

(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2019-520071

(P2019-520071A)

(43) 公表日 令和1年7月18日 (2019.7.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/573 (2006.01)	A 6 1 K 31/573	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-565398 (P2018-565398)	(71) 出願人	591100596
(86) (22) 出願日	平成29年6月14日 (2017.6.14)		アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月8日 (2019.2.8)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2017/064496		ディカル
(87) 国際公開番号	W02017/216206		フランス国、エフ-75013 パリ、リ
(87) 国際公開日	平成29年12月21日 (2017.12.21)		ュ・ドゥ・トルビアック 101
(31) 優先権主張番号	16305715.1	(71) 出願人	508266546
(32) 優先日	平成28年6月14日 (2016.6.14)		ユニベルシテ パリ ディドロ-パリ 7
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		UNIVERSITE PARIS DI
			DEROT-PARIS 7
			フランス国 エフ-75205 パリ セ
			デックス 13 リュ トマ マン 5
			5, rue Thomas Mann
			F-75205 Paris Cedex
			13 FRANCE
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性重症大腸炎の処置応答を予測するための方法

(57) 【要約】

本発明は、急性重症大腸炎の処置応答を予測するための方法に関する。現在、薬剤応答のバイオマーカーは存在しない。本発明は、急性重症潰瘍性大腸炎における第一選択及び第二選択の処置に対する応答のための最初の予測ツールを提供する。調節不全マイクロRNAの推定のmRNAターゲットを患者の生検から特定した。入院時の5個の生体値に加えて、15個の大腸マイクロRNAの1つの分類子が、ステロイドに対するレスポnderと非レスポnderとの区別について、96.6%の予測精度で特定された。類似する方法を使用して、インフリキシマブ及びシクロスポリンに対するレスポnderと非レスポnderとを分類するのに、6及び4個の粘膜マイクロRNA系アルゴリズムが特定された。特に、本発明は、hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-100、hsa-mir-718、hp_hsa-mir-193b、hsa-mir-3150a-5p、hp_hsa-mir-1260b、hsa-mir-938、hsa-mir-518b及びhsa-mir-1468からなる群より選択される複数のmiRNAの発現レベルを測定することにより、急性重症大腸炎の処置応答を予測するための方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

急性重症大腸炎（ASC）を患う対象がコルチコステロイドに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する方法であって、

i) コルチコステロイド投与前又は同投与の初日の間に前記対象から得られた粘膜組織サンプル中の、hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-3667、hp_hsa-mir-100、hsa-miR-603、hsa-miR-718、hsa-miR-4259、hp_hsa-mir-193b、hsa-miR-3150a-5p、hp_hsa-mir-1260b、hsa-miR-938、hsa-miR-3128、hsa-miR-4423-3p、hsa-miR-518b、hsa-miR-1468及びhsa-miR-3152-3pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルを測定する工程と、ii) 工程i)において測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、iii) 粘膜組織サンプルと、前記対象がレスポnder又は非レスポnderとなることを示す参照値との間での発現レベルの差を検出する工程とを含む、方法。

【請求項2】

急性重症大腸炎（ASC）を患う対象がコルチコステロイドに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する方法であって、

i) コルチコステロイド投与前又は同投与の初日の間に前記対象から得られた粘膜組織サンプル中の、hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-100、hsa-miR-718、hp_hsa-mir-193b、hsa-miR-3150a-5p、hp_hsa-mir-1260b、hsa-miR-938、hsa-miR-518b及びhsa-miR-1468からなる群より選択されるmiRNAの発現レベルを測定する工程と、ii) 工程i)において測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、iii) 粘膜組織サンプルと、前記対象がレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなることを示す参照値との間での発現レベルの差を検出する工程とを含む、方法。

【請求項3】

コルチコステロイドが、メチルプレドニゾロンである、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

急性重症大腸炎（ASC）を患う対象が抗TNF α 剤に対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する方法であって、

i) 抗TNF α 剤投与前又は同投与の初日の間に前記対象から得られた粘膜組織サンプル中の、hsa-miR-4423-3p、hsa-miR-3128、hsa-miR-3152-3p、hp_hsa-mir-193b、hsa-miR-938及びhp_hsa-mir-100からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルを測定する工程と、ii) 工程i)において測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、iii) 粘膜組織サンプルと、前記対象がレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなることを示す参照値との間での発現レベルの差を検出する工程とを含む、方法。

【請求項5】

急性重症大腸炎（ASC）を患う対象が抗TNF α 剤に対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する方法であって、

i) 抗TNF α 剤投与前又は同投与の初日の間に前記対象から得られた粘膜組織サンプル中の、hp_hsa-mir-100、hsa-miR-938及びhsa-miR-518bからなる群より選択されるmiRNAの発現レベルを測定する工程と、ii) 工程i)において測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、iii) 粘膜組織サンプルと、前記対象がレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなることを示す参照値との間での発現レベルの差を検出する工程とを含む、

方法。

【請求項 6】

抗 T N F α 剤が、インフリキシマブである、請求項 4 又は 5 記載の方法。

【請求項 7】

急性重症大腸炎（A S C）を患う対象がシクロスポリンに対するレスポonderとなるか、又は非レスポonderとなるかを判定する方法であって、

i) シクロスポリン投与前又は同投与の初日の間に前記対象から得られた粘膜組織サンプル中の、m i R-4 4 2 3-3 p、m i R-9 3 8、m i R-5 1 8 b 及び m i R-1 0 0 からなる群より選択される少なくとも 1 つの m i R N A の発現レベルを測定する工程と、i i) 工程 i) において測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、i i i) 粘膜組織サンプルと、前記対象がレスポonderとなるか、又は非レスポonderとなるかを示す参照値との間での発現レベルの差を検出する工程とを含む、

方法。

【請求項 8】

急性重症大腸炎（A S C）を患う対象がシクロスポリンに対するレスポonderとなるか、又は非レスポonderとなるかを判定する方法であって、

i) シクロスポリン投与前又は同投与の初日の間に前記対象から得られた粘膜組織サンプル中の、h p__h s a-m i r-1 0 0、h s a-m i R-9 3 8 及び h p__h s a-m i r-1 9 3 b からなる群より選択される m i R N A の発現レベルを測定する工程と、i i) 工程 i) において測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、i i i) 粘膜組織サンプルと、前記対象がレスポonderとなるか、又は非レスポonderとなるかを示す参照値との間での発現レベルの差を検出する工程とを含む、

方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の方法を行うことにより、急性重症大腸炎（A S C）を患う対象がコルチコステロイド、抗 T N F α 剤及びシクロスポリンに対するレスポonderとなるか、又は非レスポonderとなるかを判定する方法。

【請求項 1 0】

ディープラーニング分類、線形判別分析（L D A）、トポロジーデータ分析（T D A）、ニューラルネットワーク及びランダムフォレストアルゴリズム（R F）から選択される分類アルゴリズムを使用して、対象応答を判定する工程を含む、請求項 1、2、4、5、7、8 又は 9 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 1】

白血球、赤血球、好塩基球及びリンパ球カウント、ヘマトクリット、ヘモグロビン、グルコース、フェリチン、アルブミン、鉄、C-反応性タンパク質（C R P）及びトランスフェリンからなる群より選択される少なくとも 1 つの生体値を測定することを含む、請求項 1、2、4、5、7、8 又は 9 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 2】

急性重症大腸炎（A S C）の処置を必要とする対象においてコルチコステロイドにより急性重症大腸炎（A S C）を処置する方法であって、

a) 対象がコルチコステロイドに対するレスポonderとなるか、又は非レスポonderとなるかを請求項 1 又は 2 記載の方法を行うことにより判定する工程と、b) 前記対象が工程 a) においてレスポonderであると考えられた場合には、コルチコステロイドを投与する工程とを含む、

方法。

【請求項 1 3】

コルチコステロイドが、メチルプレドニゾロンである、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

急性重症大腸炎（A S C）の処置を必要とする対象において抗 T N F α 剤により急性重症大腸炎（A S C）を処置する方法であって、

a) 対象が抗TNF α 剤に対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを請求項4又は5記載の方法を行うことにより判定する工程と、b) 前記対象が工程a)においてレスポnderであると考えられた場合には、抗TNF α 剤を投与する工程とを含む、方法。

【請求項15】

抗TNF α 剤が、インフリキシマブである、請求項10記載の方法。

【請求項16】

急性重症大腸炎(ASC)の処置を必要とする対象においてシクロスポリンにより急性重症大腸炎(ASC)を処置する方法であって、

a) 対象がシクロスポリンに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを請求項7又は8記載の方法を行うことにより判定する工程と、b) 前記対象が工程a)においてレスポnderであると考えられた場合には、シクロスポリンを投与する工程とを含む、方法。

【請求項17】

急性重症大腸炎(ASC)の処置を必要とする対象においてコルチコステロイド、抗TNF α 剤、シクロスポリン又は結腸切除術により急性重症大腸炎(ASC)を処置する方法であって、

a) 対象がコルチコステロイド、抗TNF α 剤及びシクロスポリンに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを請求項9記載の方法を行うことにより判定する工程と、b) 前記対象が工程a)においてコルチコステロイドに対するレスポnderであると考えられた場合には、コルチコステロイドを投与する工程、c) 前記対象が工程a)においてコルチコステロイドに対する非レスポnderであり、抗TNF α 剤に対するレスポnderであると考えられた場合には、抗TNF α 剤を投与する工程、d) 前記対象が工程a)においてコルチコステロイドに対する非レスポnderであり、シクロスポリンに対するレスポnderであると考えられた場合には、シクロスポリンを投与する工程、又は、e) 前記対象が工程a)においてコルチコステロイド、抗TNF α 剤及びシクロスポリンに対する非レスポnderであると考えられた場合には、結腸切除術により前記対象を処置する工程とを含む、方法。

【請求項18】

前記対象が工程a)においてコルチコステロイドに対する非レスポnderであり、抗TNF α 剤に対するレスポnderであり、シクロスポリンに対するレスポnderであると考えられた場合には、抗TNF α 剤及びシクロスポリンを投与する工程を含む、請求項9記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、急性重症大腸炎の処置応答を予測するための方法に関する。

【0002】

発明の背景

潰瘍性大腸炎(UC)は、結腸直腸粘膜に影響を及ぼす生涯性、特発性の慢性炎症障害である[1]。約15~25% UC患者は、少なくとも1回の急性重症UC(ASUC)のエピソードを有する。このようなエピソードは、患者を敗血症、中毒性巨大結腸、結腸穿孔、消化器出血及び血栓塞栓性アクシデントを含む深刻な合併症に曝すため[2、3]、生命を脅かす症状であり、外科手術を必要とする。緊急の結腸切除術を必要としない患者において、静脈内(IV)コルチコステロイドが、処置の第一選択として推奨されている[4]。しかしながら、40%の患者は、IVステロイドに応答しないであろうし[5、6]、救済的結腸切除術又は、良好な効率及び安全性を有する[9]シクロスポリン

10

20

30

40

50

(C s A) [7] もしくはインフリキシマブ (I F X) [8] による第二選択処置を必要とするであろう。これら2つの薬剤のいずれかに対して難治性の患者には、外科手術の遅延が死亡率の向上 (2~3%になると推定される [10]) に関連するために、第三選択の医薬療法に代えて、緊急の結腸切除術が推奨される。このため、A S U C の処置は、各医学処置に対する応答の早期評価を必要とする。しかしながら、現在、処置に関する医師の決定は、患者の評価と、わずかな臨床又は生体パラメータ、例えば、精度が低いOxford評価基準又はHo指標 [11] に基づいている。次に、薬効の関連及び早期予測子は未だに発見されていない。マイクロRNA (m i R N A) は、RNA I I I により最も一般的に転写され、タンパク質、例えば、D r o s h a 及びD i c e r により処理される短い (21~25個のヌクレオチド)、非コードRNA分子である [12]。m i R N A は、最近、免疫発達及び応答の重要なメディエータとして出現してきた。これは、種々の疾患における診断、予後の判定及び／又は処置応答の予測のためのバイオマーカーとしてのその可能性のある有効性を示唆している [13、14]。炎症性腸疾患 (I B D)、例えば、U C において、複数の研究から、活動性及び非活動性患者の両方における粘膜又は血中m i R N A サインが特定された [15] が、薬剤応答を予測するためのサインは特定されなかった。

