - との間で異なる CRP - IFX 関係に対応する。

10

【0100】

IV. 粘膜治癒指数

20

[0125] 本発明の方法は、治療応答をモニターし、再発のリスクを予測するステップを含む。いくつかの実施形態では、前記方法は、粘膜治癒のマーカーの存在及び/又はレベルを検出、測定及び/又は決定するステップを含む。

【0101】

[0126] 腸粘膜は、栄養素の消化、吸収及び代謝に加えて、障壁防御において重要な役割を果たしている。腸上皮細胞の増殖、移動、及びアポトーシスの動的プロセスは、一般的な栄養状態、摂取経路、及び食事時の特定の栄養素の十分さによって大きく影響される。しかしながら、腸の炎症性疾患がある場合、粘膜細胞の機能障害は、粘膜傷害又は損傷をもたらす、それによって大分子に対する透過性の増大、内腔からの細菌の転移の増加、及び上皮細胞アポトーシスの刺激をもたらす得る。

30

【0102】

[0127] 粘膜傷害は、肉眼レベルから分子レベルにまで及ぶ多面的な生理学的プロセスである。粘膜傷害は、内視鏡検査の間に検出可能な肉眼で見える粘膜病変の形成、顕微鏡組織レベルでの肉芽腫形成及び筋層の崩壊、細胞レベルでの上皮アポトーシス並びに活性化炎症細胞及びリンパ球細胞の浸潤、細胞内レベルでの上皮透過性の増加、並びに分子レベルでのギャップ結合崩壊を含む。

【0103】

[0128] 粘膜傷害は、内因性因子と環境因子との組合せにより開始されると考えられる。第一段階で、食物由来化合物、ウイルス及び細菌由来因子、並びに宿主由来因子が、上皮細胞の破壊並びに自然免疫及び適応免疫の活性化を引き起こし得ると考えられる。損傷した粘膜は、好中球、好酸球、マスト細胞、炎症性単球、活性化マクロファージ及び樹状細胞からなる多様な炎症細胞により最初に浸潤される。腸内細菌叢に対する特異的適応免疫応答が生成され、活性化 B 細胞、CD4 + 及び CD8 + T 細胞の炎症粘膜への後のリクルートメントを誘導する。好中球は、上皮の細胞外マトリックス分解をもたらす得るエラスターゼを分泌する。同様に、T 細胞、マクロファージ及び腸線維芽細胞は、細胞外マトリックス分解、上皮損傷、内皮活性化、及び/又は線維構造形成を誘導する IL-1、IL-2、IL-6、IL-14、IL-17、TGF 及び TNF 等の炎症因子を発現する。粘膜傷害のマーカーの非限定的な例としては、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 及び酸化ストレスのマーカー (例えば、iNOS、反応性酸素代謝物) が挙げられる。

40

50

## 【0104】

## A. 粘膜治癒マーカーのアレイ

[0129]増殖因子を含む様々な粘膜マーカーが、治療を選択すること、治療を最適化すること、毒性を低減すること、及び/又は生物製剤(例えば、抗TNF薬)等の1つ若しくは複数の治療剤を用いる治療処置の有効性をモニターすることによる個別治療管理のための本発明の方法において特に有用である。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、疾患経過の予測、適切な抗TNF薬物療法の選択、抗TNF薬物療法の最適化、抗TNF薬物療法と関連する毒性の低減、及び/又は抗TNF薬を用いる治療処置の有効性のモニタリングを補助又は援助するために、増殖因子等の1つ又は複数の(複数の)粘膜治癒マーカー(例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせて)に基づく粘膜治癒指数の決定を用いる。

10

## 【0105】

[0130]したがって、特定の実施形態では、試料中の1つ又は複数の増殖因子の存在及び/又はレベルの決定が、本発明において有用である。本明細書で用いられる用語「増殖因子」は、細胞増殖及び/又は細胞分化を刺激することができる任意の様々なペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質を含む。

## 【0106】

[0131]いくつかの実施形態では、粘膜治癒マーカーとして、限定されるものではないが、増殖因子、炎症マーカー、細胞接着マーカー、サイトカイン、抗炎症マーカー、マトリックスメタロプロテイナーゼ、酸化ストレスマーカー、及び/又はストレス応答マーカーが挙げられる。

20

## 【0107】

[0132]いくつかの実施形態では、粘膜治癒マーカーとして、増殖因子が挙げられる。増殖因子の非限定的な例としては、アンフィレグリン(AREG)、エピレグリン(EREG)、ヘパリン結合表皮増殖因子(HB-EGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、ヘレグリン-1(HRG)及びアイソフォーム、ニューレグリン(NRG1、NRG2、NRG3、NRG4)、ベタセルリン(BTC)、表皮増殖因子(EGF)、インスリン増殖因子-1(IGF-1)、トランスフォーミング増殖因子(TGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮増殖因子(VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D)、幹細胞因子(SCF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、可溶性fms様チロシンキナーゼ1(sflt1)、胎盤増殖因子(PIGF、PLGF又はPGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF1、FGF2、FGF7、FGF9)、及びそれらの組合せが挙げられる。他の実施形態では、粘膜治癒マーカーとして、色素上皮由来因子(PEDF、SERPINF1としても知られる)、エンドセリン-1(ET-1)、ケラチノサイト増殖因子(KGF; FGF7としても知られる)、骨形成タンパク質(例えば、BMP1~BMP15)、血小板由来増殖因子(PDGF)、神経増殖因子(NGF)、  
- 神経増殖因子(-NGF)、神経栄養因子(例えば、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン3(NT3)、ニューロトロフィン4(NT4)等)、増殖分化因子-9(GDF-9)、顆粒球-コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、ミオスタチン(GDF-8)、エリスロポエチン(EPO)、トロポポエチン(TPO)、及びそれらの組合せも挙げられる。

30

40

## 【0108】

[0133]他の実施形態では、粘膜治癒マーカーとして、サイトカインも挙げられる。粘膜治癒指数を確立するのに用いることができるサイトカインの非限定的な例としては、bFGF、TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-12(p70)、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、GM-CSF、IL-13、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、及びそれらの組合せが挙げられる。細胞接着マーカーの非限定的な例としては、SAA、CRP、ICAM、VCAM、及びそれらの組合せが挙げられる。抗炎症マーカーの非限定的な例としては、IL-12p70、IL-10、及びそれらの組合せが挙げられる。

50

## 【0109】

[0134]いくつかの実施形態では、粘膜治癒マーカーは、本明細書に記載の炎症マーカー及び血清学的マーカー等の胃腸管に特異的なマーカーを含む。非限定的な例として、例えば、OmpC、フラゲリン(cBir-1、Fla-A、Fla-X等)、I2及びその他(pANCA、ASCA等)等の細菌抗原に対する抗体；抗好中球抗体、抗サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)抗体、並びに抗微生物抗体が挙げられる。

## 【0110】

[0135]試料中の酸化ストレスのマーカーの決定も、本発明において有用である。酸化ストレスのマーカーの非限定的な例としては、それぞれ、タンパク質酸化及びDNA断片化を測定することにより検出することができるタンパク質又はDNAに基づくものが挙げられる。酸化ストレスのマーカーの他の例としては、マロンジアルデヒド等の有機化合物が挙げられる。

10

## 【0111】

[0136]酸化ストレスは、反応性酸素種の生成及び発現と、反応性中間体を容易に解毒するか、又はもたらされる損傷を修復する生物系の能力との不均衡である。組織の正常な酸化還元状態のかく乱は、タンパク質、脂質及びDNA等の細胞のあらゆる成分を損傷する過酸化物質及びフリーラジカルの生成を介して毒性効果を引き起こし得る。いくつかの反応性酸化種が、酸化還元シグナル伝達と呼ばれる現象を介してメッセンジャーとしてさらに作用することができる。

20

## 【0112】

[0137]特定の実施形態では、反応性酸化代謝物の誘導体(DROM)、グルタチオンの酸化/還元比(Eh GSH)、及び/又はシステインの酸化/還元比(Eh CysH)を用いて、酸化ストレスを定量することができる。例えば、Neumanら、Clin. Chem.、53:1652~1657(2007)を参照されたい。チロシンホスファターゼ及びチオレドキシン関連タンパク質等のタンパク質中の高反応性システイン残基の酸化的改変を、例えば、質量分析(MS)等の技術を用いて検出又は測定することもできる。例えば、Naitoら、Anti-Aging Medicine、7(5):36~44(2010)を参照されたい。酸化ストレスの他のマーカーとしては、例えば、Uchidaら、PNAS、95(9):4882~4887(1998)に記載のタンパク質結合アクロレイン、有機ヒドロペルオキシドのレベルを反映するフリー酸素ラジカルテスト(FORT)、及び還元グルタチオン/グルタチオンジスルフィドカップルの酸化還元能力、(Eh)GSH/GSSGが挙げられる。例えば、Abramsonら、Atherosclerosis、178(1):115~21(2005)を参照されたい。

30

## 【0113】

[0138]いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)は、あらゆる種類のECMタンパク質を分解することができるエンドペプチダーゼを分解するZn<sup>2+</sup>依存性細胞外マトリックス(ECM)のファミリーのメンバーを含む。MMPの非限定的な例としては、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-12、MMP-13、MT1-MMP-1、及びそれらの組合せが挙げられる。MMP-3及びMMP-9はCD患者における粘膜傷害及び瘻孔に関連することが示されている(Baughら、Gastroenterology、117:814~822(1999);Baileyら、J. Clin. Pathol.、47:113~116(1994))。いくつかの実施形態では、ストレス応答マーカーとしては、反応性酸素種(ROS)、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、カタラーゼ(CAT)、及びグルタチオン等の酸化ストレスのマーカー、並びに小胞体(ER)ストレスのマーカーが挙げられる。酸化ストレスのマーカーの非限定的な例としては、それぞれ、タンパク質酸化及びDNA断片化を測定することにより検出することができる、タンパク質又はDNAに基づくものが挙げられる。他の実施形態では、粘膜治癒マーカーは、酸化的

40

50

DNA及び/又はタンパク質損傷のマーカ-をさらに含む。ERストレスマーカ-の非限定的な例としては、非折畳みタンパク質応答のマーカ-（例えば、ATF6、HSPA5、PDIA4、XBP1、IRE1、PERK、EIF2A、GADD34、GRP-78、リン酸化JNK、カスパーゼ-12、カスパーゼ-3、及びそれらの組合せ）が挙げられる。

【0114】

[0139]ヒトアンフィレグリン（AREG）ポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_001648.1及びXP\_\_001125684.1に記載されている。ヒトAREG mRNA（コード）配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_001657.2及びXM\_\_001125684.3に記載されている。当業者であれば、AREGはAR、結腸直腸細胞由来増殖因子、CRDGF、SDGF、及びAREGBとしても知られることを理解するであろう。

10

【0115】

[0140]ヒトエピレグリン（EREG）ポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_001423.1に記載されている。ヒトEREG mRNA（コード）配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_001432.2に記載されている。当業者であれば、EREGはEPRとしても知られることを理解するであろう。

【0116】

[0141]ヒトヘパリン結合EGF様増殖因子（HB-EGF）ポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_001936.1に記載されている。ヒトHB-EGF mRNA（コード）配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_001945.2に記載されている。当業者であれば、HB-EGFはジフテリア毒素受容体、DTR、HBEGF、DTR、DTS、及びHEGFLとしても知られることを理解するであろう。

20

【0117】

[0142]ヒト肝細胞増殖因子（HGF）ポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_000592.3、NP\_\_001010931.1、NP\_\_001010932.1、NP\_\_001010933.1、及びNP\_\_001010934.1に記載されている。ヒトHGF mRNA（コード）配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_000601.4、NM\_\_001010931.1、NM\_\_001010932.1、NM\_\_001010933.1、及びNM\_\_001010934.1に記載されている。当業者であれば、HGFは散乱因子、SF、HPTA及びヘパトポエチン-Aとしても知られることを理解するであろう。当業者であれば、HGFが全てのアイソフォーム変異体を含むことも理解するであろう。

30

【0118】

[0143]ヒトニューレグリン-1（NRG1）ポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_001153467.1、NP\_\_001153471.1、NP\_\_001153473.1、NP\_\_001153477.1、NP\_\_039250.2、NP\_\_039251.2、NP\_\_039252.2、NP\_\_039253.1、NP\_\_039254.1、NP\_\_039256.2、及びNP\_\_039258.1に記載されている。ヒトNRG1 mRNA（コード）配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_001159995.1、NM\_\_001159999.1、NM\_\_001160001.1、NM\_\_001160005.1、NM\_\_013956.3、NM\_\_013957.3、NM\_\_013958.3、NM\_\_013959.3、NM\_\_013960.3、NM\_\_013962.2、及びNM\_\_013964.3に記載されている。当業者であれば、NRG1はGGF、HGL、HRGA、NDF、SMDF、ARIA、アセチルコリン受容体-誘導活性、乳がん細胞分化因子p45、グリア増殖因子、ヘレグリン、HRG、neu分化因子、並びに感覚及び運動ニューロン由来因子としても知られることを理解するであろう。当業者であれば、NRG1は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

40

50

## 【0119】

[0144]ヒトニューレグリン - 2 (NRG2) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_001171864.1、NP\_\_004874.1、NP\_\_053584.1、NP\_\_053585.1 及び NP\_\_053586.1 に記載されている。ヒト NRG2 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_001184935.1、NM\_\_004883.2、NM\_\_013981.3、NM\_\_013982.2 及び NM\_\_013983.2 に記載されている。当業者であれば、NRG2 は NTA K、ERBB キナーゼのための神経及び胸腺由来活性化因子、DON - 1、並びにニューレグリン - 1 の分岐体 (divergent) としても知られることを理解するであろう。当業者であれば、NRG2 は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

10

## 【0120】

[0145]ヒトニューレグリン - 3 (NRG3) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_001010848.2 及び NP\_\_001159445.1 に記載されている。ヒト NRG3 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_001010848.3 及び NM\_\_001165973.1 に記載されている。当業者であれば、NRG3 は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

## 【0121】

[0146]ヒトニューレグリン - 4 (NRG4) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_612640.1 に記載されている。ヒト NRG4 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_138573.3 に記載されている。当業者であれば、NRG4 は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

20

## 【0122】

[0147]ヒトベタセルリン (BTC) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_001720.1 に記載されている。ヒト BTC mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_001729.2 に記載されている。当業者であれば、BTC は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

## 【0123】

[0148]ヒト表皮増殖因子 (EGF) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_001954.2 及び NP\_\_001171602.1 に記載されている。ヒト EGF mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_001963.4 及び NM\_\_001178131.1 に記載されている。当業者であれば、EGF は - ウロガストロン、ウロガストロン、URG、及び HOMG4 としても知られることを理解するであろう。

30

## 【0124】

[0149]ヒトインスリン様増殖因子 (IGF) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_000609.1 及び NP\_\_001104755.1 に記載されている。ヒト IGF mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_000618.3 及び NM\_\_001111285.1 に記載されている。当業者であれば、IGF が全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。当業者であれば、IGF がメカノ (mechano) 増殖因子、MGF 及びソマトメジン - C としても知られることを理解するであろう。

40

## 【0125】

[0150]ヒトトランスフォーミング増殖因子アルファ (TGF - ) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_003227.1 及び NP\_\_001093161.1 に記載されている。ヒト TGF - mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_003236.3 及び NM\_\_001099691.2 に記載されている。当業者であれば、TGF - は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。当業者であれば、TGF - は EGF 様 TGF、ETGF、及び 1 型 TGF

50

としても知られることを理解するであろう。

【0126】

[0151] ヒト血管内皮増殖因子 (VEGF-A) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_001020537、NP\_\_001020538、NP\_\_001020539、NP\_\_001020540、NP\_\_001020541、NP\_\_001028928、及び NP\_\_003367 に記載されている。ヒト VEGF-A mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_001025366、NM\_\_001025367、NM\_\_001025368、NM\_\_001025369、NM\_\_001025370、NM\_\_001033756、及び NM\_\_003376 に記載されている。当業者であれば、VEGF-A は VPF、VEGFA、VEGF、及び MGC70609 としても知られることを理解するであろう。当業者であれば、VEGF-A は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

10

【0127】

[0152] ヒト血管内皮増殖因子 (VEGF-B) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_001230662 及び NP\_\_003368 に記載されている。ヒト VEGF-B mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_001243733 及び NM\_\_003377 に記載されている。当業者であれば、VEGF-B は VEGFB、VEGF 関連因子、及び VRF としても知られることを理解するであろう。当業者であれば、VEGF-B は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

20

【0128】

[0153] ヒト血管内皮増殖因子 (VEGF-C) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_005420 に記載されている。ヒト VEGF-C mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_005429 に記載されている。当業者であれば、VEGF-C は Flt4 リガンド、Flt4-L、VRP 及び血管内皮増殖因子関連タンパク質としても知られることを理解するであろう。当業者であれば、VEGF-C は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

【0129】

[0154] ヒト線維芽細胞増殖因子 1 (FGF1) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_000791、NP\_\_001138364、NP\_\_001138406、NP\_\_001138407、NP\_\_001138407、NP\_\_149127、及び NP\_\_149128 に記載されている。ヒト FGF1 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_000800、NM\_\_001144892、NM\_\_001144934、NM\_\_001144934、NM\_\_001144935、NM\_\_033136 及び NM\_\_033137 に記載されている。当業者であれば、FGF1 は FGF A、FGF-1、酸性線維芽細胞増殖因子、aFGF、内皮細胞増殖因子、ECGF、ヘパリン結合増殖因子 1、及び HB-EGF1 としても知られることを理解するであろう。当業者であれば、FGF1 は全てのアイソフォーム変異体を含むことを理解するであろう。

30

【0130】

[0155] ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_001997.5 に記載されている。ヒト bFGF mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_002006.4 に記載されている。当業者であれば、bFGF は FGF2、FGFB、及び HBGF-2 としても知られることを理解するであろう。

40

【0131】

[0156] ヒト線維芽細胞増殖因子 7 (FGF7) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_002000.1 に記載されている。ヒト FGF7 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_002009.3 に記載されている。当業者であれば、FGF7 は FGF-7、HBGF-7 及び ケラチノサイト増殖因子

50

としても知られることを理解するであろう。

【0132】

[0157] ヒト線維芽細胞増殖因子9 (FGF9) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_002001.1 に記載されている。ヒト FGF9 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_002010.2 に記載されている。当業者であれば、FGF9 は FGF-9、GAF、及び HBGF-9 としても知られることを理解するであろう。

【0133】

[0158] アポトーシスのヒト TNF 関連弱誘導因子 (TWEAK) ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_003800.1 に記載されている。ヒト TWEAK mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_003809.2 に記載されている。当業者であれば、TWEAK は TNF12、APO3 リガンド、APO3L、DR3LG、及び UNQ181 / PRO207 としても知られることを理解するであろう。

【0134】

[0159] 特定の場合では、増殖因子等の特定の粘膜治癒マーカーの存在又はレベルを、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅に基づくアッセイ等のアッセイを用いて mRNA 発現のレベルで検出する。特定の他の場合では、特定の増殖因子の存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ (例えば、ELISA) 又は免疫組織化学アッセイを用いて、タンパク質発現のレベルで検出する。例示的な実施形態では、特定の増殖因子の存在又はレベルを、例えば、協調的近接免疫アッセイ (COPIA) としても知られる、協調的酵素増強反応免疫アッセイ (CEER) 等の多重免疫アレイを用いて検出する。CEER は、あらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる以下の特許文献：国際公開第 2008/036802 号、国際公開第 2009/012140 号、国際公開第 2009/108637 号、国際公開第 2010/132723 号、国際公開第 2011/008990 号、及び 2010 年 10 月 20 日に出版された国際出願 PCT/US2010/053386 に記載されている。血清、血漿、唾液、又は尿試料中の増殖因子の存在又はレベルを決定するための好適な ELISA キットは、例えば、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、Promega (Madison, WI)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Invitrogen (Camarillo, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、PeproTech (Rocky Hill, NJ)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)、及び / 又は Abzyme (Needham, MA) から入手可能である。

【0135】

[0160] 特定の実施形態では、少なくとも 1 つ又は複数 (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、若しくは 21、例えば、パネル若しくはアレイ) の下記増殖因子マーカーを検出 (例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせ) して、疾患経過の予測の補助若しくは援助、並びに / 又は治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び / 若しくは抗 TNF 薬物療法に対する治療処置の有効性のモニタリングの正確性の改善を行うことができる：AREG、EREG、HB-EGF、HGF、NRG1、NRG2、NRG3、NRG4、BTC、EGF、IGF、TGF-、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、FGF1、FGF2、FGF7、FGF9、TWEAK 及びそれらの組合せ。

【0136】

B. 粘膜治癒指数

[0161] 特定の態様では、本発明は、治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び / 又

は抗TNF 薬物療法に対する治療処置の有効性をモニタリングの正確性を改善するための1つ又は複数(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21以上)の粘膜治癒マーカーのアルゴリズムに基づく分析を提供する。

【0137】

[0162]次いで、本明細書に記載の単一の統計的アルゴリズム又は2つ以上の統計的アルゴリズムの組合せを、試料中で検出、測定又は決定される粘膜治癒マーカーの存在又は濃度レベルに適用することによって、治療を選択し、治療を最適化し、毒性を低減するか、又は抗TNF 薬を用いる治療処置の有効性をモニターすることができる。したがって、本発明の方法は、患者の免疫状態を決定することによって患者管理を決定するのに有用である。

10

【0138】

[0163]いくつかの実施形態では、統計的アルゴリズムは、学習統計分類子システムを含む。いくつかの場合では、学習統計分類子システムは、ランダムフォレスト、分類ツリー及び回帰ツリー、増幅ツリー、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、一般カイ二乗自動相互作用検出モデル、相互作用ツリー、多変量回帰スプライン、マシン学習分類子、並びにそれらの組合せからなる群から選択される。特定の場合では、統計的アルゴリズムは、単一の学習統計分類子システムを含む。他の実施形態では、統計的アルゴリズムは、少なくとも2つの学習統計分類子システムの組合せを含む。いくつかの場合では、少なくとも2つの学習統計分類子システムは、直列に適用される。本発明における使用にとって好適な統計的アルゴリズム及び分析の非限定的な例は、2011年10月18日に出願された国際出願PCT/US2011/056777に記載されており、その開示はあらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0139】

[0164]粘膜治癒指数は、経験的に誘導され、実験的に調製された指数値であることが好ましい。いくつかの場合では、指数値は、実験的に決定された対照測定値のアレイから変換される。一態様では、マーカーの濃度又はその測定濃度値は、コンピュータ内にあるアルゴリズムによって指数に変換される。特定の場合では、指数は、生物学的データを数値で表す、合成又はヒトにより誘導された出力、スコア、又はカットオフ値(複数可)である。前記指数を用いて、臨床決定を決定するか、又は行うか、又は行うのを援助することができる。粘膜治癒指数を、経時的に複数の時点で測定することができる。一態様では、アルゴリズムを既知の試料を用いて訓練した後、既知の同一性の試料を用いて実証することができる。

30

【0140】

[0165]さらなる実施形態では、粘膜治癒を評価又は測定するための方法は、試料中に存在する粘膜治癒マーカーの決定されたレベルを、指数値又はカットオフ値又は参照値又は閾値と比較するステップをさらに含み、その値より高いか、又は低い粘膜治癒マーカーのレベルは、被験体が粘膜治癒を起こすか、又は粘膜治癒を起こさない可能性が増加するか、又はより高いことを予測するか、又は示す。当業者であれば、指数値又はカットオフ値又は参照値又は閾値が、測定される対象のマーカーに応じて、mg/ml、 $\mu$ g/ml、ng/ml、pg/ml、fg/ml、EU/ml、又はU/ml等の単位であることを理解できる。

40

【0141】

[0166]いくつかの実施形態では、粘膜治癒指数対照は、健康な個体、又は疾患状態から健康な状態に進行した個体から誘導された粘膜治癒指数である。或いは、対照は、より重い疾患状態又は健康状態から疾患への時間経過を表す指数であってもよい。

【0142】

[0167]いくつかの実施形態では、治療過程等を決定する方法は、例えば、薬物の用量の選択、適切な薬物、又は治療の経過若しくは長さ、治療レジメンの選択、又は存在する薬物若しくは用量の維持のために選択する経験的に誘導された指数、スコア又は分析の使用

50



を含む。特定の態様では、誘導されたか、又は測定された指数を用いて、治療過程を決定することができる。

【0143】

[0168]疾患の臨床過程の理解により、医師は、その炎症性疾患患者（例えば、IBD、クローン病又は潰瘍性大腸炎）のためのより良好な同意に基づく処置決定を行うことができ、将来の新規薬物開発に役立つ。本明細書に記載の粘膜治癒指数における使用のための理想的な粘膜治癒マーカー（複数可）は、疾患のリスクを有する個体を特定することができるべきであり、疾患特異的であるべきである。さらに、粘膜治癒マーカー（複数可）は、疾患活動性を検出し、処置の効果をモニターすることができるべきである；また、疾患の再燃又は再発に対する予測値を有するべきである。しかしながら、疾患経過の予測は、今や疾患再発を超えて拡大されているが、おそらくより重要なことに、外科手術を含む疾患合併症の予測因子を含む。本発明は、粘膜治癒の指示因子を提供し、寛解にある患者における再燃のリスクの予測を可能にするため、特に有利である。さらに、本発明の粘膜治癒マーカー及び粘膜治癒指数は、患者管理のため、並びに治療決定を行うための大きな意味を有し、それから利益を得る可能性が最も高い患者に対する適切な治療を指示するのを補助又は援助し、再発のリスクが低い患者における慢性維持療法の費用及び潜在的毒性を回避する。

【0144】

I. 疾患活動性プロファイル

[0169]本明細書に記載される通り、本発明の疾患活動性プロファイル（DAP）は、治療の最適化及び／又は治療有効性のモニタリングを行うための疾患の個別治療管理のための方法において有利に用いることができる。特定の実施形態では、本発明の方法は、治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び／又は抗TNF薬物療法に対する治療処置の有効性のモニタリングの正確性を改善することができる。特定の実施形態では、DAPは、1つ又は複数（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50以上）のマーカーを、治療抗体（例えば、抗TNF薬）を用いる治療過程にわたる複数の時点で測定してDAPを決定することにより決定され、DAPは経時的な各マーカーの濃度レベルの表示を含む。特定の実施形態では、DAPは、経時的な各マーカーの存在若しくは非存在、濃度（例えば、発現）レベル、活性化（例えば、リン酸化）レベル、及び／又は速度値（例えば、特定のマーカーのレベルの勾配変化）の表示を含んでもよい。したがって、本発明の方法は、患者の免疫状態を決定することによる患者管理の決定において有用である。

【0145】

[0170]特定の場合では、単一の統計的アルゴリズム又は2つ以上の統計的アルゴリズムの組合せを、治療過程にわたる各マーカーの濃度レベル又はDAP自体に適用することができる。

【0146】

[0171]疾患の臨床過程の理解により、医師は、その炎症性疾患患者（例えば、IBD（例えば、クローン病）、慢性関節リウマチ（RA）その他）のためのより良好な同意に基づく処置決定を行うことができ、将来の新規薬物開発に役立つ。本明細書に記載の疾患活動性プロファイルにおける使用のための理想的なバイオマーカー（複数可）は、疾患のリスクを有する個体を特定することができ、疾患特異的である。さらに、バイオマーカー（複数可）は、疾患活動性を検出し、処置の効果をモニターすることができる；また、疾患の再燃又は再発に対する予測値を有する。しかしながら、疾患経過の予測は、今や疾患の再発を超えて拡大されているが、より重要なことに、外科手術を含む疾患合併症の予測因子を含む。本発明は、疾患活動性及び／又は重症度の指示因子を提供し、寛解にある患者における再燃のリスクの予測を可能にするため、特に有利である。さらに、本発明のバイオマーカー及び疾患活動性プロファイルは、患者管理のため、並びに治療決定を行うための大きな意味を有し、それから利益を得る可能性が最も高い患者に対して適切な治療を指

示するのを補助又は援助し、再発のリスクが低い患者における慢性維持療法の費用及び潜在的毒性を回避する。

#### 【0147】

[0172]非限定的な例として、一実施形態における疾患活動性プロファイル(DAP)は、以下の分類のバイオマーカー：

- (1) 薬物レベル(例えば、抗TNF薬レベル)；
- (2) 抗薬物抗体(ADA)レベル(例えば、抗TNF薬に対する自己抗体のレベル)；
- (3) 炎症マーカー；
- (4) 抗炎症マーカー；及び/又は
- (5) 組織修復マーカー

のうちの1つ又は複数における1つ又は複数の特異的バイオマーカーの存在、レベル(濃度(例えば、総濃度)及び/若しくは活性化(例えば、リン酸化))、又は遺伝子型を検出、測定、又は決定することを含む。

#### 【0148】

[0173]存在、レベル(濃度(例えば、総濃度)及び/若しくは活性化(例えば、リン酸化))、又は遺伝子型を測定することができるさらなる及び/又は代替的なマーカーの非限定的な例としては、

- (6) 血清(例えば、免疫マーカー)；
- (7) 酸化ストレスのマーカー；
- (8) 細胞表面受容体(例えば、CD64、その他)；
- (9) シグナル伝達経路；
- (10) 治療抗体(例えば、インフリキシマブ)等の薬物のk<sub>e</sub>1、若しくは消失速度定数；及び/又は
- (11) 他のマーカー(例えば、炎症経路遺伝子等の遺伝子マーカー)

が挙げられる。

#### 【0149】

A. 抗TNF薬レベル及び抗薬物抗体(ADA)レベル

[0174]いくつかの実施形態では、疾患活動性プロファイル(DAP)は、複数の時点、例えば、治療過程の前、間、及び/又は後での患者試料(例えば、抗TNF薬物療法にある患者からの血清試料)中の抗TNF薬(例えば、インフリキシマブ等の遊離抗TNF治療抗体のレベル)及び/又は抗薬物抗体(ADA)(例えば、HACA等の抗TNF薬に対する自己抗体のレベル)の存在及び/又はレベルを決定することを含む。

#### 【0150】

[0175]特定の実施形態では、抗TNF薬及び/又はADAの存在及び/又はレベルは、サイズ排除クロマトグラフィーを用いる均一移動度シフトアッセイを用いて決定される。その開示があらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる2010年10月26日に出願された国際出願PCT/US2010/054125に記載されたこの方法は、TNF阻害剤並びにそれに対して生成される自己抗体(例えば、HACA、HAA等)の存在又はレベルを測定するのに特に有利である。

#### 【0151】

[0176]一実施形態では、試料中の抗TNF抗体の存在を検出するための方法は、

- (a) 標識されたTNFと、抗TNF抗体を有するか、又は有することが疑われる試料とを接触させて、抗TNF抗体との標識された複合体を形成させるステップと、
- (b) 標識された複合体をサイズ排除クロマトグラフィーにかけて、標識された複合体を分離するステップと、
- (c) 標識された複合体を検出し、それによって抗TNF抗体を検出するステップとを含む。

#### 【0152】

[0177]特定の場合では、前記方法は、以下の抗TNF抗体：レミケード(商標)(インフリキシマブ)、エンブレル(商標)(エタネルセプト)、ヒュミラ(商標)(アダリ

10

20

30

40

50

ムマブ)、及びシムジア(登録商標)(セルトリズマブペゴール)にとって特に有用である。

【0153】

[0178]腫瘍壊死因子(TNF)は、全身性炎症に関与するサイトカインであり、急性期反応を刺激するサイトカイン群のメンバーである。TNFの主な役割は、免疫細胞の調節である。TNFはまた、アポトーシス細胞死を誘導し、炎症を誘導し、並びに腫瘍形成及びウイルス複製を阻害することもできる。TNFは、安定なホモ三量体中に配置された212アミノ酸長のII型膜貫通タンパク質として主として生成される。

【0154】

[0179]本明細書で用いられる用語「TNF」、「TNF」及び「TNF-」は、17kDaの分泌型及び26kDaの膜会合型として存在するヒトサイトカインを含むことが意図され、その生物学的に活性な型は非共有結合した17kDaの分子の三量体から構成される。TNF-の構造は、例えば、Johnsら(1989)Nature、338:225~228にさらに記載される。用語「TNF-」は、ヒト、組換えヒトTNF-(rhTNF-)、又はヒトTNFタンパク質に対して少なくとも約80%の同一性を含むことが意図される。ヒトTNFは、35アミノ酸(aa)の細胞質ドメイン、21aaの膜貫通部分、及び177aaの細胞外ドメイン(ECD)からなる(Pennica, D.ら(1984)Nature 312:724)。ECD内で、ヒトTNFは、アカゲザルとの97%のアミノ酸配列同一性を有し、ウシ、イヌ、コットンラット、ウマ、ネコ、マウス、ブタ、及びラットTNFと71%~92%のアミノ酸配列同一性を有する。TNFは、標準的な組換え発現方法により調製するか、又は商業的に購入することができる(R&D Systems、カタログ番号210-TA、Minneapolis, Minn.)。

【0155】

[0180]特定の場合では、TNF抗体を検出した後、TNF抗体を標準曲線を用いて測定する。

【0156】

[0181]別の実施形態では、試料中の抗TNF抗体に対する自己抗体を検出するための方法は、

(a) 標識された抗TNF抗体と、試料とを接触させて、自己抗体との標識された複合体を形成させるステップと、

(b) 標識された複合体をサイズ排除クロマトグラフィーにかけて、標識された複合体を分離するステップと、

(c) 標識された複合体を検出することによって、自己抗体を検出するステップとを含む。

【0157】

[0182]特定の場合では、自己抗体は、ヒト抗キメラ抗体(HACA)、ヒト抗ヒト化抗体(HAHA)、及びヒト抗マウス抗体(HAMA)を含む。

【0158】

[0183]抗TNF薬及び/又は抗薬物抗体(ADA)の存在及び/又はレベルを決定するための他の方法の非限定的な例としては、架橋ELISA等の酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)が挙げられる。例えば、Matr ix Biotech LaboratoriesからのインフリキシマブELISAは、血清及び血漿試料中の遊離インフリキシマブを検出し、PeaceHealth LaboratoriesからのHACA ELISAは、血清試料中のHACAを検出する。

【0159】

B. 炎症マーカー

[0184]炎症性疾患の疾患経過は、典型的には白血球計数を用いる非侵襲的試験により炎症活性に関して測定されるが、この方法は特異性が低く、疾患活動性との限られた相関を示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 0 】