10

【0003】

発明の概要

本発明は、急性重症大腸炎の処置応答を予測するための方法に関する。特に、本発明は、特許請求の範囲により定義される。

20

【0004】

発明の詳細な説明

急性重症潰瘍性大腸炎 (A S U C) は、ステロイド抵抗性の症例において、静脈内ステロイドとインフリキシマブ又はシクロスポリンとにより管理される重篤な症状である。医学処置が失敗した場合、救済的結腸切除術は遅いであろう。同遅延は、死亡率の上昇につながる。現在、薬剤応答のバイオマーカーは存在しない。本目的は、A S U C における第一選択及び第二選択処置に対する応答の予測子を特定することであった。ステロイド、シクロスポリン及びインフリキシマブに対するその応答について十分特徴付けられた、2つの三次フランスユニット (tertiary French units) からのA S U C を有する47名の患者を遡及的に含ませた。臨床及び生体パラメータを入院時にレビューした。処置前又は同処置の最初の3日以内に取得した固定大腸生検を、マイクロアレイによるマイクロRNA発現プロファイルに使用した。ランダムフォレスト系分類アルゴリズムを使用して、各処置に対するレスポnderと非レスポnderとを区別するための候補バイオマーカーを導き出し、一個抜き交差検証により校正した。機能不全マイクロRNAの推定のmRNAターゲットを特定した。入院時の5個の生物学的数値 (ヘモグロビン、ヘマトクリット、アルブミン、CRP及びトランスフェリンの発現レベル) に加えて、15個の大腸マイクロRNAの1つの分類子を、ステロイドに対するレスポnderと非レスポnderとの区別について、96.6%の予測精度 ($AUC = 0.96$) で特定した。類似する方法を使用して、インフリキシマブ ($90\% - AUC = 0.86$) 及びシクロスポリン ($83\% - AUC = 0.81$) それぞれに対するレスポnderと非レスポnderとを分類するのに、6及び4個の粘膜マイクロRNA系アルゴリズムを特定した。マイクロRNA関連mRNAターゲット分析により、A S U C における薬剤応答プロファイルに関連する可能性のある粘膜変化が強調された。この研究において、A S U C を有する患者における処置の第一選択及び第二選択に対する応答の新たな予測子を特定された。このため、本発明は、急性重症大腸炎 (A S C) を患う対象の薬剤応答を予測するための方法を提供する。特に、本発明は、コルチコステロイド、抗TNF α 剤及びシクロスポリンに対する応答を予測するための方法を提供する。

30

40

【0005】

本明細書で使用する場合、「急性重症大腸炎」又は「A S C」という用語は、急性重症大腸炎、潰瘍性大腸炎 (U C) の可能性のある致死性合併症、大腸粘膜に影響を及ぼす特

50

発性、慢性炎症性障害（例えば、世界保健機関分類で改定された K 5 1 - K 5 2）を指す。「急性重症大腸炎」という用語は、急性重症潰瘍性大腸炎も指す。急性重症大腸炎の活性を、当技術分野において認識された基準に従って測定することができる。急性重症大腸炎の活性を臨床試験及び身体検査、L i c h t i g e r スコア及び組織学的類別により測定することができる。

【0006】

本明細書で使用する場合、「A S C 処置」という用語は、コルチコステロイドの第一選択投与並びに抗 T N F α 剤（インフリキシマブ）及び／又は免疫抑制剤（シクロスポリン）により第二選択投与を含む、急性重症大腸炎の典型的な医療計画を指す。

【0007】

本明細書で使用する場合、「コルチコステロイド」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を有し、第一選択 A S C 処置又は第一選択 A S C 治療を指す。「コルチコステロイド」という用語は、抗炎症作用を有する水素化シクロペントパーヒドロフェナントレン環系を有する有効成分の分類である、コルチコステロイドの第一選択投与を指す。コルチコステロイド剤は、典型的には、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、ベタメタゾン、ベクロメタゾン、ジプロピオナート、ブデソニド、デキサメタゾンリン酸ナトリウム、フルニソリド、プロピオン酸フルチカゾン、トリアムシノロンアセトニド、ベタメタゾン、フルオシノロン、フルオシノニド、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、デソニド、デソキシメタゾン、フルオシノロン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、プロピオン酸クロベ

【0008】

本明細書で使用する場合、「抗 T N F α 剤」という用語は、例えば、T N F α と T N F α に対する細胞表面レセプターとの相互作用を阻害し、T N F α タンパク質生成を阻害し、T N F α 遺伝子発現を阻害し、細胞からの T N F α 分泌を阻害し、T N F α レセプターシグナル伝達を阻害することにより、又は、対象における T N F α 活性の低下をもたらす任意の他の手段により、T N F α 活性を直接又は間接的に阻害する、タンパク質、抗体、抗体フラグメント、融合タンパク質（例えば、I g 融合タンパク質又は F c 融合タンパク質）、多価結合タンパク質（例えば、D V D I g）、小分子 T N F α アンタゴニスト及び類似する天然もしくは非天然分子、並びに／又はそのリコンビナント及び／もしくは操作形態を含む薬剤を包含するのを意図している。「抗 T N F α 剤」という用語は、好ましくは、T N F α 活性と干渉する薬剤を含む。抗 T N F α 剤の例は、インフリキシマブ（REMICAD（商標）、Johnson and Johnson）、ヒト抗 T N F モノクローナル抗体アダリムマブ（D2E7/HUMIRA（商標）、Abbott Laboratories）、エタネルセプト（ENBREL（商標）、Amgen）、セルトリズマブペゴール（CIMZIA（登録商標）、UCB, Inc.）、ゴリムマブ（SIMPONI（登録商標）；CNT0 148）、CDP 571（Celltech）、CDP 870（Celltech）及び、T N F α 活性が有害である対象に投与された場合、障害（すなわち、急性重症大腸炎）を処置することができるように T N F α 活性を阻害する他の化合物を含むが、これらに限定されない。

【0009】

本明細書で使用する場合、「シクロスポリン」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を有し、免疫抑制剤を指す。シクロスポリン（「シクロスポリン A」又は「C y A」とも呼ばれる）は、抗 T N F 剤の登場まで、ステロイド難治性急性重症大腸炎のための救済的医学治療の基礎であった。C y A は、強力な免疫抑制特性を有する競合的カルシニューリン阻害剤である。

【0010】

本明細書で使用する場合、「レスポnder」という用語は、A S C 処置に応答するであろう急性重症大腸炎（A S C）対象を指す。更なる態様では、「レスポnder」という用語は、コルチコステロイドによる第一選択 A S C 処置に応答するであろう急性重症大腸炎（A S C）対象を指す。更なる態様では、「レスポnder」という用語は、抗 T N F α 剤

による第二選択A S C処置に応答するであろう急性重症大腸炎（A S C）対象を指す。更なる態様では、「レスポnder」という用語は、シクロスポリンによる第二選択A S C処置に応答するであろう急性重症大腸炎（A S C）対象を指す。更なる態様では、「レスポnder」という用語は、抗T N F α 剤及びシクロスポリンによる第二選択A S C処置に
10
応答するであろう急性重症大腸炎（A S C）対象を指す。急性重症大腸炎の活性を、当技術分野において認識された基準に従って測定することができる。急性重症大腸炎の活性を臨床検査及び身体検査、L i c h t i g e rスコア、組織学的類別並びに無増悪生存期間又は全生存期間により測定することができる。急性重症大腸炎（A S C）処置に対する「レスポnder」又は「応答性」対象は、急性重症大腸炎（A S C）処置により処置された場合、疾患における臨床的に顕著な軽減を示すか、又は、示すであろう対象を指す。

【0011】

本発明の第1の目的（「目的N o . 1」）は、急性重症大腸炎（A S C）を患う対象が
コルチコステロイドに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定
する方法であって、i）コルチコステロイド投与前又は同投与の初日の間に前記対象から
得られた粘膜組織サンプル中の、h p _ h s a - m i r - 3 9 3 4、h p _ h s a - m i
r - 3 6 6 7、h p _ h s a - m i r - 1 0 0、h s a - m i R - 6 0 3、h s a - m i
R - 7 1 8、h s a - m i R - 4 2 5 9、h p _ h s a - m i r - 1 9 3 b、h s a - m
i R - 3 1 5 0 a - 5 p、h p _ h s a - m i r - 1 2 6 0 b、h s a - m i R - 9 3 8
、h s a - m i R - 3 1 2 8、h s a - m i R - 4 4 2 3 - 3 p、h s a - m i R - 5 1
8 b、h s a - m i R - 1 4 6 8及びh s a - m i R - 3 1 5 2 - 3 pからなる群より選
20
択される少なくとも1つのm i R N Aの発現レベルを測定する工程と、i i）工程i）に
おいて測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、i i i）粘膜組織サンプルと、
前記対象がレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを示す参照値との間での
発現レベルの差を検出する工程とを含む、方法に関する。

【0012】

一部の実施態様では、h p _ h s a - m i r - 3 9 3 4、h p _ h s a - m i r - 3 6
6 7、h p _ h s a - m i r - 1 0 0、h s a - m i R - 6 0 3、h s a - m i R - 7 1
8、h s a - m i R - 4 2 5 9、h p _ h s a - m i r - 1 9 3 b、h s a - m i R - 3
1 5 0 a - 5 p、h p _ h s a - m i r - 1 2 6 0 b、h s a - m i R - 9 3 8、h s a
- m i R - 3 1 2 8、h s a - m i R - 4 4 2 3 - 3 p、h s a - m i R - 5 1 8 b、h
30
s a - m i R - 1 4 6 8及びh s a - m i R - 3 1 5 2 - 3 pからなる群より選択される
1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のm i
R N Aの発現レベルが判定される。一部の実施態様では、h p _ h s a - m i r - 3 9 3
4、h p _ h s a - m i r - 3 6 6 7、h p _ h s a - m i r - 1 0 0、h s a - m i R
- 6 0 3、h s a - m i R - 7 1 8、h s a - m i R - 4 2 5 9、h p _ h s a - m i r
- 1 9 3 b、h s a - m i R - 3 1 5 0 a - 5 p、h p _ h s a - m i r - 1 2 6 0 b、
h s a - m i R - 9 3 8、h s a - m i R - 3 1 2 8、h s a - m i R - 4 4 2 3 - 3 p
、h s a - m i R - 5 1 8 b、h s a - m i R - 1 4 6 8及びh s a - m i R - 3 1 5 2
- 3 pの発現レベルが測定される。

【0013】

一部の実施態様では、9個のm i R N Aの発現レベルが測定される。前記9個のm i R
N Aは、h p _ h s a - m i r - 3 9 3 4、h p _ h s a - m i r - 1 0 0、h s a - m
i R - 7 1 8、h p _ h s a - m i r - 1 9 3 b、h s a - m i R - 3 1 5 0 a - 5 p、
h p _ h s a - m i r - 1 2 6 0 b、h s a - m i R - 9 3 8、h s a - m i R - 5 1 8
b及びh s a - m i R - 1 4 6 8である。

【0014】

本発明の第2の目的（「目的N o . 2」）は、急性重症大腸炎（A S C）を患う対象が
抗T N F α 剤に対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する方
法であって、（i）抗T N F α 剤投与前又は同投与の初日の間に前記対象から得られた粘
50
膜組織サンプル中の、h s a - m i R - 4 4 2 3 - 3 p、h s a - m i R - 3 1 2 8、h

s a-m i R-3 1 5 2-3 p、h p__h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-9 3 8 及び h p__h s a-m i r-1 0 0 からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N A の発現レベルを測定する工程と、(i i) 工程 i) において測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、(i i i) 粘膜組織サンプルと、前記対象がレスポnder又は非レスポnderとなることを示す参照値との間での発現レベルの差を検出する工程とを含む、方法に関する。

【0015】

一部の実施態様では、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-3 1 2 8、h s a-m i R-3 1 5 2-3 p、h p__h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-9 3 8 及び h p__h s a-m i r-1 0 0 からなる群より選択される1、2、3、4、5 又は6個のm i R N A の発現レベルが判定される。一部の実施態様では、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-3 1 2 8、h s a-m i R-3 1 5 2-3 p、h p__h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-9 3 8 及び h p__h s a-m i r-1 0 0 の発現レベルが判定される。

10

【0016】

一部の実施態様では、3個のm i R N A の発現レベルが測定される。前記3個のm i R N A は、h p__h s a-m i r-1 0 0、h s a-m i R-9 3 8 及び h s a-m i R-5 1 8 bである。

【0017】

本発明の第3の目的(「目的No. 3」)は、急性重症大腸炎(ASC)を患う対象がシクロスポリンに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する方法であって、i)シクロスポリン投与前又は同投与の初日の間に前記対象から得られた粘膜組織サンプル中の、h a s-m i R-4 4 2 3-3 p、h a s-m i R-9 3 8、h a s-m i R-5 1 8 b 及び h a s-m i R-1 0 0 からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N A の発現レベルを測定する工程と、i i) 工程 i) において測定された発現レベルを参照値と比較する工程と、i i i) 粘膜組織サンプルと、前記対象がレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなることを示す参照値との間での発現レベルの差を検出する工程とを含む、方法に関する。