[0185]したがって、特定の実施形態では、生化学マーカー、血清学的マーカー、タンパク質マーカー、遺伝子マーカー、及び／又は他の臨床若しくは超音波特性等の様々な炎症マーカーが、治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び／又は生物製剤（例えば、抗TNF薬）等の1つ若しくは複数の治療剤を用いる治療処置の有効性のモニタリングによる個別治療管理のための本発明の方法において特に有用である。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、疾患経過の予測、適切な抗TNF薬物療法の選択、抗TNF薬物療法の最適化、抗TNF薬物療法に伴う毒性の低減、及び／又は抗TNF薬を用いる治療処置の有効性のモニタリングを補助又は援助するために、1つ又は複数の（複数の）炎症マーカー（例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせて）に基づく疾患活動性プロファイル（DAP）の決定を用いる。

10

## 【 0 1 6 1 】

[0186]炎症マーカーの非限定的な例としては、サイトカイン、ケモカイン、急性期タンパク質、細胞接着分子、S100タンパク質、及び／又は他の炎症マーカーが挙げられる。好ましい実施形態では、炎症マーカーは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上のサイトカインを含む。1つの特定の実施形態では、サイトカインは、下記のもの：GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 及びsTNF RIIのうちの少なくとも1、2、3、4、5、6、7つ、又は8つ全部である。

20

## 【 0 1 6 2 】

## 1. サイトカイン及びケモカイン

[0187]試料中の少なくとも1つのサイトカイン又はケモカインの存在又はレベルの決定は、本発明において特に有用である。本明細書で用いられる用語「サイトカイン」は、様々な免疫系の機能を調節する免疫細胞により分泌される任意の様々なポリペプチド又はタンパク質を含み、ケモカイン等の小さいサイトカインを包含する。用語「サイトカイン」はまた、例えば、体重、造血、血管新生、創傷治癒、インスリン耐性の調節、免疫応答、及び炎症応答において機能する脂肪細胞により分泌されるサイトカイン群を含むアジポサイトカインも含む。

## 【 0 1 6 3 】

[0188]特定の実施形態では、限定されるものではないが、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、可溶性腫瘍壊死因子-受容体II（sTNF RII）、アポトーシスのTNF関連弱誘導因子（TWEAK）、オステオプロテゲリン（OPG）、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-1受容体アンタゴニスト（IL-1ra）、IL-4、IL-5、可溶性IL-6受容体（sIL-6R）、IL-7、IL-9、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23、及びIL-27等の、少なくとも1つのサイトカインの存在又はレベルが、試料中で決定される。

30

## 【 0 1 6 4 】

[0189]他の特定の実施形態では、例えば、CXCL1/GRO1/GRO、CXCL2/GRO2、CXCL3/GRO3、CXCL4/PF-4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL9/MIG、CXCL10/IP-10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15、CXCL16、CXCL17/DMC、CCL1、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 $\beta$ 、CCL4/MIP-1 $\alpha$ 、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/CCL10、CCL11/エオタキシン、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/MIP-5、CCL16/LEC、CCL17/TARC、CCL18/MIP-4、CCL19/MIP-3 $\beta$ 、CCL20/MIP-3 $\alpha$ 、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPHF1、CCL24/エオタキシン-2、CCL25/TECK、CCL

40

50

26 / エオタキシン - 3、CCL27 / CTACK、CCL28 / MEC、CL1、CL2、及びCX<sub>3</sub>CL1等の少なくとも1つのケモカインの存在又はレベルが、試料中で決定される。特定のさらなる実施形態では、限定されるものではないが、レプチン、アジポネクチン、レジスチン、活性又は全プラスミノゲン活性化因子阻害剤 - 1 (PAI - 1)、ビスファチン、及びレチノール結合タンパク質4 (RBP4)等の少なくとも1つのアジポサイトカインの存在又はレベルが、試料中で決定される。GM-CSF、IFN - 、IL - 1、IL - 2、IL - 6、IL - 8、TNF - 、sTNF RII、及び/又は他のサイトカイン若しくはケモカインの存在又はレベルが決定されることが好ましい。

#### 【0165】

[0190] 特定の場合では、特定のサイトカイン又はケモカインの存在又はレベルが、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅に基づくアッセイ等のアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出される。他の特定の場合では、特定のサイトカイン又はケモカインの存在又はレベルが、例えば、免疫アッセイ (例えば、ELISA) 又は免疫組織化学アッセイを用いて、タンパク質発現のレベルで検出される。血清、血漿、唾液、又は尿試料中の対象のサイトカイン又はケモカインの存在又はレベルを決定するための好適なELISAキットは、例えば、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI)、BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA)、Invitrogen (Camarillo, CA)、Calbiochem (San Diego, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、QIAGEN Inc. (Valencia, CA)、Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA)、及び/又はBender MedSystems Inc. (Burlingame, CA) から入手可能である。

#### 【0166】

[0191] ヒトIL - 6ポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_000591に記載されている。ヒトIL - 6 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_000600に記載されている。当業者であれば、IL - 6はインターフェロン 2 (IFNB2)、HGF、HSF、及びBSF2としても知られることを理解するであろう。

#### 【0167】

[0192] ヒトIL - 1 ポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_000567に記載されている。ヒトIL - 1 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_000576に記載されている。当業者であれば、IL - 1はIL1F2及びIL - 1ベータとしても知られることを理解するであろう。

#### 【0168】

[0193] ヒトIL - 8ポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_000575 (配列番号1) に記載されている。ヒトIL - 8 mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_000584 (配列番号2) に記載されている。当業者であれば、IL - 8はCXCL8、K60、NAF、GCP1、LECT、LUCT、NAP1、3 - 10C、GCP - 1、LYNAP、MDNCF、MONAP、NAP - 1、SCYB8、TSG - 1、AMCF - I、及びb - ENAPとしても知られることを理解するであろう。

#### 【0169】

[0194] ヒトTWEAKポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_\_003800及びAAC51923に記載されている。ヒトTWEAK mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_\_003809及びBC104420に

10

20

30

40

50

記載されている。当業者であれば、TWEAKは腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー12(TNFSF12)、APO3リガンド(APO3L)、CD255、DR3リガンド、増殖因子誘導性14(Fn14)リガンド、及びUNQ181/PRO207としても知られることを理解するであろう。

#### 【0170】

##### 2. 急性期タンパク質

[0195]試料中の1つ又は複数の急性期タンパク質の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。急性期タンパク質は、血漿濃度が炎症に応答して増加(正の急性期タンパク質)又は減少(負の急性期タンパク質)するタンパク質のクラスである。この応答は、急性期反応と呼ばれる(急性期応答とも呼ばれる)。正の急性期タンパク質の例としては、限定されるものではないが、C-反応性タンパク質(CRP)、D-二量体タンパク質、マンノース結合タンパク質、アルファ1-抗トリプリン、アルファ1-抗キモトリプシン、アルファ2-マクログロブリン、フィブリノゲン、プロトロンビン、第VII因子、von Willebrand因子、プラスミノゲン、補体因子、フェリチン、血清アミロイドP成分、血清アミロイドA(SAA)、オロソムコイド(アルファ1-酸糖タンパク質、AGP)、セルロプラスミン、ハプトグロビン、及びそれらの組合せが挙げられる。負の急性期タンパク質の非限定的な例としては、アルブミン、トランスフェリン、トランスサイレチン、トランスコルチン、レチノール結合タンパク質、及びそれらの組合せが挙げられる。CRP及び/又はSAAの存在又はレベルが決定されることが好ましい。

10

20

#### 【0171】

[0196]特定の場合では、特定の急性期タンパク質の存在又はレベルが、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅に基づくアッセイ等のアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出される。他の特定の場合では、特定の急性期タンパク質の存在又はレベルが、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)又は免疫組織化学アッセイを用いて、タンパク質発現のレベルで検出される。例えば、Alpco Diagnostics(Salem, NH)から入手可能なサンドイッチ比色ELISAアッセイを用いて、血清、血漿、尿、又は糞便試料中でCRPのレベルを決定することができる。同様に、Biomed Corporation(Foster City, CA)から入手可能なELISAキットを用いて、試料中のCRPレベルを検出することができる。試料中のCRPレベルを決定するための他の方法は、例えば、米国特許第6,838,250号及び第6,406,862号;並びに米国特許出願公開第20060024682号及び第20060019410号に記載されている。CRPレベルを決定するためのさらなる方法としては、例えば、免疫比濁アッセイ、迅速免疫拡散アッセイ、及び視覚的凝集アッセイが挙げられる。血清、血漿、唾液、尿、又は糞便等の試料中のSAAの存在又はレベルを決定するための好適なELISAキットは、例えば、Antigenix America Inc.(Huntington Station, NY)、Abazyme(Nedham, MA)、USCN Life(Missouri City, TX)、及び/又はU.S. Biological(Swampscott, MA)から入手可能である。

30

40

#### 【0172】

[0197]C-反応性タンパク質(CRP)は、炎症に応答して血中に見出されるタンパク質である(急性期タンパク質)。CRPは、典型的には、肝臓及び脂肪細胞(アジポサイト)により生成される。それはペントラキシンファミリーのタンパク質のメンバーである。ヒトCRPポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_000558に記載されている。ヒトCRP mRNA(コード)配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_000567に記載されている。当業者であれば、CRPはPTX1、MGC88244、及びMGC149895としても知られることを理解するであろう。

#### 【0173】

[0198]血清アミロイドA(SAA)タンパク質は、血漿中の高密度リポタンパク質(H

50

D L ) と関連するアポリポタンパク質のファミリーである。異なるアイソフォームの S A A が、異なるレベルで構成的に ( 構成的 S A A )、又は炎症刺激に応答して ( 急性期 S A A ) 発現される。これらのタンパク質は、主に肝臓により生成される。無脊椎動物及び脊椎動物を通じたこれらのタンパク質の保存は、S A A が全ての動物において高度に必須の役割を果たすことを示唆している。急性期血清アミロイド A タンパク質 ( A - S A A ) は、炎症の急性期に分泌される。ヒト S A A ポリペプチド配列は、例えば、Genbank 受託番号 NP\_\_000322 に記載されている。ヒト S A A mRNA (コード) 配列は、例えば、Genbank 受託番号 NM\_\_000331 に記載されている。当業者であれば、S A A は P I G 4、T P 5 3 I 4、M G C 1 1 1 2 1 6、及び S A A 1 としても知られることを理解するであろう。

10

#### 【0174】

##### 3. 細胞接着分子 ( I g S F C A M )

[0199] 試料中の 1 つ又は複数の免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書で用いられる用語「免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子」( I g S F C A M ) は、1 つ又は複数の免疫グロブリン様折畳みドメインを有し、細胞間接着及び / 又はシグナル伝達において機能する、細胞の表面上に位置する任意の様々なポリペプチド又はタンパク質を含む。多くの場合、I g S F C A M は膜貫通タンパク質である。I g S F C A M の非限定的な例としては、神経細胞接着分子 ( N C A M ; 例えば、N C A M - 1 2 0、N C A M - 1 2 5、N C A M - 1 4 0、N C A M - 1 4 5、N C A M - 1 8 0、N C A M - 1 8 5 等)、細胞間接着分子 ( I C A M、例えば、I C A M - 1、I C A M - 2、I C A M - 3、I C A M - 4、及び I C A M - 5)、血管細胞接着分子 - 1 ( V C A M - 1)、血小板 - 内皮細胞接着分子 - 1 ( P E C A M - 1)、L 1 細胞接着分子 ( L 1 C A M)、L 1 C A M に対する相同性を有する細胞接着分子 ( L 1 の近い相同体) ( C H L 1)、シアル酸結合 I g 様レクチン ( S I G L E C ; 例えば、S I G L E C - 1、S I G L E C - 2、S I G L E C - 3、S I G L E C - 4 等)、ネクチン ( 例えば、ネクチン - 1、ネクチン - 2、ネクチン - 3 等)、並びにネクチン様分子 ( 例えば、N e c 1 - 1、N e c 1 - 2、N e c 1 - 3、N e c 1 - 4、及び N e c 1 - 5) が挙げられる。I C A M - 1 及び / 又は V C A M - 1 の存在又はレベルが決定されることが好ましい。

20

#### 【0175】

[0200] I C A M - 1 は、白血球及び内皮細胞の膜中に低濃度で継続的に存在する膜貫通細胞接着タンパク質である。サイトカイン刺激に際して、その濃度は大きく増加する。I C A M - 1 を I L - 1 及び T N F により誘導することができ、I C A M - 1 は血管内皮、マクロファージ、及びリンパ球により発現される。I B D においては、前炎症性サイトカインは I C A M - 1 及び V C A M - 1 等の接着分子の発現を上方調節することにより炎症を引き起こす。接着分子の発現の増加はより多くのリンパ球を感染した組織に動員し、組織炎症をもたらす ( G o k e ら、J . G a s t r o e n t e r o l .、3 2 : 4 8 0 ( 1 9 9 7 ) ; 及び R i j c k e n ら、G u t、5 1 : 5 2 9 ( 2 0 0 2 ) を参照されたい)。I C A M - 1 は、細胞間接着分子 1 遺伝子 ( I C A M 1 ; E n t r e z G e n e I D : 3 3 8 3 ; G e n b a n k 受託番号 NM\_\_000201) によりコードされ、細胞間接着分子 1 前駆体ポリペプチド ( G e n b a n k 受託番号 NP\_\_000192) のプロセッシング後に生成される。

30

40

#### 【0176】

[0201] V C A M - 1 は、血管内皮へのリンパ球、単球、好酸球、及び好塩基球の接着を媒介する膜貫通細胞接着タンパク質である。サイトカインによる内皮細胞における V C A M - 1 の上方調節が、遺伝子転写の増加 ( 例えば、腫瘍壊死因子 - アルファ ( T N F ) 及びインターロイキン - 1 ( I L - 1 ) に応答する) の結果として起こる。V C A M - 1 は血管細胞接着分子 1 遺伝子 ( V C A M 1 ; E n t r e z G e n e I D : 7 4 1 2 ) によりコードされ、転写物 ( G e n b a n k 受託番号 NM\_\_001078 ( 変異体 1 ) 又は NM\_\_080682 ( 変異体 2 ) ) の示差的スプライシング、及び前駆体ポリペプチドス

50

プライスアイソフォーム (Genbank 受託番号 NP\_001069 (アイソフォーム a) 又は NP\_542413 (アイソフォーム b)) のプロセッシング後に生成される。

【0177】

[0202] 特定の場合では、IgSF CAM の存在又はレベルが、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅に基づくアッセイ等のアッセイを用いて、mRNA 発現のレベルで検出される。他の特定の場合では、IgSF CAM の存在又はレベルが、例えば、免疫アッセイ (例えば、ELISA) 又は免疫組織化学アッセイを用いて、タンパク質発現のレベルで検出される。組織試料、生検、血清、血漿、唾液、尿、又は糞便等の試料中の ICAM-1 及び / 又は VCAM-1 の存在又はレベルを決定するための好適な抗体及び / 又は ELISA キットは、例えば、Invitrogen (Camarillo, CA)、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)、及び / 又は Abcam Inc. (Cambridge, MA) から入手可能である。

10

【0178】

#### 4. S100 タンパク質

[0203] 試料中の少なくとも 1 つの S100 タンパク質の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書で用いられる用語「S100 タンパク質」は、細胞型特異的発現及び 2 つの EF ハンドカルシウム結合ドメインの存在を特徴とする低分子量酸性タンパク質ファミリーの任意のメンバーを含む。ヒトにおいては少なくとも 21 の異なる種類の S100 タンパク質が存在する。その名称は、S100 タンパク質が中性 pH で硫酸アンモニウム中に 100% 溶解するという事実由来する。ほとんどの S100 タンパク質は、非共有結合により一緒に保持された 2 つの同一のポリペプチドからなるホモ二量体である。S100 タンパク質はカルモジュリンと構造的に類似するが、それらは細胞特異的であり、環境因子に応じて異なるレベルで特定の細胞中で発現される点で異なる。S-100 タンパク質は通常は神経堤 (例えば、シュワン細胞、メラノサイト、グリア細胞)、軟骨細胞、アジポサイト、筋上皮細胞、マクロファージ、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、及びケラチノサイトに由来する細胞中に存在する。S100 タンパク質は、タンパク質リン酸化、転写因子、 $Ca^{2+}$  恒常性の調節、細胞骨格構成要素、酵素活性、細胞の増殖及び分化の動力学、並びに炎症応答等の様々な細胞内及び細胞外機能に参与している。

20

30

【0179】

[0204] カルグラニユリンは、腎臓上皮細胞及び好中球等の複数の細胞型において発現される S100 タンパク質であり、慢性炎症の条件下で浸潤性単球及び顆粒球中に豊富に存在する。カルグラニユリンの例としては、限定されるものではないが、カルグラニユリン A (S100A8 又は MRP-8 としても知られる)、カルグラニユリン B (S100A9 又は MRP-14 としても知られる)、及びカルグラニユリン C (S100A12 としても知られる) が挙げられる。

【0180】

[0205] 特定の場合では、特定の S100 タンパク質の存在又はレベルが、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅に基づくアッセイ等のアッセイを用いて、mRNA 発現のレベルで検出される。他の特定の場合では、特定の S100 タンパク質の存在又はレベルが、例えば、免疫アッセイ (例えば、ELISA) 又は免疫組織化学アッセイを用いて、タンパク質発現のレベルで検出される。血清、血漿、又は尿試料中のカルグラニユリン A (S100A8)、カルグラニユリン B (S100A9)、又はカルグラニユリン C (S100A12) 等の S100 タンパク質の存在又はレベルを決定するための好適な ELISA キットは、例えば、Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos, CA) 及び Hycult biotechnology b.v. (Uden, The Netherlands) から入手可能である。

40

【0181】

[0206] S100A8 と S100A9 との複合体であるカルプロテクチンは、好中球、単

50



球、及びケラチノサイトの細胞質ゾル中にあるカルシウム及び亜鉛結合タンパク質である。カルプロテクチンは、好中球性顆粒球及びマクロファージ中の主要タンパク質であり、これらの細胞において細胞質ゾル画分中の全タンパク質の60%も占める。したがって、それは好中球代謝回転の代用マーカーである。糞便中のその濃度は、腸粘膜の好中球浸潤の強度及び炎症の重篤度と相関する。いくつかの場合では、カルプロテクチンを、少量(50~100mg)の糞試料を用いるELISAを用いて測定することができる(例えば、John et al., Scand J Gastroenterol., 36:291~296(2001))を参照されたい)。

#### 【0182】

##### 5. 他の炎症マーカー

[0207]試料中のラクトフェリンの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。特定の場合では、ラクトフェリンの存在又はレベルが、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅に基づくアッセイ等のアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出される。他の特定の場合では、ラクトフェリンの存在又はレベルが、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)又は免疫組織化学アッセイを用いて、タンパク質発現のレベルで検出される。Calbiochem(San Diego, CA)から入手可能なラクトフェリンELISAキットを用いて、血漿、尿、気管支肺胞洗浄液、又は脳脊髄液試料中のヒトラクトフェリンを検出することができる。同様に、U.S. Biological(Swampscott, MA)から入手可能なELISAキットを用いて、血漿試料中のラクトフェリンのレベルを決定することができる。米国特許出願公開第20040137536号は、糞便試料中のラクトフェリンレベルの上昇の存在を決定するためのELISAアッセイを記載している。同様に、米国特許出願公開第20040033537号は、糞便、粘液、又は胆汁試料中の内因性ラクトフェリンの濃度を決定するためのELISAアッセイを記載している。いくつかの実施形態では、次いで、例えば、ラクトフェリンタンパク質又はその断片を用いて、試料中の抗ラクトフェリン抗体の存在又はレベルを検出することができる。

#### 【0183】

[0208]試料中のM1-PK及びM2-PK等の1つ又は複数のピルビン酸キナーゼアイソザイムの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。特定の場合では、M1-PK及び/又はM2-PKの存在又はレベルが、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅に基づくアッセイ等のアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出される。他の特定の場合では、M1-PK及び/又はM2-PKの存在又はレベルが、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)又は免疫組織化学アッセイを用いて、タンパク質発現のレベルで検出される。ピルビン酸キナーゼアイソザイムM1/M2は、ピルビン酸キナーゼ筋肉アイソザイム(PKM)、ピルビン酸キナーゼK型、細胞質ゾル甲状腺ホルモン結合タンパク質(CTHBP)、甲状腺ホルモン結合タンパク質1(THBP1)、又はopa相互作用タンパク質3(OIP3)としても知られる。

#### 【0184】

[0209]さらなる実施形態では、試料中の1つ又は複数の増殖因子の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。増殖因子の非限定的な例としては、以下で詳細に説明されるTGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3等のトランスフォーミング増殖因子(TGF)が挙げられる。

#### 【0185】

##### 6. 炎症マーカーセットの例

[0210]特定の実施形態では、少なくとも1つ又は複数(例えば、2、3、4、5、6、7つ、若しくは8つ全部、例えば、パネル若しくはアレイ等)の下記炎症マーカーを検出して(例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせで)、疾患経過の予測の補助若しくは援助、並びに/又は治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び/若しくは抗TNF薬物療法に対する治療処置の有効性のモニタリングの正確性の改善を行うことができる：(1)GM-CSF；(2)IFN- $\gamma$ ；(3)IL-1；(

10

20

30

40

50

4) IL - 2 ; ( 5 ) IL - 6 ; ( 6 ) IL - 8 ; ( 7 ) TNF - ; 及び ( 8 ) s TNF R I I。

【 0 1 8 6 】

C . 抗炎症マーカー

[0211] 特定の実施形態では、様々な抗炎症マーカーが、治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び / 又は生物製剤 ( 例えば、抗 TNF 薬 ) 等の 1 つ若しくは複数の治療剤を用いる治療処置の有効性のモニタリングによる個別治療管理のための本発明の方法において特に有用である。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法は、疾患経過の予測、適切な抗 TNF 薬物療法の選択、抗 TNF 薬物療法の最適化、抗 TNF 薬物療法と関連する毒性の低減、及び / 又は抗 TNF 薬を用いる治療処置の有効性のモニタリングを補助又は援助するために、1 つ又は複数の ( 複数の ) 抗炎症マーカー ( 例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせて ) に基づく疾患活動性プロファイル ( D A P ) の決定を用いる。

10

【 0 1 8 7 】

[0212] 抗炎症マーカーの非限定的な例としては、IL - 1 2 p 7 0 及び IL - 1 0 が挙げられる。好ましい実施形態では、IL - 1 2 p 7 0 と IL - 1 0 の両方の存在及び / 又は濃度レベルが決定される。

【 0 1 8 8 】

[0213] 特定の場合では、特定の抗炎症マーカーの存在又はレベルが、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅に基づくアッセイ等のアッセイを用いて、mRNA 発現のレベルで検出される。他の特定の場合では、特定の抗炎症マーカーの存在又はレベルが、例えば、免疫アッセイ ( 例えば、ELISA ) 又は免疫組織化学アッセイを用いて、タンパク質発現のレベルで検出される。

20

【 0 1 8 9 】

[0214] ヒト IL - 1 2 p 7 0 ポリペプチドは、IL - 1 2 タンパク質の 2 つのサブユニットから作られるヘテロ二量体である : 1 つは 4 0 k D a ( IL - 1 2 p 4 0 ) であり、1 つは 3 5 k D a ( IL - 1 2 p 3 5 ) である。血清、血漿、唾液、又は尿試料中の IL - 1 2 p 7 0 の存在又はレベルを決定するための好適な ELISA キットは、例えば、Gen - Probe Diacclone SAS ( France )、Abazyme ( N e d h a m , M A )、BD Biosciences Pharmingen ( S a n D i e g o , C A )、Cell Sciences ( C a n t o n , M A )、eBioscience ( S a n D i e g o , C A )、Invitrogen ( C a m a r i l l o , C A )、R&D Systems , I n c . ( M i n n e a p o l i s , M N )、及び Thermo Scientific Pierce Protein Research Products ( R o c k f o r d , I L ) から入手可能である。

30

【 0 1 9 0 】

[0215] ヒト IL - 1 0 ポリペプチドは、ヒトサイトカイン合成阻害因子 ( C S I F ) としても知られる抗炎症サイトカインである。血清、血漿、唾液、又は尿試料中の IL - 1 2 p 7 0 の存在又はレベルを決定するための好適な ELISA キットは、例えば、Antigenix America Inc . ( H u n t i n g t o n S t a t i o n , N Y )、BD Biosciences Pharmingen ( S a n D i e g o , C A )、Cell Sciences ( C a n t o n , M A )、eBioscience ( S a n D i e g o , C A )、Gen - Probe Diacclone SAS ( F r a n c e )、Invitrogen ( C a m a r i l l o , C A )、R&D Systems , I n c . ( M i n n e a p o l i s , M N )、及び Thermo Scientific Pierce Protein Research Products ( R o c k f o r d , I L ) から入手可能である。

40

【 0 1 9 1 】

D . 血清学 ( 免疫マーカー )

[0216] 試料 ( 例えば、血清試料 ) 中の自己抗体等の血清学的又は免疫マーカーの決定も

50

、本発明において有用である。IL - 10、TGF - 及びその他等の抗炎症分子に対する抗体は、炎症を制御する身体的能力を抑制することができ、患者におけるこれらの抗体の存在又はレベルは、抗TNF薬等の強力な免疫抑制剤の使用を指示する。粘膜治癒は、例えば、OmpC、フラゲリン(cBir - 1、Fla - A、Fla - X等)、I2、及びその他(pANCA、ASCA等)等の細菌抗原に対する抗体の抗体力価の低下をもたらし得る。

#### 【0192】

[0217]したがって、特定の態様では、本明細書に記載の方法は、疾患経過の予測、適切な抗TNF薬物療法の選択、抗TNF薬物療法の最適化、抗TNF薬物療法と関連する毒性の低減、及び/又は抗TNF薬を用いる治療処置の有効性のモニタリングを補助又は援助するために、1つ又は複数の(複数の)血清学的又は免疫マーカー(例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせて)に基づく疾患活動性プロファイル(DAP)の決定を用いる。

10

#### 【0193】

[0218]本発明における使用にとって好適な血清学的免疫マーカーの非限定的な例としては、抗好中球抗体、抗サッカロミセス・セレピシエ抗体、及び/又は他の抗微生物抗体が挙げられる。

#### 【0194】

##### 1. 抗好中球抗体

[0219]試料中のANCAレベル及び/又はpANCAの存在若しくは非存在の決定は、本発明の方法において有用である。本明細書で用いられる用語「抗好中球細胞質抗体」又は「ANCA」は、好中球の細胞質及び/又は核成分に対する抗体を含む。ANCA活性を、好中球におけるANCA染色パターンに基づいていくつかの幅広い分類に分割することができる：(1)核周囲の強調がない細胞質好中球染色(cANCA)；(2)核の外側端周辺の核周囲染色(pANCA)；(3)核の内側端周辺の核周囲染色(NSNA)；及び(4)好中球全体にわたって斑点を有する広範な染色(SAPPA)。特定の場合では、pANCA染色は、DNase処置に対して感受性である。用語「ANCA」は、限定されるものではないが、cANCA、pANCA、NSNA及びSAPPA等の全ての種類の抗好中球反応性を包含する。同様に、用語「ANCA」は、限定されるものではないが、免疫グロブリンA及びG等の全ての免疫グロブリンアイソタイプを包含する。

20

30

#### 【0195】

[0220]個体からの試料中のANCAレベルを、例えば、アルコール固定された好中球を用いる酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)等の免疫アッセイを用いて決定することができる。pANCA等の特定の分類のANCAの存在又は非存在を、例えば、間接蛍光抗体(IFA)アッセイ等の免疫組織化学アッセイを用いて決定することができる。試料中のpANCAの存在又は非存在を、DNaseで処理された固定された好中球を用いる免疫蛍光アッセイを用いて決定することが好ましい。固定された好中球に加えて、ANCAレベルを決定するのに好適なANCAに特異的な抗原としては、限定されるものではないが、未精製の、若しくは部分的に精製された好中球抽出物；ヒストンH1若しくはそのANCA反応性断片等の精製タンパク質、タンパク質断片、又は合成ペプチド(例えば、米国特許第6,074,835号を参照されたい)；ヒストンH1様抗原、ポリリン抗原、バクテロイデス(Bacteroides)抗原、又はそのANCA反応性断片(例えば、米国特許第6,033,864号を参照されたい)；分泌ベシクル抗原又はそのANCA反応性断片(例えば、米国特許出願公開第08/804,106号を参照されたい)；及び抗ANCAイディオタイプ抗体が挙げられる。当業者であれば、ANCAに特異的なさらなる抗原の使用は本発明の範囲内にあることを理解するであろう。

40

#### 【0196】

##### 2. 抗サッカロミセス・セレピシエ抗体

[0221]試料中のASCA(例えば、ASCA - IgA及び/又はASCA - IgG)レベルの決定は、本発明において有用である。本明細書で用いられる用語「抗サッカロミセ

50

ス・セレピシエ免疫グロブリンA」又は「ASCA-IgA」は、サッカロミセス・セレピシエと特異的に反応する免疫グロブリンAアイソタイプの抗体を含む。同様に、用語「抗サッカロミセス・セレピシエ免疫グロブリンG」又は「ASCA-IgG」は、サッカロミセス・セレピシエと特異的に反応する免疫グロブリンGアイソタイプの抗体を含む。  
【0197】

[0222]試料がASCA-IgA又はASCA-IgGについて陽性であるかどうかの決定を、ASCAに特異的な抗原を用いて行う。そのような抗原は、ASCA-IgA及び/又はASCA-IgGにより特異的に結合される任意の抗原又は抗原の混合物であってよい。ASCA抗体はサッカロミセス・セレピシエに結合するその能力によって最初に特徴付けられたが、当業者であれば、ASCAにより特異的に結合される抗原がASCA抗体に特異的に結合することができる限り、前記抗原をサッカロミセス・セレピシエから、又は様々な他の供給源から取得することができることを理解するであろう。したがって、試料中のASCA-IgA及び/又はASCA-IgGのレベルを決定するのに用いることができるASCAに特異的な抗原の例示的な供給源としては、限定されるものではないが、サッカロミセス又はカンジダ(*Candida*)細胞等の殺傷酵母全細胞；ホスホペプチドマンナン(PPM)等の酵母細胞壁マンナン；オリゴマンノシド等のオリゴ糖；ネオ糖脂質；抗ASCAイディオタイプ抗体等が挙げられる。サッカロミセス・セレピシエ株Su1、Su2、CBS1315、若しくはBM156、又はカンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)株VW32等の、様々な種及び株の酵母が、ASCA-IgA及び/又はASCA-IgGに特異的な抗原としての使用にとって好適である。ASCAに特異的な精製抗原及び合成抗原も、試料中のASCA-IgA及び/又はASCA-IgGのレベルの決定における使用にとって好適である。精製抗原の例としては、限定されるものではないが、オリゴマンノシド等の精製オリゴ糖抗原が挙げられる。合成抗原の例としては、限定されるものではないが、米国特許出願公開第20030105060号に記載のもの、例えば、D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man-OR、D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man-OR、及びD-Man (1-3) D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man-OR(式中、Rは水素原子、C<sub>1</sub>~C<sub>20</sub>アルキル、又は標識されていてもよい接続基である)等の合成オリゴマンノシドが挙げられる。

【0198】

[0223]酵母細胞壁マンナン、例えば、PPMの調製を、試料中のASCA-IgA及び/又はASCA-IgGのレベルの決定において用いることができる。そのような水溶性表面抗原を、例えば、オートクレーブ等の当技術分野で公知の任意の好適な抽出技術により調製するか、又は商業的に取得することができる(例えば、Lindbergら、Gut, 33:909~913(1992)を参照されたい)。PPMの酸安定画分も、本発明において有用である(Sendidら、Clin. Diag. Lab. Immunol., 3:219~226(1996))。試料中のASCAレベルの決定において有用である例示的なPPMは、S. ウバルム(*uv arum*)株ATCC#38926に由来する。

【0199】

[0224]オリゴマンノシド等の精製オリゴ糖抗原も、試料中のASCA-IgA及び/又はASCA-IgGのレベルの決定において有用であり得る。精製オリゴ糖抗原は、例えば、Faillleら、Eur. J. Microbiol. Infect. Dis., 11:438~446(1992)に記載のネオ糖脂質に好ましく変換される。当業者であれば、そのようなオリゴマンノシド抗原とASCAとの反応性を、マンノシル鎖の長さ(Froshら、Proc Natl. Acad. Sci. USA, 82:1194~1198(1985))；アノマー配置(Fukazawaら、Immunology of Fungal Disease, E. Kurstak(編)、Marcel Dekker Inc., New York, pp. 37~62(1989))；Nishikawa

ら、*Microbiol. Immunol.*、34:825~840(1990); *Poulain*ら、*Eur. J. Clin. Microbiol.*、23:46~52(1993); *Shibata*ら、*Arch. Biochem. Biophys.*、243:338~348(1985); *Trinel*ら、*Infect. Immun.*、60:3845~3851(1992); 又は結合の位置(*Kikuchi*ら、*Planta*、190:525~535(1993))を変化させることにより最適化することができることを理解する。

#### 【0200】

[0225]本発明の方法における使用のための好適なオリゴマンノシドとしては、限定されるものではないが、マンノテトラオース  $\text{Man}(1-3)\text{Man}(1-2)\text{Man}(1-2)\text{Man}$  を有するオリゴマンノシドが挙げられる。そのようなオリゴマンノシドを、例えば、*Faille*ら、上掲に記載のようにPPMから精製することができる。ASCAに特異的な例示的なネオ糖脂質を、その対応するPPMからオリゴマンノシドを遊離させた後、遊離したオリゴマンノシドを4-ヘキサデシルアニリン等にカップリングすることにより構築することができる。

10

#### 【0201】

##### 3. 抗微生物抗体

[0226]試料中の抗OmpC抗体レベルの決定も、本発明において有用である。本明細書で用いられる用語「抗外膜タンパク質C抗体」又は「抗OmpC抗体」は、例えば、国際公開第01/89361号に記載のような細菌外膜ポリンに対する抗体を含む。用語「外膜タンパク質C」又は「OmpC」とは、抗OmpC抗体と免疫反応する細菌ポリンを指す。

20

#### 【0202】

[0227]個体からの試料中に存在する抗OmpC抗体のレベルを、OmpCタンパク質又はその免疫反応性断片等のその断片を用いて決定することができる。試料中の抗OmpC抗体レベルを決定するのに有用な好適なOmpC抗原としては、限定されるものではないが、OmpCタンパク質、OmpCタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するOmpCポリペプチド、又はその免疫反応性断片等のその断片が挙げられる。本明細書で用いられる場合、OmpCポリペプチドは、一般的には、OmpCタンパク質との約50%を超える同一性、好ましくは約60%を超える同一性、より好ましくは、約70%を超える同一性、さらにより好ましくは、約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%を超えるアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドに記載し、そのアミノ酸同一性はCLUSTALW等の配列アラインメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原を、例えば、大腸菌等の腸内細菌からの精製、Genbank受託番号K00541等の核酸の組換え発現、液相若しくは固相ペプチド合成等の合成手段、又はファージディスプレイの使用により調製することができる。

30

#### 【0203】

[0228]試料中の抗I2抗体レベルの決定も、本発明において有用である。本明細書で用いられる用語「抗I2抗体」は、例えば、米国特許第6,309,643号に記載の細菌転写調節因子との相同性を有する微生物抗原に対する抗体を含む。用語「I2」とは、抗I2抗体と免疫反応する微生物抗原を指す。微生物I2タンパク質は、*C. pasteurianum*に由来する推定タンパク質4、*Mycobacterium tuberculosis*に由来するRv3557c、及びアキフェックス・エオリクス(*Aquifex aeolicus*)に由来する転写調節因子といくらかの類似性、弱い相同性を有する100アミノ酸のポリペプチドである。I2タンパク質の核酸及びタンパク質配列は、例えば、米国特許第6,309,643号に記載されている。

40

#### 【0204】

[0229]個体からの試料中に存在する抗I2抗体のレベルは、I2タンパク質又はその免疫反応性断片等のその断片を用いて決定することができる。試料中の抗I2抗体レベルを

50

決定するのに有用な好適な I 2 抗原としては、限定されるものではないが、I 2 タンパク質、I 2 タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する I 2 ポリペプチド、又はその免疫反応性断片等のその断片が挙げられる。そのような I 2 ポリペプチドは、C . パスツリアナムタンパク質 4 に対するよりも I 2 タンパク質に対するより高い配列類似性を示し、そのアイソタイプ変異体及び相同体を含む。本明細書で用いられる場合、I 2 ポリペプチドは、一般的には、天然の I 2 タンパク質との約 50 % を超える同一性、好ましくは約 60 % を超える同一性、より好ましくは、約 70 % を超える同一性、さらにより好ましくは、約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % を超えるアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記載し、そのアミノ酸同一性は C L U S T A L W 等の配列アラインメントプログラムを用いて決定される。そのような I 2 抗原を、例えば、微生物からの精製、I 2 抗原をコードする核酸の組換え発現、液相若しくは固相ペプチド合成等の合成手段、又はファージディスプレイの使用により調製することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0205】

[0230] 試料中の抗フラゲリン抗体レベルの決定も、本発明において有用である。本明細書で用いられる用語「抗フラゲリン抗体」は、例えば、国際公開第 03 / 053220 号及び米国特許出願公開第 20040043931 号に記載の細菌鞭毛のタンパク質成分に対する抗体を含む。用語「フラゲリン」は、抗フラゲリン抗体と免疫反応する細菌鞭毛タンパク質を指す。微生物フラゲリンは、それら自身を中空の円筒中に配置し、フィラメントを形成する細菌鞭毛中に見出されるタンパク質である。

#### 【0206】

[0231] 個体からの試料中に存在する抗フラゲリン抗体のレベルを、フラゲリンタンパク質又はその免疫反応性断片等のその断片を用いて決定することができる。試料中の抗フラゲリン抗体レベルの決定において有用な好適なフラゲリン抗原としては、限定されるものではないが、C b i r - 1 フラゲリン、フラゲリン X、フラゲリン A、フラゲリン B 等のフラゲリンタンパク質、その断片、及びそれらの組合せ、フラゲリンタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するフラゲリンポリペプチド、又はその免疫反応性断片等のその断片が挙げられる。本明細書で用いられる場合、フラゲリンポリペプチドは、一般的には、天然のフラゲリンタンパク質との約 50 % を超える同一性、好ましくは約 60 % を超える同一性、より好ましくは、約 70 % を超える同一性、さらにより好ましくは、約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % を超えるアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記載し、そのアミノ酸同一性は C L U S T A L W 等の配列アラインメントプログラムを用いて決定される。そのようなフラゲリン抗原を、例えば、ヘリコバクター・ビルス ( *Helicobacter Bilis* )、ヘリコバクター・ムステラ ( *Helicobacter mustelae* )、ヘリコバクター・ピロリ ( *Helicobacter pylori* )、ブチリビブリオ・フィブリソルベンス ( *Butyrivibrio fibrisolvens* )、及び盲腸中に見出される細菌等の細菌からの精製、フラゲリン抗原をコードする核酸の組換え発現、液相若しくは固相ペプチド合成等の合成手段、又はファージディスプレイの使用により調製することができる。

#### 【0207】

##### E . 細胞表面受容体

[0232] 試料中の細胞表面受容体の決定も、本発明において有用である。レミケード及びヒュミラ等の抗 T N F 薬の半減期は、高レベルの炎症を有する患者において有意に低下している。免疫グロブリン ( I g ) G 1 及び I g G 3 の高親和性受容体である C D 6 4 は、単核食細胞により主に発現される。休止中の多形核 ( P M N ) 細胞は、C D 6 4 をほとんど発現しないが、このマーカーの発現は骨髄中の骨髄前駆細胞に作用するインターフェロン及び顆粒球 - コロニー刺激因子により上方調節される。C D 6 4 と I g G 複合体との架橋は、エンドサイトーシスによる免疫複合体の内在化、オプソニン化された粒子の食作用、脱顆粒、酸化バーストの活性化、及びサイトカインの放出等のいくつかの細胞応答を示

す。

#### 【0208】

[0233]したがって、特定の態様では、本明細書に記載の方法は、疾患経過の予測、適切な抗TNF薬物療法の選択、抗TNF薬物療法の最適化、抗TNF薬物療法と関連する毒性の低減、及び／又は抗TNF薬を用いる治療処置の有効性のモニタリングを補助又は援助するために、CD64等の1つ又は複数の（複数の）細胞表面受容体（例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせて）に基づく疾患活動性プロファイル（DAP）の決定を用いる。

#### 【0209】

##### F．シグナル伝達経路

[0234]試料中のシグナル伝達経路の決定も、本発明において有用である。多形核（PMN）細胞活性化、次いで、腸粘膜（RAについては滑膜）への浸潤及び陰窩上皮をわたる移動は、IBDの鍵となる特徴と見なされている。循環から腸の疾患部分へのPMN細胞の移動がIBD患者においては10倍以上増加すると糞便インジウム111標識白血球排出により見積もられている。かくして、本明細書に記載の協調的酵素増強反応免疫アッセイ（CEER）等のアッセイを用いてシグナル伝達経路を測定することによる、血液又は組織炎症に由来するPMN細胞の活性化の測定は、炎症性疾患を理解するための理想的な手段である。

#### 【0210】

[0235]したがって、特定の態様では、本明細書に記載の方法は、疾患経過の予測、適切な抗TNF薬物療法の選択、抗TNF薬物療法の最適化、抗TNF薬物療法と関連する毒性の低減、及び／又は抗TNF薬を用いる治療処置の有効性のモニタリングを補助又は援助するために、1つ又は複数のシグナル伝達経路における1つ又は複数の（複数の）シグナル伝達分子（例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせて）に基づく疾患活動性プロファイル（DAP）の決定を用いる。好ましい実施形態では、1つ又は複数のシグナル伝達経路における1つ又は複数のシグナル伝達分子の全（例えば、発現）レベル及び／又は活性化（例えば、リン酸化）レベルが測定される。

#### 【0211】

[0236]用語「シグナル伝達分子」又は「シグナル伝達因子」は、細胞が、細胞外シグナル又は刺激を、典型的には、細胞内部での一連の生化学反応を含む応答に変換するプロセスを実行するタンパク質及び他の分子を含む。シグナル伝達分子の例としては、限定されるものではないが、EGFR（例えば、EGFR/HER1/ErbbB1、HER2/Neu/ErbbB2、HER3/ErbbB3、HER4/ErbbB4）、VEGFR1/FLT1、VEGFR2/FLK1/KDR、VEGFR3/FLT4、FLT3/FLK2、PDGFR（例えば、PDGFRA、PDGFRB）、c-KIT/SCFR、INSR（インスリン受容体）、IGF-IR、IGF-IIR、IRR（インスリン受容体関連受容体）、CSF-1R、FGFR1~4、HGFR1~2、CKK4、TRKA~C、c-MET、RON、EPHA1~8、EPHB1~6、AXL、MER、TYRO3、TIE1~2、TEK、RYK、DDR1~2、RET、c-ROS、V-カドヘリン、LTK（白血球チロシンキナーゼ）、ALK（未分化リンパ腫キナーゼ）、ROR1~2、MUSK、AATYK1~3、及びRTK106；切断型の受容体チロシンキナーゼ、例えば、アミノ末端細胞外ドメインが失われた切断型HER2受容体（例えば、p95ErbbB2（p95m）、p110、p95c、p95n等）、アミノ末端細胞外ドメインが失われた切断型cMET受容体、及びアミノ末端細胞外ドメインが失われた切断型HER3受容体；受容体チロシンキナーゼ二量体（例えば、p95HER2/HER3；p95HER2/HER2；HER1、HER2、HER3、又はHER4；HER2/HER2；HER3/HER3；HER2/HER3；HER1/HER2；HER1/HER3；HER2/HER4；HER3/HER4等を含む切断型HER3受容体）；BCR-ABL、Src、Frk、Btk、Csk、Ab1、Zap70、Fes/Fps、Fak、Jak、Ack、及びLIMK等の非受容体チロシンキナーゼ；AKT（

10

20

30

40

50

例えば、AKT1、AKT2、AKT3)、MEK(MAP2K1)、ERK2(MAPK1)、ERK1(MAPK3)、PI3K(例えば、PIK3CA(p110)、PIK3R1(p85))、PDK1、PDK2、ホスファターゼ及びテンシン相同体(PTEN)、SGK3、4E-BP1、P70S6K(例えば、p70S6キナーゼスプライス変異体I)、タンパク質チロシンホスファターゼ(例えば、PTP1B、PTPN13、BDP1等)、RAF、PLA2、MEKK、JNKK、JNK、p38、Shc(p66)、Ras(例えば、K-Ras、N-Ras、H-Ras)、Rho、Rac1、Cdc42、PLC、PKC、p53、サイクリンD1、STAT1、STAT3、ホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸(PIP2)、ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸(PIP3)、mTOR、BAD、p21、p27、ROCK、IP3、TSP-1、NOS、GSK-3、RSK1~3、JNK、c-Jun、Rb、CREB、Ki67、パキシリン、NF-kB、及びIKK等のチロシンキナーゼシグナル伝達カスケード成分；エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、アンドロゲン受容体、糖質コルチコイド受容体、ミネラルコルチコイド受容体、ビタミンA受容体、ビタミンD受容体、レチノイド受容体、甲状腺ホルモン受容体、及びオーファン受容体等の核ホルモン受容体；それぞれ、乳がん増幅-1(AIB1)及び核受容体コリプレッサー1(NCOR)等の核受容体コアクチベーター及びリプレッサー；並びにそれらの組合せが挙げられる。

#### 【0212】

[0237]用語「活性化状態」とは、特定のシグナル伝達分子が活性化されているかどうかを指す。同様に、用語「活性化レベル」とは、特定のシグナル伝達分子がどの程度活性化されているかを指す。活性化状態は、典型的には、1つ又は複数のシグナル伝達分子のリン酸化、ユビキチン化、及び/又は複合体化状態に対応する。活性化状態の非限定的な例(括弧内に列挙)としては、HER1/EGFR(EGFRvIII、リン酸化(p-)EGFR、EGFR:Shc、ユビキチン化(u-)EGFR、p-EGFRvIII)；ErbB2(p-ErbB2、p95HER2(切断型ErbB2)、p-p95HER2、ErbB2:Shc、ErbB2:PI3K、ErbB2:EGFR、ErbB2:ErbB3、ErbB2:ErbB4)；ErbB3(p-ErbB3、切断型ErbB3、ErbB3:PI3K、p-ErbB3:PI3K、ErbB3:Shc)；ErbB4(p-ErbB4、ErbB4:Shc)；c-MET(p-c-MET、切断型c-MET、c-Met:HGFR複合体)；AKT1(p-AKT1)；AKT2(p-AKT2)；AKT3(p-AKT3)；PTEN(p-PTEN)；P70S6K(p-P70S6K)；MEK(p-MEK)；ERK1(p-ERK1)；ERK2(p-ERK2)；PDK1(p-PDK1)；PDK2(p-PDK2)；SGK3(p-SGK3)；4E-BP1(p-4E-BP1)；PIK3R1(p-PIK3R1)；c-KIT(p-c-KIT)；ER(p-ER)；IGF-1R(p-IGF-1R、IGF-1R:IRS、IRS:PI3K、p-IRS、IGF-1R:PI3K)；INSR(p-INSR)；FLT3(p-FLT3)；HGFR1(p-HGFR1)；HGFR2(p-HGFR2)；RET(p-RET)；PDGFRA(p-PDGFRA)；PDGFRB(p-PDGFRB)；VEGFR1(p-VEGFR1、VEGFR1:PLC、VEGFR1:Src)；VEGFR2(p-VEGFR2、VEGFR2:PLC、VEGFR2:Src、VEGFR2:硫酸ヘパリン、VEGFR2:VE-カドヘリン)；VEGFR3(p-VEGFR3)；FGFR1(p-FGFR1)；FGFR2(p-FGFR2)；FGFR3(p-FGFR3)；FGFR4(p-FGFR4)；TIE1(p-TIE1)；TIE2(p-TIE2)；EPHA(p-EPHA)；EPHB(p-EPHB)；GSK-3(p-GSK-3)；NF-kB(p-NF-kB、NF-kB-IkBアルファ複合体及びその他)；IKB(p-IkB、p-P65:IkB)；IKK(ホスホIKK)；BAD(p-BAD、BAD:14-3-3)；mTOR(p-mTOR)；Rsk-1(p-Rsk-1)；Jnk(p-Jnk)；P38(p-P38)；STAT1(p-STAT1)；STAT3(p-

10

20

30

40

50



S T A T 3 ) ; F A K ( p - F A K ) ; R B ( p - R B ) ; K i 6 7 ; p 5 3 ( p - p 5 3 ) ; C R E B ( p - C R E B ) ; c - J u n ( p - c - J u n ) ; c - S r c ( p - c - S r c ) ; パキシリン ( p - パキシリン ) ; G R B 2 ( p - G R B 2 ) 、 S h c ( p - S h c ) 、 R a s ( p - R a s ) 、 G A B 1 ( p - G A B 1 ) 、 S H P 2 ( p - S H P 2 ) 、 G R B 2 ( p - G R B 2 ) 、 C R K L ( p - C R K L ) 、 P L C ( p - P L C ) 、 P K C ( 例えば、 p - P K C 、 p - P K C 、 p - P K C ) 、 アデュシン ( p - アデュシン ) 、 R B 1 ( p - R B 1 ) 、 及び P Y K 2 ( p - P Y K 2 ) が挙げられる。

【 0 2 1 3 】

[0238] 以下の表は、疾患経過の予測、適切な抗 T N F 薬物療法の選択、抗 T N F 薬物療法の最適化、抗 T N F 薬物療法と関連する毒性の低減、及び / 又は抗 T N F 薬を用いる治療処置の有効性のモニタリングを補助又は援助するために、試料中で総レベル及び / 又は活性化 ( 例えば、リン酸化 ) レベルを決定することができる ( 例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組み合わせて ) シグナル伝達分子のさらなる例を提供する。

10

【 表 2 - 1 】

トータル/ホスホアッセイ		ホスホ部位
VEGFR2トータル	VEGFR2ホスホ	Y951, 1212
Erkトータル	Erkホスホ	T202/Y204
Aktトータル	Aktホスホ	T308, S473
MEKトータル	MEKホスホ	S217/221
MEKトータル	MEKホスホ	S217/221
P70S6Kトータル	P70S6Kホスホ	T389 (T229)
PTENトータル		
VEGFR1 (T)	VEGFR1ホスホ	
SGKトータル	SGKホスホ	T320, S486
CRKLトータル	CRKLホスホ	Y207
SRCトータル	SRCホスホ	Y416, 527
FAKトータル	FAKホスホ	Y397
BCRトータル	BCRホスホ	
PI3K活性化	PI3K複合体化	P85 Y688
4EBP1	4EBP1ホスホ	T70, T37, T46
PRAS40	PRAS40ホスホ	T246

20

30

【表 2 - 2】

トータル/ホスホアッセイ		ホスホ部位
TIE トータル	TIE-2ホスホ	Y992 (S1119)
Jak 2 トータル	JAK 2ホスホ	Y1007/1008
STAT 5 トータル	STAT 5ホスホ	Y694/699
STAT 3 トータル	STAT 3ホスホ	Y705
FGFR1 トータル	FGFR1ホスホ	Y653, 766
FGFR2 トータル	FGFR2ホスホ	Y653
FGFR3 トータル	FGFR3ホスホ	
FGFR4 トータル	FGFR4ホスホ	
Axl トータル	Axlホスホ	Y702
BAD トータル	BADホスホ	(S112) (S136)
RSK トータル	RSKホスホ	(T359/S363)
PDK トータル	PDK1ホスホ	(S241)
JAK 1及び3 トータル	JAK 1及び3ホスホ	
TSC2 トータル	TSC2ホスホ	S664,S939
S6RP トータル	S6RPホスホ	S235/236

10

## 【 0 2 1 4 】

[0239] 協調的 近接免疫アッセイ (C O P I A) としても知られる 協調的 酵素増強反応免疫アッセイ (C E E R) は、あらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる以下の特許文献に記載されている：国際公開第 2 0 0 8 / 0 3 6 8 0 2 号；国際公開第 2 0 0 9 / 0 1 2 1 4 0 号；国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 8 6 3 7 号；国際公開第 2 0 1 0 / 1 3 2 7 2 3 号；国際公開第 2 0 1 1 / 0 0 8 9 9 0 号；及び 2 0 1 0 年 1 0 月 2 0 日に出願された国際出願 P C T / U S 2 0 1 0 / 0 5 3 3 8 6。

20

## 【 0 2 1 5 】

G . 消失速度定数

[0240] 特定の実施形態では、疾患活動性プロファイル (D A P) のマーカーは  $k_{el}$ 、又は抗 T N F 抗体 (例えば、インフリキシマブ) 等の抗体の消失速度定数である。 $k_{el}$  等の消失速度定数の決定は、治療の選択、治療の最適化、毒性の低減、及び / 又は生物製剤 (例えば、抗 T N F 薬) 等の 1 つ若しくは複数の治療剤を用いる治療処置の有効性のモニタリングによる個別治療管理のための本発明の方法において特に有用である。

30

## 【 0 2 1 6 】

[0241] 特定の場合では、微分方程式を用いて、患者からの薬物消失をモデル化することができる。特定の場合では、2 コンパートメント P K モデルを用いることができる。この場合では、静脈内ボラス投与後の中枢コンパートメントにおける薬物に関する式は、

## 【数 1】

$$\frac{dX_1}{dt} = -k_{el} \bullet X_1 - k_{12} \bullet X_1 + k_{21} \bullet X_2$$

40

である。

## 【 0 2 1 7 】

[0242]  $k_{el} \bullet X_1$  項は、中枢コンパートメントからの薬物の消失を記述するが、 $k_{12} \bullet X_1$  及び  $k_{21} \bullet X_2$  項は中枢コンパートメントと末梢コンパートメントとの間の薬物の分布を記述する。

## 【 0 2 1 8 】

H . 遺伝子マーカー

[0243] 試料中の 1 つ又は複数の遺伝子マーカーにおける対立遺伝子変異体 (例えば、S N P) の存在又は非存在 (例えば、単独で、又は他の分類に由来するバイオマーカーと組

50

み合わせて)の決定もまた、疾患経過の予測、適切な抗TNF薬物療法の選択、抗TNF薬物療法の最適化、抗TNF薬物療法と関連する毒性の低減、及び/又は抗TNF薬を用いる治療処置の有効性のモニタリングを補助又は援助するための本発明の方法において有用である。

【0219】

[0244] 遺伝子マーカーの非限定的な例としては、限定されるものではないが、表1に記載のように遺伝子型決定を行うことができる任意の炎症経路遺伝子及び対応するSNP(例えば、NOD2/CARD15遺伝子、IL12/IL23経路遺伝子等)が挙げられる。NOD2/CARD15遺伝子及び/又はIL12/IL23経路中の1つ若しくは複数の遺伝子における、少なくとも1つの対立遺伝子変異体、例えば、単一ヌクレオチド多型(SNP)の存在又は非存在を決定することが好ましい。例えば、Barrettら、Nat. Genet.、40:955~62(2008)及びWangら、Amer. J. Hum. Genet.、84:399~405(2009)を参照されたい。

【0220】

【表3-1】

表1

遺伝子	SNP
NOD2 (R702W) - SNP8	rs2066844
NOD2 (G908R) - SNP12	rs2066845
NOD2 (3030insC) - SNP13	rs5743293
ATG16L1 (T300A)	rs2241880
IL23R (R381Q)	rs11209026
DLG5	rs2165047
NOD2/CARD15	rs2066847
IL23R	rs11465804
ATG16L1	rs3828309
MST1	rs3197999
PTGER4	rs4613763
IRGM	rs11747270
TNFSF15	rs4263839
ZNF365	rs10995271
NKX2-3	rs11190140
PTPN2	rs2542151
PTPN22	rs2476601
ITLN1	rs2274910
IL12B	rs10045431
CDKAL1	rs6908425
CCR6	rs2301436
JAK2	rs10758669
C11orf30	rs7927894
LRRK2, MUC19	rs11175593
ORMDL3	rs2872507
STAT3	rs744166
ICOSLG	rs762421
GCKR	rs780094
BTNL2, SLC26A3, HLA-DRB1, HLA-DQA1	rs3763313
PUS10	rs13003464
CCL2, CCL7	rs991804
LYRM4	rs12529198
SLC22A23	rs17309827
IL18RAP	rs917997

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

IL12RB2	rs7546245
IL12RB1	rs374326
CD3D	rs3212262
CD3G	rs3212262
CD247	rs704853
JUN	rs6661505
CD3E	rs7937334
IL18R1	rs1035127
CCR5	
MAPK14	rs2237093
IL18	rs11214108
IFNG	rs10878698
MAP2K6	rs2905443
STAT4	rs1584945
IL12A	rs6800657
TYK2	rs12720356
ETV5	rs9867846
MAPK8	rs17697885
IRGM	rs13361189
IRGM	rs4958847
IRGM	rs1000113
IRGM	rs11747270
TL1A/TNFSF15	rs6478109
TL1A/TNFSF15	rs6478108
TL1A/TNFSF15	rs4263839
PTN22	rs2476601
CCR6	rs1456893
CCR6	rs2301436
5p13/PTGER4	rs1373692
5p13/PTGER4	rs4495224
5p13/PTGER4	rs7720838
5p13/PTGER4	rs4613763
ITLN1	rs2274910
ITLN1	rs9286879
ITLN1	rs11584383

10

20

30

【表 3 - 3】

IBD5/5q31	rs2188962
IBD5/5q31	rs252057
IBD5/5q31	rs10067603
GCKR	rs780094
TNFRSF6B	rs1736135
ZNF365	rs224136
ZNF365	rs10995271
C11orf30	rs7927894
LRRK2:MUC19	rs1175593
IL-27	rs8049439
TLR2	rs4696480
TLR2	rs3804099
TLR2	rs3804100
TLR2	rs5743704
TLR2	rs2405432
TLR4 (D299G)	rs4986790
TLR4 (T339I)	rs4986791
TLR4 (S360N)	rs4987233
TLR9	rs187084
TLR9	rs352140
NFC4	rs4821544
KIF21B	rs11584383
IKZF1	rs1456893
C11orf30	rs7927894
CCL2, CCL7	rs991804
ICOSLG	rs762421
TNFAIP3	rs7753394
FLJ45139	rs2836754
PTGER4	rs4613763
ECM1	rs7511649
ECM1 (T130M)	rs3737240
ECM1 (G290S)	rs13294
GLI1 (G933D)	rs2228224
GLI1 (Q1100E)	rs2228226
MDR1 (3435C>T)	rs1045642

10

20

30

【表 3 - 4】

MDR1 (A893S/T)	rs2032582
MAGI2	rs6962966
MAGI2	rs2160322
IL26	rs12815372
IFNG, IL26	rs1558744
IFNG, IL26	rs971545
IL26	rs2870946
ARPC2	rs12612347
IL10, IL19	rs3024493
IL10, IL19	rs3024505
IL23R	rs1004819
IL23R	rs2201841
IL23R	rs11465804
IL23R	rs10889677
BTLN2	rs9268480
HLA-DRB1	rs660895
MEP1	rs6920863
MEP1	rs2274658
MEP1	rs4714952
MEP1	rs1059276
PUS10	rs13003464
PUS10	rs6706689
RNF186	rs3806308
RNF186	rs1317209
RNF186	rs6426833
FCGR2A, C	rs10800309
CEP72	rs4957048
DLD, LAMB1	rs4598195
CAPN10, KIF1A	rs4676410
IL23R	rs11805303
IL23R	rs7517847
IL12B/p40	rs1368438
IL12B/p40	rs10045431
IL12B/p40	rs6556416
IL12B/p40	rs6887695

10

20

30

【表 3 - 5】

IL12B/p40	rs3212227
STAT3	rs744166
JAK2	rs10974914
JAK2	rs10758669
NKX2-3	rs6584283
NKX2-3	rs10883365
NKX2-3	rs11190140
IL18RAP	rs917997
LYRM4	rs12529198
CDKAL1	rs6908425
MAGI2	rs2160322
TNFRSF6B	rs2160322
TNFRSF6B	rs2315008
TNFRSF6B	rs4809330
PSMG1	rs2094871
PSMG1	rs2836878
PTPN2	rs2542151
MST1/3p21	rs9858542
MST1/3p21	rs3197999
SLC22A23	rs17309827
MHC	rs660895
XBP1	rs35873774
ICOSLG1	rs762421
BTLN2	rs3763313
BTLN2	rs2395185
BTLN2	rs9268480
ATG5	rs7746082
CUL2, CREM	rs17582416
CARD9	rs4077515
ORMDL3	rs2872507
ORMDL3	rs2305480

10

20

30

## 【 0 2 2 1】

[0245]本発明において有用なさらなるSNPとしては、例えば、rs2188962、rs9286879、rs11584383、rs7746082、rs1456893、rs1551398、rs17582416、rs3764147、rs1736135、rs4807569、rs7758080、及びrs8098673が挙げられる。例えば、Barrettら、Nat. Genet.、40:955~62(2008)を参照されたい。

## 【 0 2 2 2】

[0246]特定の実施形態では、1つ又は複数の下記遺伝子マーカー中の1つ又は複数の突然変異の存在又は非存在が決定される：炎症経路遺伝子、例えば、NOD2/CARD15(例えば、米国特許第7,592,437号に記載のSNP8、SNP12、及び/又はSNP13)、ATG16L1(例えば、Lakatosら、Digestive and Liver Disease、40(2008)867~873に記載のrs2241880(T300A)SNP)、IL23R(例えば、Lakatosらに記載のrs11209026(R381Q)SNP)、ヒト白血球抗原(HLA)遺伝子及び/又は例えば、Gascheら(Eur. J. Gastroenterology & Hepatology、(2003)15:599~606)に記載のサイトカイン遺伝子、並びにIBD5遺伝子座に由来するDLG5及び/又はOCTN遺伝子等の1つ又は複数の炎症マーカー中の対立遺伝子変異体(例えば、SNP)の存在又は非存在。

40

## 【 0 2 2 3】

50

## 1. NOD2 / CARD15

[0247] NOD2 / CARD15 遺伝子中の SNP 等の対立遺伝子変異体の存在又は非存在の決定は、本発明において特に有用である。本明細書で用いられる用語「NOD2 / CARD15 変異体」又は「NOD2 変異体」は、野生型 NOD2 遺伝子と比較して1つ若しくは複数の変化を含む NOD2 遺伝子のヌクレオチド配列又は野生型 NOD2 ポリペプチド配列と比較して1つ若しくは複数の変化を含む NOD2 ポリペプチドのアミノ酸配列を含む。CARD15 としても知られる NOD2 は、第16染色体上の IBD1 遺伝子座に位置し、位置的クローニング (Hugot ら、Nature、411:599~603 (2001)) 並びに位置的候補遺伝子戦略 (Ogura ら、Nature、411:603~606 (2001); Hampe ら、Lancet、357:1925~1928 (2001)) により特定された。IBD1 遺伝子座は、炎症性腸疾患に関する高い複点連鎖スコア (MLS) を有する (16q12 中のマーカー D16S411 で MLS = 5.7)。例えば、Cho ら、Inflamm. Bowel Dis.、3:186~190 (1997); Akolkar ら、Am. J. Gastroenterol.、96:1127~1132 (2001); Ohmen ら、Hum. Mol. Genet.、5:1679~1683 (1996); Parkes ら、Lancet、348:1588 (1996); Cavanaugh ら、Ann. Hum. Genet.、62:291~8 (1998); Brant ら、Gastroenterology、115:1056~1061 (1998); Curran ら、Gastroenterology、115:1066~1071 (1998); Hampe ら、Am. J. Hum. Genet.、64:808~816 (1999); 及び Annesse ら、Eur. J. Hum. Genet.、7:567~573 (1999) を参照されたい。

10

20

## 【0224】

[0248] ヒト NOD2 の mRNA (コード) 配列及びポリペプチド配列は、例えば、それぞれ Genbank 受託番号 NM\_022162 及び NP\_071445 に記載されている。さらに、NOD2 を含む、ヒト第16染色体クローン RP11-327F22 の完全配列は、例えば、Genbank 受託番号 AC007728 に記載されている。さらに、他の種に由来する NOD2 の配列は、GenBank データベース中に見出すことができる。

## 【0225】

[0249] NOD2 タンパク質は、NK-カッパB (NF- $\kappa$ B) を活性化することができるアミノ末端カスパーゼ動員ドメイン (CARD)、及びいくつかのカルボキシ末端ロイシンリッチ反復ドメインを含む (Ogura ら、J. Biol. Chem.、276:4812~4818 (2001))。NOD2 は、アポトーシス調節因子 Apaf-1 / CED-4 及びあるクラスの植物疾患耐性遺伝子産物との構造的相同性を有する (Ogura ら、上掲)。植物疾患耐性遺伝子産物と同様、NOD2 はアミノ末端エフェクタードメイン、ヌクレオチド結合ドメイン及びロイシンリッチ反復 (LRR) を有する。野生型 NOD2 は核因子 NF-カッパB を活性化し、それを細菌リポ多糖に対して応答性にする (LPS; Ogura ら、上掲; Inohara ら、J. Biol. Chem.、276:2551~2554 (2001))。NOD2 は応答性にとって必要とされるロイシンリッチ反復と共に LPS のための細胞間受容体として機能することができる。

30

40

## 【0226】

[0250] NOD2 のコード領域中の3つの単一ヌクレオチド多型での変異は以前に記載されている。R702W (「SNP8」)、G908R (「SNP12」) 及び1007fs (「SNP13」) と命名されたこれらの3つの SNP は、NOD2 遺伝子のカルボキシ末端領域中に位置する (Hugot ら、上掲)。本発明における使用にとって好適な NOD2 遺伝子中の SNP8、SNP12、及び SNP13、並びにさらなる SNP のさらなる説明を、例えば、米国特許第6,835,815号; 第6,858,391号; 及び第7,592,437号; 並びに米国特許出願公開第20030190639号、第20050054021号、及び第20070072180号に見出すことができる。

50



## 【0227】

[0251]いくつかの実施形態では、NOD2変異体は、NOD2遺伝子座のコード領域中、例えば、NOD2ポリペプチドのカルボキシ末端部分中のいくつかのロイシンリッチ反復をコードする領域内に位置する。NOD2のロイシンリッチ反復領域中に位置するそのようなNOD2変異体としては、限定されるものではないが、R702W(「SNP8」)及びG908R(「SNP12」)が挙げられる。本発明において有用なNOD2変異体はまた、野生型NOD2ポリペプチドによるNF-カッパB活性化と比較してNF-カッパBを活性化する能力が低下したNOD2ポリペプチドをコードしてもよい。非限定的な例として、NOD2変異体1007fs(「SNP13」)は、LPS刺激に応答してNF-カッパBを誘導する能力が低下した切断型NOD2ポリペプチドをもたらす(Oguraら、Nature、411:603~606(2001))。

10

## 【0228】

[0252]本発明において有用なNOD2変異体は、例えば、R702W、G908R、又は1007fsであってよい。R702W、G908R、及び1007fsは、NOD2のコード領域内に位置する。一実施形態では、本発明の方法は、R702W NOD2変異体を用いて実施される。本明細書で用いられる用語「R702W」は、NOD2遺伝子のエクソン4内の単一ヌクレオチド多型を含み、これはNOD2タンパク質のアミノ酸702をコードするトリプレット内に存在する。野生型NOD2対立遺伝子は、AC007728配列の位置138,991にシトシン(c)残基を含み、これはアミノ酸702のアルギニン( R )をコードするトリプレット内に存在する。R702W NOD2変異体は、AC007728配列の位置138,991にチミン(t)残基を含み、NOD2タンパク質のアミノ酸702のアルギニン(R)からトリプトファン(W)への置換をもたらす。したがって、このNOD2変異体は、「R702W」又は「702W」と呼ばれ、Hugo tら、上掲の以前の番号付けシステムに基づいて「R675W」と呼ぶこともできる。さらに、R702W変異体は、「SNP8」対立遺伝子又はSNP8での「2」対立遺伝子としても知られる。R702W又はSNP8のNCBI SNP ID番号は、rs2066844である。R702W NOD2変異体及び他のNOD2変異体の存在を、例えば、対立遺伝子識別アッセイ又は配列分析によってうまく検出することができる。

20

## 【0229】

[0253]本発明の方法を、G908R NOD2変異体を用いて実施することもできる。本明細書で用いられる用語「G908R」は、NOD2遺伝子のエクソン8内に単一ヌクレオチド多型を含み、これはNOD2タンパク質のアミノ酸908をコードするトリプレット内に存在する。アミノ酸908は、NOD2遺伝子のロイシンリッチ反復領域内に位置する。野生型NOD2対立遺伝子は、AC007728配列の位置128,377にグアニン(g)残基を含み、これはアミノ酸908のグリシンをコードするトリプレット内に存在する。G908R NOD2変異体は、AC007728配列の位置128,377にシトシン(c)残基を含み、NOD2タンパク質のアミノ酸908のグリシン(G)からアルギニン(R)への置換をもたらす。したがって、このNOD2変異体は「G908R」又は「908R」と呼ばれ、Hugo tら、上掲の以前の番号付けシステムに基づいて「G881R」と呼ぶこともできる。さらに、G908R変異体は、「SNP12」対立遺伝子又はSNP12での「2」対立遺伝子としても知られる。G908R SNP12のNCBI SNP ID番号は、rs2066845である。