20

【0018】

一部の実施態様では、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-9 3 8、h s a-m i R-5 1 8 b 及び h s a-m i R-1 0 0 からなる群より選択される1、2、3 又は4個のm i R N A の発現レベルが判定される。一部の実施態様では、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-9 3 8、h s a-m i R-5 1 8 b 及び h s a-m i R-1 0 0 の発現レベルが測定される。

30

【0019】

一部の実施態様では、3個のm i R N A の発現レベルが測定される。前記3個のm i R N A は、h p__h s a-m i r-1 0 0、h s a-m i R-9 3 8 及び h p__h s a-m i r-1 9 3 bである。

【0020】

本発明の第4の目的(「目的No. 4」)は、上記された目的1、2 及び3の方法を行うことにより、急性重症大腸炎(ASC)を患う対象がコルチコステロイド、抗TNF α 剤及びシクロスポリンに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する方法に関する。一部の実施態様では、急性重症大腸炎(ASC)を患う対象がコルチコステロイド、抗TNF α 剤及びシクロスポリンに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する方法は、連続的又は同時に行われる。

40

【0021】

一部の実施態様では、9個のm i R N A の発現レベルが測定される。前記9個のm i R N A は、h p__h s a-m i r-3 9 3 4、h p__h s a-m i r-1 0 0、h s a-m i R-7 1 8、h p__h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-3 1 5 0 a-5 p、h p__h s a-m i r-1 2 6 0 b、h s a-m i R-9 3 8、h s a-m i R-5 1 8

50

b 及び h s a - m i R - 1 4 6 8 である。

【0022】

一部の実施態様では、本発明の方法は、m i R N A の発現レベルを参照値と比較することからなる工程を含み、ここで、粘膜組織サンプルと参照値との間でのm i R N A の発現レベルの差の検出は、前記対象がレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを示すものである。

【0023】

参照値は、各m i R N A について決定される。典型的には、参照値は、閾値又はカットオフ値であることができる。典型的には、「閾値」又は「カットオフ値」は、実験的、経験的又は理論的に決定することができる。閾値は、当業者に認識されるであろうように、既存の実験及び／又は臨床条件に基づいて任意に選択することもできる。閾値は、試験の機能による最適な感受性及び特異性並びに効果／リスクバランス（擬陽性及び擬陰性の臨床結果）を得るために決定される必要がある。典型的には、最適な感受性及び特異性（したがって、閾値）は、実験データに基づく受信者動作特性（ROC）曲線を使用して決定することができる。好ましくは、当業者であれば、（定義された閾値と、本発明の方法に従って得られた）m i R N A 発現レベルを比較することができる。本発明の一実施態様において、閾値は、コルチコステロイド、抗T N F α 剤又はシクロスポリンに対するレスポnderである1名以上の対象から得られた粘膜組織サンプル中で決定されたm i R N A 発現レベル（又は比、又はスコア）から導出される。本発明の一実施態様において、閾値は、コルチコステロイド、抗T N F α 剤又はシクロスポリンに対する非レスポnderである1名以上の対象から得られた粘膜組織サンプル中で決定されたm i R N A 発現レベル（又は比、又はスコア）から導出することもできる。更に、適切に預けられた過去の対象サンプルにおけるm i R N A の発現レベル（又は比、又はスコア）の遡及的測定を、これらの閾値を確立するのに使用することができる。

【0024】

一部の実施態様では、参照値は、a）コルチコステロイド処置前又は同処置の初日の間に対象から得られた粘膜組織サンプルのコレクションを提供する工程と、b）工程a）において提供された各サンプルについて、実際の臨床アウトカム（応答又は無応答）に関する情報を提供する工程と、c）一連の任意の定量値を提供する工程と、d）工程a）において提供されたコレクションに含まれる各サンプルについてのm i R N A のレベルを決定する工程と、e）前記サンプルを、工程c）において提供された1つの特定の任意の定量値について2つのグループそれぞれ：（i）前記一連の定量値に含まれる前記任意の定量値より低いレベルの定量値を示すサンプルを含む第1のグループ；（i i）前記一連の定量値に含まれる前記任意の定量値より高い前記レベルの定量値を示すサンプルを含む第2のグループ（これにより、2つのグループのサンプルは、前記特定の定量値について得られ、ここで、各グループのサンプルは別々に列挙される）に分類する工程と、f）（i）工程e）で得られた定量値と（i i）工程f）で定義された第1及び第2のグループに含まれるサンプルから導出される対象の実際の臨床アウトカム（すなわち、応答又は無応答）との間の統計学的有意差を算出する工程と、g）工程d）において提供された全ての任意の定量値が試験されるまで、工程f）及びg）を反復する工程と、h）前記参照値を、最も高い統計学的有意差（最も有意）が工程g）において算出される任意の定量値からなるように設定する工程とを含む方法を行うことにより決定することができる。

【0025】

例えば、m i R N A のレベルは、100名の対象の100個のサンプルについて評価される。100個のサンプルは、m i R N A のレベルに従って並べられる。サンプル1は、最も高いレベルを有し、サンプル100は、最も低いレベルを有する。第1のグループ分けは、2つの部分集合：一方側にサンプルNr1と、他方側に99個の他のサンプルとを提供する。次のグループ分けは、一方側にサンプル1及び2と、他方側に98個の残りのサンプルとを提供する等（最後のグループ分け：一方側にサンプル1～99と、他方側にサンプルNr100とを提供するまで）。対応する対象についての実際の臨床アウトカム

に関する情報に従って、两部分集合間の p 値が算出された。ついで、最小 p 値の評価基準に基づく区別が最も強力であるように、参照値が選択される。換言すると、 p 値が最小である两部分集合間の境界に対応する $miRNA$ のレベルは、参照値と考えられる。参照値が、 $miRNA$ のレベルの中央値である必要がないことに留意されたい。

【0026】

このため、1つの「カットオフ」値の設定により、レスポnder又は非レスポnder間の区別が可能となる。実際には、高い統計学的有意差値（例えば、低い P 値）は、一般的には、1つの任意の定量値のみについてではなく、連続的な任意の定量値の範囲について得られる。このため、本発明の1つの代替的な実施態様では、一定の参照値を使用するのに代えて、一定の範囲の値が提供される。したがって、最小統計学的有意差値（有意差の最小閾値、例えば、最大閾値 P 値）が任意に設定され、工程 g ）において算出された統計学的有意差がより高い（より有意、例えば、より低い P 値）複数の任意の定量値の範囲が保持され、そのため、一定範囲の定量値が提供される。定量値のこの範囲は、上記された「カットオフ」値を含む。例えば、1～10の仮定のスケールにおいて、理想的なカットオフ値（最も高い統計学的有意差を有する値）が5である場合、適切な（例示的な）範囲は、4～6であることができる。したがって、対象は、 $miRNA$ のレベルを測定することにより得られた値を比較することにより評価することができ、この場合、5より大きい値は、対象がレスポnder（又は代替的には、非レスポnder）であろうことを示し、5未満の値は、対象が非レスポnder（又は代替的には、レスポnder）であろうことを示す。別の実施態様では、対象は、 $miRNA$ のレベルを測定することにより得られた値を比較すること及びスケールにおける値を比較することにより評価することができ、この場合、4～6の範囲を上回る値は、対象がレスポnder（又は代替的には、非レスポnder）であろうことを示し、4～6の範囲を下回る値は、対象が非レスポnder（又は代替的には、非レスポnder）であろうことを示す。ここで、4～6の範囲内にある値は、中間の応答を示す。

【0027】

一部の実施態様では、種々の $miRNA$ の複数の発現レベルであるスコアも決定し、参照値と比較することができる。ここで、前記スコアと前記参照値との間の差は、前記対象がコルチコステロイド、抗 $TNF\alpha$ 剤又はシクロスポリン処置に対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを示す。

【0028】

一部の実施態様では、本発明の方法は、線形判別分析（ LDA ）、トポロジータ分析（ TDA ）、ニューラルネットワーク及び、例えば、実施例に記載されたランダムフォレストアルゴリズム（ RF ）から選択される分類アルゴリズムを使用して、対象応答を判定する工程を含む。一部の実施態様では、本発明の方法は、分類アルゴリズムがディープラーニング分類である分類アルゴリズムを使用して、対象応答を判定する工程を含む。本明細書で使用する場合、「分類アルゴリズム」という用語は、当技術分野においてその通常の意味を有し、例えば、 US 第 8, 126, 690 号； WO 第 2008/156617 号に記載された当技術分野において周知の分類及び回帰木法及び多分散分類を指す。本明細書で使用する場合、「ランダムフォレストアルゴリズム」又は「 RF 」という用語は、当技術分野においてその通常の意味を有し、例えば、 US 第 8, 126, 690 号； WO 第 2008/156617 号に記載された分類アルゴリズムを指す。ランダムフォレストは、Leo Breiman (Breiman L, 「Random forests,」 Machine Learning 2001, 45:5-32) により最初に開発されたアルゴリズムを使用して構築される決定木系分類子である。該分類子は、大量の個々の決定木を使用し、個々の木により決定される分類のモードを選択することによりクラスを決定する。個々の木は、下記アルゴリズム：（1）訓練事例集合における事例数が N であり、分類子における変数の数が M であると仮定し、（2）該木のノードにおける決定を判定するのに使用されるであろう入力変数の数を選択し（この数 m は、 M より非常に少なくあるべきである）、（3）置換を有する訓練事例集合からの N 個のサンプルを選択することにより訓練事例集合を選択し、（4）該木の各ノードについて、

そのノードにおける決定に基づいてM個のうちのm個の変数をランダムに選択し、(5) 訓練事例集合におけるこれらm個の変数に基づいて最良の分類を算出する、を使用して構築される。一部の実施態様では、スコアは、コンピュータプログラムにより生成される。

【0029】

一部の実施態様では、hsa-miR-4423-3p、hsa-miR-3128、hsa-miR-3152-3p及びhsa-miR-603からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAのより高い発現レベル並びにhsa-miR-718、hsa-miR-4259、hp_hsa-mir-193b、hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-3667、hp_hsa-mir-1260b、hsa-miR-938、hsa-miR-3150a-5p、hp_hsa-mir-100、hsa-miR-518b及びhsa-miR-1468からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAのより低い発現レベルは、対象がコルチコステロイド処置に対するレスポnderであろうことを示し、したがって、hsa-miR-4423-3p、hsa-miR-3128、hsa-miR-3152-3p及びhsa-miR-603からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAのより低い発現レベル並びにhsa-miR-718、hsa-miR-4259、hp_hsa-mir-193b、hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-3667、hp_hsa-mir-1260b、hsa-miR-938、hsa-miR-3150a-5p、hp_hsa-mir-100、hsa-miR-518b及びhsa-miR-1468からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAのより高い発現レベルは、対象がコルチコステロイド処置に対する非レスポnderであろうことを示す。

【0030】

一部の実施態様では、参照値は、コルチコステロイド処置に対するレスポnderである1名以上の対象から得られた粘膜組織サンプルにおいて決定された発現レベルに対応させることができる。したがって、hsa-miR-4423-3p、hsa-miR-3128、hsa-miR-3152-3p及びhsa-miR-603からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAについて決定された発現レベルが対応する参照値以上であり、並びに／又は、hsa-miR-718、hsa-miR-4259、hp_hsa-mir-193b、hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-3667、hp_hsa-mir-1260b、hsa-miR-938、hsa-miR-3150a-5p、hp_hsa-mir-100、hsa-miR-518b及びhsa-miR-1468からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルが対応する参照値以下である場合、対象は、コルチコステロイド処置に対するレスポnderであろうと結論付けられ、したがって、hsa-miR-4423-3p、hsa-miR-3128、hsa-miR-3152-3p及びhsa-miR-603からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAについて決定された発現レベルが対応する参照値未満であり、並びに／又は、hsa-miR-718、hsa-miR-4259、hp_hsa-mir-193b、hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-3667、hp_hsa-mir-1260b、hsa-miR-938、hsa-miR-3150a-5p、hp_hsa-mir-100、hsa-miR-518b及びhsa-miR-1468からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルが対応する参照値超である場合、対象は、コルチコステロイド処置に対する非レスポnderであろうと結論付けられる。