30

40

## 【0230】

[0254]本発明の方法を、1007fs NOD2変異体を用いて実施することもできる。この変異体は、NOD2タンパク質の10番目のロイシンリッチ反復中にフレームシフトをもたらす単一ヌクレオチドの挿入、次いで、未成熟終止コドンがある。結果として生じるNOD2タンパク質の切断は、細菌リポ多糖に応答してNF-カッパBの活性化を防止すると考えられる(Oguraら、上掲)。本明細書で用いられる用語「1007fs」は、NOD2遺伝子のエクソン11内に単一ヌクレオチド多型を含み、これはNOD2タンパク質のアミノ酸1007をコードするトリプレット中に存在する。1007fs変

50

異体は、AC007728配列の位置121, 139に付加されたシトシンを含み、アミノ酸1007にフレームシフト突然変異をもたらす。したがって、このNOD2変異体は「1007fs」と呼ばれ、Hugotら、上掲の以前の番号付けシステムに基づいて「3020insC」又は「980fs」と呼ぶこともできる。さらに、1007fs NOD2変異体は、「SNP13」対立遺伝子又はSNP13での「2」対立遺伝子としても知られる。1007fs又はSNP13のNCBI SNP ID番号は、rs2066847である。

#### 【0231】

[0255]当業者であれば、特定のNOD2対立遺伝子変異体又は他の多型対立遺伝子を、例えば、PE Biosystems (Foster City, CA) から得られる商業的に利用可能な参照DNAを用いて、1347-02と命名された個体等のCentred'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) 参照個体 (Dibら、Nature、380:152~154 (1996)) と比較して都合良く定義することを認識する。さらに、SNPに関する特定の情報を、全米バイオテクノロジー情報センター (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) のdbSNPから取得することができる。

10

#### 【0232】

[0256]NOD2変異体は、NOD2遺伝子座の非コード領域中に位置してもよい。非コード領域としては、例えば、イントロン配列並びに5'及び3'非翻訳配列が挙げられる。NOD2遺伝子の非コード領域中に位置するNOD2対立遺伝子変異体の非限定的な例は、Sugimuraら、Am. J. Hum. Genet.、72:509~518 (2003) 及び米国特許出願公開第20070072180号に記載されたJW1変異体である。NOD2遺伝子の3'非翻訳領域中に位置するNOD2対立遺伝子変異体の例としては、限定されるものではないが、米国特許出願公開第20070072180号に記載されたJW15及びJW16対立遺伝子変異体が挙げられる。NOD2遺伝子の5'非翻訳領域 (例えば、プロモーター領域) 中に位置するNOD2対立遺伝子変異体の例としては、限定されるものではないが、米国特許出願公開第20070072180号に記載されたJW17及びJW18対立遺伝子変異体が挙げられる。

20

#### 【0233】

[0257]本明細書で用いられる用語「JW1対立遺伝子変異体」は、NOD2遺伝子の介在配列8 (イントロン8) のヌクレオチド158の遺伝子変異を含む。AC007728配列に関して、JW1対立遺伝子変異体は、位置128, 143に位置する。イントロン8のヌクレオチド158の遺伝子変異は、限定されるものではないが、単一のヌクレオチド置換、複数のヌクレオチド置換、又は1つ若しくは複数のヌクレオチドの欠失若しくは挿入であってよい。イントロン8の野生型配列は、位置158にシトシンを有する。非限定的な例として、JW1対立遺伝子変異体は、イントロン8のヌクレオチド158にシトシン (c) からアデニン (a)、シトシン (c) からグアニン (g)、又はシトシン (c) からチミン (t) への置換を有してもよい。一実施形態では、JW1対立遺伝子変異体は、NOD2イントロン8のヌクレオチド158でのシトシン (c) からチミン (t) への変化である。

30

40

#### 【0234】

[0258]用語「JW15対立遺伝子変異体」は、AC007728配列のヌクレオチド位置118, 790にNOD2の3'非翻訳領域中の遺伝子変異を含む。ヌクレオチド118, 790での遺伝子変異は、限定されるものではないが、単一のヌクレオチド置換、複数のヌクレオチド置換、又は1つ若しくは複数のヌクレオチドの欠失若しくは挿入であってよい。野生型配列は位置118, 790にアデニン (a) を有する。非限定的な例として、JW15対立遺伝子変異体は、ヌクレオチド118, 790にアデニン (a) からシトシン (c)、アデニン (a) からグアニン (g)、又はアデニン (a) からチミン (t) への置換を有してもよい。一実施形態では、JW15対立遺伝子変異体は、ヌクレオ

50

チド 1 1 8 , 7 9 0 でのアデニン ( a ) からシトシン ( c ) への変化である。

【 0 2 3 5 】

[0259] 本明細書で用いられる用語「 J W 1 6 対立遺伝子変異体」は、 A C 0 0 7 7 2 8 配列のヌクレオチド位置 1 1 8 , 0 3 1 に N O D 2 の 3 ' 非翻訳領域中の遺伝子変異を含む。位置 1 1 8 , 0 3 1 での遺伝子変異は、限定されるものではないが、単一のヌクレオチド置換、複数のヌクレオチド置換、又は 1 つ若しくは複数のヌクレオチドの欠失若しくは挿入であってよい。野生型配列は、位置 1 1 8 , 0 3 1 にグアニン ( g ) を有する。非限定的な例として、 J W 1 6 対立遺伝子変異体は、ヌクレオチド 1 1 8 , 0 3 1 にグアニン ( g ) からシトシン ( c ) 、グアニン ( g ) からアデニン ( a ) 、又はグアニン ( g ) からチミン ( t ) への置換を有してもよい。一実施形態では、 J W 1 6 対立遺伝子変異体は、ヌクレオチド 1 1 8 , 0 3 1 でのグアニン ( g ) からアデニン ( a ) への変化である。

10

【 0 2 3 6 】

[0260] 用語「 J W 1 7 対立遺伝子変異体」は、 A C 0 0 7 7 2 8 配列のヌクレオチド位置 1 5 4 , 6 8 8 に N O D 2 の 5 ' 非翻訳領域中の遺伝子変異を含む。ヌクレオチド 1 5 4 , 6 8 8 の遺伝子変異は、限定されるものではないが、単一のヌクレオチド置換、複数のヌクレオチド置換、又は 1 つ若しくは複数のヌクレオチドの欠失若しくは挿入であってよい。野生型配列は、位置 1 5 4 , 6 8 8 にシトシン ( c ) を有する。非限定的な例として、 J W 1 7 対立遺伝子変異体は、ヌクレオチド 1 5 4 , 6 8 8 にシトシン ( c ) からグアニン ( g ) 、シトシン ( c ) からアデニン ( a ) 、又はシトシン ( c ) からチミン ( t ) への置換を有してもよい。一実施形態では、 J W 1 7 対立遺伝子変異体は、ヌクレオチド 1 5 4 , 6 8 8 でのシトシン ( c ) からチミン ( t ) への変化である。

20

【 0 2 3 7 】

[0261] 本明細書で用いられる用語「 J W 1 8 対立遺伝子変異体」は、 A C 0 0 7 7 2 8 配列のヌクレオチド位置 1 5 4 , 4 7 1 に N O D 2 の 5 ' 非翻訳領域中の遺伝子変異を含む。ヌクレオチド 1 5 4 , 4 7 1 の遺伝子変異は、限定されるものではないが、単一のヌクレオチド置換、複数のヌクレオチド置換、又は 1 つ若しくは複数のヌクレオチドの欠失若しくは挿入であってよい。野生型配列は、位置 1 5 4 , 4 7 1 にシトシン ( c ) を有する。非限定的な例として、 J W 1 8 対立遺伝子変異体は、ヌクレオチド 1 5 4 , 4 7 1 にシトシン ( c ) からグアニン ( g ) 、シトシン ( c ) からアデニン ( a ) 、又はシトシン ( c ) からチミン ( t ) への置換を有してもよい。一実施形態では、 J W 1 8 対立遺伝子変異体は、ヌクレオチド 1 5 4 , 4 7 1 でのシトシン ( c ) からチミン ( t ) への変化である。

30

【 0 2 3 8 】

[0262] 本発明の方法を、 N O D 2 遺伝子座のコード領域又は非コード領域 (例えば、イントロン若しくはプロモーター領域) 中に位置するこれらの又は他の N O D 2 対立遺伝子変異体を用いて実施することができることが理解される。本発明の方法は、限定されるものではないが、 S N P 8、 S N P 1 2 及び S N P 1 3 対立遺伝子等の 1、2、3、4 つ以上の N O D 2 変異体、及び他のコード並びに非コード領域変異体の存在を決定するステップを含んでもよいことがさらに理解される。

40

【 0 2 3 9 】

I I . 統計分析

[0263] いくつかの態様では、本発明は、 1 つ又は複数 (例えば、 2、3、4、5、6、7 つ以上の組合せ) の生化学マーカー、血清学的マーカー、及び / 又は遺伝子マーカーに対して統計的アルゴリズムを適用して、疾患活動性プロファイル ( D A P ) を生成することにより、抗 T N F 薬物療法の選択、抗 T N F 薬物療法の最適化、抗 T N F 薬物療法と関連する毒性の低減、及び / 又は抗 T N F 薬処置の有効性のモニタリングを行うための方法を提供する。特定の実施形態では、変位値分析を、 1 つ又は複数のマーカーの存在、レベル、及び / 又は遺伝子型に適用して、抗 T N F 薬物療法を受ける患者のための処置決定をガイドする。他の実施形態では、 1 つ又は 2 つ以上の組合せの学習統計分類子システムを

50

、1つ又は複数のマーカーの存在、レベル、及び/又は遺伝子型に適用して、抗TNF薬物療法を受ける患者のための処置決定をガイドする。本発明の方法の統計分析は、抗TNF薬（例えば、増加した、減少した、又は同じ用量）と、メトトレキサート（MTX）若しくはアザチオプリン（AZA）等の1つ若しくは複数の免疫抑制剤とを組み合わせる、及び/又は現在の治療過程を変化させる（例えば、異なる抗TNF薬に切り替える）ために、初期の抗TNF薬物療法を選択するため、及び抗TNF薬のその後の用量をいつ、又はどのように調整又は改変する（例えば、増加又は減少させる）かを決定するための改善された感度、特異性、負の予測値、正の予測値及び/又は全体的正確性を有利に提供する。

#### 【0240】

[0264]用語「統計分析」又は「統計的アルゴリズム」又は「統計処理」は、変数間の関係を決定するのに用いられる任意の様々な統計方法及びモデルを含む。本発明において、変数は、対象の少なくとも1つのマーカーの存在、レベル、又は遺伝子型である。本明細書に記載の統計分析を用いて、任意の数のマーカーを分析することができる。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60以上のマーカーの存在又はレベルを、統計分析に含有させることができる。一実施形態では、ロジスティック回帰を用いる。別の実施形態では、線形回帰を用いる。さらに別の実施形態では、通常の最小二乗回帰又は非条件付ロジスティック回帰を用いる。特定の好ましい実施形態では、本発明の統計分析は、例えば、変数として、所与の集団内の1つ又は複数のマーカーの変位値測定を含む。変位値は、データの試料を、（可能な限り）等しい数の観測値を含む群に分割する「切点」のセットである。例えば、変位値は、データの試料を、（可能な限り）等しい数の観測値を含む4つの群に分割する値である。下位四分位点は、順位付けられたデータセットを通して上に向かう四分の一のデータ値である。上位四分位点は、順位付けられたデータセットを通して下に向かう四分の一のデータ値である。変位値は、データの試料を、（可能な限り）等しい数の観測値を含む5つの群に分割する値である。本発明はまた、統計分析における変数としての（連続変数とちょうど同様に）、マーカーレベルのパーセンタイル範囲（例えば、三分位数、四分位数、五分位数等）、又はその累積指数（例えば、四分位数合計スコア（QSS）を得るためのマーカーレベルの四分位数合計）の使用を含んでもよい。

#### 【0241】

[0265]特定の実施形態では、本発明は、四分位数分析を用いて対象の1つ又は複数のマーカーの存在、レベル（例えば、規模）、及び/又は遺伝子型を検出又は決定することを含む。この種類の統計分析においては、対象のマーカーのレベルは、試料の参照データベースに関して第1四分位数（<25%）、第2四分位数（25~50%）、第3四分位数（51%~<75%）、又は第4四分位数（75~100%）中にあると定義される。これらの四分位数に、それぞれ、1、2、3及び4の四分位数スコアを割り当てることができる。特定の場合では、試料中で検出されないマーカーは、0又は1の四分位数スコアを割り当てられるが、試料中で検出される（例えば、存在する）マーカー（例えば、試料がマーカーについて陽性である）は、4の四分位数スコアを割り当てられる。いくつかの実施形態では、四分位数1は、最も低いマーカーレベルを有する試料を表すが、四分位数4は最も高いマーカーレベルを有する試料を表す。他の実施形態では、四分位数1は特定のマーカー遺伝子型（例えば、野生型対立遺伝子）を有する試料を表すが、四分位数4は別の特定のマーカー遺伝子型（例えば、対立遺伝子変異体）を有する試料を表す。試料の参照データベースは、例えば、IBD等のTNFにより媒介される疾患又は障害を有する広範囲の患者を含んでもよい。そのようなデータベースから、四分位数カットオフを確立することができる。本発明における使用にとって好適な四分位数分析の非限定的な例は、例えば、Mowら、Gastroenterology、126:414~24（2004）に記載されている。

#### 【0242】

[0266]いくつかの実施形態では、本発明の統計分析は、1つ又は複数の学習統計分類子システムを含む。本明細書で用いられる用語「学習統計分類子システム」は、複合データセット（例えば、対象のマーカのパネル）に適合させ、そのようなデータセットに基づいて決定を行うことができる機械学習アルゴリズム技術を含む。いくつかの実施形態では、決定/分類ツリー（例えば、ランダムフォレスト（RF）又は分類及び回帰ツリー（C&RT））等の単一の学習統計分類子システムが用いられる。他の実施形態では、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上の学習統計分類子システムの組合せが、好ましくは直列に用いられる。学習統計分類子システムの例としては、限定されるものではないが、誘導的学習を用いるもの（例えば、ランダムフォレスト、分類及び回帰ツリー（C&RT）、増幅ツリー等の決定/分類ツリー）、確率的近似（Probably Approximately Correct（PAC））学習、コネクショニスト学習（例えば、ニューラルネットワーク（NN）、人工ニューラルネットワーク（ANN）、ニューラルファジーネットワーク（NFN）、ネットワーク構造、コックス比例ハザードモデル（CPHM）、多層パーセプトロン等のパーセプトロン、多層フィードフォワードネットワーク、ニューラルネットワークの適用、信念ネットワーク中のベイジアン学習等）、強化学習（例えば、ナイーブ学習、適応動的学習、及び時間差学習等の既知の環境における受動的学習、未知の環境における受動的学習、未知の環境における能動的学習、学習行為 - 価値関数、強化学習の適用等）、並びに遺伝子アルゴリズム及び進化プログラミングが挙げられる。他の学習統計分類子システムとしては、サポートベクターマシン（例えば、Kernel法）、多変量適応回帰スプライン（MARS）、Levenberg-Marquardtアルゴリズム、Gauss-Newtonアルゴリズム、ガウス分布、勾配降下アルゴリズム、及び学習ベクター量子化（LVQ）の混合が挙げられる。

#### 【0243】

[0267]ランダムフォレストは、Leo Breiman及びAdele Cutlerにより開発されたアルゴリズムを用いて構築された学習統計分類子システムである。ランダムフォレストは、多数の個々の決定ツリーを使用し、個々のツリーにより決定されたクラスの様式（すなわち、最も頻繁に生じる）を選択することによりクラスを決定する。ランダムフォレスト分析は、例えば、Salford Systems（San Diego、CA）から入手可能なRandomForestソフトウェアを用いて実施することができる。ランダムフォレストの説明については、例えば、Breiman、Machine Learning、45：5～32（2001）；及び[http://stat-www.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/cc\\_home.htm](http://stat-www.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/cc_home.htm)を参照されたい。

#### 【0244】

[0268]分類及び回帰ツリーは、固定古典的回帰モデルに代わるコンピュータ集約型であり、典型的には、1つ又は複数の予測因子に基づいて対象の分類又は連続応答の最良のモデルを決定するために典型的に用いられる。分類及び回帰ツリー分析を、例えば、Salford Systemsから入手可能なC&RTソフトウェア又はStatSoft, Inc.（Tulsa、OK）から入手可能なStatisticaデータ分析ソフトウェアを用いて実施することができる。分類及び回帰ツリーの説明は、例えば、Breimanら、「Classification and Regression Trees」、Chapman and Hall、New York（1984）；及びSteinbergら、「CART：Tree-Structured Non-Parametric Data Analysis」、Salford Systems、San Diego（1995）に見出される。

#### 【0245】

[0269]ニューラルネットワークは、計算のためのコネクショニスト手法に基づく情報処理のための数学的又は計算モデルを用いる人工ニューロンの相互接続された群である。典型的には、ニューラルネットワークは、ネットワークを通じて流動する外部又は内部情報に基づいてその構造を変化させる適応システムである。ニューラルネットワークの特定例

としては、パーセプトロン、単層パーセプトロン、多層パーセプトロン、逆伝播ネットワーク、ADALINEネットワーク、MADALINEネットワーク、Learnmatrixネットワーク、放射基底関数(RBF)ネットワーク、及び自己組織化マップ又はKohonen自己組織化ネットワーク等のフィードフォワードニューラルネットワーク；単純再帰ネットワーク及びHopfieldネットワーク等の再帰ニューラルネットワーク；Boltzmannマシン等の確率論的ニューラルネットワーク；コミッティマシン(committee of machine)及び連想型ニューラルネットワーク等のモジュラーニューラルネットワーク；並びに即時訓練型ニューラルネットワーク、スパイクニューラルネットワーク、動的ニューラルネットワーク、及びカスケードニューラルネットワーク等の他の種類のネットワークが挙げられる。ニューラルネットワーク分析を、例えば、StatSoft, Inc. から入手可能なStatisticaデータ分析ソフトウェアを用いて実施することができる。ニューラルネットワークの説明については、例えば、Freemanら、「Neural Networks: Algorithms, Applications and Programming Techniques」、Addison-Wesley Publishing Company (1991)；Zadeh、Information and Control、8：338～353 (1965)；Zadeh、「IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics」、3：28～44 (1973)；Gershoら、「Vector Quantization and Signal Compression」、Kluwer Academic Publishers、Boston、Dordrecht、London (1992)；及びHassoun、「Fundamentals of Artificial Neural Networks」、MIT Press、Cambridge、Massachusetts、London (1995)を参照されたい。

#### 【0246】

[0270] サポートベクターマシンは、分類及び回帰のために用いられる関連する教師あり学習技術のセットであり、例えば、Cristianiniら、「An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-Based Learning Methods」、Cambridge University Press (2000)に記載されている。サポートベクターマシン分析を、例えば、Thorsten Joachims (Cornell University)により開発されたSVM<sup>light</sup>ソフトウェアを用いるか、又はChih-Chung Chang及びChih-Jen Lin (National Taiwan University)により開発されたLIBSVMソフトウェアを用いて実施することができる。

#### 【0247】

[0271] 本明細書に記載の様々な統計方法及びモデルを、健康な個体及び、例えば、IBD (例えば、CD及び/又はUC)等のTNF 媒介性疾患又は障害を有する患者からの試料 (例えば、血清学的及び/又は遺伝的試料)のコホートを用いて訓練及び試験することができる。例えば、米国特許第6,218,129号に記載された生検、大腸内視鏡検査、又は免疫アッセイを用いて、医師、好ましくは、胃腸科専門医により、IBD又はその臨床サブタイプを有すると診断された患者からの試料は、本発明の統計方法及びモデルの訓練及び試験における使用にとって好適である。IBDと診断された患者からの試料を、例えば、米国特許第5,750,355号及び第5,830,675号に記載された免疫アッセイを用いてクローン病又は潰瘍性大腸炎中で階層化することもできる。健康な個体からの試料は、IBD試料として特定されなかったものを含んでもよい。当業者であれば、本発明の統計方法及びモデルの訓練及び試験において用いることができる患者試料のコホートを取得するためのさらなる技術及び診断基準を知っているであろう。

#### 【0248】

[0272] 本明細書で用いられる用語「感度」は、抗TNF薬物療法の選択、抗TNF薬物

療法の最適化、抗TNF薬物療法と関連する毒性の低減、及び／又は抗TNF薬物処置の有効性のモニタリングを行うための本発明の方法が、試料が陽性である、例えば、抗TNF薬物療法に対する予測された治療応答又は抗TNF薬物療法と関連する毒性を有する場合に正の結果を与える確率を含む。感度は、真の陽性及び偽陰性の合計で除算した真の陽性の結果の数として算出される。感度は、本質的には本発明が、抗TNF薬物療法に対する予測された治療応答又は抗TNF薬物療法と関連する毒性を有する者を、予測された治療応答又は毒性を有さない者からどのようによく正確に特定するかの尺度である。感度が少なくとも約60%であるように統計方法及びモデルを選択することができ、例えば、少なくとも約65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%であってよい。

10

#### 【0249】

[0273]用語「特異性」は、抗TNF薬物療法の選択、抗TNF薬物療法の最適化、抗TNF薬物療法と関連する毒性の低減、及び／又は抗TNF薬物処置の有効性のモニタリングを行うための本発明の方法が、試料が陽性ではない、例えば、抗TNF薬物療法に対する予測された治療応答又は抗TNF薬物療法と関連する毒性を有さない場合に陰性の結果を与える確率を含む。特異性は、真の陰性及び偽陽性の合計で除算した真の陰性の結果の数として算出される。特異性は、本質的には、本発明が、抗TNF薬物療法に対する予測された治療応答又は抗TNF薬物療法と関連する毒性を有さない者を、予測された治療応答又は毒性を有する者からどのようによく除外するかの尺度である。特異性が少なくとも約60%であるように統計方法及びモデルを選択することができ、例えば、少なくとも約65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%であってよい。

20

#### 【0250】

[0274]用語「負の予測値」又は「NPV」は、抗TNF薬物療法に対する予測された治療応答又は抗TNF薬物療法と関連する毒性を有しないと特定された個体が、実際に予測された治療応答又は毒性を有さない確率を含む。負の予測値を、真の陰性及び偽陰性の合計により除算した真の陰性の数として算出することができる。負の予測値は、本発明の方法の特徴並びに分析される集団中の疾患の有病率により決定される。疾患有病率を有する集団中の負の予測値が約70%～約99%の範囲にあるように統計方法及びモデルを選択することができ、例えば、少なくとも約70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%であってよい。

30

#### 【0251】

[0275]用語「正の予測値」又は「PPV」は、抗TNF薬物療法に対する予測された治療応答又は抗TNF薬物療法と関連する毒性を有すると特定された個体が、実際に予測された治療応答又は毒性を有する確率を含む。正の予測値を、真の陽性及び偽陽性の合計により除算した真の陽性の数として算出することができる。正の予測値は、本発明の方法の特徴並びに分析される集団中の疾患の有病率により決定される。疾患有病率を有する集団中の正の予測値が約70%～約99%の範囲にあるように統計方法及びモデルを選択することができ、例えば、少なくとも約70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%であってよい。

40

#### 【0252】

[0276]負及び正の予測値を含む予測値は、分析される集団中の疾患の有病率により影響される。本発明においては、例えば、IBD等のTNF媒介性疾患又は障害の特定の有

50

病率を有する臨床集団に関する所望の臨床パラメータを生成するように統計方法及びモデルを選択することができる。非限定的な例として、最大で約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、又は 70 % の I B D 有病率のために統計方法及びモデルを選択することができ、例えば、胃腸科専門医のオフィス又は一般開業医のオフィス等の医師のオフィスにおいて見ることができる。

#### 【0253】

[0277] 本明細書で用いられる用語「全体的一致」又は「全体的正確性」は、本発明の方法が抗 T N F 薬物療法の選択、抗 T N F 薬物療法の最適化、抗 T N F 薬物療法と関連する毒性の低減、及び / 又は抗 T N F 薬物処置の有効性のモニタリングを行う正確性を含む。全体的正確性は、試料結果の総数で除算した真の陽性及び真の陰性の合計として算出され、分析される集団中の疾患の有病率により影響される。例えば、疾患有病率を有する患者集団中の全体的正確性が少なくとも約 40 % であるように統計方法及びモデルを選択することができ、例えば、少なくとも約 40 %、41 %、42 %、43 %、44 %、45 %、46 %、47 %、48 %、49 %、50 %、51 %、52 %、53 %、54 %、55 %、56 %、57 %、58 %、59 %、60 %、61 %、62 %、63 %、64 %、65 %、66 %、67 %、68 %、69 %、70 %、71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % であってよい。

10

20

#### 【実施例】

#### 【0254】

##### I I I . 実施例

[0278] 具体的な実施例によって、本発明をさらに詳細に記載する。以下の実施例は例示目的で提供し、何らかの形式で本発明を限定することを目的とするものではない。当業者は、ほぼ同じ結果をもたらすために変更又は改変することができる、様々なノンクリティカルパラメータを容易に認識するであろう。

#### 【0255】

[0279] 2011 年 2 月 17 日に出願された米国仮出願第 61 / 444,097 号、及び 2010 年 10 月 26 日に出願された P C T 出願 P C T / U S 2010 / 054125 号中で言及された実施例は、あらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0256】

実施例 1 抗 T N F 生物製剤に対するレスポonder とノンレスポonder を特定するための疾患活動性プロファイリング。

[0280] この実施例は、抗 T N F 薬物療法に対するレスポonder 又はノンレスポonder として被験体を特定するために本発明の疾患活動性プロファイリングを使用して、被験体における治療を最適化する、又は治療有効性をモニターするための、T N F 媒介性疾患の個別治療管理に関する方法を記載する。

#### 【0257】

[0281] 図 1 は、創傷進行が炎症、増殖、及び再構成期に分かれる、例示的な I B D 創傷応答プロファイルを示す。非限定的な例として、試験した炎症応答期マーカーには、レミケード（インフリキシマブ）等の抗 T N F 薬物、H A C A 等の抗薬物抗体（A D A）、G M - C S F、I F N - 、I L - 1、I L - 2、I L - 6、I L - 8、T N F - 、及び s T N F R I I 等の炎症マーカー、並びに I L - 12 p 70 及び I L - 10 等の抗炎症マーカーがある。試験した増殖応答期マーカーの非限定的な例には、A R E G、E R E G、H B - E G F、H G F、N R G 1、N R G 2、N R G 3、N R G 4、B T C、E G F、I G F、T G F - 、V E G F - A、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、F G F 1、F G F 2、F G F 7、F G F 9、及び T W E A K 等の（粘膜治癒マーカーとも呼ばれる）組織修復 / 再構成因子がある。

40

50



## 【 0 2 5 8 】

[0282] C O M M I T (メトトレキサート・インフリキシマブ併用維持試験) 研究を実施して、クローン病 (C D) の長期処置に関する、メトトレキサートと併用したレミケード (インフリキシマブ) の安全性と有効性を評価した。処置の成功は、第 1 4 週での臨床的寛解状態 (すなわち、プレドニソン療法の完全な中断及び 1 5 0 未満のクローン病活動性指数 (C D A I) スコア) である被験体の割合、及び研究第 1 4 週と第 5 0 週の間の臨床的寛解の維持によって定義した。特に、C D A I による臨床的評価を第 0 週、第 4 6 週、第 5 0 週、及び第 6 6 週で実施した。1 5 0 を超える C D A I を有する被験体はノンレスポonderとして特定した。C O M M I T 研究に関する他の情報は、その開示があらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00132899> で与える。

10

## 【 0 2 5 9 】

[0283] 疾患活動性プロファイリングを、C O M M I T 研究において数人の被験体を実施した。特に、以下のマーカーのアレイを、レミケード (インフリキシマブ) 単独、又はレミケード (インフリキシマブ) とメトトレキサートの併用、( 1 ) レミケード (インフリキシマブ) と H A C A ; ( 2 ) 炎症マーカー G M - C S F 、 I F N - 、 I L - 1 、 I L - 2 、 I L - 6 、 I L - 8 、 T N F - 、及び s T N F R I I ; ( 3 ) 抗炎症マーカー I L - 1 2 p 7 0 及び I L - 1 0 ; 並びに ( 4 ) 組織修復マーカー E G F 、 b F G F 、 P I G F 、 s F l t 1 、及び V E G F での処置中に様々な時点において測定した。レスポonderとノンレスポonderのプロファイルの間の比較を与える、7 人のこれらの被験体に関する疾患活動性プロファイリング ( D A P ) を本明細書中に示す。これらの患者の実施例は、炎症及び組織修復に関するマーカーは C D 活性患者の選択においてインフリキシマブ及び H A C A レベルと関連があったこと、特定のマーカーは疾患活動性プロファイルを予想することができること、及び疾患活動性プロファイリングは患者の療法をさらにガイドし、粘膜治癒マーカーを同定することを示す。さらに、これらの患者の実施例は、I L - 1 2 p 7 0 及び I L - 1 0 等の抗炎症性サイトカインが増大すると常に、患者は応答し、サイトカインが粘膜治癒のマーカーであり得ること、及び組織修復マーカー ( T R M ) がノンレスポonderにおいて増大することを示す。

20

## 【 0 2 6 0 】

【表 4】

個別疾患活動性プロファイリングの表:IFX、HACA、炎症マーカー、抗炎症マーカー、及び粘膜治癒マーカーのレベル

患者のID番号	処置レジメン	CDAI	臨床的定義	IFX	HACA	炎症マーカー	抗炎症マーカー	粘膜治癒マーカー
12209	IFX及びMTX	時間0でのCDAIは202であった。 第26週で、CDAIは183であった。 第66週で、CDAIは152であった。	ノンレスポonder	トラフ時(第14週)低い	HACA+低い	高い	低い	中程度
11010	IFX	時間0でのCDAIは262であった。 第46週で、CDAIは85であった。	レスポonder	トラフ時(第14週)高い	HACA-ND	低い	高い	高い
10118	IFX	時間0でのCDAIは251であった。 第46週で、CDAIは109であった。	レスポonder	トラフ時(第14週)高い	HACA-ND	中程度	高い	高い
11602	IFX及びMTX	時間0でのCDAIは217であった。 第46週で、CDAIは68であった。	レスポonder	トラフ時(第14週)高い	HACA-ND	低い	高い	高い
11505	IFX	時間0でのCDAIは272であった。 第46週で、CDAIは145であった。 第66週で、CDAIは195であった	ノンレスポonder	トラフ時(第14週)非常に低い	HACA++高い	中程度	低い	高い
11601	IFX及びMTX	時間0でのCDAIは207であった。 第46週で、CDAIは0であった。	レスポonder	トラフ時(第14週)高い	HACA+低い	高い	高い	中程度

IFX=インフリキシマブ。MTX=メトトレキサート。ND=検出不能なレベルのHACA。

## 【0261】

患者12209：インフリキシマブ+メトトレキサート(MTX)で処置。

[0284]時間0でのCDAIは202であった。第46週で、CDAIは183であった(「デルタ19」又は $202 - 19 = 183$ )。第66週で、CDAIは152であった(「デルタ50」又は $202 - 50 = 152$ )。ノンレスポonderとして臨床的に定義した。疾患活動性プロファイル(DAP)によってこの患者を正確に特定した。特にDAPは、この患者が、トラフ時(「T」；第14週)の低いインフリキシマブ(IFX)レベル、検出可能な濃度レベルHACAの存在(「HACA+」)、高い炎症マーカーレベル、低い抗炎症マーカーレベル、及び中程度の組織修復マーカー(TRM)レベルを有していたことを示した。別の処置選択肢は、例えば、IFXの用量の増大、アダリムマブ(ヒュミラ(商標))を用いた療法への変更、アザチオプリン(AZA)等の異なる免疫抑制剤を用いた処置、及び/又は異なる機構を標的とする薬物(例えば、フォントリズマブ等の抗INF抗体)を用いた療法への変更を含むことができると考えられる。

## 【0262】

患者11010：インフリキシマブで処置。

[0285]第0週でのCDAIは262であった。第46週で、CDAIは85であった(「デルタ177」又は $262 - 177 = 85$ )。臨床的レスポonder。疾患活動性プロファイル(DAP)によってこの患者を正確に特定した。特にDAPは、この患者が、トラフ時(「T」；第14週)の高いインフリキシマブ(IFX)レベル、検出不能なレベルのHACA(「HACA--」)、低い炎症マーカーレベル、高い抗炎症マーカーレベル、及び高い組織修復マーカー(TRM)レベルを有していたことを示した。例えば、抗炎

症性サイトカインIL-12p70及びIL-10は高かった。この実施例中の患者に関して示すように、抗炎症性サイトカインが高いと常に、患者はおそらく粘膜治癒に最も応答した。さらに、bFGF濃度レベルは全ての時点で低かったが、他のTRMレベルは高く、組織修復が既に起こったように組織成長が弱まったことを示した。

#### 【0263】

患者10118：インフリキシマブで処置。

[0286]第0週でのCDAIは251であった。第46週で、CDAIは109であった(「デルタ142」又は $251 - 142 = 109$ )。臨床的レスポナー。疾患活動性プロファイル(DAP)によってこの患者を正確に特定した。特にDAPは、この患者が、トラフ時(「T」；第14週)の高いインフリキシマブ(IFX)レベル、検出不能なレベルのHACA(「HACA - -」)、中程度の炎症マーカーレベル、高い抗炎症マーカーレベル、及び高い組織修復マーカー(TRM)レベルを有していたことを示した。例えば、抗炎症性サイトカインIL-12p70及びIL-10は高かった。再度、この実施例中の患者に関して示すように、抗炎症性サイトカインが高いと常に、患者はおそらく粘膜治癒に最も応答した。さらに、bFGF濃度レベルは全ての時点で低く、療法の過程にわたり一定状態であったが、他のTRMレベルは高く、組織修復が既に起こったように組織成長が弱まったことを示した。

10

#### 【0264】

患者11602：インフリキシマブ+メトトレキサート(MTX)で処置。

[0287]第0週でのCDAIは217であった。第46週で、CDAIは68であった(「デルタ149」又は $217 - 149 = 68$ )。臨床的レスポナー。疾患活動性プロファイル(DAP)によってこの患者を正確に特定した。特にDAPは、この患者が、トラフ時(「T」；第14週)の高いインフリキシマブ(IFX)レベル、検出不能なレベルのHACA(「HACA - -」)、低い炎症マーカーレベル、高い抗炎症マーカーレベル、及び高い組織修復マーカー(TRM)レベルを有していたことを示した。例えば、抗炎症性サイトカインIL-12p70及びIL-10は高かった。再度、この実施例中の患者に関して示すように、抗炎症性サイトカインが高いと常に、患者はおそらく粘膜治癒に最も応答した。さらに、他のTRMレベルと比較して、bFGF濃度レベルは全ての時点で低く、組織修復が既に起こったように組織成長が弱まったことを示した。

20

#### 【0265】

患者11505：インフリキシマブで処置。

[0288]時間0でのCDAIは272であった。第46週で、CDAIは145であった(「デルタ127」又は $272 - 127 = 145$ )。第66週で、CDAIは195であった。ノンレスポナーとして臨床的に定義した。疾患活動性プロファイル(DAP)によってこの患者を正確に特定した。特にDAPは、この患者が、トラフ時(「T」；第14週)の非常に低いインフリキシマブ(IFX)レベル、高濃度レベルのHACA(「HACA++」)、中程度の炎症マーカーレベル、低い抗炎症マーカーレベル、及び高い組織修復マーカー(TRM)レベルを有していたことを示した。ノンレスポナーでは、bFGF等のTRMのレベルが増大し、一方レスポナーでは、それらは減少するか又は変更なしのいずれかである。別の処置選択肢は、例えば、IFXの用量の増大、アダリムマブ(ヒュミラ(商標))を用いた療法への変更、MTX又はアザチオプリン(AZA)等の免疫抑制剤を用いた処置、及び/又は異なる機構を標的とする薬物(例えば、フォントリズマブ等の抗INF抗体)を用いた療法への変更を含むことができると考えられる。

30

40

#### 【0266】

患者11601：インフリキシマブ+メトトレキサート(MTX)で処置。

[0289]第0週でのCDAIは207であった。第46週で、CDAIは0であった(「デルタ207」又は $207 - 207 = 0$ )。患者はレスポナーとして臨床的に定義した。疾患活動性プロファイル(DAP)によってこの患者を正確に特定した。特にDAPは、この患者が、トラフ時(「T」；第14週)の高いインフリキシマブ(IFX)レベル、低いHACAレベル(「HACA+」)、高い炎症マーカーレベル、高い抗炎症マーカー

50

ーレベル、及び中程度の組織修復マーカー（TRM）レベルを有していたことを示した。例えば、抗炎症性サイトカインIL-12p70及びIL-10は高かった。再度、この実施例中の患者に関して示すように、抗炎症性サイトカインが高いと常に、患者はおそらく粘膜治癒に最も応答し、抗炎症マーカーが非常に重要であることを明らかに示す。多量の炎症の存在は合併症が原因であり得る。

#### 【0267】

患者10113：インフリキシマブで処置。

[0290]時間0でのCDAIは150であった。第46週で、CDAIは96であった（「デルタ54」又は $150 - 54 = 96$ ）。訪問（visit）10（「V10」）でCDAIは154であり、訪問11（「V11」）ではCDAIは169であった。したがって、CDAIは150で始まり、150近辺に留まった。患者はノンレスポnderとして臨床的に定義した。疾患活動性プロファイル（DAP）によってこの患者を正確に特定した。特にDAPは、この患者が、トラフ時（「T」；第14週）の低いインフリキシマブ（IFX）レベル、検出可能な濃度レベルのHACA（「HACA+」）、中程度の炎症マーカーレベル、低い抗炎症マーカーレベル、及び中程度の組織修復マーカー（TRM）レベルを有していたことを示した。再度、ノンレスポnderではTRMのレベルが増大し、一方レスポnderでは、それらは減少するか又は変更なしのいずれかである。別の処置選択肢は、例えば、IFXの用量の増大、アダリムマブ（ヒュミラ（商標））を用いた療法への変更、MTX又はアザチオプリン等の免疫抑制剤を用いた処置、及び/又は異なる機構を標的とする薬物（例えば、フォントリズマブ等の抗INF 抗体）を用いた療法への変更を含むことができると考えられる。

10

20

#### 【0268】

実施例2 疾患活動性プロファイリングのモデル化。

[0291]本発明の疾患活動性プロファイル（DAP）の例示的な3次元グラフレンダリングは、x軸上のマーカーのアレイに存在するそれぞれの異なるマーカー、y軸上の標準化マーカーレベル、及びz軸上の時間（例えば、試料を採取しマーカーレベルを測定する時点）を含む。（本明細書では個別疾患プロファイルとも呼ぶ）本発明のDAPの例示的なトポグラフィックマップは、y軸上のマーカーのアレイに存在するそれぞれの異なるマーカー、x軸上の時間（例えば、試料を採取しマーカーレベルを測定する時点）、及びグレイスケールでの相対マーカーレベルを含む。

30

#### 【0269】

[0292]本明細書に記載する3Dモデルは処置の新規なパラダイムとなるが、これは個別に用量調節を行うようにそれらが個別で滴定可能であるからである。例えば、炎症、増殖、及び再構成期マーカー等のマーカーを含めたマーカーパネルによって、例えばCD又はRAを治療するための抗TNF薬物療法等の療法に関して、患者に最も良い治療過程をリアルタイムで決定することができる。結果として、マーカーのパネル又はアレイにおけるマーカーの時間過程と濃度レベルの両方が、療法調節、並びに療法を個別化及び個人化するためのモニター、並びに最適用量又は用量調節の決定に重要である。特定の場合では、経時的な1つ又は複数のマーカーレベルの変化は、療法調節及びモニターに関する重要な考慮事項である。特定の実施形態では、アレイ又はパネル中のマーカーのセット又はサブセットに関する望ましい治療範囲は、3Dグラフ又はトポグラフィックマップにおいて定義した範囲内にある。

40

#### 【0270】

実施例3 インフリキシマブの未検出

[0293]この実施例は、「タイムトゥイベント」に関するモデルを表す。言い換えると、この実施例はコックス比例ハザードモデル（CPHM）を使用して、「事象」が生じるのに要する時間及びこのような事象が発生するリスクをモデル化する。このモデルは、応答変数であるY軸上の「タイムトゥイベント」、及びX軸上の「予測変数」による回帰分析である。この実施例では、インフリキシマブの未検出（すなわち、検出閾値より下落するインフリキシマブの濃度）が事象であり、このような事象の考えられる予測因子は、バイ

50

オマーカー、例えばCRP、IL-2、VEGF等、及び又は例えば年齢、MTX処置、性別等の臨床情報である。

【0271】

[0294]この実施例では、「ハザード」は、移動度シフトアッセイ等の分析アッセイによってインフリキシマブが検出されないリスク（例えば、未検出）である。例えば図11は、その処置過程の間の様々な患者に関するインフリキシマブ濃度レベルを示す。この実施例では、インフリキシマブの濃度が所定の検出閾値より下落するとき、事象が発生する。特定の場合では、CPHMを使用して事象が発生するリスク（インフリキシマブの未検出）を予測している。この実施例は、このようなリスクの発生を示すバイオマーカーも同定する。

10

【0272】

[0295]CPHMを使用して、移動度シフトアッセイによってインフリキシマブが検出可能でなくなるまでの時間をモデル化する。このモデルでは、所定の閾値は $0.67 \mu\text{g/mL}$ であり、これは参照範囲の下限である。時間「t」でインフリキシマブ濃度レベルが閾値未満である場合、したがって時間「t」で事象が発生している。図12中では、事象までのそれらの時間によって患者をランク付けした。処置中の異なる地点で様々な患者に関して事象が発生し、それは小球で示す。

【0273】

[0296]初期モデルでは、移動度シフトアッセイによりインフリキシマブ未検出のハザード又はリスクを予測するために使用した、様々なマーカー及び臨床情報が存在した。これらのマーカーは、表中の以下のマーカーを含んでいた：

20

【表5】

EGF	IL-1 $\beta$	VCAM-1
bFGF	IL-2	年齢
PIGF	IL-6	診断後の月数
sFlt1	IL-8	疾患@結腸
VEGF	TNF- $\alpha$	疾患@小腸
GM-CSF	sTNFRII	MTX 処置
IFN- $\gamma$	CRP	成功
IL-10	SAA	
IL-12p70	ICAM-1	

30

【0274】

[0297]初期マーカーリストから、事象を示すのに好ましいマーカーとして以下のリストを誘導した：

【表6】

GM-CSF	sRNFRII	疾患@小腸
IL-2	SAA	成功
IL-6	ICAM-1	
TNF- $\alpha$	診断後の月数	

40

【0275】

[0298]以下の表は、インフリキシマブ未検出のリスク又はハザードの有意な予測因子を列挙する：

【表 7】

予測因子	係数	exp(係数)	se(係数)	p
GM-CSF	-1.92E-01	0.826	9.48E-02	4.34E-02
IL-2	1.42E-01	1.153	1.92E-02	1.63E-13
TNF- $\alpha$	2.33E-02	1.024	7.57E-03	2.11E-03
sTNFRII	3.57E-01	1.429	5.76E-02	5.67E-10
SAA	6.13E-06	1.000	1.90E-06	1.25E-03
診断後の月数	-3.20E-03	0.997	1.45E-03	2.68E-02
疾患@小腸	1.10E+00	2.995	4.46E-01	1.39E-02
成功	8.84E-01	2.421	3.13E-01	4.72E-03

10

## 【 0 2 7 6 】

[0299] 前述の表中の結果は、以下はインフリキシマブ未検出のハザード、すなわちリスクの予測因子であることを示す：

## 【 0 2 7 7 】

[0300] GM-CSF：全ての他の変数を一定に保つと、過剰な  $\text{ng} / \mu\text{l}$  の GM-CSF は、0.826 倍、又は 17.4%、1 週間当たりのインフリキシマブ未検出のハザードを低減する。

## 【 0 2 7 8 】

[0301] IL-2：追加的な  $\text{ng} / \mu\text{l}$  の IL-2 によって、1.153 倍、又は 15.3% ハザードが増大する。

20

## 【 0 2 7 9 】

[0302] TNF- $\alpha$ ：1  $\text{ng} / \mu\text{l}$  の TNF- $\alpha$  によって、1.024 倍 / 2.4% ハザードが増大する。

## 【 0 2 8 0 】

[0303] sTNFRII：1  $\text{ng} / \mu\text{l}$  の sTNFRII によって、1.429 倍 / 42.9% ハザードが増大する。

## 【 0 2 8 1 】

[0304] SAA：1  $\text{ng} / \mu\text{l}$  の SAA によって 1.000006 倍 / 0.0006% ハザードが増大し、これは非常にわずかであるが、依然として検出可能な影響である（わずかな SE）。

30

## 【 0 2 8 2 】

[0305] 診断後の月数：診断後のさらなる月ごとに、0.997 倍、又は 0.3% ハザードが低減する。

## 【 0 2 8 3 】

[0306] 小腸における疾患部位（カテゴリカル変数）：疾患が小腸に位置する場合、ハザードは 2.995 倍、又はほぼ 200% 増大する。

## 【 0 2 8 4 】

[0307] 成功（カテゴリカル変数）：さらにハザードの予測因子；失敗患者では、ハザードは 2.421 倍又は 142% 増大する。

## 【 0 2 8 5 】

[0308] 要約すると、以下のマーカー：1) GM-CSF；2) IL-2；3) TNF- $\alpha$ ；4) sTNFRII；及び 5) 小腸にある疾患はインフリキシマブの「クリアランス」/ 又は未検出の良い予測因子であるようである。

40

## 【 0 2 8 6 】

[0309] したがって、一実施形態では、本発明は、処置過程の間の抗 TNF 療法剤又は抗体の濃度が閾値より下落する可能性を予測するための方法であって、

1) GM-CSF；2) IL-2；3) TNF- $\alpha$ ；4) sTNFRII；及び 5) 小腸にある疾患からなる群から選択されるマーカーのパネルを測定するステップと、

マーカーの濃度に基づいて抗 TNF 療法剤又は抗体の濃度が閾値より下落する可能性を

50

予測するステップと  
を含む、方法を提供する。

【0287】

実施例4 インフリキシマブに対する抗薬物抗体(「ATI」又は「HACA」)の検出  
[0310]この実施例はコックス比例ハザードモデル(CPHM)を使用して、事象が生じるのに要する時間をモデル化する。事象としてのATI又はHACAとしても知られる抗薬物抗体の出現、及びハザードとしてのATI形成(検出)のリスク以外、これは前述の実施例3と類似の分析である。図13は、処置過程の間の様々な患者におけるATI(HACA)の濃度を示す。図14中では、事象までのそれらの時間によって患者をランク付けした。処置の間の異なる地点で様々な患者に関して事象が発生し、それは小球で示す。ATI検出のリスクがハザードである。ハザードの有意な予測因子は以下のものを含む：

【0288】

【表8】

予測因子	係数	exp(係数)	se(係数)	p
EGF	-2.33E-03	0.998	1.18E-03	7.82E-03
VEGF	1.37E-03	1.001	4.10E-04	8.64E-04
GM-CSF	-2.72E-01	0.762	1.06E-01	1.06E-02
IL-2	6.15E-01	1.850	2.81E-01	2.83E-02
IL-8	3.58E-04	1.000	1.22E-04	3.25E-03
TNF- $\alpha$	2.37E-02	1.024	8.76E-03	6.81E-03
CRP	3.09E-05	1.000	1.04E-05	3.00E-03
VCAM	1.28E-03	1.001	2.01E-04	1.87E-10

【0289】

[0311]前述の表中のデータは、EGF、VEGF、IL-8、CRP及びVCAM-1は全て、ハザードに対して非常にわずかではあるが、有意な影響があることを示す。

【0290】

[0312]GM-CSF：全ての他の変数を一定に保つと、過剰なng/ $\mu$ lのGM-CSFは、0.762倍、又は27.4%、1週間当たりのATI検出のハザードを低減する

【0291】

[0313]IL-2：1ng/ $\mu$ lのIL-2の増大によって、1.85倍、又は85%ハザードが増大する。

【0292】

[0314]TNF- $\alpha$ ：1ng/ $\mu$ lのTNF- $\alpha$ の増大によって、1.024倍/2.4%ハザードが増大する。

【0293】

[0315]要約すると、ATI検出ハザードの予測因子はGM-CSF、IL-2及びTNF- $\alpha$ である。

【0294】

[0316]したがって、一実施形態では、本発明は、  
抗薬物抗体が抗TNF療法又は抗体に対して個体中に生じる可能性を予測するための方法であって、

EGF、VEGF、IL-8、CRP及びVCAM-1からなる群から選択されるマーカーのパネルを測定するステップと、

マーカーレベルの濃度に基づいて抗薬物抗体が抗TNF療法に対して個体中に生じる可能性を予測するステップと  
を含む、方法を提供する。

【0295】

実施例5 COMMIT研究試料を使用したクローン病予後に関する疾患活動性プロファイリング。

[0317]この実施例は、本発明の疾患活動性プロファイリングを使用して、被験体における治療を最適化する、又は治療有効性をモニターするための、TNF 媒介性疾患の個別

治療管理に関する方法を例示する。この実施例は、1つ又は複数の特異的バイオマーカーの存在、レベル及び又は活性化（例えば、薬物レベル、抗薬物抗体レベル、炎症マーカー、抗炎症マーカー、及び組織修復マーカー）の検出、測定、又は決定を含む疾患活動性プロファイリングを例示する。

#### 【0296】

[0318]この実施例は、COMMIT研究からのいくつかの試料に関する、疾患活動性プロファイリングを記載する。実施例1中に記載したように、COMMIT（メトトレキサート-インフリキシマブ併用維持試験）研究を実施して、クローン病（CD）の長期処置に関する、メトトレキサート（MTX）と併用したレミケード（インフリキシマブ）の安全性と有効性を評価した。特に、以下のマーカーのアレイを、レミケード（インフリキシマブ；IFX）単独、又はレミケードとMTXの処置、（1）レミケード（インフリキシマブ）とインフリキシマブに対する抗薬物抗体（ATI）；（2）炎症マーカーCRP、SAA、ICAM、VCAM；及び（3）組織修復マーカーVEGFでの処置の間に様々な時点において測定した。この実施例は、炎症及び組織修復のマーカーは、TNF 媒介性疾患（例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎）の患者の選択においてIFX及びATIレベルと関係があったことを示す。いくつかの場合、マーカーのアレイは疾患活動性指数（例えば、クローン病活動性指数）を予測することができる。COMMIT研究の分析は本明細書中に例示する。

10

#### 【0297】

[0319]ATIの存在とIFX濃度の血清中レベルの間の関係を調べた。評価用の、定量化レベル未満（BLOQ）の全ATIレベルは $3.13 \text{ U/ml}$ であり、0に設定した。検出レベル未満（BLOD）のIFX濃度は0に設定した。試料比較につき、トラフ試料のみ使用し、合計219を評価において使用した。24試料がATI陽性（ATI+）であると決定した。ATI+試料中のIFXのメジアンレベルは $0 \mu\text{g/ml}$ であり、一方ATI陰性（ATI-）試料中のIFXのメジアンレベルは $8.373 \mu\text{g/ml}$ であったと決定した（マンホイットニーのU検定により $p = 3.71 \times 10^{-9}$ ）。図4Aは、患者試料におけるATIの存在とIFXレベルの間の関係を例示する。検出可能レベルのATIがない患者試料は、ATI+試料と比較して有意に高いIFXメジアン濃度を有していた。

20

#### 【0298】

[0320]CDAIとATIの存在の間の関係を評価した。分析中、 $3.13 \text{ U/ml}$ のATIをカットオフ値として設定し、試料中でのみ評価し、ATIのBLOQは0として設定した。195の試料がATI-であり、一方で合計4患者由来の24試料がATI+であった。これらの結果は、ATI+試料に関するメジアンCDAIは121.5であり、一方でATI-試料に関するメジアンCDAIは82であったことを示した（マンホイットニーのU検定により $p = 0.0132$ ）。図4Bは、ATIの存在は高いCDAIと関係があることを例示する。これらの結果は、ATI+試料がATI-試料より有意に高いCDAIを有することを示す。

30

#### 【0299】

[0321]ATIの存在と、IFXと免疫抑制剤（例えばMTX）の併用療法の間の関係を調べた。任意のトラフ時点でATI+試料を分析した。これらの結果は、IFX療法単独とIFX+MTX併用療法の間で、ATIを有するオッズに有意な差がなかったことを示した。高いオッズ比（例えば2.851）は、MTXは患者が療法の生物製剤に対して免疫応答を発生するのを妨げ得ることを示す。図4Cは、併用免疫抑制剤療法（例えばMTX）はATIの存在を抑制する可能性がより高いことを示す。

40

#### 【0300】

[0322]フォローアップ時のATIと臨床結果の間の関係も調べた。任意のトラフ時点でATI+試料を分析した。研究から得た臨床データから記載した臨床結果は、「成功」又は「失敗」のいずれかとして解析した。処置レジメンとは無関係に、ATI+であるオッズの有意な差は見られなかった。低いオッズ比（例えば0.1855、 $p = 0.1459$

50



）は、A T I + 患者は不十分な臨床結果を有する傾向があることを示す。図 5 A は、A T I を有する患者は、処置に対して不十分な応答を発生する可能性がより高いことを示す。

【0301】

[0323]この実施例は、患者試料における例示的な P R O 炎症指数とインフリキシマブ ( I F X ) 血清中レベル又は I F X に対する抗体 ( A T I ) の存在の関係も例示する。図 5 B は、炎症マーカー C R P は高レベルの A T I と関係があることを例示する。データは、A T I + 試料におけるメジアン C R P レベルは  $8.11 \mu\text{g}/\text{ml}$  であり、A T I - 試料では  $1.73 \mu\text{g}/\text{ml}$  であったことを示す (マンホイットニーの U 検定により  $p = 2.67 \times 10^{-6}$ )。他の炎症及び組織修復マーカーを評価した。図 6 は、1 つ又は複数の炎症及び組織修復マーカーのアレイのタンパク質レベルは、I F X に対する抗体の形成と関係があることを例示する。データは、5 マーカー (例えば、C R P、S A A、I C A M、V C A M、V E G F、及び少なくとも 1 つの炎症マーカーを含む) の組合せが、24 A T I 陽性試料の 23 試料において発現されたことを示す (図 7 A、グレーボックス)。炎症マーカー S A A は 24 A T I 陽性試料の 19 試料において陽性であることが分かり、これらの試料はまた「高い炎症」を有するとして臨床的に記載した。これらの結果は、V E G F と C R P は分析中最も重複しないマーカーであることも示す。

10

【0302】

[0324]この実施例は、例示的な P R O 炎症指数 ( P I I ) をさらに示す。炎症指数スコアは、複数マーカーの所定の発現レベルを表す値の組合せの対数変換によって作製する (例えば、 $P I I = \log (C R P + S A A + I C A M + V C A M + V E G F)$ )。図 7 B は、例示的な P R O 炎症指数 ( P I I ) は、C O M M I T 研究の患者試料において I F X のレベルと関係があることを例示する ( $p < 0.0001$  及び  $R^2 = -0.129$ )。これらの結果は、A T I 陽性試料は、A T I 陰性試料と比較して有意に高い炎症指数スコアを有することを示す ( $P = 6.4 \times 10^{-8}$ ; 図 7 C 参照)。

20

【0303】

[0325]したがって、一実施形態では、本発明は、インフリキシマブ処置レジメンをモニターするための方法であって、

a) インフリキシマブ及びインフリキシマブに対する抗薬物抗体 ( A T I ) を測定するステップと、

b) 炎症マーカー C R P、S A A、I C A M、V C A M を測定するステップと、

c) 組織修復マーカー V E G F を測定するステップと、

d) 測定値を治療有効性と関連させるステップと

を含む、方法を提供する。

30

【0304】

実施例 6 臨床研究番号 1 の試料を使用した T N F 媒介性疾患予後に関する疾患活動性プロファイリング。

[0326]この実施例は、抗 T N F 薬物療法に対するレスポナー又はノンレスポナーとして被験体を特定するために本発明の疾患活動性プロファイリングを使用して、被験体における治療有効性をモニターするための方法を記載する。この実施例は、クローン病臨床研究番号 1 からいくつかの患者試料に関する、疾患活動性プロファイリングの使用を例示する。

40

【0305】

[0327]特に、マーカーのアレイを、レミケード (インフリキシマブ; I F X) 単独、又はレミケードと M T X の処置、レミケード (インフリキシマブ)、インフリキシマブに対する抗体 ( A T I )、及び I F X に対する中和抗体での処置の間に様々な時点において測定した。この実施例は、疾患活動性プロファイルは、A T I、I F X 及び中和抗体の間の関係を示し得ることを示す。臨床研究番号 1 の分析は本明細書中に例示する。

【0306】

[0328]図 8 A ~ B は、臨床研究番号 1 中のいくつかの患者におけるクローン病活動性指数 ( C D A I ) スコアと血清中インフリキシマブ濃度の間の関係を例示する。簡単に言う

50

と、894の試料を分析した。検出限界(LOD)における $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のIFX濃度を「存在する」として定義した。これらの結果は、IFX陰性(IFX-)試料は、IFX陽性試料(IFX+)と比較して有意に高いCDAIを有することも示した(マンホイットニーのU検定により計算して $p = 0.0254$ )。

#### 【0307】

[0329]さらなる分析によって、ATIの存在は低いIFX濃度と関係があることが明らかになった。 $3.13 \text{ U}/\text{ml}$ の定量化レベル未満(BLOQ)の全ATIを0として設定し、検出レベル未満(BLOD)のIFX濃度は0に設定して仮定した。3つの時点の1つでの陽性全ATIレベルとして定義して、研究中の患者の24%(62/258)がATI+であったと決定した。894試料の分析によって、IFX濃度とATIレベルの間の関係を示した。特に、ATI+試料に関するメジアンIFXは $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ATI-試料に関しては $7.95 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった(マンホイットニーのU検定により $p < 2.2 \times 10^{-16}$ )。図9Aは、分析した試料における、IFX濃度とインフリキシマブに対する抗薬物抗体の存在の間の関係を例示する。

#### 【0308】

[0330]分析は、試料中の高濃度のATIは、TNF-生物製剤を標的化する中和抗体の存在と関係があることを示す。いくつかの実施形態では、アッセイを使用して中和抗体を検出することができる。最高濃度のATIを有する患者試料において中和抗体を検出した。図9Bは、高濃度のATIは、中和抗体の存在及び検出不能レベルのIFXをもたらし得ることを例示する。

#### 【0309】

[0331]CDAIとATIの存在の関係の長期分析結果を、臨床訪問番号1及び番号3で283患者から回収した試料において評価した。訪問番号1(V1)でのATIの存在と訪問番号3(V3)でのCDAIの間の関係を確定した。ATI+試料ではV1においてメジアンCDAIは109であり、一方ATI-試料ではメジアンCDAIは78であった(マンホイットニーのU検定により $p = 0.027$ )。これらの結果は、ATI陽性とCDAIの間の偶発的關係を示す。図9Cは、初期の時点で決定したATI+試料は、後期により高いCDAIを有する可能性がより高いことを例示する。これらの結果は、初期の時点での疾患活動性プロファイリングは、後期の時点でCDAIを予測することができることを示す。図9Dは、臨床研究番号1では、インフリキシマブ(IFX)と免疫抑制剤(例えば、MTX及びAZA)の併用療法を施した場合、患者はATIが生じる低いオッズを有していたことを例示する。オッズ比は0.320であった(フィッシャーの正確確率検定により $p = 0.0009$ )。この分析では、全ATI $3.13 \text{ U}/\text{ml}$ 以上としてATI陽性(ATI+)を定義した。

#### 【0310】

実施例7 臨床研究番号2の試料を使用したTNF媒介性疾患予後に関する疾患活動性プロファイリング。

##### A. 臨床研究番号2A

[0332]この実施例は、レミケード(インフリキシマブ)を単独又は免疫抑制剤(例えば、メトトレキサート、アザチオプリン及び/又はコルチコステロイド)と併用して与えた患者における、治療有効性をモニターするための方法の使用を例示する。この実施例は、一連の臨床試験から試料の疾患活動性プロファイルを決定するための、本発明の使用法を記載する。

#### 【0311】

[0333]分析中、本発明者らは、コホートにおけるインフリキシマブに対する抗薬物抗体(ATI)とIFX濃度の間の関係を調べた。ATI+試料が少なくとも1つの時点で $3.13 \text{ U}/\text{ml}$ を超える全ATIを有する試料であると定義したとき、90.6%の患者(58/64)がATI+であったと決定した。ATI陽性試料におけるIFXのメジアン濃度は $0 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ATI陰性試料では $3.74 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった(マンホイットニーのU検定により $P < 2.2 \times 10^{-16}$ )。ATI+試料における中和抗体の

濃度は0であった。これらの結果は、A T Iの存在によって、I F X療法において患者中のI F X濃度が低下することを示唆する。A T I - 試料に関するI F X濃度の範囲は0 . 0 ~ 6 7 . 2 8  $\mu$  g / m lであった。A T I + 試料では、I F X濃度は0 . 0 ~ 2 6 . 1 5  $\mu$  g / m lであった。中和抗体 ( N a b )を含むA T I + 試料では、I F X濃度は0 ~ 1 . 0 7  $\mu$  g / m lの範囲であった。図1 0 Aは、臨床研究番号2 Aの試料における、I F X濃度とA T Iの存在の間の関係を示す。これらの結果は、A T I陽性とA T I陰性であるオッズは、免疫抑制剤 ( I S A、例えば、メトトレキサート、アザチオプリン、コルチコステロイド、及びこれらの組合せ) で処置した試料に関して有意に低いことも実証した。この分析では8 1 4の試料を評価した。A T I + であるオッズは、A T I - である試料よりI S A処置試料に関して有意に低かった ( フィッシャーの正確確率検定により、オッズ比 = 0 . 5 6 4 ;  $p < 0 . 0 0 0 0 1$  )。さらに、より少ないI S A処置試料が中和A T Iを発現した。分析した中和抗体を含む3 4のA T I + 試料の中では、3 4の試料の9試料がI S Aで処置され、2 5試料が非I S A処置試料であった。これはI S A療法が、A T I、及びさらにI F Xに対する中和抗体の進行を低減し得ることを示す。図1 0 Bは、研究中のI S A療法とA T Iの存在の間の関係を例示する。

10

20

30

40

50

#### 【0312】

[0334]次に本発明者らは、A T Iと炎症マーカーの間の関係を調べた。本明細書に記載するように、全体のA T I B L O Qを0で設定した。C E E Rアッセイ等の方法によって、C R P濃度を決定した。これらの結果は、C R Pのメジアン濃度はA T I - 試料において最低であり ( 5 . 0  $\mu$  g / m l )、A T I + 試料においてより高かった ( 1 0 . 0  $\mu$  g / m l )ことを示す。中和A T Iを発現する試料は、依然としてより高いC R Pのメジアン濃度 ( 1 0 . 0  $\mu$  g / m l )を有していた。C R P濃度とA T I状態の間の全ペアワイズ比較によれば、値は有意に異なっていたはずである ( マンホイットニーのU検定により  $p < 0 . 0 0 0 1$  )。図1 0 Cは、C R P濃度とA T I ( A T I及び/又は中和A T I )の存在の間の関係を例示する。

#### 【0313】

[0335]本発明者らは、A T Iと療法に対する応答の消失の間の関係も調べた。コホートにおいて、I F X療法に関する「応答あり」、「応答消失」及び「情報なし」として試料を記した。試料は、応答消失があった場合「真」、又は応答消失がなかった場合「偽」としてさらに分類した。合計7 7 7の試料において分析した。これらの結果は、「真」として記した試料では、A T I陽性でもある有意に高いオッズ比が存在したことを示した ( フィッシャーの正確確率検定により、オッズ比 = 2 . 2 5 4 ;  $p < 0 . 0 0 0 1$  )。驚くことに、I F Xに対する中和抗体に対して陽性であったより多くの試料が、もはや応答性がなかった試料と比較してI F Xに応答性があったと決定された。3 4の中和A T I + 試料の中で、2 1試料を「応答あり」として記し、8試料を「応答消失」として記した。図1 0 Dは、研究中のI F X療法に対する応答消失とA T Iの存在の間の関係を例示する。図1 1は、A T I及び中和抗体のレベルは、様々な患者由来の一連の試料において経時的に決定することができることを例示する。

#### 【0314】

[0336]本発明者らは、I F Xの濃度と炎症マーカーC R Pの存在を比較した。本発明者らは、I F XがアッセイのL O Dである0 . 1  $\mu$  g / m l以上であった場合、「真」として試料当たりの「I F Xの存在」を定義した。これらの結果は、メジアンC R P濃度は、I F Xが存在した試料又はI F Xが存在しなかった試料の間で異ならなかったことを示唆する。I F Xを含む試料中のメジアンC R Pレベルは7 . 4 0  $\mu$  g / m lであり、一方I F Xを含まない試料中のメジアンC R P = 7 . 5 5  $\mu$  g / m lであった ( マンホイットニーのU検定により  $p = 0 . 5 9 1$  )。図1 2 Aは、I F Xの存在とC R Pレベルの比較を例示する。

#### 【0315】

[0337]本発明者らは、注入反応とA T Iの存在の間の関係も比較した。分析は合計7 9 7の試料を含んでおり、3 0の試料は注入反応あり ( 「Y e s」 )として分類し、7 6 7

の試料は注入反応なし（「No」）として分類した。注入反応があった29の試料はATI+でもあった（フィッシャーの正確確率検定により、オッズ比 = 35.54、 $p < 0.0001$ ）。図12Bは、ATIの存在と注入反応の間の関係を例示する。ATIを発現した患者は、注入反応があった可能性がより高い。さらに、中和ATIを含む27の試料に関しては、22の試料中で注入反応を観察しなかった。中和ATIを含む残りの5試料には注入反応があった。

#### 【0316】

##### B. 臨床研究番号2B

[0338]臨床研究番号2Bのこの分析において、本発明者らは、ATIの存在、IFX濃度、ISAの投与、炎症マーカー（例えばCRP）の発現、及びIFX処置に対する応答の消失の間の関係を調べた。本発明者らは、メジアンIFX濃度は、この抗薬物抗体を発現しなかった試料と比較して、ATIを発現した試料中でより高かったことを決定した。15.2%の患者（105中16）がATI+であり、少なくとも1つの時点で全ATIが3.13 U/mlを超えた。分析した489の試料の中で、ATI+試料におけるメジアンIFX濃度は0.59 µg/mlであり、ATI-試料では7.78 µg/mlであった（マンホイットニーのU検定により $p < 2.2 \times 10^{-16}$ ）。図12Cは、コホートにおけるIFX濃度とATIの存在の間の関係を例示する。この分析は、免疫抑制剤を除去したとき、IFXに対する抗体が生じる高いオッズがあることを示した（フィッシャーの正確確率検定により、オッズ比 = 0.412、 $p = 0.0367$ ）。図12Dは、所与の特定の日における、ATIの存在とISA療法の除去の間の関係を例示する。本発明者らは、ATI陽性試料は、ATI陰性試料（メジアンCRP = 1.5 µg/ml）と比較して、CRPのより高いメジアン濃度を有することを決定した（マンホイットニーのU検定により $9.6 \mu\text{g/ml}$ 、 $p = 1.25 \times 10^{-12}$ ）。図13Aは、ATIと炎症マーカーCRPの間の関係を例示する。本発明者らの分析は、IFXに対する応答の消失を経験するオッズは、任意の時点でATI陽性であると決定した患者においてより高かったことを示した（フィッシャーの正確確率検定に関してオッズ比 = 3.967、 $p = 0.0374$ ）。図13Bは、任意の時点におけるATIの存在と、IFX処置に対する応答性の間の関係を例示する。IFXに対する応答の消失は、炎症マーカーCRPのより高いメジアン濃度とも関係があった。この分析では、フォローアップ時に応答が消失した14の試料が存在し、91の試料がレスポnder由来であった。メジアンCRPレベルは応答が消失した試料に関して11.767 µg/mlであり、応答があった試料に関して2.585 µg/mlであった。IFXに対する応答が消失した患者は、有意に高い平均CRPを有していた（マンホイットニーのU検定により $p = 7.45 \times 10^{-5}$ ）。図13Cは、応答の消失はCRPの増大と関係があり得ることを示す。検出可能なIFX2を欠く試料においてもCRPは有意に高かった。IFXのレベルが試料当たり0.1 µg/ml（例えば、アッセイのLOD）以上であった場合、試料はIFXを有する（「IFXが存在する」）と決定した。メジアンCRPはIFX存在試料において1.6 µg/mlであり、IFX不在試料において13 µg/mlであった（マンホイットニーのU検定により $p = 3.69 \times 10^{-5}$ ）。図13Dは、IFXの存在とCRPレベルの間の関係を例示する。この研究では、少なくとも1つの時点で3.13 U/mlを超える全ATIを有する試料として「ATI+」を定義した。