【0031】

一部の実施態様では、参照値は、コルチコステロイド処置に対する非レスポnderである1名以上の対象から得られた粘膜組織サンプルにおいて決定された発現レベルに対応させることができる。したがって、hsa-miR-4423-3p、hsa-miR-3128、hsa-miR-3152-3p及びhsa-miR-603からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAについて決定された発現レベルが対応する参照値超であり、並びに／又は、hsa-miR-718、hsa-miR-4259、hp_h

s a-m i r-1 9 3 b、h p_h s a-m i r-3 9 3 4、h p_h s a-m i r-3 6 6 7、h p_h s a-m i r-1 2 6 0 b、h s a-m i R-9 3 8、h s a-m i R-3 1 5 0 a-5 p、h p_h s a-m i r-1 0 0、h s a-m i R-5 1 8 b及びh s a-m i R-1 4 6 8からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aの発現レベルが対応する参照値未満である場合、対象は、コルチコステロイド処置に対するレスポonderであろうと結論付けられ、したがって、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-3 1 2 8、h s a-m i R-3 1 5 2-3 p及びh s a-m i R-6 0 3からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aについて決定された発現レベルが対応する参照値以下であり、並びに／又は、h s a-m i R-7 1 8、h s a-m i R-4 2 5 9、h p_h s a-m i r-1 9 3 b、h p_h s a-m i r-3 9 3 4、h p_h s a-m i r-3 6 6 7、h p_h s a-m i r-1 2 6 0 b、h s a-m i R-9 3 8、h s a-m i R-3 1 5 0 a-5 p、h p_h s a-m i r-1 0 0、h s a-m i R-5 1 8 b及びh s a-m i R-1 4 6 8からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aの発現レベルが対応する参照値以上である場合、対象は、コルチコステロイド処置に対する非レスポonderであろうと結論付けられる。

【0032】

一部の実施態様では、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-3 1 2 8及びh s a-m i R-3 1 5 2-3 pからなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aのより高い発現レベル並びにh p_h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-9 3 8及びh p_h s a-m i r-1 0 0からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aのより低い発現レベルは、対象が抗T N F α剤処置に対するレスポonderであろうことを示し、したがって、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-3 1 2 8及びh s a-m i R-3 1 5 2-3 pからなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aのより低い発現レベル並びにh p_h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-9 3 8及びh p_h s a-m i r-1 0 0からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aのより高い発現レベルは、対象が抗T N F α剤処置に対する非レスポonderであろうことを示す。

【0033】

一部の実施態様では、参照値は、抗T N F α剤処置に対するレスポonderである1名以上の対象から得られた粘膜組織サンプルにおいて決定された発現レベルに対応させることができる。したがって、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-3 1 2 8及びh s a-m i R-3 1 5 2-3 pからなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aについて決定された発現レベルが対応する参照値以上であり、並びに／又は、h p_h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-9 3 8及びh p_h s a-m i r-1 0 0からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aの発現レベルが対応する参照値以下である場合、対象は、抗T N F α剤処置に対するレスポonderであろうと結論付けられ、したがって、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-3 1 2 8及びh s a-m i R-3 1 5 2-3 pからなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aについて決定された発現レベルが対応する参照値未満であり、並びに／又は、h p_h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-9 3 8及びh p_h s a-m i r-1 0 0からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aの発現レベルが対応する参照値超である場合、対象は、抗T N F α剤処置に対する非レスポonderであろうと結論付けられる。

【0034】

一部の実施態様では、参照値は、抗T N F α剤処置に対する非レスポonderである1名以上の対象から得られた粘膜組織サンプルにおいて決定された発現レベルに対応させることができる。したがって、h s a-m i R-4 4 2 3-3 p、h s a-m i R-3 1 2 8及びh s a-m i R-3 1 5 2-3 pからなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aについて決定された発現レベルが対応する参照値超であり、並びに／又は、h p_h s a-m i r-1 9 3 b、h s a-m i R-9 3 8及びh p_h s a-m i r-1 0 0からなる群より選択される少なくとも1つのm i R N Aの発現レベルが対応する参照値未満

である場合、対象は、抗TNF α 剤処置に対するレスポナーであろうと結論付けられ、したがって、hsa-miR-4423-3p、hsa-miR-3128及びhsa-miR-3152-3pからなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAについて決定された発現レベルが対応する参照値以下であり、並びに／又は、hp_hsa-miR-193b、hsa-miR-938及びhp_hsa-miR-100からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルが対応する参照値以上である場合、対象は、抗TNF α 剤処置に対する非レスポナーであろうと結論付けられる。

【0035】

一部の実施態様では、miR-4423-3pのより高い発現レベル並びに、hsa-miR-938、hsa-miR-518b及びhsa-miR-100からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAのより低い発現レベルは、対象がシクロスポリン処置に対するレスポナーであろうことを示し、したがって、miR-4423-3pのより低い発現レベル並びに、hsa-miR-938、hsa-miR-518b及びhsa-miR-100からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAのより高い発現レベルは、対象がシクロスポリン処置に対する非レスポナーであろうことを示す。

【0036】

一部の実施態様では、参照値は、シクロスポリン処置に対するレスポナーである1名以上の対象から得られた粘膜組織サンプルにおいて決定された発現レベルに対応させることができる。したがって、miR-4423-3pについて決定された発現レベルが対応する参照値以上であり、並びに／又は、hsa-miR-938、hsa-miR-518b及びhsa-miR-100からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルが対応する参照値以下である場合、対象は、シクロスポリン処置に対するレスポナーであろうと結論付けられ、したがって、hsa-miR-4423-3pについて決定された発現レベルが対応する参照値未満であり、並びに／又は、hsa-miR-938、hsa-miR-518b及びhsa-miR-100からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルが対応する参照値超である場合、対象は、シクロスポリン処置に対する非レスポナーであろうと結論付けられる。

【0037】

一部の実施態様では、参照値は、シクロスポリン処置に対する非レスポナーである1名以上の対象から得られた粘膜組織サンプルにおいて決定された発現レベルに対応させることができる。したがって、hsa-miR-4423-3pについて決定された発現レベルが対応する参照値超であり、並びに／又は、hsa-miR-938、hsa-miR-518b及びhsa-miR-100からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルが対応する参照値未満である場合、対象は、シクロスポリン処置に対するレスポナーであろうと結論付けられ、したがって、hsa-miR-4423-3pについて決定された発現レベルが対応する参照値以下であり、並びに／又は、hsa-miR-938、hsa-miR-518b及びhsa-miR-100からなる群より選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルが対応する参照値以上である場合、対象は、シクロスポリン処置に対する非レスポナーであろうと結論付けられる。

【0038】

一部の実施態様では、本発明の方法は、白血球、赤血球、好塩基球及びリンパ球カウント、ヘマトクリット、ヘモグロビン、グルコース、フェリチン、アルブミン、鉄、C-反応性タンパク質（CRP）並びにトランスフェリンからなる群より選択される少なくとも1つの生体値を測定することを更に含む。

【0039】

本明細書で使用する場合、「粘膜組織サンプル」という用語は、対象の結腸から得られる任意のサンプルを意味し、同サンプルは、粘膜細胞を含む。前記粘膜組織サンプルは、コルチコステロイドによる第一選択処置前又は同処置の初日の間に得ることができる。前記粘膜組織サンプルは、in vitro評価の目的で得られる。特定の実施態様では、粘膜組織サンプルは、対象の結腸で行われる内視鏡生検から生じる。前記内視鏡生検は、

10

20

30

40

50

結腸の種々の領域から得ることができる。別の特定の実施態様では、粘膜組織サンプルは、対象の結腸の炎症している粘膜から単離することができる。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する場合、「m i R」という用語は、当技術分野においてその通常の意味を有し、データベース<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>からmiRBaseアクセッションナンバーで公衆に利用可能なm i R N A配列を指す。本発明に適したm i R N Aはそれ自体公知であり、以下の表Aに列記される。

【 0 0 4 1 】

【表 1】

miRNA	miRBase アクセッションナンバー
hp_hsa-mir-3934	MI0016590
hp_hsa-mir-3667	MI0016068
hp_hsa-mir-100	MI0000102
hsa-miR-603	MI0003616
hsa-miR-718	MI0012489
hsa-miR-4259	MI0015858
hp_hsa-mir-193b	MI0003137
hsa-miR-3150a-5p	MIMAT0019206
hp_hsa-mir-1260b	MI0014197
hsa-miR-938	MI0005760
hsa-miR-3128	MI0014145
hsa-miR-4423-3p	MIMAT0018936
hsa-miR-518b	MI0003156
hsa-miR-1468	MI0003782
hsa-miR-3152-3p	MIMAT0015025
hsa-miR-3128	MI0014145
hp_hsa-mir-193b	MI0003137
hsa-miR-4423-3p	MIMAT0018936

表A:本発明のmiRNAバイオマーカーの列記

【 0 0 4 2 】

本発明によれば、対象から得られた粘膜組織サンプル中の本発明の表Aのm i R N Aからなる群より選択されるm i R N Aの発現レベルを測定することは、各種の技術により行うことができる。例えば、まず、サンプル（対象から調製された粘膜組織）に含有される核酸が、標準的な方法に従って、例えば、溶解酵素もしくは化学溶液を使用して抽出され、又は、核酸結合樹脂により製造メーカーの説明に従って抽出される。R N Aを粘膜組織サンプルから単離するための従来法及び試薬は、高純度m i R N A単離キット（Roche）、Trizol（Invitrogen）、グアニジニウムチオシアナートーフェノールクロロホルム抽出、PureLink（商標）m i R N A単離キット（Invitrogen）、PureLink M i c r o ~ M i d i トータルR N A精製システム（invitrogen）、RNeasyキット（Qiagen）、miRNeasyキット（Qiagen）、Oligtexキット（Qiagen）、フェノール抽出、フェノールクロロホ

ルム抽出、T C A / アセトン沈殿、エタノール沈殿、カラム精製、シリカゲルメンブラン精製、PureYield（商標）RNA Midiprep（Promega）、PolyAtractシステム1000（Promega）、Maxwell（登録商標）16システム（Promega）、SVトータルRNA単離（Promega）、geneMAG-RNA/DNAキット（Chemicell）、TRI Reagent（登録商標）（Ambion）、RNAqueousキット（Ambion）、ToTALLY RNA（商標）キット（Ambion）、Poly(A)Purist（商標）キット（Ambion）及び市販されているか又は市販されていない当業者に公知の任意の他の方法を含む。

【0043】

粘膜組織サンプルにおける1つ以上のmiRNAの発現レベルは、任意の適切な方法により決定することができる。サンプル中のmiRNAのレベル又は量を測定するための任意の信頼できる方法を使用することができる。一般的には、miRNAは、粘膜組織サンプル（その画分を含む）、例えば、単離されたRNAサンプルから、mRNAについて公知の種々の方法により検出し、定量することができる。同方法は、例えば、増幅系の方法（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、定量ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）、ローリングサークル増幅等）、ハイブリダイゼーション系の方法（例えば、ハイブリダイゼーションアレイ（例えば、マイクロアレイ）、NanoString分析、ノーザンブロット分析、分岐DNA（bDNA）シグナル増幅、in situハイブリダイゼーション等）及びシーケンシング系の方法（例えば、Illumina又はIonTorrentプラットフォームを使用する次世代シーケンシング法等）を含む。他の例示的な技術は、リボヌクレアーゼ保護アッセイ（RPA）及び質量分光法を含む。

【0044】

一部の実施態様では、RNAは、分析前にDNA（cDNA）に変換される。cDNAは、従来技術を使用する、単離されたmiRNAの逆転写により生成することができる。miRNA逆転写キットは公知であり、市販されている。適切なキットの例は、mirVana TaqMan（登録商標）miRNA転写キット（Ambion, Austin, TX）及びTaqMan（登録商標）miRNA転写キット（Applied Biosystems, Foster City, CA）を含むが、これらに限定されない。ユニバーサルプライマー又はmiRNA-特異的ステムループプライマーを含む特異的プライマーは公知であり、例えば、Applied Biosystemsから市販されている。一部の実施態様では、miRNAは、測定前に増幅される。一部の実施態様では、miRNAの発現レベルは、増幅プロセス中に測定される。一部の実施態様では、miRNAの発現レベルは、測定前に増幅されない。サンプル中のmiRNAの発現レベルを決定するのに適した一部の例示的な方法は、以下により詳細に記載されている。これらの方法は、例証としてのみ提供され、他の適切な方法を同様に使用することができることは、当業者に明らかであろう。

【0045】

miRNAの核酸配列の発現レベルを検出するための多くの増幅系の方法が存在し、同方法は、PCR、RT-PCR、qPCR及びローリングサークル増幅を含むが、これらに限定されない。他の増幅系の技術は、例えば、リガーゼ連鎖反応（LCR）、multiple x ligatable probe amplification、in vitro転写（IVT）、鎖置換増幅（SDA）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列系増幅（NASBA）、RNA（Eberwine）増幅及び当業者に公知の他の方法を含む。典型的なPCR反応は、ターゲット核酸種を選択的に増幅する複数の工程又はサイクル：変性工程（同工程では、ターゲット核酸が変性される）；アニーリング工程（同工程では、PCRプライマー（すなわち、フォワード及びリバースプライマー）が相補的なDNA鎖にアニーリングする）及び伸長工程（同工程では、熱安定性DNAポリメラーゼがプライマーを伸長させる）を含む。これらの工程を複数回繰り返すことにより、DNAフラグメントが増幅されて、ターゲット配列に対応するアンプリコンを生成する。典型的なPCR反応は、変性、アニーリング及び伸長の20回以上のサイクルを含む。多くの場合には、アニーリング及び伸長工程は、同時に行うことができ、その場合には、サイクルは、2つの工程のみを含む。逆転写反応（同反応によ

り、m i R N A に対して相補性を有する c D N A 配列が生成される) は、P C R 増幅前に行うことができる。逆転写反応は、例えば、R N A 系 D N A ポリメラーゼ (リバーストランスクリプターゼ) 及びプライマーの使用を含む。m i R N A の定量的リアルタイム P C R 用のキットは公知であり、市販されている。適切なキットの例は、TaqMan (登録商標) m i R N A アッセイ (Applied Biosystems) 及び mirVana (商標) q R T - P C R m i R N A 検出キット (Ambion) を含むが、これらに限定されない。m i R N A は、リバーストランスクリプターゼの前にユニバーサルプライマー配列、ポリアデニル化配列又はアダプター配列を含有する一本鎖オリゴヌクレオチドにライゲーションすることができ、ユニバーサルプライマー配列に対して相補的なプライマー、ポリ (T) プライマー又はアダプター配列に対して相補的な配列を含むプライマーを使用して増幅することができる。一部の 10 実施態様では、m i R N A レベルの決定のためのカスタム q R T - P C R アッセイを開発することができる。サンプル中の m i R N A を測定するためのカスタム q R T - P C R アッセイを、例えば、広範な逆転写プライマー及びロックド核酸改良 P C R を含む方法を使用して開発することができる。カスタム m i R N A アッセイは、ターゲット配列に対応する化学合成された m i R N A の系列希釈においてアッセイを行うことにより試験することができる。これにより、各アッセイの定量的検出限界及び比例領域の決定が可能となる。更に、検量線として使用する場合、これらのデータにより、サンプル中で測定された m i R N A の絶対量の確立が可能となる。増幅曲線は、C t 値が各増幅プロットの比例領域において評価されるのを実証するために、場合により確認することができる。典型的には、 20 比例領域は、複数の桁に広がる。アッセイされた各候補 m i R N A について、化学的に合成されたバージョンの m i R N A を得ることができ、アッセイの感度限界及び定量的比例領域を決定するために系列希釈で分析することができる。相対的な発現レベルは、例えば、Livak et al, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. Methods (2001) Dec;25(4):402-8に記載された $2(-\Delta\Delta C(T))$ 法に従って決定することができる。

【0046】

一部の実施態様では、2つ以上の m i R N A が、1つの反応容量で増幅される。例えば、多重 q - P C R、例えば、q R T - P C R により、対象となる少なくとも2つの m i R N A の同時増幅及び定量が1つの反応容量で1対以上のプライマー及び／又は1つ以上のプローブを使用することで可能となる。プライマーペアは、各 m i R N A に特異的に結合 30 する少なくとも1つの増幅プライマーを含み、プローブは、それら同士が区別可能なようにラベルされることにより、複数の m i R N A の同時定量が可能となる。

【0047】

ローリングサークル増幅は、等温条件下で線形又は幾何学的動力学のいずれかにより、環化されたオリゴヌクレオチドプローブを複製することができる D N A ポリメラーゼ駆動反応である (例えば、Lizardi et al., Nat. Gen. (1998) 19(3):225-232; Gusev et al, Am. J. Pathol. (2001) 159(1):63-69; Nallur et al, Nucleic Acids Res. (2001) 29(23):E118を参照のこと)。2つのプライマーの存在下で、一方が、D N A の (+) 鎖にハイブリダイズし、他方が、(-) 鎖にハイブリダイズする。鎖置換の複合的なパターンにより、各 D N A 分子の 109 個超のコピーの生成が90分以内にもたらされる。閉環 D N A 分子のタンデムに結合しているコピーは、1つのプライマーを使用することにより形成 40 することができる。該プロセスは、マトリックス会合 D N A を使用して行うこともできる。ローリングサークル増幅に使用されるテンプレートは逆転写することができる。この方法は、非常に低い m i R N A 濃度での m i R N A 配列及び発現レベルの高感度な指標として使用することができる (例えば、Cheng et al., Angew Chem. Int. Ed. Engl. (2009) 48(18):3268-72; Neubacher et al, Chembiochem. (2009) 10(8): 1289-91を参照のこと)。

【0048】

m i R N A の定量は、逆転写 (R T) のためのステムループプライマー、続けて、リアルタイム TaqMan (登録商標) プローブを使用することにより行うことができる。典型的 50

には、前記方法は、ステムループプライマーがm i R N A ターゲットにアニーリングされ、リバーストランスクリプターゼの存在下で伸長される第1の工程を含む。ついで、m i R N A 特異的フォワードプライマー、TaqMan（登録商標）プローブ及びリバースプライマーが、P C R 反応に使用される。m i R N A の定量は、測定されたC T 値に基づいて確立される。多くのm i R N A 定量アッセイは、Qiagen (S. A. Courtaboeuf, France)、Exiqon (Vedbaek, Denmark)又はApplied Biosystems (Foster City, USA) から市販されている。

【0049】

m i R N A の発現レベルは、絶対発現レベル及び正規化発現レベルとして表現することができる。典型的には、発現レベルは、m i R N A の絶対発現レベルを、その発現を急性重症大腸炎（A S C）を患う対象がコルチコステロイド、抗T N F α 剤及びシクロスポリンに対してレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定するのに関連するマーカーではないm R N A、例えば、構成的に発現しているハウスキーピングm R N A の発現と比較することにより補正することで正規化される。正規化に適したm R N A は、U 6、U 2 4、U 4 8 及びS 1 8 等のハウスキーピングm R N A を含む。この正規化により、1つのサンプル、例えば、対象サンプル中の発現レベルの別のサンプルに対する比較又は異なる供給元からのサンプル間の比較が可能となる。特定の実施態様では、発現レベルは、その発現を参照m R N A の発現と比較することでm i R N A の絶対発現レベルを補正することにより正規化される。

【0050】

本明細書における対象となるm i R N A に対して配列相補性又は相同性を示す核酸は、ハイブリダイゼーションプローブ又は増幅プライマーとしての有用性が見出される。このような核酸は、同一である必要はないが、典型的には、比較可能なサイズの相同領域に対して、少なくとも約80%同一、より好ましくは85%同一、及び更により好ましくは90~95%同一であると理解される。特定の実施態様では、ハイブリダイゼーションを検出するのに適した手段、例えば、検出可能なラベルとの組み合わせで核酸を使用するのが有利であろう。広い各種の適切な指標が当技術分野において公知であり、同指標は、蛍光、放射線、酵素又は他のリガンド（例えば、アビジン／ビオチン）を含む。

【0051】

プローブ及びプライマーは、それらがハイブリダイズするm i R N A に「特異的」であり、すなわち、それらは、好ましくは、高いストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下（最高融解温度T_mに対応、例えば、50% ホルムアルデヒド、5×又は6×S C C。S C Cは、0.15M N a C l、0.015M クエン酸N aである）でハイブリダイズする。

【0052】

m i R N A は、ハイブリダイゼーション系の方法を使用して検出することができ、同方法は、ハイブリダイゼーションアレイ（例えば、マイクロアレイ）、NanoString分析、ノーザンブロット分析、分岐D N A（b D N A）シグナル増幅及びi n s i t uハイブリダイゼーションを含むが、これらに限定されない。

【0053】

マイクロアレイは、大量のm i R N A の発現レベルを同時に測定するのに使用することができる。マイクロアレイは、各種の技術を使用して作製することができる。同技術は、微小点状ピンによるガラススライド上への印刷、事前に作製されたマスクを使用するフォトリソグラフィ、動的マイクロミラー装置を使用するフォトリソグラフィ、インクジェット印刷又は微小電極アレイでの電気化学を含む。微小流体TaqMan低密度アレイも有用である。同アレイは、微小流体q R T-P C R 反応のアレイ及び関連する微小流体q R T-P C R 系の方法に基づいている。マイクロアレイ検出の1つの例において、ヒトセンスm i R N A 配列に対応する種々のオリゴヌクレオチド（例えば、200+5'-アミノ-改変C6オリゴ）が、終濃度約20 μ Mで三次元CodeLinkスライド（GE Health/Amersham Biosciences）上にスポットされ、製造メーカーの推奨に従って処理される。20 μ g TRI

zol精製トータルRNAから合成された第1鎖cDNAは、ビオチン化ddUTPによりEnzo BioArray end labelingキット (Enzo Life Sciences Inc.) を使用してラベルされる。ハイブリダイゼーション、染色及び洗浄は、改良Affymetrix Antisenseゲノムアレイプロトコルに従って行うことができる。Axon B-4000スキャナ及びGene-Pix Pro 4.0ソフトウェア又は他の適切なソフトウェアを、画像をスキャンするのに使用することができる。バックグラウンドを差し引いた後の非陽性スポット及びESD法により検出された外れ値が除去される。得られたシグナル強度値は、チップ当たりの中央値に正規化され、ついで、幾何平均及び標準誤差を各miRNAについて得るのに使用される。各miRNAシグナルは、対数底2に変換することができ、1サンプルt検定を行うことができる。各サンプルについての独立したハイブリダイゼーションを、データの堅牢性を向上させるために複数回スポットされた各miRNAを有するチップ上で行うことができる。

10

【0054】

マイクロアレイは、miRNAの発現プロファイルに使用することができる。例えば、RNAは、サンプルから抽出することができ、場合により、miRNAは、トータルRNAからサイズ選択される。オリゴヌクレオチドリンカーを、miRNAの5'及び3'端に付着させることができ、得られたライゲーション生成物は、RT-PCR反作用のテンプレートとして使用される。センス鎖PCRプライマーは、その5'端に付着した蛍光体を有することができ、これにより、PCR生成物のセンス鎖をラベルすることができる。PCR生成物は変性され、ついで、マイクロアレイにハイブリダイズされる。アレイ上の対応するmiRNA捕捉プローブ配列に相補的なターゲット核酸とも呼ばれるPCR生成物が、塩基対合を介して、捕捉プローブが固定されているスポットにハイブリダイズするであろう。ついで、スポットは、マイクロアレイレーザスキャナを使用した際に蛍光を発するであろう。ついで、各スポットの蛍光強度は、特定のmiRNAのコピー数に関して、陽性及び陰性対照の数並びにアレイデータ正規化法を使用して評価される。同方法により、特定のmiRNAの発現レベルの評価がもたらされるであろう。サンプルから抽出されたmiRNAを含有するトータルRNAを、miRNAのサイズ選択なしに直接使用することもできる。例えば、RNAは、T4 RNAリガーゼ及び蛍光体ラベルした短いRNAリンカーを使用して3'端ラベルすることができる。アレイ上の対応するmiRNA捕捉プローブ配列に相補的な蛍光体ラベルmiRNAは、塩基対合を介して、捕捉プローブが固定されているスポットにハイブリダイズする。ついで、各スポットの蛍光強度が、特定のmiRNAのコピー数に関して、陽性及び陰性対照の数並びにアレイデータ正規化法を使用して評価される。同方法により、特定のmiRNAの発現レベルの評価がもたらされるであろう。複数種類のマイクロアレイを利用することができ、同マイクロアレイは、スポットオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、予め作製されたオリゴヌクレオチドマイクロアレイ又はスポットされた長いオリゴヌクレオチドアレイを含むが、これらに限定されない。

20

30

【0055】

したがって、核酸プローブは、例えば、ターゲット核酸分子の検出を開示されたプローブを使用して可能にするための1つ以上のラベルを含む。種々の用途、例えば、in situハイブリダイゼーション法において、核酸プローブは、ラベル（例えば、検出可能なラベル）を含む。「検出可能なラベル」は、サンプル中のプローブ（特に、結合したプローブ又はハイブリダイズしたプローブ）の存在又は濃度を示す検出可能なシグナルを生成するのに使用することができる分子又は材料である。このため、ラベルされた核酸分子は、サンプル中のターゲット核酸配列（例えば、ゲノムターゲット核酸配列）の存在又は濃度の指標を提供する（同配列に、ラベルされた固有に特異的な核酸分子が結合し又はハイブリダイズする）。1つ以上の核酸分子（例えば、開示された方法により生成されたプローブ）と会合したラベルは、直接又は間接的のいずれかで検出することができる。ラベルは、任意の公知又は未だに発見されていないメカニズムにより検出することができる。同メカニズムは、光子（無線周波数、マイクロ波周波数、赤外周波数、可視周波数及び紫外周波数の光子）の吸光、発光及び／又は散乱を含む。検出可能なラベルは、着色、蛍光

40

50

、リン光及び発光分子及び材料、1つの物質を別の物質に変換して、（例えば、無色の物質を有色の物質に変換しもしくはその逆をすることにより、又は、沈殿を生じさせもしくはサンプルの濁度を上昇させることにより）検出可能な差を提供する触媒（例えば、酵素）、抗体結合相互作用により検出することができるハプテン並びに常磁性もしくは磁性の分子もしくは材料を含む。