#### 【0317】

##### C. 臨床研究番号2C

[0339]臨床研究番号2Cのこの分析において、本発明者らは、IFXレベルとATIの存在の間の関係を調べた。3.28 µg/mlのメジアンIFXを有するATI-試料と比較して、ATI+は有意に低い0.43 µg/mlのメジアンIFXを有すると決定した（マンホイットニーのU検定により $p = 1.95 \times 10^{-4}$ ）。図14Aは、低いIFXレベルはATIの存在と関係があることを示す。

#### 【0318】

[0340]したがって、一実施形態では、本発明は、個体が併用療法の候補であるかどうか

決定するための方法であって、前記個体にインフリキシマブを投与し、前記個体中の A T I の有無を測定することを含み、個体中の免疫抑制剤（例えば M T X）の投与に有意なレベルの A T I がある方法を提供する。特定の態様では、C R P の濃度レベルは A T I の存在を示す。

#### 【0319】

実施例 8 臨床研究番号 3 由来の患者試料を使用した T N F 媒介性疾患予後に関する疾患活動性プロファイリング。

[0341]この実施例は、抗 T N F 薬物療法の治療有効性をモニターするための、本発明の方法の使用を例示する。特に、臨床研究番号 3 の研究データ、薬物動態データ、フォローアップ研究データを含むプールしたデータを分析した。これらの結果は、A T I 陽性試料における  $0.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  のメジアン I F X 濃度は、A T I 陰性試料における  $12.21 \mu\text{g}/\text{ml}$  の I F X 濃度と比較して低かったことを示した（マンホイットニーの U 検定により  $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ）。図 14 B は、低い I F X レベルは、これらの臨床試料中の A T I の存在と関係があることを示す。図 14 C は、I F X レベルと A T I の間の同じ関係が、研究データ、フォローアップ研究及び薬物動態研究においても存在したことを例示する（マンホイットニーの U 検定により  $p < 0.05$ ）。本発明者らはまた、試料中の高濃度の A T I は I F X に対する中和効果があることを決定するために、本発明の方法を使用した。特に、高濃度の A T I はインフリキシマブに対する中和抗体として作用する。高濃度の A T I を有する試料は、 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$  の I F X レベルを有していた。図 15 A は、中和 A T I 及び I F X を含めた A T I レベル間の関係を例示する。

#### 【0320】

実施例 9 ヒュミラを与えた患者における P R O 炎症指数を含めた疾患活動性プロファイリングの方法。

[0342]この実施例は、患者試料中の、T N F - 生物製剤（例えば、アダリムマブ（ヒュミラ）；A D L）のレベル、及び T N F - 生物製剤に対する抗薬物抗体（例えば A T A）の存在を決定することを含む、本発明の方法を例示する。この分析では、1 試料は 1 患者を表し、全 98 の C D 試料を評価した。全 A T A  $> 0$  として A T A 陽性を設定したとき、2.04% の試料（98 C D 患者中 2 患者）が A T A に対して陽性であった。驚くことに、2 つの A T A 陽性試料が最高濃度の A D L も有していた。図 15 B は、患者試料における A D L 濃度と A T A の存在の間の関係を例示する。

#### 【0321】

[0343]この実施例は、例示的な P R O 炎症指数（P I I）を記載する。この実施例は、ヒュミラ（アダリムマブ）と異なる薬物の組合せを与えた患者試料における P I I の使用も例示する。図 16 A は、例示的な P R O 炎症指数の詳細を記載する。P I I は、5 つのバイオマーカーに基づき炎症レベルを記載した試料当たりの 1 スコアを表し得る。スコアは、5 つのバイオマーカーの合計の対数変換から得る。いくつかの実施形態では、バイオマーカーは  $\text{pg}/\text{ml}$  単位の V E G F、 $\text{ng}/\text{ml}$  単位の C R P、 $\text{ng}/\text{ml}$  単位の S A A、 $\text{ng}/\text{ml}$  単位の I C A M 及び  $\text{ng}/\text{ml}$  単位の V C A M を含む。図 16 B は、A D L 単独又は他の薬物との併用で、試料のアレイにおいて P I I と A D L 濃度の間に明らかな関係は存在しないことを例示する。これは、試料コホートにおける高い A D L トラフ血清濃度の出現に原因があり得る。P I I と A D L 濃度の間には有意な負の相関がある（ $p = 1.66 \times 10^{-5}$  及びスペルマンの  $R h o = -0.459$ ）。同様の負の相関が I F X と P I I の間に見られた。

#### 【0322】

[0344]本発明者らは、T N F 媒介性疾患を処置するために使用した治療剤の存在と P I I の間の関係も比較した。 $0 \mu\text{g}/\text{ml}$  を超える A D L 濃度を有する試料として、A D L 陽性試料を定義した。これらの結果は、レミケード及びヒュミラを与えた患者と比較して、ヒュミラを与えた患者においてより高い P I I を検出したことを示した。図 17 は、ヒュミラ、及びレミケード、シムジア、アザチオプリン及びメトトレキサート等の他の薬物と組み合わせたヒュミラを与えた患者に関する P I I スコアのプロットを示す。

## 【 0 3 2 3 】

[0345]したがって、一実施形態では、本発明は、クローン病活動性をモニターするための方法であって、

p g / m l 単位の V E G F、n g / m l 単位の C R P、n g / m l 単位の S A A、n g / m l 単位の I C A M 及び n g / m l 単位の V C A M を含むマーカーのパネルの測定値を含む炎症指数を決定するステップと、

炎症指数を有効性スケール又は指数と比較して、疾患をモニターし管理するステップとを含む、方法を提供する。

## 【 0 3 2 4 】

実施例 10 改善された患者管理のための方法。

10

[0346]この実施例は、個別化された患者の処置の開発を援助するための、改善された患者管理のための方法を記載する。

## 【 0 3 2 5 】

[0347]いくつかの実施形態では、疾患活動性プロファイリングと共に、移動度シフトアッセイ（例えば、その開示があらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる、P C T 国際公開第 2 0 1 1 / 0 5 6 5 9 0 号を参照）を使用して、活性 C D 及び U C を有する患者を分析することができる。図 18 は、C D 及び / 又は U C を有する患者の管理を改善するための、本発明の方法の詳細を示す。いくつかの実施形態では、疾患活動性プロファイリングの方法は、薬物動態分析、並びに疾患活動性プロファイルマーカー及び / 又は粘膜治癒マーカーの存在及び / 又はレベルの決定を含む。

20

## 【 0 3 2 6 】

[0348]いくつかの実施形態では、疾患活動性プロファイリングは、バイオマーカー、サイトカイン、及び / 又は増殖因子の存在及び / 又はレベルを検出、測定、及び決定する方法を含む。疾患活動性プロファイリングにおいて使用することができるサイトカインの非限定的な例には、b F G F、T N F - 、I L - 10、I L - 12 p 70、I L - 1、I L - 2、I L - 6、G M - C S F、I L - 13、I F N - 、T G F - 1、T G F - 2、T G F - 3、及びこれらの組合せがある。炎症マーカーの非限定的な例には、S A A、C R P、I C A M、V C A M、及びこれらの組合せがある。抗炎症マーカーの非限定的な例には、T G F - 、I L - 10、及びこれらの組合せがある。増殖因子の非限定的な例には、アンフィレグリン（A R E G）、エピレグリン（E R E G）、ヘパリン結合性上皮増殖因子（H B - E G F）、肝細胞増殖因子（H G F）、ヘレグリン - 1（H R G）及びアイソフォーム、ニューレグリン（N R G 1、N R G 2、N R G 3、N R G 4）、ベータセルリン（B T C）、上皮増殖因子（E G F）、インスリン増殖因子 - 1（I G F - 1）、形質転換増殖因子（T G F）、血小板由来増殖因子（P D G F）、血管内皮細胞増殖因子（V E G F）、幹細胞因子（S C F）、血小板由来増殖因子（P D G F）、可溶性 f m s 様チロシンキナーゼ 1（s F l t 1）、胎盤増殖因子（P I G F）、線維芽細胞増殖因子（F G F）、及びこれらの組合せがある。

30

## 【 0 3 2 7 】

[0349]他の実施形態では、疾患活動性プロファイリングは薬物動態及び粘膜治癒の検出、測定及び決定を含む。いくつかの態様では、選択したバイオマーカーの存在及び / 又はレベル及び / 又は内視鏡検査によって、粘膜治癒を評価することができる。いくつかの場合、全ての目に見える腸管粘膜部分における破碎性、出血、腐食及び潰瘍の不在として粘膜治癒を定義することができる。いくつかの実施形態では、粘膜治癒のバイオマーカーには、限定されるものではないが、A R E G、E R E G、H G - E G F、H G F、N R G 1、N R G 2、N R G 3、N R G 4、B T C、E G F、I G F - 1、H R G、F G F 1、F G F 2（b F G F）、F G F 7、F G F 9、S C F、P D G F、T W E A K、G M - C S F、T N F - 、I L - 12 p 70、I L - 1、I L - 2、I L - 6、I L - 10、I L - 13、I F N - 、T G F - 、T G F - 1、T G F - 2、T G F - 3、S A A、C R P、I C A M、V C A M、及びこれらの組合せがある。いくつかの実施形態では、粘膜治癒のバイオマーカーの検出レベルの統計解析を使用して、増殖因子指数を確定す

40

50

ることができる。いくつかの場合、増殖因子指数を疾患活動性の他のマーカーと関連付け、本発明の方法中で利用して患者の処置を個別化することができる。

### 【0328】

[0350] 図19は、異なる細胞型、細胞機構及び疾患（例えば、クローン病（CD）、関節リウマチ（RA）及び乾癬（Ps））に対するTNF-経路及び関連経路の効果を示す。図20は、例示的なCEER多重増殖因子アレイの概略を例示する。特定の実施形態では、本発明の方法はこのアレイを利用することができる。非限定的な例として、図21A～Fは、このアレイを用いた患者試料の多重増殖因子プロファイリングを例示する。特に、AREG、EREG、HB-EGF、HGF、HRG、BTC、EGF、IGF、TGF、及びVEGF等の増殖因子の長期的分析を、患者試料の回収において実施した。図21B及びEは、患者10109、患者10118及び患者10308由来の試料における、ASCA-a、ASCA-g、Cbir1及びOmpC等の血清学的及び免疫学的マーカーのレベルの決定を例示する。図21Gは、健常対照、IBS-Cを有する患者、及びIBS-Dを有する患者由来の試料において実施した例示的な増殖因子アレイを示す。

10

### 【0329】

[0351] 一連の多重CEER増殖因子及びCRPアレイを患者試料において実施した。（以下の）表A～Dは、患者試料における粘膜治癒の長期的分析結果を強調する。以下の表（A）は、CRP及び増殖因子によって粘膜治癒を予測し得ることを示す：

20

【表9】

被験体 ID	回収日	CRP		EGF		bFGF		VEGF		FGF1		Tweak		TGF β1		TGF β2	
10101	回収1	3.98		315.67		4.83		1454.94		15.16		0.65		68.64		964.02	
10101	回収2	0.13	N	365.74	P	3.79	N	1201.53	N	15.37	P	6.39	P	78.52	P	562.77	N
10103	回収1	0.66		439.03		4.00		969.78		17.86		35.05		67.68		300.36	
10103	回収2	15.44	P	372.64	N	3.90	N	881.27	N	17.00	N	35.50	P	73.85	P	311.76	P
10109	回収1	15.86		418.89		1.66		223.85		13.52		6.35		63.79		386.64	
10109	回収2	1.22	N	162.75	N	0.49	N	177.42	N	15.66	P	5.69	N	57.93	N	544.34	P
10118	回収1	0.41		126.86		1.31		1173.42		13.11		9.51		71.43		339.43	
10118	回収2	3.54	P	282.16	P	3.03	P	1200.74	P	14.43	P	1.92	N	68.69	N	920.00	P
10308	回収1	1.80		336.45		2.23		1361.03		15.05		5.35		98.94		730.52	
10308	回収2	155.95	P	525.57	P	23.83	P	3233.27	P	15.34	P	11.18	P	153.21	P	466.49	N
10503	回収1	2.10		237.62		6.76		760.17		13.63		13.07		64.72		475.00	
10503	回収2	27.39	P	215.81	N	3.59	N	1135.46	P	11.81	N	61.50	P	90.11	P	737.82	P
11003	回収1	6.32				1.58		408.49		14.06		7.69		40.53		395.19	
11003	回収2	0.16	N	123.57		1.90	P	394.88	N	14.81	P	5.12	N	35.85	N	221.67	N
11601	回収1	0.23		241.76		3.36		173.02		15.43		2.54		46.92		589.91	
11601	回収2	0.92	P	310.64	P	6.89	P	169.40	N	17.31	P	12.50	P	61.67	P	514.21	N
11602	回収1	1.71		327.92		15.31		562.30		12.82		12.13		58.15		1120.06	
11602	回収2	1.93	P	338.88	P	4.83	N	334.69	N	12.36	N	14.61	P	59.83	P	1599.43	P
12121	回収1	6.85		484.22		4.89		477.49		11.90		25.90		35.44		1307.92	
12121	回収2	2.16	N	607.95	P	4.72	N	842.54	P	11.13	N	10.93	N	43.32	P	1284.24	N
12121	回収3	58.64	P	458.80	N	0.81	N	286.72	N	12.38	P	6.71	N	60.23	P	631.34	N
190	回収1	0.74		353.47				252.71				1.63		22.79			
190	回収2	25.18	P	941.21	P			656.11	P			4.71	P	84.07	P		
492	回収1	0.66						351.79				3.61		20.02			
492	回収2	91.49	P					962.96	P					27.89	P		
2546	回収1	4.73		857.25				866.87				10.37		31.01			
2546	回収2	28.18	P	805.11	N			826.44	N			7.23	N	56.28	P		

30

40

「N」及び「P」は、それぞれ被験体当たりの各マーカーに関する、観察ペア間の負又は正の関係を示す。下線を引いたデータは定量化の上限を超えるペア数であり、正の関係があると考えられる。

### 【0330】

[0352] 以下の表Bは、粘膜治癒を予測するCRP及び増殖因子を列挙する：

【表 10】

被験体 ID	回収日	CRP		AREG		HGF		HRG		HB EGF		BTC		TGFα	
10101	回収1	3.98		12.16		26.60		143.10		6.60		0.00		3.10	
10101	回収2	0.13	N	9.91	N	23.90	N	46.50	N	5.00	N	0.00		2.00	N
10103	回収1	0.66		26.06		41.30		2000.00		17.80		0.00		6.60	
10103	回収2	15.44	P	50.00	P	82.70	P	2000.00	P	18.10	P	0.00		6.60	P
10109	回収1	15.86		13.81		27.40		243.10		7.80		0.00		3.30	
10109	回収2	1.22	N	9.71	N	0.00	N	95.60	N	6.30	N	0.00		2.60	N
10118	回収1	0.41		27.10		26.12		541.30		10.51		0.00		7.07	
10118	回収2	3.54	P	21.40	N	29.95	P	492.70	P	7.83	N	26.00	P	6.42	P
10308	回収1	1.80		0.00		45.10		0.00		4.28		0.00		0.00	
10308	回収2	155.95	P	0.00		121.67	P	0.00		5.31	P	0.00		0.00	
10503	回収1	2.10		4.90		35.36		0.00		2.80		0.00		0.00	
10503	回収2	27.39	P	7.10	P	46.07	P	145.70	P	5.80	P	0.00		1.70	P
11003	回収1	6.32		10.20		31.11		205.20		5.80		0.00		3.30	
11003	回収2	0.16	N	7.30	N	25.98	N	124.50	N	5.40	N	0.00		2.80	N
11601	回収1	0.23		0.00		8.10		0.00		8.40		8.00		1.39	
11601	回収2	0.92	P	6.00	P	12.90	P	467.00	P	8.80	P	8.30	P	1.91	P
11602	回収1	1.71		0.00		55.50		0.00		7.50		7.40		0.70	
11602	回収2	1.93	P	0.00		11.90	N	0.00		5.40	N	7.70	P	0.88	P
12121	回収1	6.85		0.00		37.40		0.00		7.80		9.00		2.63	
12121	回収2	2.16	N	0.00		54.00	P	0.00		8.00	P	7.40	N	0.24	N
12121	回収3	58.64	P	0.00		66.30	P	0.00		7.90	P	7.50	N	1.86	N
190	回収1	0.74		0.00		10.80		0.00		5.90		0.00		1.90	
190	回収2	25.18	P	0.00		11.50	P	0.00		5.70	N	0.00		0.00	N
492	回収1	0.66		10.90		13.00		441.80		19.40		0.00		3.11	
492	回収2	91.49	P	8.60	N	21.00	P	355.60	P	13.30	N	0.00		2.12	N
2546	回収1	4.73		11.55		16.70		299.40		8.00		0.00		3.50	
2546	回収2	28.18	P	26.12	P	38.80	P	912.70	P	13.30	P	0.00		5.40	P

「N」及び「P」は、それぞれ被験体当たりの各マーカーに関する、観察ペア間の負又は正の関係を示す。下線を引いたデータは定量化の上限を超えるペア数であり、正の関係があると考えられる。

## 【0331】

[0353]以下の表Cは、CRP及び増殖因子によって粘膜治癒を予測し得ることを示す：



【表 1 1】

被験体 ID	回収日	CRP		EGF		VEGF		Tweak		TGF $\beta$ 1	
2834	回収1	6.88		604.22		624.03		2.00		68.05	
2834	回収2	24.33	P	631.31	P	509.73	N	3.72	P	44.79	N
3570	回収1	105.46		1046.04		191.49		5.51		33.61	
3570	回収2	1.31	N	487.25	N	237.91	P	6.33	P	41.29	P
3713	回収1	7.76		1117.85		1267.74		3.94		45.08	
3713	回収2	107.22	P	633.56	N	957.18	N	5.44	P	39.59	N
5301	回収1	7.62								32.19	
5301	回収2	36.61	P	217.02		389.33		2.88		30.89	N
7757	回収1	4.49		838.39		11.24		7.90		43.35	
7757	回収2	138.56	P	705.18	N			5.33	N		
7966	回収1	3.03		120.82		326.72		5.59		38.67	
7966	回収2	31.04	P	1089.52	P	691.29	P	6.81	P	48.68	P
8075	回収1	6.81		968.26		840.06		8.10		58.65	
8075	回収2	34.62	P	620.97	N	876.55	P	6.27	N	51.36	N
8127	回収1	34.41		323.51		310.67		5.54		41.13	
8127	回収2	2.78	N	318.02	N	284.46	N	6.87	P	51.87	P
8431	回収1	4.53		1829.91		214.78		2.18		52.82	
8431	回収2	30.51	P	816.10	N	301.14	P	3.47	P	58.41	P
3831	回収1	32.95		804.87		491.46		6.83		36.16	
3831	回収2	0.29	N	491.17	N	912.29	P	7.31	P	23.62	N
3852	回収1	68.59		494.06		252.18		6.10		32.76	
3852	回収2	1.00	N	291.49	N	122.66	N	6.56	P	39.22	P
3852	回収3	0.60	N	375.97	N	100.53	N	1.34	N	22.83	N
5477	回収1	23.17		550.58		485.76		7.51		36.73	
5477	回収2	2.12	N	1101.83	P	575.69	P	7.55	P	34.98	N
7456	回収1	35.21		51.23		452.45		6.13		22.05	
7456	回収2	0.89	N	496.87	P	366.73	N	0.99	N	14.19	N

「N」及び「P」は、それぞれ被験体当たりの各マーカーに関する、観察ペア間の負又は正の関係を示す。下線を引いたデータは定量化の上限を超えるペア数であり、正の関係があると考えられる。

【0 3 3 2】

[0354]以下の表Dは、CRP及び増殖因子によって粘膜治癒を予測し得ることを示す：

10

20

30

【表 1 2】

被験体 ID	回収日	CRP		AREG		HGF		HRG		HB EGF		BTC		TGFα	
2834	回収1	6.88													
2834	回収2	24.33	P												
3570	回収1	105.46													
3570	回収2	1.31	N												
3713	回収1	7.76		0.00		17.40		0.00		6.90		0.00		2.20	
3713	回収2	107.22	P	0.00		13.20	N	0.00		5.80	N	0.00		0.00	N
5301	回収1	7.62													
5301	回収2	36.61	P												
7757	回収1	4.49		2.60		26.00		0.00		6.90		0.00		6.82	
7757	回収2	138.56	P	2.70	P	43.00	P	0.00		5.70	N	0.00		6.82	P
7966	回収1	3.03		4.20		21.00		0.00		6.10		34.58		3.33	
7966	回収2	31.04	P	2.40	N	36.00	P	0.00		5.70	N	0.00	N	2.62	N
8075	回収1	6.81		8.50		14.70		359.30		8.90		0.00		0.00	
8075	回収2	34.62	P	6.40	N	16.80	P	0.00	N	6.30	N	0.00		0.00	
8127	回収1	34.41		13.20		16.50		476.30		23.00		16.90		5.28	
8127	回収2	2.78	N	9.40	N	16.90	P	355.30	P	9.10	N	0.00	N	3.46	N
8431	回収1	4.53		5.00		21.40		0.00		5.50		0.00		0.00	
8431	回収2	30.51	P	31.30	P	24.80	P	671.90	P	23.10	P	0.00		25.00	P
3831	回収1	32.95													
3831	回収2	0.29	N												
3852	回収1	68.59		0.00		17.08		0.00		6.00		0.00		0.00	
3852	回収2	1.00	N	0.00		13.84	N	0.00		5.10	N	0.00		0.00	
3852	回収3	0.60	N												
5477	回収1	23.17		2.30		15.25		143.20		5.60		0.00		0.00	
5477	回収2	2.12	N	2.00	N	19.05	P	0.00	N	5.40	N	0.00		2.50	P
7456	回収1	35.21		16.70		0.00		315.30		8.10		0.00		5.10	
7456	回収2	0.89	N	6.60	N	12.92	P	128.90	N	3.60	N	0.00		2.70	N

「N」及び「P」は、それぞれ被験体当たりの各マーカーに関する、観察ペア間の負又は正の関係を示す。下

線を引いたデータは定量化の上限を超えるペア数であり、正の関係があると考えられる。

## 【0 3 3 3】

[0355]表 A、B、C 及び D は、CRP 及び増殖因子データにおけるマーカー値及び観察ペア間の関係を示す。 $\alpha = 0.1$ の基準を使用して、本発明者らは、3 増殖因子と CRP の間の関係を特定した。以下の表 (E) は、AREG、HRG 及び TGF の増大又は減少が CRP の増大又は減少と有意に関係があることを発見したことを強調する  $2 \times 2$  の分割表を示す。

【表 1 3】

		AREG*		HRG**		TGF-α***	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
CRP	陽性	6	4	7	1	8	5
	陰性	0	6	1	5	1	6

\*は $p=0.034$ を示す。\*\*は $p=0.026$ を示す。\*\*\*は $p=0.07$ を示す。

## 【0 3 3 4】

[0356]図 2 2 は、疾患の寛解を決定する際の、CRP レベルと増殖因子指数スコアの間の関係を例示する。

## 【0 3 3 5】

[0357]粘膜治癒の予測マーカーを同定するためのさらなる研究は、いくつかの臨床研究からの試料を含むことができる。1 つの非限定的な例として、臨床研究 A は、413 の試料 (患者当たり 1 ~ 5 試料での対試料) を含むことができる。臨床データは、患者の年齢、性別、体重、診断日、疾患部位、試料回収日、用量、結腸鏡検査結果、粘膜の改善、粘膜治癒の存在、及び / 又は同時薬物使用を詳述することができる。臨床研究 A では、最初の薬物注入の前に結腸鏡検査を実施することができる。別の非限定的な例として、臨床研究 B では、212 の UC 試料を分析することができる (110 の試料をフォローアップ時に CD と診断し、102 の試料は粘膜治癒に基づいて UC と診断した)。臨床データは、

10

20

30

40

50

患者の年齢、性別、体重、診断日、疾患部位、試料回収日、I F X 用量、結腸鏡検査結果（内視鏡検査の活性スコア）、アルブミンレベル、C R P レベル、及び / 又は M a y o スコアを詳述することができる。臨床研究 A 及び B では、誘導中第 0、2 及び 6 週で 3 回の注入を行うことができる。第 14、22、30、38、46 及び 52 週で維持期中に 6 回のさらなる薬物注入を実施することができる。2 回目の結腸鏡検査は維持期中に実施することができる。3 回目の結腸鏡検査はフォローアップ中に実施することができ、患者は薬物に応答性がある場合処置を継続することができる。

#### 【0336】

[0358] 本発明の方法を使用して T N F 媒介性疾患の個別化された治療管理をもたらすことができる。I B D と診断された患者に関する個別治療レジメンは、クローン病予後試験（例えば、その開示があらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる、P C T 国際公開第 2010/120814 号を参照）、限定されるものではないが、疾患活動性プロファイル（例えば、疾患負荷）、粘膜状態指数、及び / 又は実施例 5 中に記載した P R O 炎症指数を含めた、本明細書に記載する疾患状態及び / 又は長期的結果の予測因子に基づいて選択することができる。本発明の方法を使用して、患者が軽度の疾患活動性を有することを決定することができ、臨床医は栄養ベースの療法を推奨、処方、及び / 又は施すことができる（図 23A）。しかしながら、患者が攻撃的表現型を伴う軽度の疾患活動性を有することを決定する場合、チオプリンに加えて栄養ベースの療法を推奨、処方、及び / 又は施すことができる。患者が中程度の疾患活動性を有することを決定する場合、類似の療法を推奨、処方、及び / 又は施すことができる（図 23B）。患者が攻撃的表現型を伴う中程度の疾患活動性を有することを決定する場合、チオプリンと栄養療法（N x）又は適切な抗 T N F 薬物の組合せのいずれかを推奨、処方、及び / 又は施すことができる。いくつかの場合、抗 T N F モニター試験（例えば、その開示があらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる、P C T 国際公開第 2011/056590 号を参照）を使用して、患者が療法に应答し得るかどうかを決定することができる。重度の疾患活動性を決定する場合、最適用量で投与する適切な抗 T N F 薬物を推奨及び / 又は処方することができる（図 23C）。このような場合、抗 T N F モニター試験（例えば、その開示があらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる、P C T 国際公開第 2011/056590 号を参照）を使用して、患者が薬物に应答し得るかどうかを予測することができる。他の場合、重度の疾患活動性を有する患者が栄養ベースの療法も受けることを推奨及び / 又は指示することができる。

#### 【0337】

[0359] いくつかの実施形態では、本発明の方法を処置パラダイムにおいて使用して、患者の処置を個別化することができる（図 24）。最初に、粘膜状態のマーカーの発現に基づいて処置を選択することができる。次に、疾患負荷（例えば、疾患活動性指数）に基づいて薬物用量を選択することができる。療法薬物を投与した後、粘膜治癒のマーカーの発現から初期应答を決定することができる。A T M モニターを使用して、療法に应答性がある患者又は療法に应答性がない患者を特定することができる。应答性がない患者には、次いで適切な抗 T N F 薬物を処方することができる。

#### 【0338】

実施例 11 新規なインフリキシマブ（I F X）とインフリキシマブに対する抗体（A T I）のアッセイは、クローン病（C D）がある患者における疾患活動性を予測する。

[0360] 以前の研究は、用量維持中に I F X の高いトラフ濃度を有する C D がある患者は、処置から恩恵を受けやすいことを示す。しかしながら、A T I の開発は薬物クリアランスの増大及び应答の消失につながり得る。療法剤のモニターによって、臨床医は有効薬物濃度を維持することができる。薬物の存在下で A T I を測定できないことによって、以前の A T I アッセイは制約を受けていたが、液相 I F X 及び A T I アッセイはこの問題を克服している（例えば、その開示があらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる、P C T 国際公開第 2011/056590 号を参照）。本発明者らは、これらのアッセイを使用して血清中 I F X 濃度、A T I、及び疾患活動性の間の関係を評価した。

## 【 0 3 3 9 】

[0361]方法： I F X 処置の維持期を評価した 4 つの予測 C D R C T 又はコホート研究 ( C O M M I T 、 L e u v e n 用量最適化研究、 C a n a d i a n M u l t i c e n t e r a n d I M E D E X 1 ) における 5 3 2 参加者からの 2 0 2 1 の血清試料を使用し、データは分析用に組み合わせた。 H P L C ベースの液相アッセイを使用して、 I F X 及び A T I の血清中レベルを測定した。 E L I S A によって測定した C R P を使用して、疾患活動性を評価した。 C R P により測定したように、 R O C 分析によって、疾患活動性を最も識別した I F X 閾値を決定した。本発明者らは、連続的な時点で得た試料のペアを調べ、ペアの最初のデータ地点における I F X と A T I の存在と後の測定中の C R P の間の関係を評価した。 1 2 0 5 のこのような観察結果が存在した。本発明者らは、 4 つの異なる患者群、すなわち I F X が閾値以上で A T I - 、 I F X が閾値未満で A T I - 、 I F X が閾値以上で A T I + 、及び I F X が閾値未満で A T I + を特定した。回帰分析によって、 C R P の予測因子として I F X と A T I の間の考えられる相互作用を評価した。

10

## 【 0 3 4 0 】

[0362]結果： C R P は、  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  の I F X 濃度閾値で I F X 状態を最も識別することができる ( R O C A U C = 7 4 % ) 。ペアの連続試料を使用して、 A T I と I F X の両方をメジアン C R P と関連付けた ( 表 2 ) 。 A T I + 患者は全体的に高い C R P レベルを有していたが、この群内では、閾値を超える I F X とその後の C R P の間に関係はなかった。 A T I - 患者では、  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  未満の I F X レベルを有する患者において C R P は有意に高かった。回帰分析では、 A T I 陽性、  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  以上の I F X 及び相互作用条件はいずれも C R P の有意な予測因子であった。 C R P は A T I 陰性であった患者より A T I 陽性患者において 3 1 % 高く、  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  未満の I F X レベルを有した患者と比較して  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  以上の I F X レベルを有した患者において 6 2 % 低かった。

20

## 【 0 3 4 1 】

[0363]結論：本発明者らは、 A T I 陽性は疾患活動性の増大を予測し、一方  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  の閾値を超える I F X 濃度は有意に低い疾患活動性を予測することを示している。 A T I + 患者では、  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  を超える I F X 濃度は C R P に対して影響がなく、最適薬物濃度の存在下にもかかわらず A T I の存在下で I F X の利点が減少することを示す。これらの発見は、療法薬物のモニターが I F X 療法を最適化する際の重要なツールである概念を支持する。ペアの連続試料及び回帰分析を使用して、以下の表中に示すように、 A T I と I F X の両方をメジアン C R P と関連付けた：

30

【 表 1 4 】

	メジアンCRP濃度(ng/ml;四分位数範囲)		有意性
	ATI-患者中	ATI+患者中	
3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のIFX	5.65 (1.68, 16.1)	8.40 (3.10, 20.1)	***
3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のIFX	1.50 (1.00, 4.70)	9.90 (5.82, 20.2)	**
有意性	***	NS	

メジアンCRP濃度及び四分位数範囲(丸括弧内)、ng/ml単位。星印は2試料のマンホイットニーのU検定の有意性レベルを示す(\*\*\*、 $p < 0.001$ ; \*\*、 $p < 0.01$ ; \*、 $p < 0.05$ ; NS、有意性なし)

40

## 【 0 3 4 2 】

実施例 1 2 新規なインフリキシマブ ( I F X ) とインフリキシマブに対する抗体 ( A T I ) のアッセイは、クローン病 ( C D ) がある患者における疾患活動性を予測する。

[0364]この実施例は、クローン病 ( C D ) がある患者における疾患活動性を予測する際の、インフリキシマブ ( I F X ) とインフリキシマブに対する抗体 ( A T I ) のアッセイの使用を例示する。この実施例は、 C 反応性タンパク質 ( C R P ) レベルにより測定した疾患活動性を最も識別することができる I F X 閾値を決定する方法も例示する。この実施例は、疾患活動性の指数として働き得る、 C D 及び C R P レベルと A T I 及び I F X の両

50

方の関係も例示する。

#### 【 0 3 4 3 】

[0365] 以前の研究は、用量維持中に I F X の高いトラフ濃度を有する C D がある患者は、処置から恩恵を受けやすいことを示している。しかしながら、A T I の開発は薬物クリアランスの増大及び応答の消失につながり得る。療法剤のモニターによって、臨床医は有効薬物濃度を維持することができる。薬物の存在下で A T I を測定できないことによって、以前の A T I アッセイは制約を受けていたが、（その開示があらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組み込まれる）P C T 国際公開第 2 0 1 1 / 0 5 6 5 9 0 号中に記載された液相 I F X 及び A T I アッセイはこの問題を克服している。

#### 【 0 3 4 4 】

[0366] この研究において、本発明者らは液相 I F X 及び A T I アッセイを使用して、C R P によって測定した、血清中 I F X 濃度、A T I、及び疾患活動性の間の関係を評価した。本発明者らは、C O M M I T、L e u v e n 用量最適化研究、C a n a d i a n M u l t i c e n t e r a n d I M E D E X 1 を含めた、4 つの予測 C D ランダム化比較試験（R C T）又はコホート研究における 5 3 2 参加者からの 2 0 2 1 の血清試料を分析した。組み合わせた分析は I F X 処置の維持期中の試料に限定した。プールした C R P 間で異質でない証拠が存在した。

#### 【 0 3 4 5 】

[0367] H P L C ベースの液相アッセイを使用して、I F X 及び A T I の血清中レベルを測定した。E L I S A により C R P を測定し、これを使用して疾患活動性を評価した。レシーバーオペレーター曲線（R O C）分析を実施して、（例えば、高い C R P 値と低い C R P 値の間の）疾患活動性を最も識別することができる I F X トラフ閾値（例えば、量又は濃度）を決定した。図 2 5 は R O C 分析を示す。C R P 及び 9 の I F X トラフ閾値を分析し、レシーバーオペレーター特性曲線（A U C）下の R O C 領域は以下の通りである：