【0056】

検出可能なラベルの特定の例は、蛍光分子（又は蛍光色素）を含む。数多くの蛍光色素が当業者に公知であり、例えば、Life Technologies（以前は、Invitrogen）から選択することができ、例えば、The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologiesを参照のこと。核酸分子（例えば、固有に特異的な結合領域）に付着する（例えば、化学的にコンジュゲートする）ことができる特定の蛍光体の例は、U S 第 5, 8 6 6, 3 6 6 号 (Nazarenko et al.) に提供され、例えば、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸、アクリジン及び誘導体、例えば、アクリジン及びアクリジンイソチオシアナート、5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸 (EDANS)、4-アミノ-N-[3ビニルスルホニル]フェニルナフタリミド-3, 5ジスルホナート (Lucifer Yellow VS)、N-(4-アニリノ-1-ナフチル)マレイミド、Brilliant Yellow、クマリン及び誘導体、例えば、クマリン、7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC、クマリン120)、7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン (クマリン151)；シアノシン；4', 6-ジアミジノ (diarninidino)-2-フェニルインドール (DAPI)；5', 5''ジブロモピロガロールスルホンフタレイン (ブロモピロガロールレッド)；7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン；ジエチレントリアミン五酢酸；4, 4'-ジイソチオシアナトジヒドロースチルベン-2, 2'-ジスルホン酸；4, 4'-ジイソチオシアナトスチルベン-2, 2'-ジスルホン酸；5-[ジメチルアミノ]ナフタレン-1-スルホニルクロリド (DNS、ダンシルクロリド)；4-(4'-ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABCYL)；4-ジメチルアミノフェニルアゾフェニル-4'-イソチオシアナート (DABITC)；エオシン及び誘導体、例えば、エオシン及びエオシンイソチオシアナート；エリスロシン及び誘導体、例えば、エリスロシンB及びエリスロシンイソチオシアナート；エチジウム；フルオレセイン及び誘導体、例えば、5-カルボキシフルオレセイン (FAM)、ジクロロトリアジニルアミノフルオレセイン (JOE)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート (FITC) 及び QFITC-Q (RITC)；2', 7'-ジフルオロフルオレセイン (OREGON GREEN (登録商標))；フルオレサミン；IR144；IR1446；マラカイトグリーンイソチオシアナート；4-メチルウンベリフェロン；オルトクレゾールフタレイン；ニトロチロシン；パラローザニリン；フェノールレッド；B-フィコエリスリン；o-フタルジアルデヒド；ピレン及び誘導体、例えば、ピレン、ピレンブチラート及びスクシンイミジル-1-ピレンブチラート；Reactive Red 4 (Cibacron Brilliant Red 3B-A)；ローダミン及び誘導体、例えば、6-カルボキシ-X-ローダミン (ROX)、6-カルボキシローダミン (R6G)、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、ローダミン (Rhod)、ローダミンB、ローダミン123、ローダミンXイソチオシアナート、ローダミングリーン、スルホローダミンB、スルホローダミン101及びスルホローダミン101のスルホニルクロリド誘導体 (Texas Red)；N, N, N', N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン (TAMRA)；テトラメチルローダミン；テトラメチルローダミンイソチオシアナート (TRITC)；リボフラビン；ロゾール酸及びテルビウムキレート誘導体である。他の適切な蛍光体は、約 617 nm で発光するチオール反応性ユーロピウムキレート (Heyduk and Heyduk, Analyt. Biochem. 248:216-27, 1997; J. Biol. Chem. 274:3315-22, 1999) 並びに GFP、リサミン (商標)、ジエチルアミノクマリン、フルオレセインクロロトリアジニル、ナフトフルオレセイン、4, 7-ジクロロローダミン及びキサンテン (U S 第 5, 8 0 0, 9 9 6 号 (Lee et al.) に記載) 及びそれらの誘導体

10

20

30

40

50

を含む。当業者に公知の他の蛍光体、例えば、Life Technologies (Invitrogen; Molecular Probes (Eugene, Oreg.)) から入手できる蛍光体並びに、ALEXA FLUOR (登録商標) シリーズの色素 (例えば、U S 第 5, 6 9 6, 1 5 7 号、同第 6, 1 3 0, 1 0 1 号及び同第 6, 7 1 6, 9 7 9 号に記載)、BODIPY シリーズの色素 (ジピロメテンボロンジフルオリド色素、例えば、U S 第 4, 7 7 4, 3 3 9 号、同第 5, 1 8 7, 2 8 8 号、同第 5, 2 4 8, 7 8 2 号、同第 5, 2 7 4, 1 1 3 号、同第 5, 3 3 8, 8 5 4 号、同第 5, 4 5 1, 6 6 3 号及び同第 5, 4 3 3, 8 9 6 号に記載)、Cascade Blue (U S 第 5, 1 3 2, 4 3 2 号に記載されたスルホン化ピレンのアミン反応性誘導体) 及び Marina Blue (U S 第 5, 8 3 0, 9 1 2 号) を含む蛍光体も使用することができる。

【0057】

上記された蛍光色素に加えて、蛍光ラベルは、蛍光ナノ粒子、例えば、半導体ナノ結晶、例えば、QUANTUM DOT (商標) (例えば、Life Technologies (QuantumDot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologies, Eugene, Oreg.) から得られる; U S 第 6, 8 1 5, 0 6 4 号; 同第 6, 6 8 2, 5 9 6 号; 及び同第 6, 6 4 9, 1 3 8 号も参照のこと) であることができる。半導体ナノ結晶は、サイズ依存性光学特性及び／又は電気特性を有する微小粒子である。半導体ナノ結晶が一次エネルギー源により照射された場合、半導体ナノ結晶に使用される半導体材料のバンドギャップに対応する周波数のエネルギーの二次発光が生じる。この発光は、特定の波長の着色光又は蛍光として検出することができる。異なるスペクトル特性を有する半導体ナノ結晶は、例えば、U S 第 6, 6 0 2, 6 7 1 号に記載されている。半導体ナノ結晶は、各種の生体分子 (d N T P 及び／又は核酸を含む) 又は基質に、例えば、Bruchez et al., Science 281 :20132016, 1998; Chan et al., Science 281:2016-2018, 1998 及び U S 第 6, 2 7 4, 3 2 3 号に記載された技術により結合させることができる。種々の組成の半導体ナノ結晶の形成は、例えば、U S 第 6, 9 2 7, 0 6 9 号; 同第 6, 9 1 4, 2 5 6 号; 同第 6, 8 5 5, 2 0 2 号; 同第 6, 7 0 9, 9 2 9 号; 同第 6, 6 8 9, 3 3 8 号; 同第 6, 5 0 0, 6 2 2 号; 同第 6, 3 0 6, 7 3 6 号; 同第 6, 2 2 5, 1 9 8 号; 同第 6, 2 0 7, 3 9 2 号; 同第 6, 1 1 4, 0 3 8 号; 同第 6, 0 4 8, 6 1 6 号; 同第 5, 9 9 0, 4 7 9 号; 同第 5, 6 9 0, 8 0 7 号; 同第 5, 5 7 1, 0 1 8 号; 同第 5, 5 0 5, 9 2 8 号; 同第 5, 2 6 2, 3 5 7 号及び U S 第 2 0 0 3 / 0 1 6 5 9 5 1 号並びに W O 第 9 9 / 2 6 2 9 9 号 (1 9 9 9 年 5 月 2 7 日公開) に開示されている。その異なるスペクトル特性に基づいて特定可能な半導体ナノ結晶の別々の集団を生成することができる。例えば、その組成、サイズ又はサイズおよび組成に基づいて異なる色を発する半導体ナノ結晶を生成することができる。例えば、サイズに基づいて異なる波長 (発光波長 5 6 5 nm、6 5 5 nm、7 0 5 nm 又は 8 0 0 nm) で光を発する量子ドットは、本明細書に開示されたプローブにおける蛍光ラベルとして適しており、Life Technologies (Carlsbad, Calif.) から入手できる。

【0058】

R T - P C R は、典型的には、特定波長の光のビームにより各サンプルを照射する能力を有し、励起された蛍光体により発せられた蛍光を検出する熱サイクラーで行われる。熱サイクラーは、サンプルを素早く加熱し、冷却することもでき。これにより、核酸及び熱ポリメラーゼの物理化学特性の利点を得ることができる。現在上梓されている大部分の熱サイクラーは、類似する特徴を提供する。典型的には、熱サイクラーは、ガラスキャピラリー、プラスチックチューブ、9 6 ウェルプレート又は 3 8 4 ウェルプレートのフォーマットを伴う。熱サイクラーは、ソフトウェア分析も伴う。

【0059】

m i R N A は、nCounter Analysis System (NanoString Technologies, Seattle, WA) を使用して増幅なしに検出することもできる。この技術は、溶液中でハイブリダイズする 2 つの核酸系のプローブ (例えば、レポータープローブ及び捕捉プローブ) を利用する。ハイブリダイゼーション後に、過剰のプローブが除去され、プローブ / ターゲット複合体が、製造メーカーのプロトコルに従って分析される。nCounter m i R N A アッセイキットは、NanoString Technologies から入手できる。同キットにより、高い特異性により

非常に類似する m i R N A 間を区別可能である。nCounter（登録商標）分析システムの基礎は、アッセイされる各核酸ターゲットに割り当てられた固有のコードである（W O 第 0 8 / 1 2 4 8 4 7 号、U S 第 8 , 4 1 5 , 1 0 2 号及び Geiss et al. Nature Biotechnology. 2008. 26(3): 317-325；これらの文献の内容はそれぞれ、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる）。該コードは、アッセイされる各ターゲットに固有のバーコードを生成する着色蛍光スポットの順序系列から構成される。ビオチン化捕捉プローブ及び蛍光バーコードを有するレポータープローブのプローブペアが、各オリゴヌクレオチドターゲットのために設計される。このシステムは、本明細書において、ナノレポーターコードシステムとも呼ばれる。特定のレポーター及び捕捉プローブは、各ターゲットについて合成される。レポータープローブは、第 1 のシグナルを構成する光を発する 1 つ以上のラベルモノマーと付着する少なくとも第 1 のラベル付着領域；第 2 のシグナルを構成する光を発する 1 つ以上のラベルモノマーと付着する、第 1 のラベル付着領域と重ならない少なくとも第 2 のラベル付着領域；及び第 1 のターゲット特異的配列を含むことができる。好ましくは、各配列特異的レポータープローブは、1 個以下の遺伝子にハイブリダイズ可能なターゲット特異的配列を含み、場合により、少なくとも 3 つ又は少なくとも 4 つのラベル付着領域を含み、前記付着領域は、少なくとも第 3 のシグナル又は少なくとも第 4 のシグナルそれぞれを構成する光を発する 1 つ以上のラベルモノマーを含む。捕捉プローブは、第 2 のターゲット特異的配列；及び第 1 の親和性タグを含むことができる。一部の実施態様では、捕捉プローブは、1 つ以上のラベル付着領域も含むことができる。好ましくは、レポータープローブの第 1 のターゲット特異的配列及び捕捉プローブの第 2 のターゲット特異的配列は、検出される同じ遺伝子の異なる領域にハイブリダイズする。レポータープローブ及び捕捉プローブは全て、シングルハイブリダイゼーション混合物である「プローブライブラリ」内にプールされる。各ターゲットの相対量は、シングル多重化ハイブリダイゼーション反応において測定される。該方法は、サンプル中におけるターゲットの存在によりプローブペアターゲット複合体が生成されるように、サンプルをプローブライブラリと接触させることを含む。ついで、該複合体が精製される。より具体的には、サンプルがプローブライブラリと組み合わせられ、ハイブリダイゼーションが溶液中で生じる。ハイブリダイゼーション後に、3 成分のハイブリダイズ複合体（プローブペア及びターゲット）は、捕捉プローブ及びレポータープローブに存在するユニバーサル配列に相補的なオリゴヌクレオチドに結合した磁性ビーズを使用する 2 工程法で精製される。この二重精製プロセスにより、大過剰のターゲット特異的プローブによるハイブリダイゼーション反応を完了まで進行させることが可能となり、その時点で、それらは、最終的に除去されるため、サンプルの結合及び画像化を妨害しない。すべてのハイブリダイゼーション後の工程は、専用の液体取扱いロボット（Prep Station, NanoString Technologies）においてロボットにより取り扱われる。精製された反応物は、典型的には、サンプルカートリッジの個々のフローセル内の Prep Station により堆積され、捕捉プローブを介してストレプトアビジン被覆表面に結合し、レポータープローブを伸長するために電気泳動され、固定される。処理後に、サンプルカートリッジが完全に自動の画像化及びデータ収集装置（Digital Analyzer, NanoString Technologies）に移される。ターゲットの発現レベルは、各サンプルを画像化し、ターゲットが検出されるコードの回数をカウントすることにより測定される。各サンプルについて、典型的には、結合表面の約 1 0 mm²を表す 6 0 0 視野（F O V）が画像化される（1 3 7 6 × 1 0 2 4 ピクセル）。典型的な画像化密度は、多重化度合い、サンプル入力量及びターゲット量全体に応じて、視野当たり 1 0 0 ~ 1 2 0 0 カウントされたレポーターである。データは、サンプル当たりのターゲット当たりのカウント数を列記する単純なスプレッドシートフォーマットで出力される。このシステムは、ナノレポーターと共に使用することができる。ナノレポーターに関する更なる開示は、W O 第 0 7 / 0 7 6 1 2 9 号及び同第 0 7 / 0 7 6 1 3 2 号並びに U S 第 2 0 1 0 / 0 0 1 5 6 0 7 号及び同第 2 0 1 0 / 0 2 6 1 0 2 6 号に見出すことができる。これらの文献の内容は、その全体が本明細書に組み入れられる。更に、核酸プローブ及びナノレポーターという用語は、W O 第 2 0 1 0 / 0 1 9 8 2 6 号及び U S 第 2 0 1 0 / 0 0 4 7