#### 【 表 1 5 】

IFX トラフ閾値(μg/ml)	0.1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
ROC AUC	0.682	0.727	0.733	0.743	0.727	0.717	0.699	0.689	0.678

#### 【 0 3 4 6 】

[0368] R O C 分析は、C R P は  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  の I F X 濃度閾値で I F X 状態を最も識別することができることを示した（R O C A U C = 7 4 %）。例えば、 $3.0 \mu\text{g} / \text{ml}$  の I F X トラフ濃度閾値では、「低い」I F X 血清中濃度を有するランダムに選択した試料は、この時間の「高い」I F X 血清中濃度 7 4 . 3 % を有するランダムに選択した試料より高い C R P レベルを有する。I F X、A T I 及び C R P の関係の分析では、 $3.0 \mu\text{g} / \text{ml}$  の血清中 I F X トラフ閾値を使用した。

#### 【 0 3 4 7 】

[0369] 経時的な血清中 I F X 濃度、A T I、及び C R P レベルの関係を決定するため、本発明者らは、一連の時点で得た試料のペアを調べた。1 0 0 日のタイムギャブリミットを時点で課した。本発明者らは、ペアの最初のデータ地点における I F X と A T I の存在と後の測定中の C R P の間の関係を評価した（図 2 6 A）。図 2 6 B は、試料に関する一連の時点での C R P レベル、I F X 血清中濃度及び A T I 状態を示す。合計 1 , 2 0 5 の観察結果を調べた。

#### 【 0 3 4 8 】

[0370] 回帰分析（例えば、通常最小二乗法による回帰）を実施して、疾患の予測因子（すなわち、C R P レベル）として、事前の I F X と事前の A T I の間の考えられる相互作用を評価した。特に、第 2 の時点の観察で C R P を対数変換した。事前の I F X は、計算した  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  のトラフ閾値より上又は下の I F X 濃度を有する第 1 の時点である。事前の A T I は、検出限界（L O D）である  $3.13 \text{ U} / \text{ml}$  より上又は下の第 1 の時点の

A T I である。ペアの連続試料及び回帰分析を使用して、以下の表中に示すように、A T I と I F X の両方をメジアン C R P と関連付けた：

【表 1 6】

	メジアンCRP濃度(ng/ml;四分位数範囲)		有意性
	ATI-患者中	ATI+患者中	
3µg/ml未満のIFX	5.65 (1.68, 16.1)	8.40 (3.10, 20.1)	***
3µg/ml以上のIFX	1.50 (1.00, 4.70)	9.90 (5.82, 20.2)	**
有意性	***	NS	

メジアンCRP濃度及び四分位数範囲(丸括弧内)、ng/ml単位。星印は2試料のマンホイットニーのU検定の有意性レベルを示す(\*\*\*、 $p<0.001$ ; \*\*、 $p<0.01$ ; \*、 $p<0.05$ ; NS、有意性なし)

。

【 0 3 4 9 】

[0371]これらの結果は、因子及び因子間の相互作用は有意であることを示す。回帰係数は A T I + 試料に関して 0 . 2 7 2、及び 3 µ g / m l 以上の I F X に関して - 0 . 9 7 9 であると計算した。

【 0 3 5 0 】

[0372]本発明者らは、4つの異なる患者群：(1) I F X が閾値以上で A T I -、(2) I F X が閾値未満で A T I -、(3) I F X が閾値以上で A T I +、及び(4) I F X が閾値未満で A T I + を特定した。分析で使用した 1, 2 0 5 の観察結果の中で、6 0 5 が I F X が閾値以上で A T I - であり、1 9 6 が I F X が閾値未満で A T I - であり、4 1 が I F X が閾値以上で A T I + であり、3 6 3 が I F X が閾値未満で A T I + であった。

【 0 3 5 1 】

[0373] A T I + 患者は全体的に高い C R P レベルを有していたが、この群内では、閾値を超える I F X レベルと C R P の間に関係はなかった(図 2 7)。A T I - 患者では、閾値未満の I F X レベルを有する患者において C R P レベルは有意に高かった(図 2 7)。

【 0 3 5 2 】

[0374]回帰分析では、A T I 陽性、3 µ g / m l 以上の I F X 及びそれらの相互作用はいずれも C R P レベルの有意な予測因子であった。C R P は A T I - であった患者より A T I + 患者において 3 1 % 高く、3 µ g / m l 未満の I F X レベルを有した患者と比較して 3 µ g / m l 以上の I F X レベルを有した患者において 6 2 % 低かった。I F X 濃度と C R P レベルの間の関係は、A T I + 患者群と A T I - 患者群の間で異なる。

【 0 3 5 3 】

[0375]この研究において、本発明者らは、C R P により測定して、A T I 陽性は疾患活動性の増大を予測することを示した。本発明者らは、3 µ g / m l の閾値を超える I F X 濃度は有意に低い疾患活動性を予測することも示した。A T I + 患者では、3 µ g / m l を超える I F X 濃度は C R P レベルに対して影響がなく、最適薬物濃度の存在下にもかかわらず A T I の存在下で I F X の利点が減少することを示唆する。

【 0 3 5 4 】

[0376]本発明者らは、C R P により測定した疾患活動性は、大きな組合せデータセットにおいて I F X と A T I の両方と強く関連していることを示した。したがって、クローン病活動性がある患者は、トラフ時の I F X と A T I の両方のレベルの知識から恩恵を被ることができる。実験によるこれらの関係の誘導に基づいて、以下の処置パラダイムを作製した。例えば、トラフ時の閾値未満の I F X 及び A T I - を有するクローン病がある症候性患者は、I F X 療法の用量増大から恩恵を被ることができる。閾値以上の I F X 及び A T I - を有する患者は、内視鏡検査を受けること又は療法を変更することから恩恵を被ることができる。A T I が高い場合、又は A T I が低い場合療法用量を最適化する際に、トラフ時の閾値未満の I F X 及び A T I + を有する症候性患者は療法の変更から恩恵を被る

10

20

30

40

50

ことができる。疾患活動性（例えば、CRPレベル）が高い場合、閾値以上のIFX及びATI+を有する患者は療法の変更から恩恵を被ることができる。或いは、その患者中の疾患活動性（例えば、CRPレベル）が低い場合、さらなるモニターが勧められる。処置パラダイムは以下の表中に記載する：

【表 17】

	ATI-	ATI+
閾値未満のIFX	用量増大	療法の変更(高いATI) 又は 用量最適化(低いATI)
閾値以上のIFX	内視鏡検査によるチェック 又は 療法の変更	療法の変更(高活性) 又は モニター(低活性)

10

## 【0355】

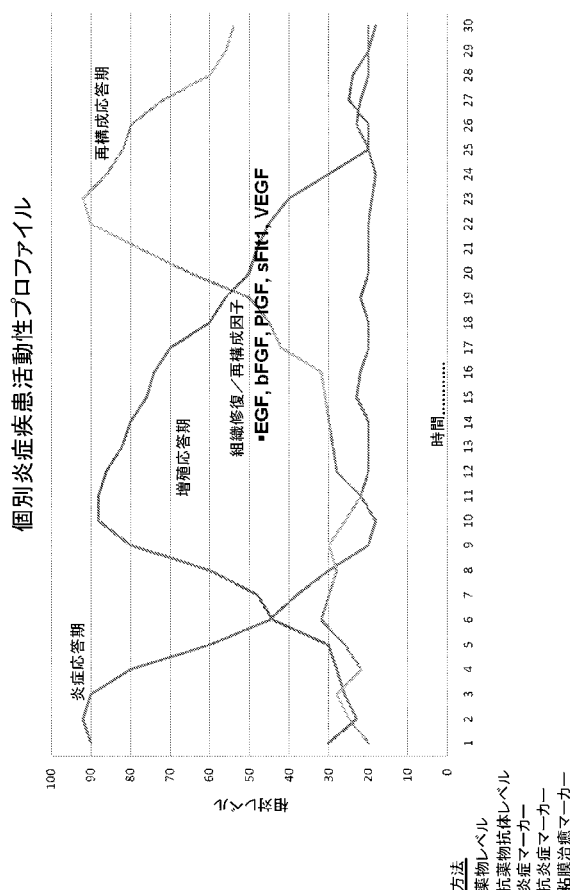
[0377]これらの発見は、本発明の方法を使用する療法薬物のモニターは、IFX療法を最適化する際の重要なツールであることを実証する。

## 【0356】

[0378]理解を明瞭にする目的での例示及び実施例によって、前述の本発明をある程度詳細に記載してきたが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲内で、特定の変更及び改変を実施することができることを理解するであろう。さらに、本明細書で与えるそれぞれの参考文献は、それぞれの参考文献が参照により個別に組み込まれる場合と同じ程度で、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【図 1】



【図 2 A - 1】

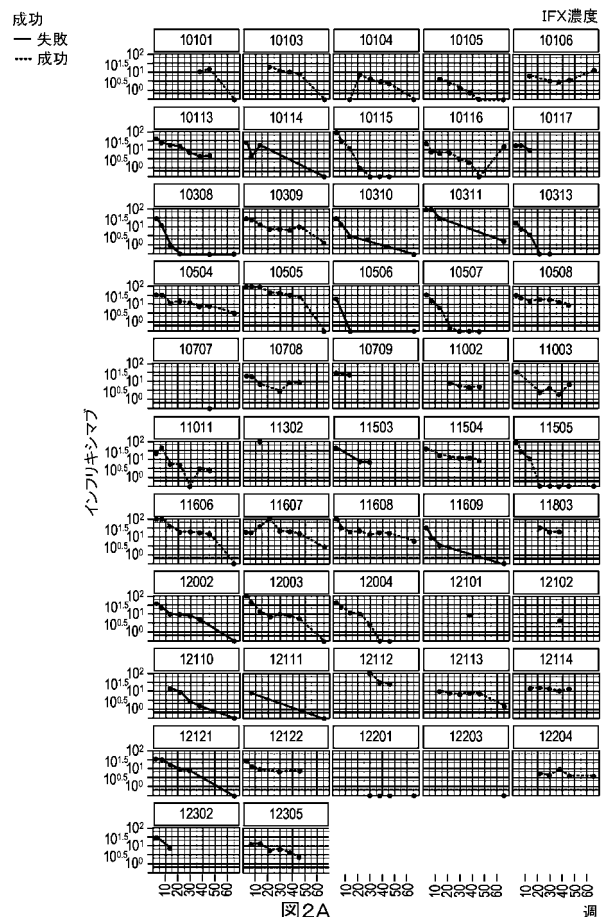


図 2A

週

【 図 2 A - 2 】

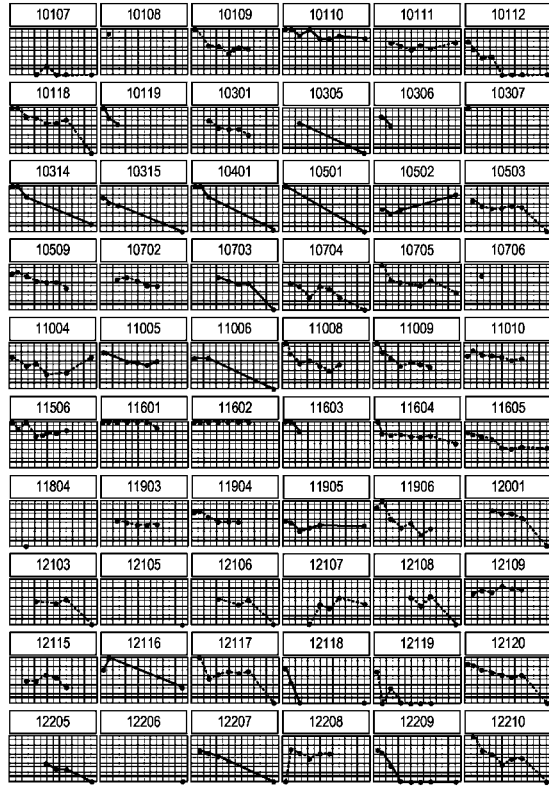


図2A(続き)

【 図 2 B - 2 】

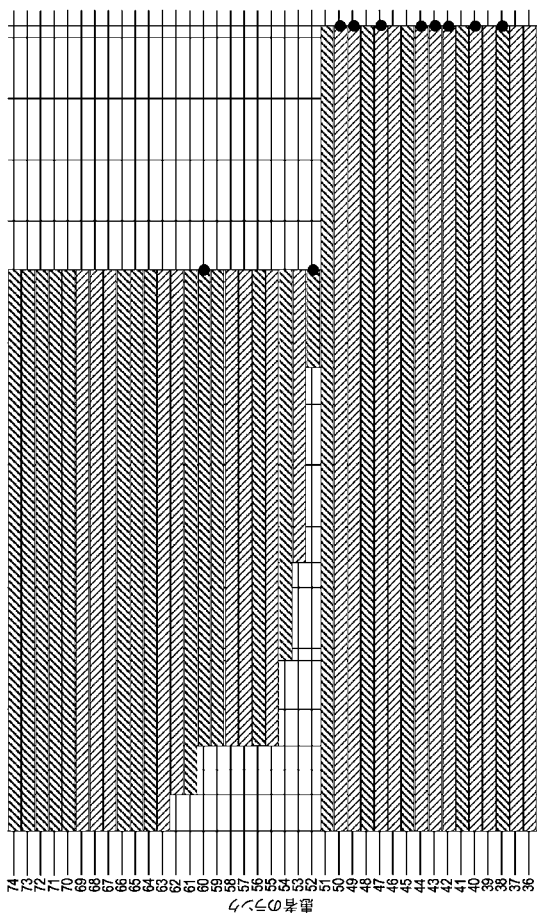


図2B(続き)

【 図 2 B - 1 】

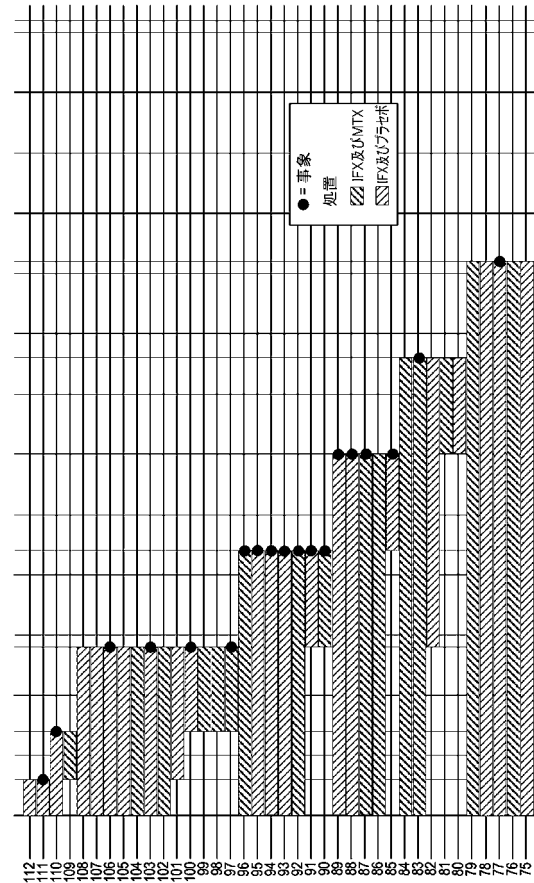


図2B

【 図 2 B - 3 】

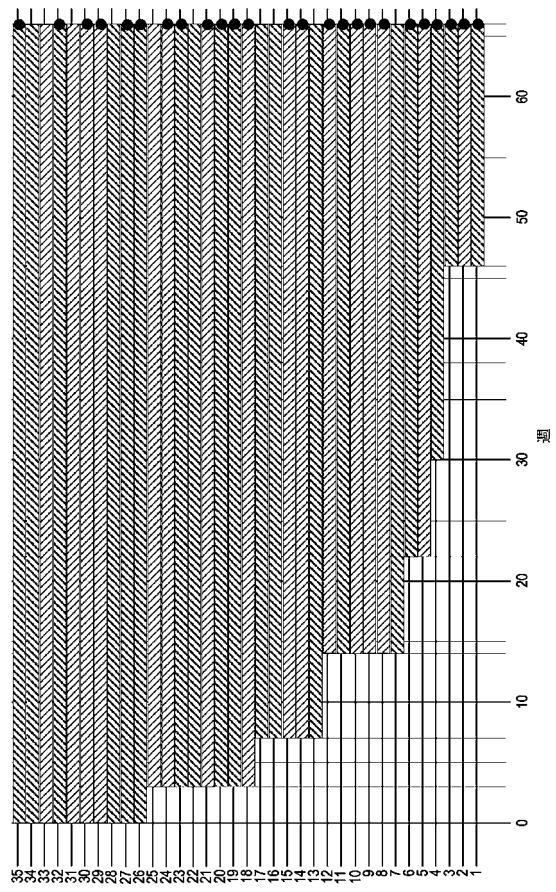


図2B(続き)



【図 3 A - 1】

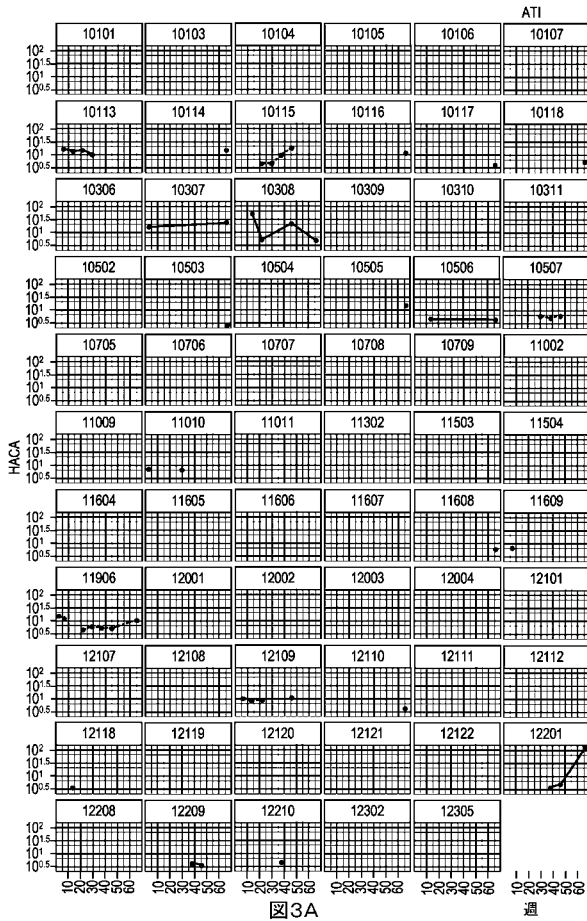


図3A

【図 3 A - 2】

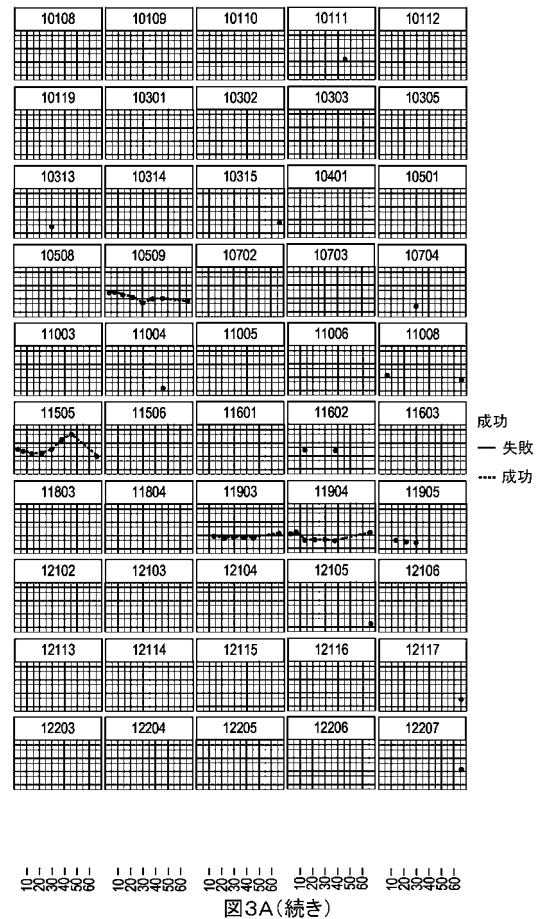


図3A(続き)

【図 3 B - 1】

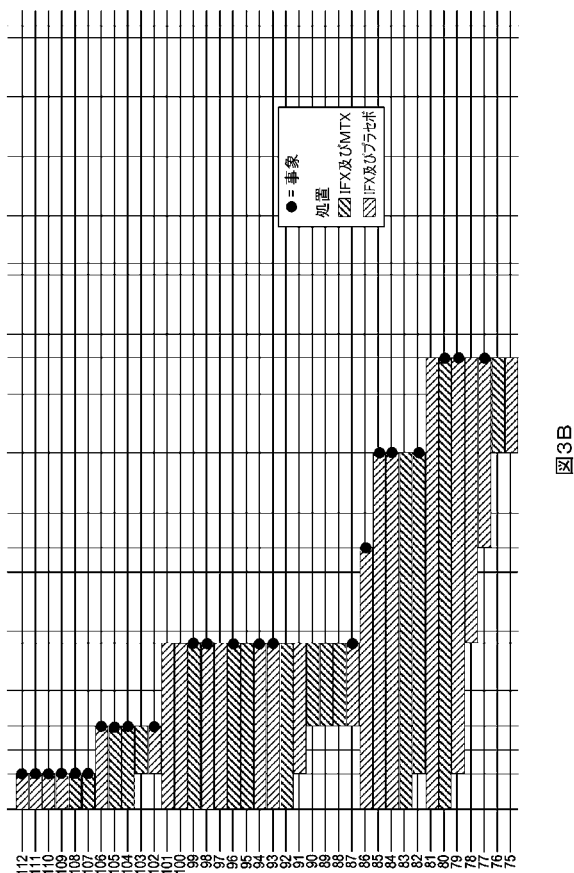


図3B

【図 3 B - 2】

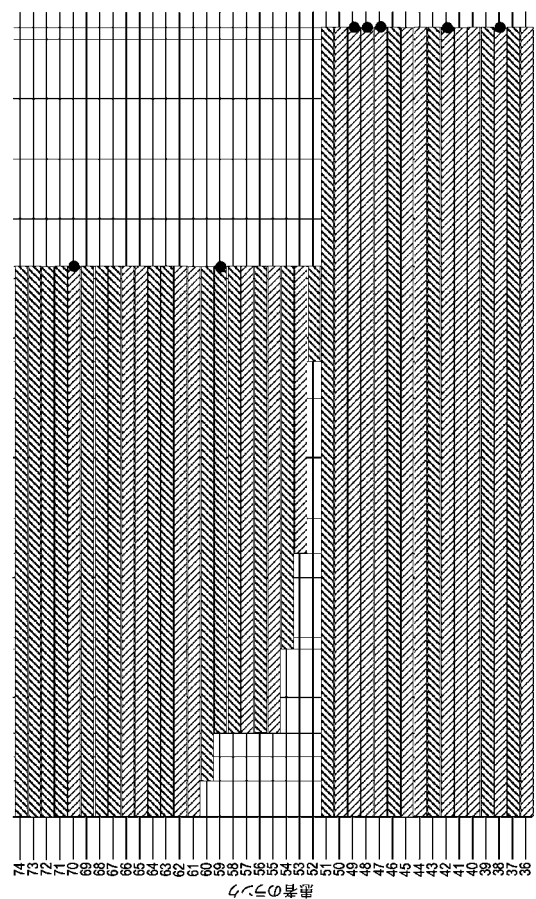


図3B(続き)

【図3B-3】

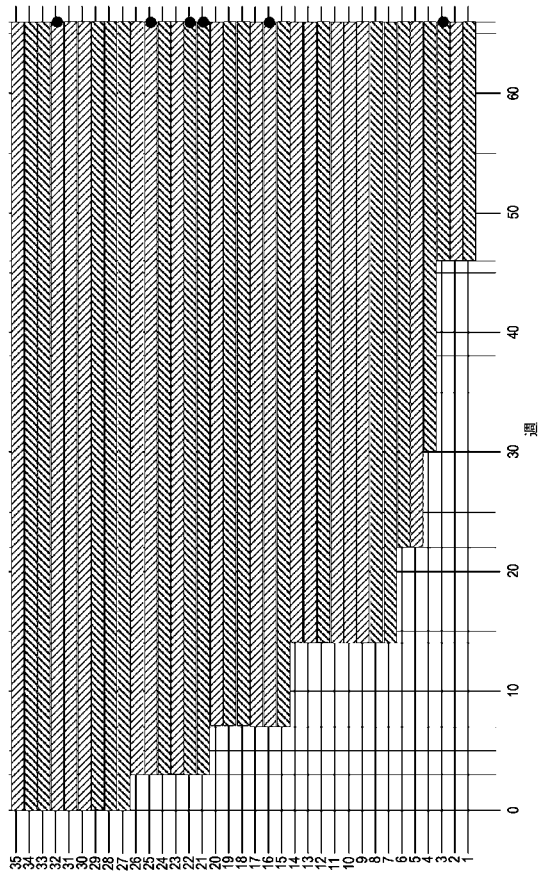
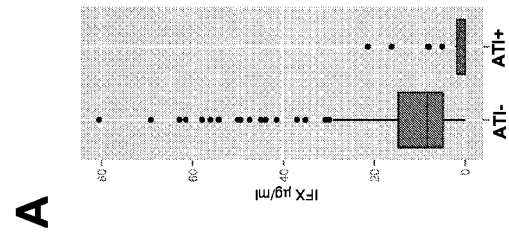
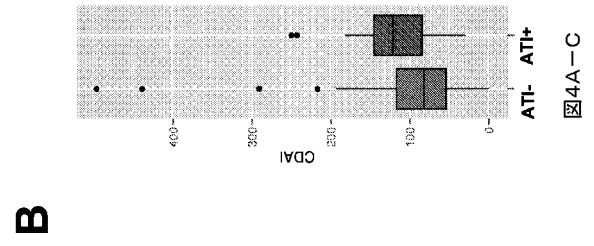
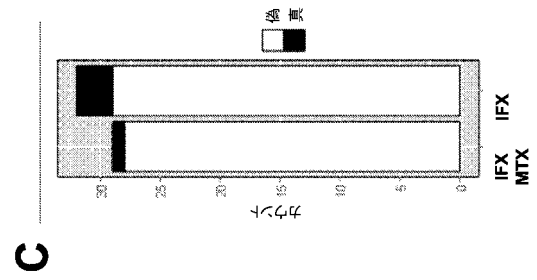


図3B(続き)

【図4】



【図6】

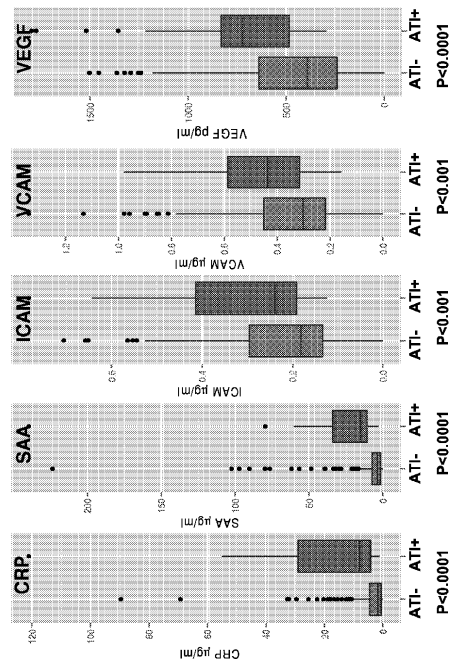


FIG. 6

【図5】

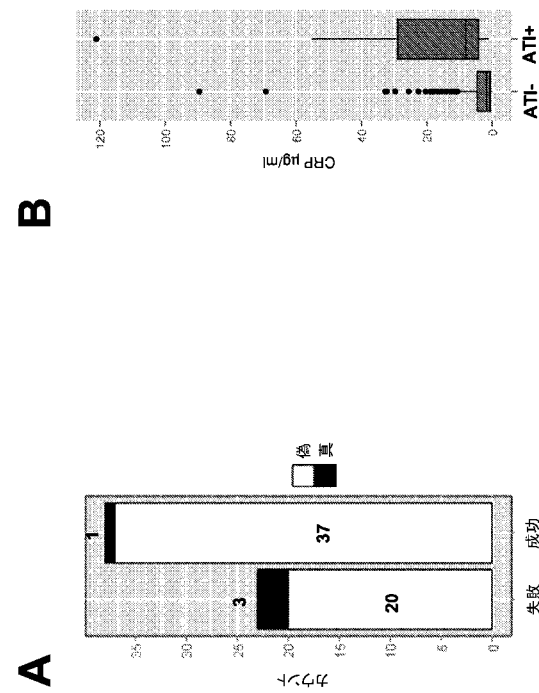
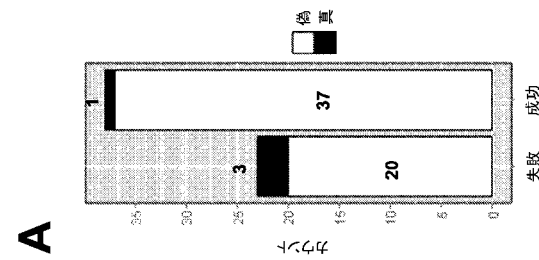


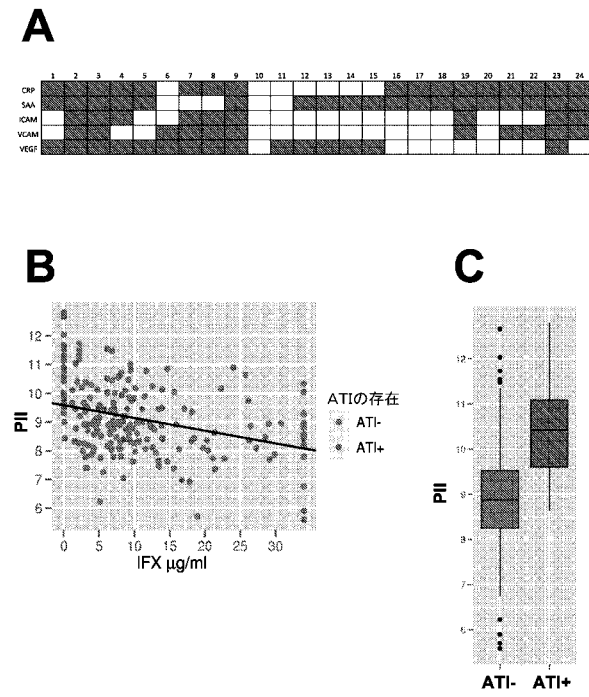
図5A-B

B



A

【図7】



【図8】

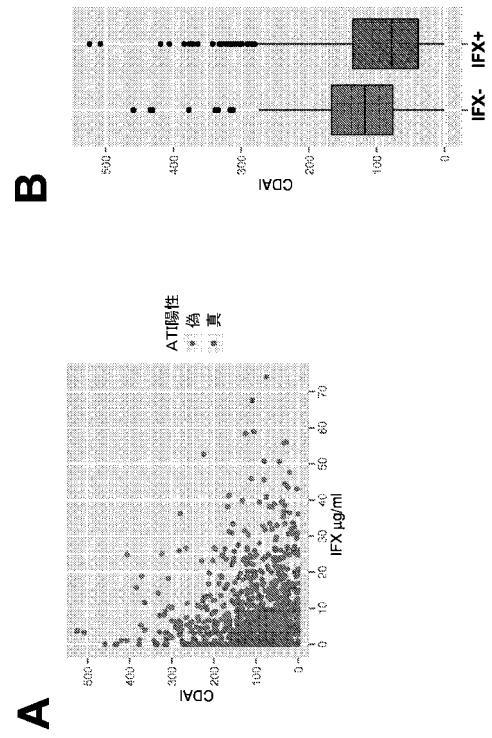


図8A—B

【図9】

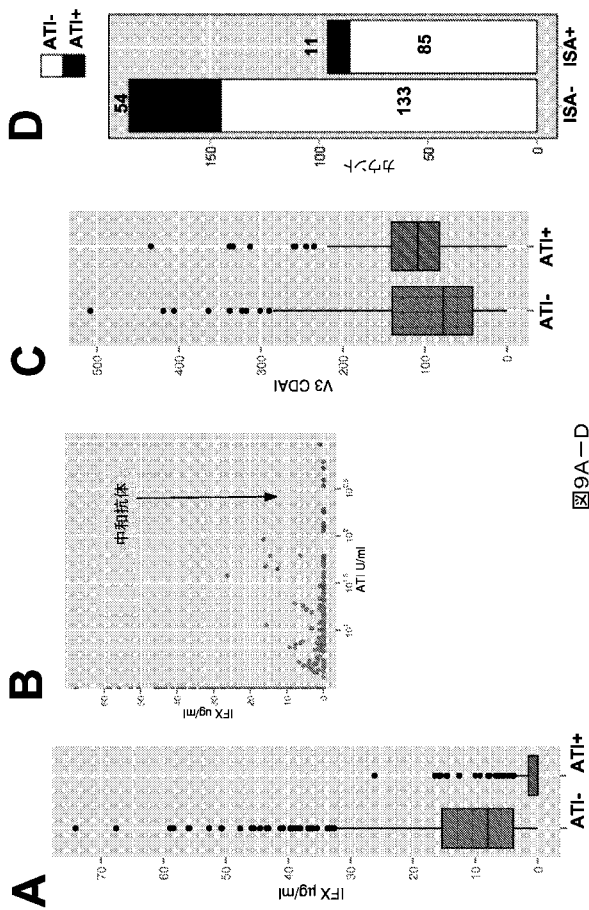


図9A—D

【図10】

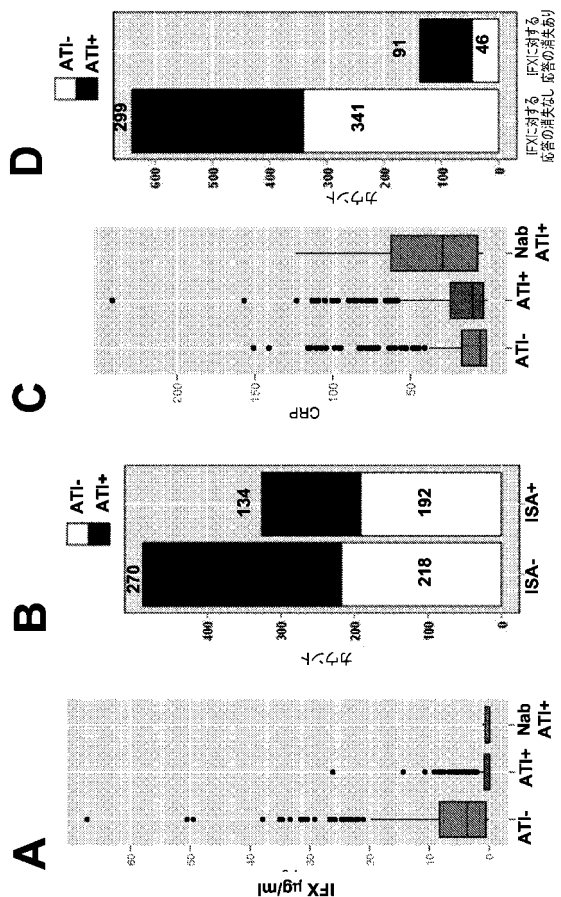


図10A—D

【 図 1 1 - 1 】

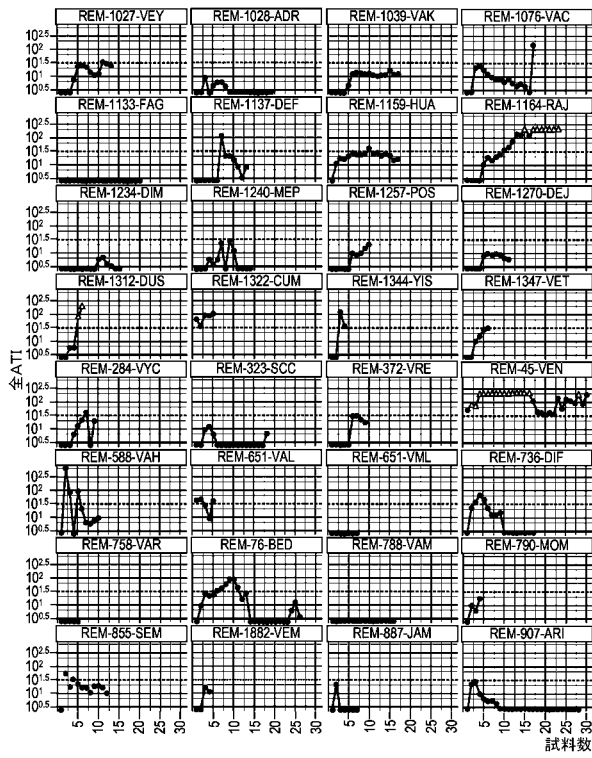


図 11

【 図 1 1 - 2 】

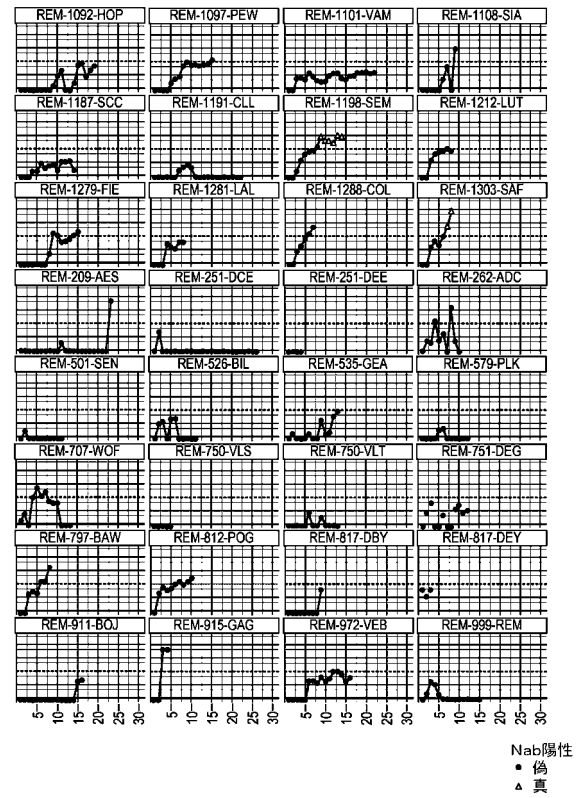


図 11 (続き)