10

20

30

40

50

924号に記載された、合理的に設計された配列（例えば、合成配列）を含むことができる。これらの文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0060】

質量分光法を、RNAaseマッピングを使用してmiRNAを定量するのに使用することができる。単離されたRNAは、MS又はタンデムMS（MS/MS）アプローチによるその分析前に、高い特異性を有するRNAエンドヌクレアーゼ（RNAase）（例えば、全ての未修飾グアノシン残基の3'側で開裂させるRNAase T1）により酵素消化することができる。開発された最初のアプローチは、ESTMSに直接連結された逆相HPLCによるエンドヌクレアーゼ消化のオンラインクロマトグラフィー分離を利用した。転写後修飾の存在を、RNA配列に基づいて予測された質量からの質量シフトにより証明することができる。ついで、異常な質量/電荷値のイオンを、タンデムMSシーケンシングのために単離して、転写後に修飾されたヌクレオシドの配列配置を位置決定することができる。マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分光法（MALDI-MS）も、転写後に修飾されたヌクレオシドについての情報を得るための分析アプローチとして使用されてきた。MALDI系のアプローチは、分離工程によりEST系のアプローチと区別することができる。MALDI-MSでは、質量分光計は、miRNAを分離するのに使用される。限られた量のインタクトなmiRNAを分析するために、ナノESI-MSと連結させたキャピラリーLCのシステムを、特注ナノスプレーイオン源、Nanovolume Valve (Valco Instruments) 及びスプリットレスナノHPLCシステム (DiNa, KYA Technologies) を備えた、リニアイオントラップオービトラップハイブリッド質量分光計 (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific) 又はタンデム四重極飛行時間型質量分光計 (QSTAR (登録商標) XL, Applied Biosystems) を使用することにより利用することができる。分析物/TEAAが、ナノLCトラップカラムにロードされ、脱塩され、ついで、濃縮される。インタクトなmiRNAは、トラップカラムから溶出され、C18キャピラリーカラム内に直接注入され、極性を増大させる溶媒の勾配を使用するRP-HPLCによりクロマトグラフされる。クロマトグラフィー溶出物は、キャピラリーカラムに取り付けられた噴霧器先端から、イオンがネガティブ極性モードでスキャンされるのを可能にするイオン化電圧を使用してスプレーされる。

【0061】

miRNA検出及び測定のための更なる方法は、例えば、ストランド侵入アッセイ (Third Wave Technologies, Inc.)、表面プラズモン共鳴 (SPR)、cDNA、MTDNA (メタリックDNA; Advance Technologies, Saskatoon, SK) 及び一分子法、例えば、US Genomicsにより開発された方法を含む。複数のmiRNAは、表面酵素反応とナノ粒子増幅SPR画像化 (SPRI) とを組み合わせる新規なアプローチを使用するマイクロアレイフォーマットにおいて検出することができる。ポリ(A)ポリメラーゼの表面反応により、ロックド核酸 (LNA) マイクロアレイ上にハイブリダイズしたmiRNAにポリ(A)テイルが生成される。ついで、DNA改変ナノ粒子が、ポリ(A)テイルに吸着され、SPRIにより検出される。この超高感度ナノ粒子増幅SPRI法は、アトモレベルでのmiRNAプロファイリングに使用することができる。miRNAは、分岐DNA (bDNA) シグナル増幅を使用しても検出することができる (例えば、Urdea, Nature Biotechnology (1994), 12:926-928を参照のこと)。bDNAシグナル増幅に基づくmiRNAアッセイは市販されている。1つのこのようなアッセイは、QuantiGene (登録商標) 2.0 miRNAアッセイ (Affymetrix, Santa Clara, CA) である。ノーザンブロット及びin situハイブリダイゼーションも、miRNAを検出するのに使用することができる。ノーザンブロット及びin situハイブリダイゼーションを行うのに適した方法は、当技術分野において公知である。進歩したシーケンシング法は、利用可能であれば同様に使用することができる。例えば、miRNAは、Illumina (登録商標) 次世代シーケンシング (例えば、HiSeq、HiScan、GenomeAnalyzer又はMiSeqシステム (Illumina, Inc., San diego, CA)) を使用する、例えば、Sequencing-By-Synthesis又はTruSeq法) を使用して検出することができる。miRNAは、Ion Torrent Sequencing (I

10

20

30

40

50

on Torrent Systems, Inc., Gulliford, CT) 又は半導体シーケンシングの他の適切な方法を使用しても検出することができる。

【0062】

更なる目的は、本発明の方法を行うためのキットに関し、ここで、前記キットは、対象がコルチコステロイド、抗TNF α 剤又はシクロスポリン処置に対するレスポnderであることを示す、表AのmiRNAから選択される少なくとも1つのmiRNAの発現レベルを測定するための手段を含む。典型的には、該キットは、プライマー、プローブマイクロアレイ又は上記されたマイクロアレイを含むことができる。例えば、該キットは、上記定義され、通常、DNAから構成され、場合により、予めラベルされているmiRNAのプローブセットを含むことができる。代替的に、プローブは、ラベルされていなくてもよく、ラベルするための成分を、別個の容器において該キットに含ませることができる。該キットは、ハイブリダイゼーション試薬又は特定のハイブリダイゼーションプロトコルに必要とされる他の適切に梱包された試薬及び材料（固相マトリックス、及び該当する場合、基準を含む）を更に含むことができる。代替的に、本発明のキットは、予めラベルされていることができるか又は親和性精製部分もしくは付着部分を含有することができる増幅プライマー（例えば、ステムループプライマー）を含むことができる。該キットは、増幅試薬を更に含むことができ、特定の増幅プロトコルに必要とされる他の適切に梱包された試薬及び材料も含むことができる。

10

【0063】

このため、本発明の方法は、コルチコステロイド、抗TNF α 剤又はシクロスポリン処置に対するレスポnder又は非レスポnderとなる対象の部分集合を定義可能とする。

20

【0064】

したがって、本発明の更なる目的は、急性重症大腸炎（ASC）の処置を必要とする対象において、コルチコステロイドにより急性重症大腸炎（ASC）を処置する方法であって、a）目的no. 1に記載の方法を行うことにより、対象がコルチコステロイドに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する工程と、b）前記対象が工程a）においてレスポnderであると考えられた場合には、コルチコステロイドを投与する工程とを含む、方法に関する。

【0065】

本発明の更なる目的は、急性重症大腸炎（ASC）の処置を必要とする対象において、抗TNF α 剤により急性重症大腸炎（ASC）を処置する方法であって、a）目的no. 2に記載の方法を行うことにより、対象が抗TNF α 剤に対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する工程と、b）前記対象が工程a）においてレスポnderであると考えられた場合には、抗TNF α 剤を投与する工程とを含む、方法に関する。

30

【0066】

本発明の更なる目的は、急性重症大腸炎（ASC）の処置を必要とする対象において、シクロスポリンにより急性重症大腸炎（ASC）を処置する方法であって、a）目的no. 3に記載の方法を行うことにより、対象がシクロスポリンに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する工程と、b）前記対象が工程a）においてレスポnderであると考えられた場合には、シクロスポリンを投与する工程とを含む、方法に関する。

40

【0067】

本発明の更なる目的は、急性重症大腸炎（ASC）の処置を必要とする対象において、コルチコステロイド、抗TNF α 剤、シクロスポリン又は結腸切除術により急性重症大腸炎（ASC）を処置する方法であって、a）目的no. 4に記載の方法を行うことにより、対象がコルチコステロイド、抗TNF α 剤及びシクロスポリンに対するレスポnderとなるか、又は非レスポnderとなるかを判定する工程と、b）前記対象が工程a）においてコルチコステロイドに対するレスポnderであると考えられた場合には、コルチコステロイドを投与する工程、c）前記対象が工程a）においてコルチコステロイドに対する非

50

レスポnderであり、抗TNF α 剤に対するレスポnderであると考えられた場合には、抗TNF α 剤を投与する工程、d)前記対象が工程a)においてコルチコステロイドに対する非レスポnderであり、シクロスポリンに対するレスポnderであると考えられた場合には、シクロスポリンを投与する工程、並びに、e)前記対象が工程a)においてコルチコステロイド、抗TNF α 剤及びシクロスポリンに対する非レスポnderであると考えられた場合には、結腸切除術を行う工程とを含む、方法に関する。

【0068】

本明細書で使用する場合、「結腸切除術」という用語は、大腸 (large intestine) (大腸 (colon)) の任意の程度の外科的切除を指す。本明細書において、結腸切除術は、結腸右半切除術、結腸左半切除術、拡大半結腸切除術、横行結腸切除術、S状結腸切除術、直腸S状結腸切除術、ハルトマン手術、「二重バレル」又はMikulicz人工肛門形成術、結腸全摘除術 (Lane手術としても公知)、結腸大腸全摘除術及び結腸垂全摘除術を含むが、これらに限定されない。

【0069】

一部の実施態様では、本発明の方法は、本発明の方法を行うことにより、対象がコルチコステロイドに対する非レスポnderであり、抗TNF α 剤に対するレスポnderであり、シクロスポリンに対するレスポnderであると考えられた場合、抗TNF α 剤及びシクロスポリンを投与する工程を含む。

【実施例】

【0070】

本発明は、下記実施例により更に例証されるであろう。ただし、この実施例は、本発明の範囲を限定すると何ら解釈されるものではない。

【0071】

実施例

材料及び方法

患者

患者を2か所のフランスにおける三次施設：Beaujon病院 (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris) 及びHaut-Leveque (CHU de Bordeaux) 病院から選択した。両施設の施設内審査委員会により、この研究は承認され、全ての患者に通知された。患者の選択を臨床ファイル及び病理データベースから遡及的に行った。組み入れ基準を下記のとおり：年齢18歳超、ECCO基準 [16] に従って十分確立されたUC診断、入院時における10点超のLichter index [17] に基づくASUCエピソードでの入院及び入院後5日以内に行われた大腸生検についての可撓性の直腸S状結腸鏡検査とした。大腸生検を入院時又は、IVステロイド処置の初日の間 (3～5日目でのこの処置に対する臨床応答の評価前) に採取した。除外基準は、下記のとおり：クローン病を有すること、入院時の生検が無いこと又はRNA量が不十分であること (5ng/ μ l未満) 及びASUCでの入院後3か月未満の経過観察期間とした。患者を2007年1月から2014年10月までリクルートした。同患者には、CYSIF研究に以前に含まれた11名の患者を含ませた。同研究では、ステロイド難治性ASUCに対する第二選択医薬療法としてCsAとIFXとが比較された [9]。両施設において、患者に、第一選択治療としてのIVステロイド (少なくとも0.8mg/kg/d メチルプレドニゾロン) を受けさせた。3～5日後に応答が不十分であった患者において、CsA又はIFXによる第二選択処置を臨床上の必要性及び熟練の臨床医のアドバイスにより結腸切除術を必要としない患者において開始した。CsAを2mg/kg/日で開始し、その後、150～250ng/mLのレベルを得るような血中濃度に適合させた。IFXを5mg/kgの通常用量で0、2及び6週で注入し、維持療法として継続した。チオプリンをステロイド、IFX又はCsAに応答する全ての患者に提供した。各処置について、使用された処置応答定義を、CYSIFトライアルからのものとした。処置失敗を1つ以上の下記条件：10点超のLichter indexにより定義された7日目での臨床応答の不存在；10点超又は3日間連続での3点超のLichter indexにより定義された3か月までの再発；新たな全身性