【 図 1 2 】

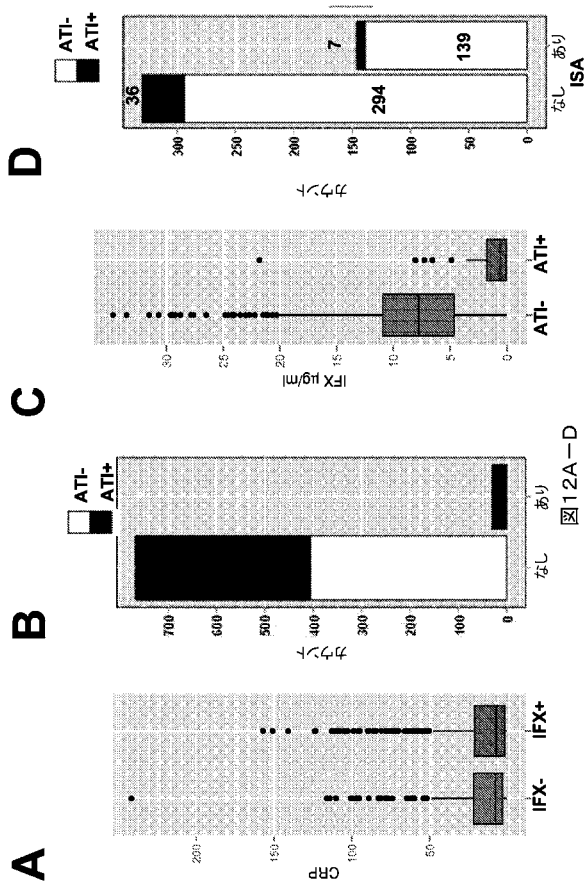


図 12A-D

【 図 1 3 】

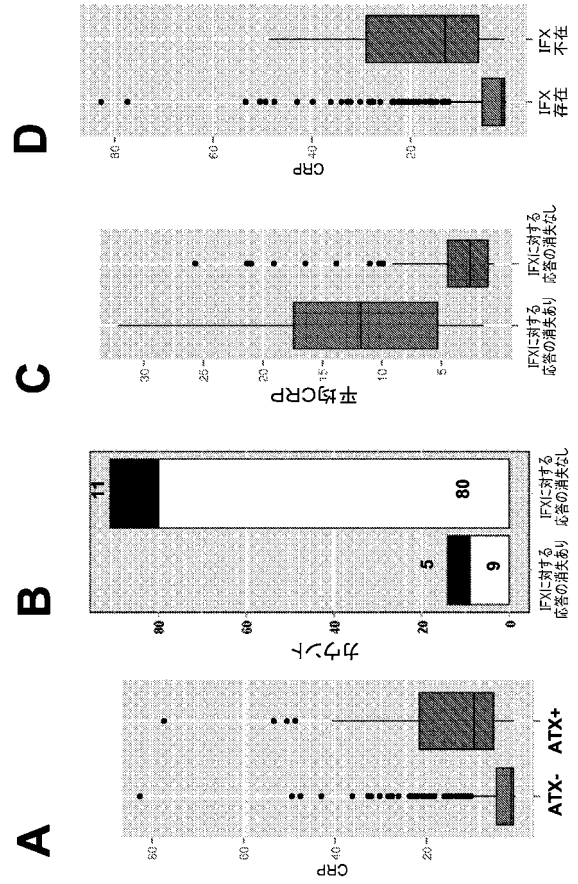


図 13A-D

【図 14】

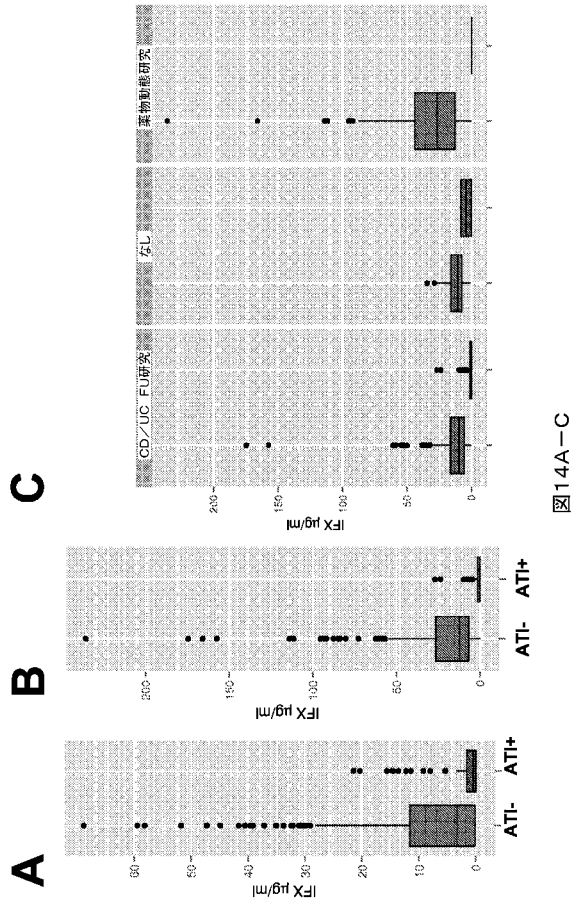


図14A-C

【図 16】

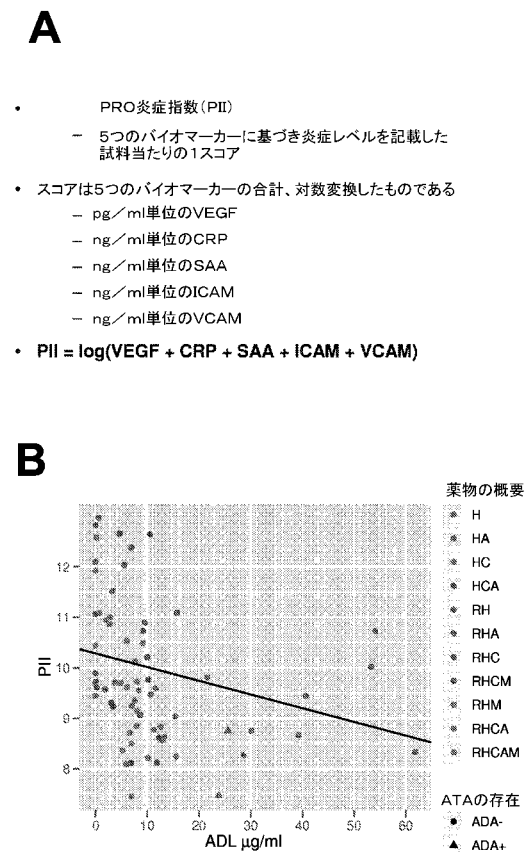


図16A-B

【図 15】

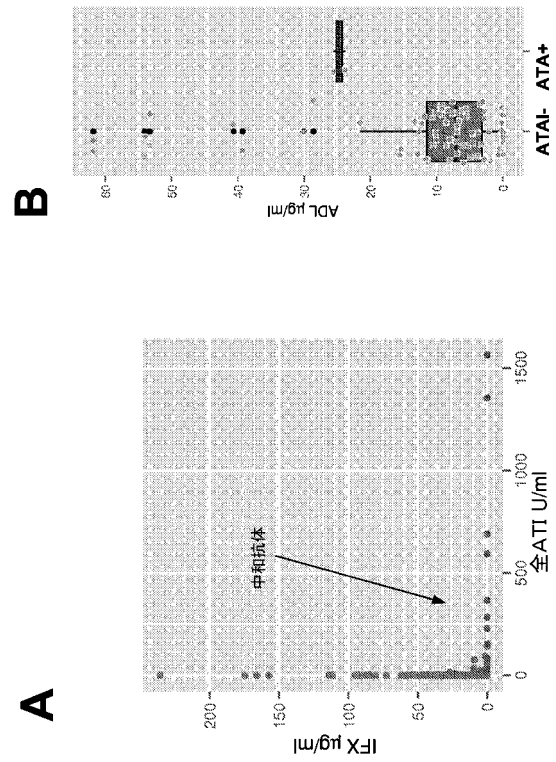
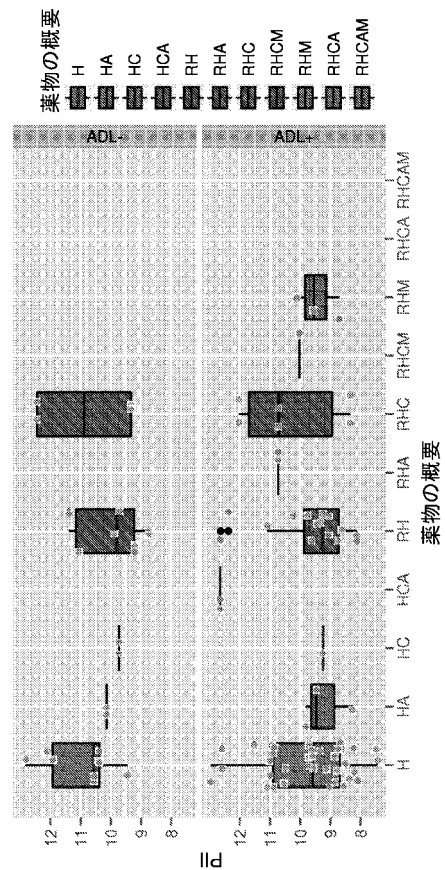


図15A-B

【図 17】

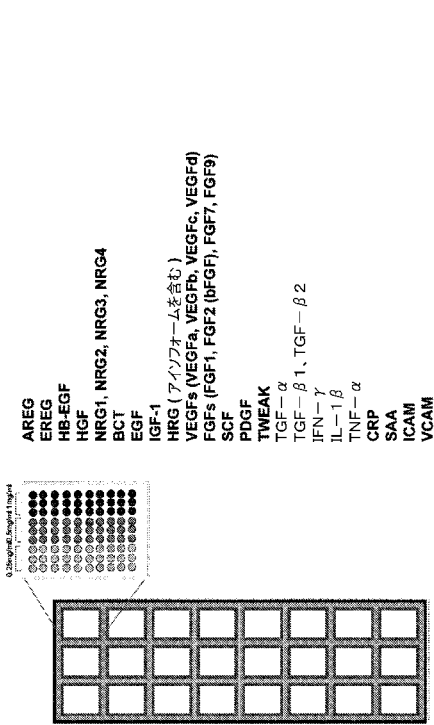


【図 18】

- 疾患活動性の測定値と共に  
新規な移動度シフトアッセイを使用して、  
活性CD及びUCを有する患者を分析する：
  - ― 薬物動態分析
    - 排出率
  - ― 疾患活動性プロファイルマーカー
    - インブリキシマブ及びATIレベルの変化と関係があるマーカーを選択する
  - ― 粘膜炎
    - バイオマーカー及び内視鏡検査
- これらの方法を利用して見出した相関によって、  
本発明者らは患者の処置を個別化することができる

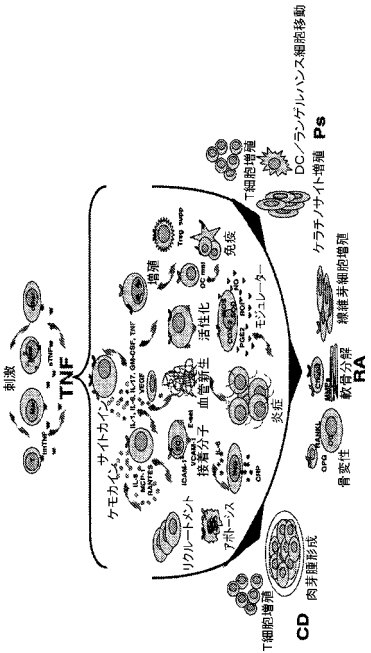
【図 20】

増殖因子、サイトカイン、ケモカイン、急性期タンパク質及び細胞接着分子

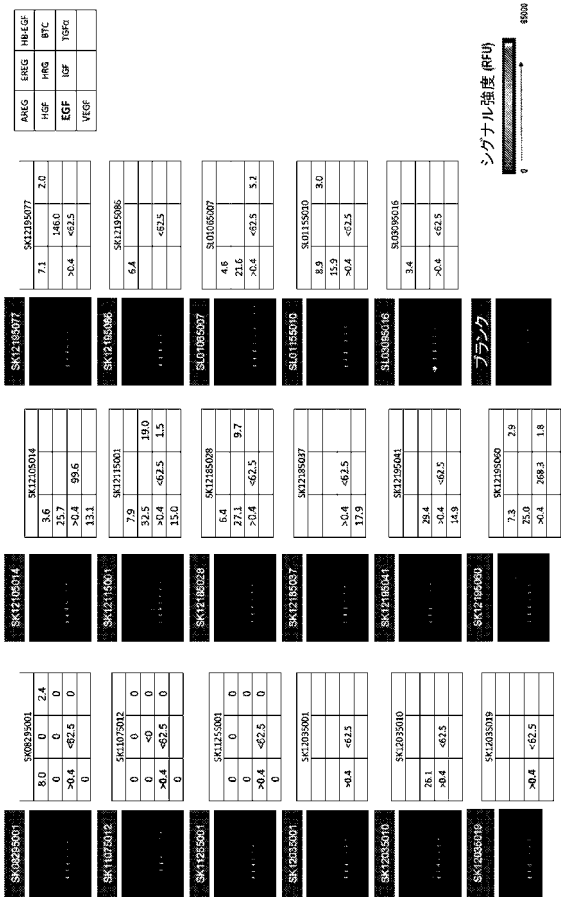


【図 19】

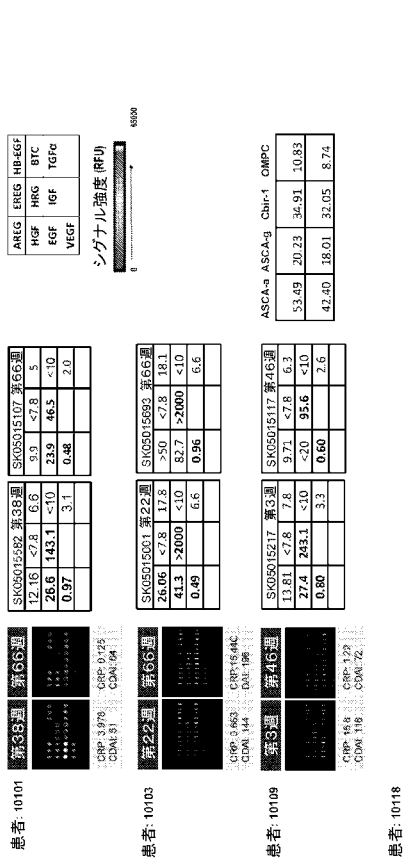
サイトカインバイオマーカーを検出するための多重アッセイ: bFGF, TNF-α, IL-12(p70), IL-1β, IL-2, GM-CSF, IL-13, IFN-γ, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3.  
炎症マーカーを検出するための多重アッセイ: SAA, CRP, ICAM, VCAM  
炎症を検出するための多重アッセイ: TGFβ, IL-10



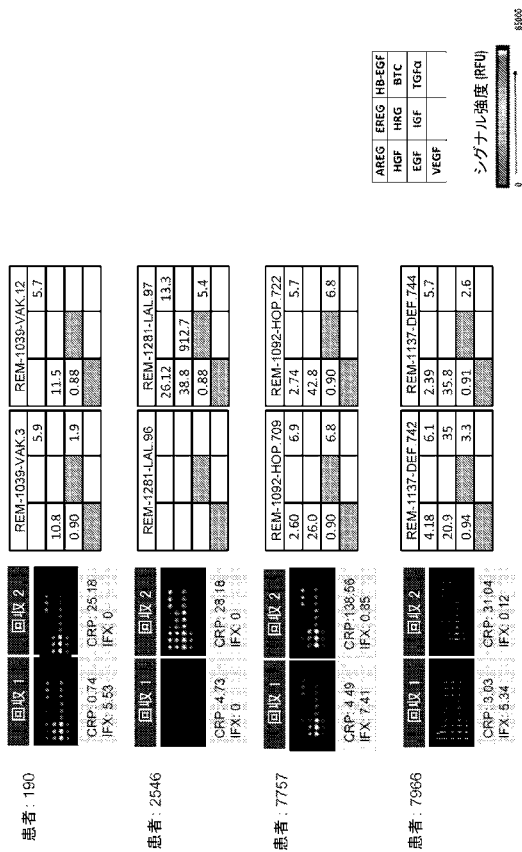
【図 21 A】



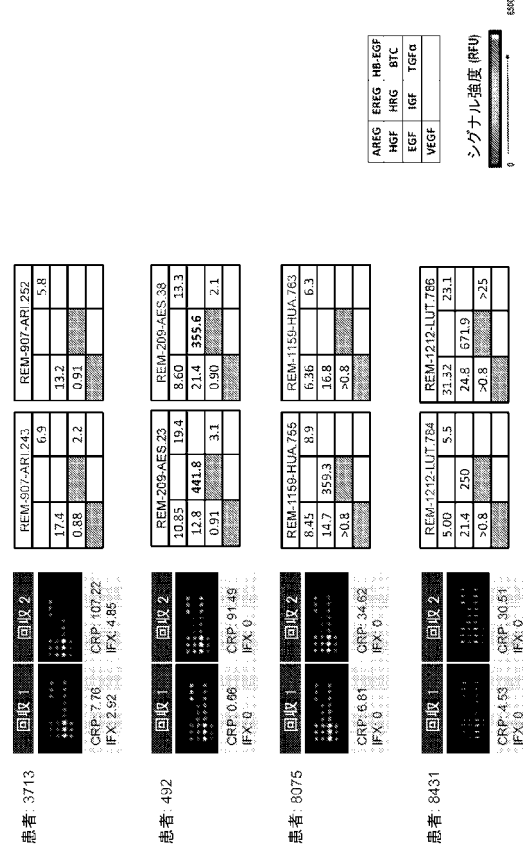
【図 2 1 B】



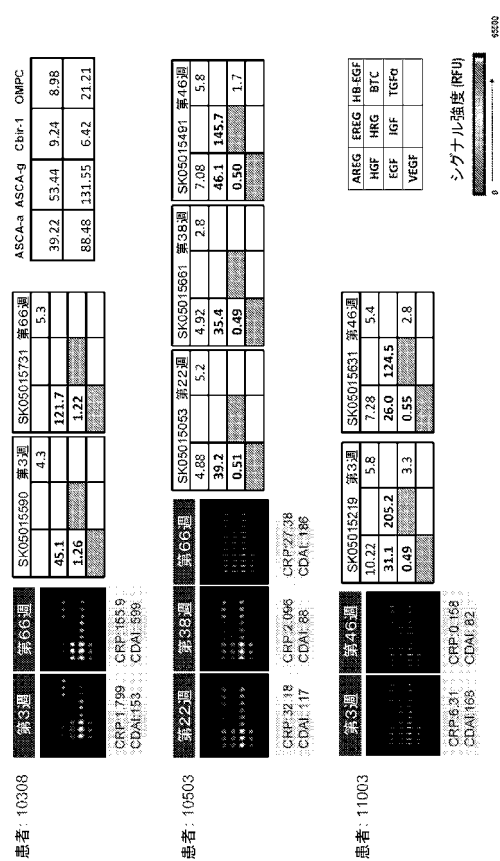
【図 2 1 D】



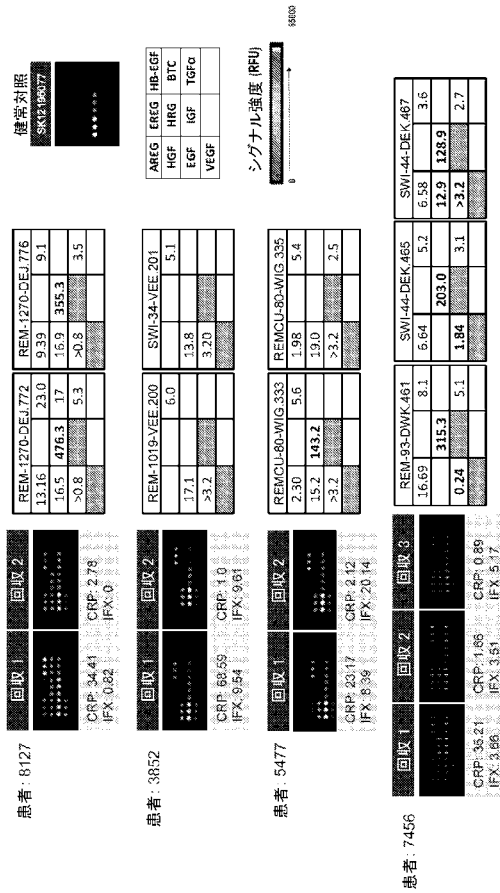
【図 2 1 C】



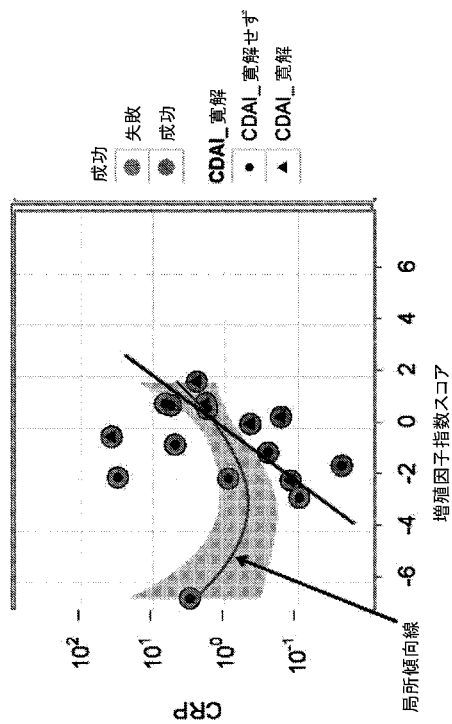
【図 2 1 E】



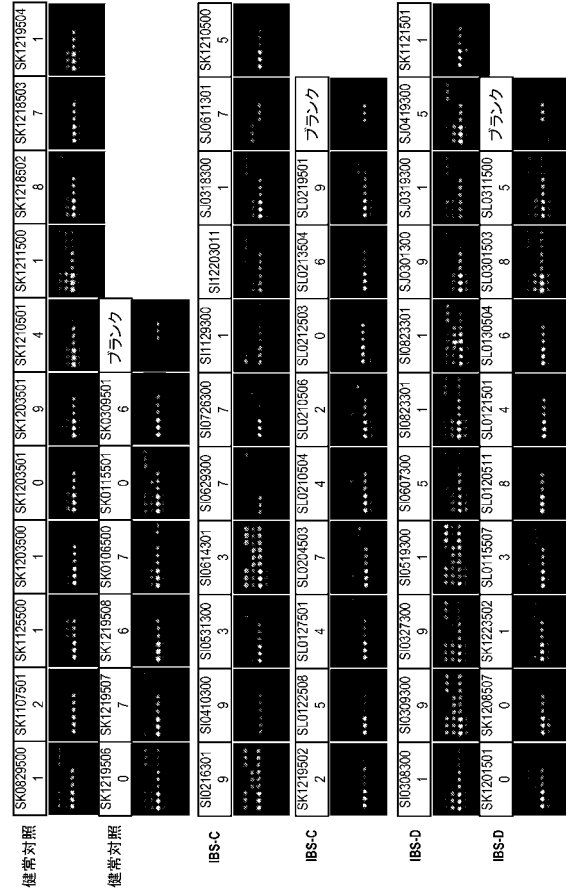
【 図 2 1 F 】



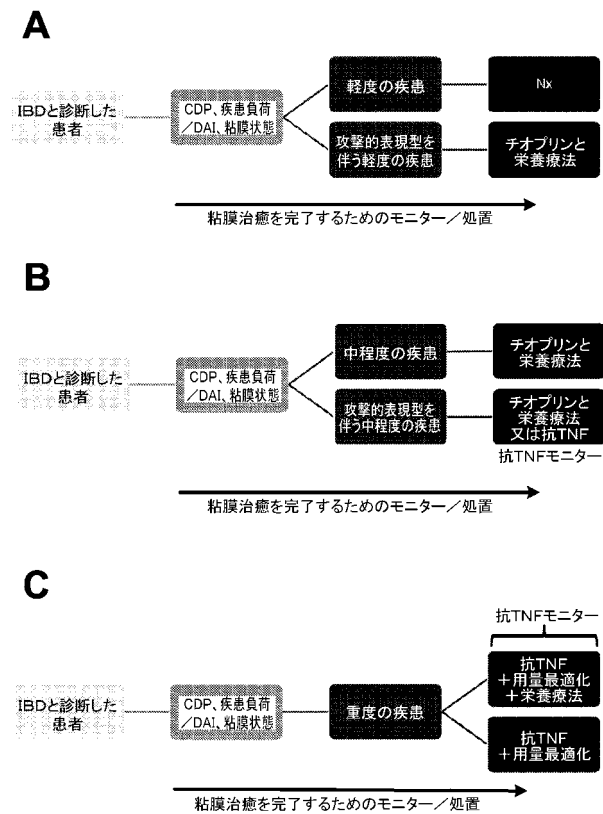
【 図 2 2 】



【 図 2 1 G 】

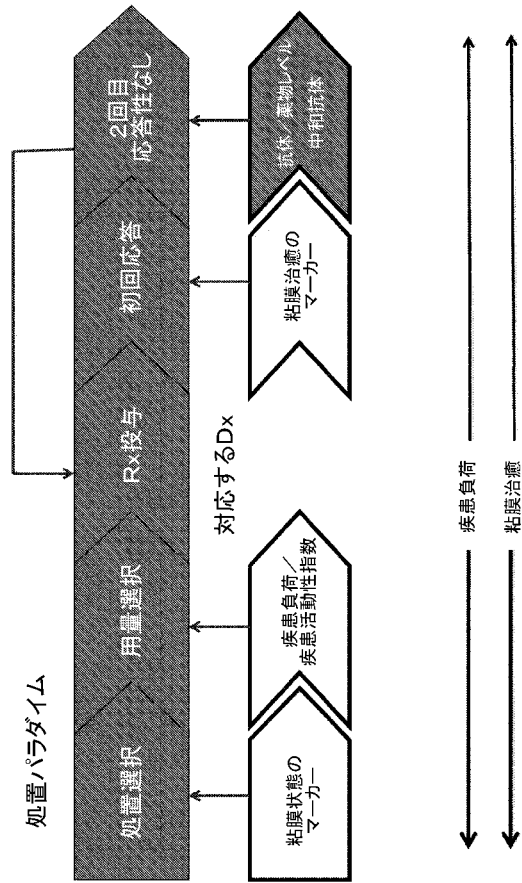


【 図 2 3 】

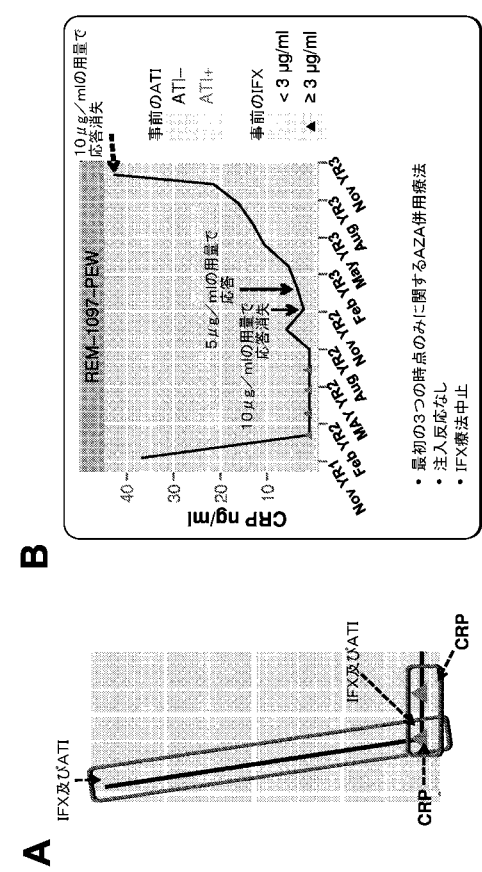




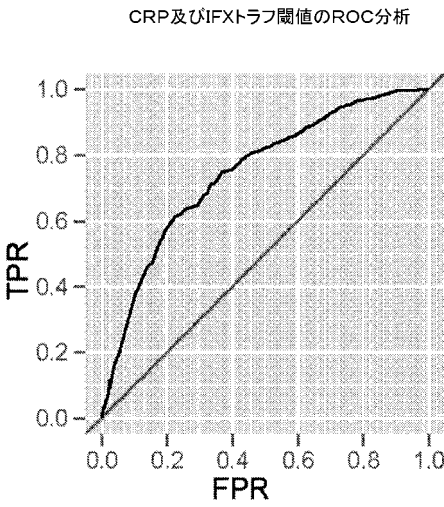
【 図 2 4 】



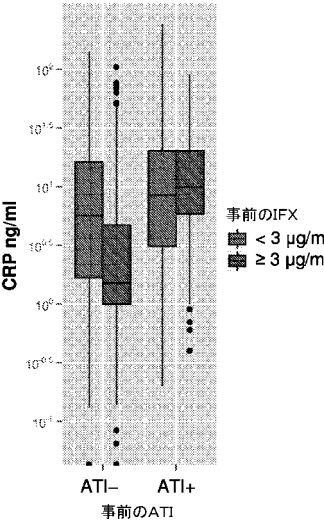
【 図 2 6 】



【 図 2 5 】



【 図 2 7 】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/037375

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68 G01N33/564 G01N33/68  
ADD.

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)

C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/045476 A1 (BARKEN ET AL) 24 February 2011 (2011-02-24) paragraphs [0005] - [0006] -----	1-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier 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

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 July 2012

Date of mailing of the international search report

16/08/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Martelli, Luca

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/037375

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011045476 A1	24-02-2011	AU 2010236568 A1	03-11-2011
		CA 2758531 A1	21-10-2010
		EP 2419529 A1	22-02-2012
		US 2011045476 A1	24-02-2011
		WO 2010120814 A1	21-10-2010
-----			

## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/566,509

(32)優先日 平成23年12月2日(2011.12.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/636,575

(32)優先日 平成24年4月20日(2012.4.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(72)発明者 シン, シャラット

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ランチョ サンタ フェ, トップ オブ ザ モーニング ウェー 8 1 7 1

(72)発明者 ホー, ニコラス

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サン ディエゴ, レナート ストリート 9 0 7 2

(72)発明者 ロックトン, スティーブ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サン ディエゴ, マウント タミ レーン 3 3 1 9

(72)発明者 ハウエンシュタイン, スコット

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サン ディエゴ, カミニート カーメル ランディング 3 6 4 3

(72)発明者 オールムンド, リンダ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サン ディエゴ, テニーソン ストリート 3 5 1 9