10

20

30

40

50

UC治療の必要性；又は処置開始から3か月以内での結腸切除術もしくは死亡により定義した。逆に、処置成功を処置の最初の週内の少なくとも2日間連続でいずれの失敗基準なしに10点未満のLichtiger indexにより定義した。

【0072】

RNA抽出

研究中に分析された生検を全て、S状結腸の炎症した粘膜から採取した。トータルRNAをホルムアルデヒド固定及びパラフィン包埋（FFPE）組織（7つの10 μ m切片をミクロトームによりFFPE組織ブロックから切断）から、RecoverAll（商標）Total Nucleic Acidキット（Ambion（登録商標）、life technologies（商標））を使用して抽出した。FFPEサンプルを一連のキシレン及びエタノール洗浄を使用して脱パラフィン化し、ついで、厳密なプロテアーゼ消化に供した。核酸を急速なガラス繊維フィルタ法（同方法はフィルタ上でのDNAse処理を含む）を使用して精製し、ついで、水中に溶出した。抽出されたトータルRNAの純度及び量を分光計（Nanodrop（商標）分光計）によりアッセイした。全てのサンプルが、1.6超の260/280比を有した。

【0073】

マイクロRNA評価

ヒトpre-miRNA及び成熟miRNAの発現レベルを、mirBASE v20に列記されたマイクロRNAを100%カバーするGeneChip（登録商標）miRNA4.0アレイ（Affymetrix, Santa Clara, USA）を使用して評価した。70ng量トータルRNAをFlashTag Biotin HSR RNAラベル化キット（Affymetrix）を使用してビオチンラベル化した。簡潔に、サンプル中のターゲットRNAへのポリ（A）テーリング、続けて、ビオチン化シグナル分子のライゲーションにより開始した。一晩ハイブリダイゼーションした後、チップを特定のプロトコルに従ってfluidic station FS450（Affymetrix）で洗浄し、GCS3000 7Gを使用してスキャンした。ついで、スキャン画像をExpression Consoleソフトウェア（Affymetrix）により分析して、生データ（CELファイル）及び品質管理のための基準を得た。これらの基準のうちの幾つかの観察及び生データの分布研究から、外れ値は示されなかった。ついで、ハイブリダイゼーションデータ（CELファイル）をmiRNA QCツールにより正規化し、フラグ（存在又は不存在）によりフィルタした。アレイの生データを独立t検定により分析した。

【0074】

差分マイクロRNAサイン発現分析

3,391個のmiRNA発現プロファイルについてのステロイド及びCSA/IFXのレスポnderと非レスポnderとの間の類似性を測定するために、R package「Limma」[19]から適合された一般線形モデルを使用して、データをモデル化した。この段階で、「レスポnder」ラベルも「非レスポnder」ラベルもマトリックスの構築には考慮しなかった。第1のセットの24個のmiRNA候補を偽発見率（ $fdr < 0.05$ ）に基づいてトップクラスの候補から選択した。その後、注釈付きヒートマップをR package「Heatplus」[20]を使用して生成した。加えて、患者データ、すなわち、miRNA発現レベルからの推定に基づく患者特性を、生体指標と統合する予測生体マーカーを特徴づけるための混合戦略を開発した。このアプローチは、2つの補完的な機能：（1）特定のmiRNAに関連する知識についての教師なし照会を統合して、以前のセットの特性を改良すること及び（2）重要な医療関連臨床指標のリストを統合することに基づいている。

【0075】

予測分析

分類アルゴリズム及び交差検証法

初期の生検から得られた生体プロファイルを第一選択及び第二選択ASUC医療処置に対する応答を予測するのに使用した。レスポnder又は非レスポnderからのサンプルの分類を一式の方法により評価した。同方法は、線形判別分析（LDA）、トポロジーデータ分析（TDA、[21]）、ニューラルネットワーク又はランダムフォレストアルゴリ

ズム (RF) を含む。ただし、目的に合わせたディープラーニングモデル (DL、[**at the bottom]) は、他の方法より性能に優れ、2つのコホート研究においてより統計学的な堅牢性を示した。方法の検証に関して、一個抜き交差検証 (LOO、[23]) アプローチを各サンプルに使用した。これらの計算において、2つの性能関数：(1) 残差平方和の性能関数 (SSE) 及び (2) 下記式： $[\Sigma \text{エラー} / (\text{サンプルサイズ})] \times 100$ からなる分類スコアが反復的に説明した。分類スコアを RF 分類法についての検定力の概算として使用するが、当該予測アルゴリズムにおける変動係数 (CV) を算出するのに SSE を利用した。CV は、残差平方和 (SSE) 及びアウトカム値の相対サイズに関するモデル当嵌めに関係することが留意される。

【0076】

10

予測精度の分析

各 DL 薬剤分類の性能をその受信者動作特性 (ROC) 曲線により分析した。先のセクションに記載されたとの類似する交差法を使用して当該特性選択法の検証も求めた。このため、患者が LOO 交差検証中に候補リストから除去された場合、当該患者を含ませずに特性選択法を行い、発見コホート及び検証コホートの両方それぞれにおいて、この手法により得られた 15 個及び 9 個の miRNA を順位付けした。したがって、サンプル外患者の予測を行う場合、特性選択プロセス中も、又は、分類アルゴリズムの訓練中も当該患者のデータを使用しなかった。

【0077】

20

ターゲット予測及び経路分析

選択された差分的に発現された miRNA の仮定のレギュラトリーターゲットが生体経路をどの程度変化させるかを判定するために、予測生体マーカー候補のマッピングを、2種類のグループ：すなわち、(1) ターゲットスキャン [26] 及び miRBase [27] に対する KEGG 及び Reactome ([24、25])；(2) マイクロ TCD S [29] 及び TarBase [30] に対する miRPath [28] における、4種類のデータベースに対して適用した。超幾何分析検定により、デレギュレーションされた機能又は経路に関する各遺伝子セットエンリッチメントを数学的に評価した。選択された miRNA のターゲット分析に類似して、特定の KEGG 又は Reactome ジーンオントロジー (GO) [31] カテゴリー又は経路でのターゲット遺伝子における成熟 miRNA 及び miRNA 領域を評価した。

30

【0078】

結果

患者

ASUC を有する 47 名の患者を含ませた。10 名の患者について、ASUC を UC のその最初の発生とした。すべての患者は、大腸炎の重篤な臨床及び生体サインを表し、13.4 点の平均 Lichtiger index 及び 60.3 mg/l 平均 C-反応性タンパク質 (CRP) レベルを有した。すべての患者は、3 の Mayo 内視鏡サブスコアを有し、そのうち 11 名は、深い潰瘍形成が認められた。完結に、14 名の患者は、第一選択の IV ステロイドに応答し、ほとんどに、チオプリンで更に処置した。33 名の患者は、ステロイドに抵抗性であり、第二又は第三選択の処置が必要であった。これら 33 名の患者の中でも、24 名に IFX を受けさせ、15 名に CsA を受けさせ、6 名に両薬剤を受けさせた。このため、12 名の患者が IFX に応答し、12 名は応答しなかった。加えて、9 名の患者が CsA に応答し、6 名の患者が応答しなかった。ステロイド非レスポナーにおいて、10 名の患者に経過観察中に結腸切除術を受けさせた。

40

【0079】

マイクロ RNA 発現プロファイル

発見コホート

ASUC のエピソードで入院した 47 名の患者からの FFPE 中に固定された大腸生検において、3,391 個のヒトマイクロ RNA の発現を測定した。FFPE 大腸生検を IV ステロイド処置前の 35 名の患者の炎症した粘膜から得た。12 名の患者に、IV ステ

50

ロイドコースの最初の3日以内に大腸生検を行った。教師なしクラスタリング分析から、ステロイドレスポnderと非レスポnderとを明らかに分ける、24個の最初のmiRNA候補が示された。サインを減らすために、特性選択のための統合法を更に適用した。15個のmiRNAのセット：hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-3667、hp_hsa-mir-100、hsa-mir-603、hsa-mir-718、hsa-mir-4259、hp_hsa-mir-193b、hsa-mir-3150a-5p、hp_hsa-mir-1260b、hsa-mir-938、hsa-mir-3128、hsa-mir-4423-3p、hsa-mir-518b、hsa-mir-1468及びhsa-mir-3152-3pが選択された。ステロイド非レスポnderグループにおいて、生検を第一選択のステロイド処置前（又は同処置中）に得た第二選択治療レスポnderと非レスポnderとの間を区別するために、miRNAを使用した値を評価した。先の選択法に従って、IFX及びCsAそれぞれに対する応答に関連する6つ（hsa-mir-4423-3p、hsa-mir-3128、hsa-mir-3152-3p、hp_hsa-mir-193b、hsa-mir-938）及び4つのmiRNA（hsa-mir-4423-3p、hsa-mir-938、hsa-mir-518b及びhsa-mir-100）を特定した。第二選択処置のレスポnder vs 非レスポnderにおいて差分的に発現されたmiRNAには、ステロイド応答に関連する15個のmiRNAのセットが含まれていた。

10

【0080】

検証コホート

20

qPCR分析により、補助的にリクルートされた類似する組み入れ基準を有する29名の更なる患者からのFFPE中に固定された大腸生検において、15個の選択されたヒトmiRNAの発現を測定した。15個のうちの9個のmiRNA：hp_hsa-mir-3934、hp_hsa-mir-100、hsa-mir-718、hp_hsa-mir-193b、hsa-mir-3150a-5p、hp_hsa-mir-1260b、hsa-mir-938、hsa-mir-518b及びhsa-mir-1468が発現され、候補として残った。次に、これらの9個のmiRNA候補をステロイドレスポnderと非レスポnderとの間での検証コホートへの区分において評価した（データを示さず）。3個のmiRNAがIFX及びCsAに対する応答に関連した（データを示さず）。

30

【0081】

ディープラーニング分類

ステロイド、IFX及びCsAのレスポnder vs 非レスポnderについてのmiRNA分類子を開発するために、複数の分類法を適用した（添付の表1を参照のこと）。それらの中でも、ディープラーニング（DL）法を選択した。同方法の性能は、発見コホート及び検証コホートの両方について最良であった（図3）。この選択をLOO検証前に生のスコア及びCVスコアに基づいて行った（方法を参照のこと）。次に、2つの分類別特性、14の数値レベルによるマルチ分類を行い、33のインプットニューロンを有すると予測するDLにより、表S1に示されたように、最良の結果を得た。特性選択の使用により、方法セクションに記載されたように、発見コホートについての分類子は、15個のmiRNAのステロイド応答、6個のmiRNAのIFX応答及び4個のmiRNAのCsA応答であり、検証コホートについては、9個のmiRNAのステロイド応答、3個のmiRNAのIFX応答及び3個のmiRNAのCsA応答であった。この段階では、3,391個から15-9、6-3又は4-3個のmiRNAを選択した過剰適合の内因性リスクを注意する必要がある。そのために、教師なし生体照会のみに基づく特性選択戦略を開発し、この特性選択戦略を以後的にLOO交差検証戦略に統合した。更に、該分類子をいくつかの生体データ（以下を更に参照のこと）と組み合わせ、発見コホートにおけるステロイド、IFX及びCsAに対するレスポnderと非レスポnderとの間での約94%、約90%及び約83%、並びに、検証コホートにおけるステロイド、IFX及びCsAに対するレスポnderと非レスポnderとの間での約90%、約84%及び約80%の分類

40

50

成功レベルを達成した。

【0082】

分類値安定性の改善のための生体データの付加

階層化戦略を改善するために、半教師有り法において、miRNAサインに対する生検と同時に収集された生体サンプル種からの値を加えた。サンプル種には、白血球、赤血球、ヘマトクリット、ヘモグロビン、グルコース、フェリチン、トランスフェリン、アルブミン、鉄、好塩基球及びリンパ球カウント並びにC-反応性タンパク質（CRP）レベルを含ませた。重要なことは、ステロイド応答についての予後値が、選択されたmiRNAと、5つの臨床関連生体パラメータ（ヘモグロビン、ヘマトクリット、アルブミン、CRP及びトランスフェリンレベル）の非線形変換とを組み合わせることにより改善された。これにより、DL階層化アルゴリズムによるステロイド応答予測性能（図4及び表2を参照のこと）は、発見コホート及び検証コホートそれぞれについて、約97%/約93%の成功レベルに向上した。しかしながら、生体値の組み合わせにより、IFX及びCSAの応答分類子を改善させることはできなかった。

10

【0083】

交差検証

当該予測子を数学的に検証するために利用したパラメータをCVとした。同CVは、当該戦略により示された良好性の指数及び分類の生のスコアとして使用した。このため、このスコアから、各DL薬剤の分析を通して、分類をその関連するROC曲線に従って行った（図4）、すなわち、発見コホート及び検証コホートについての $AUC_{ステロイド} = 0.92 - 0.96 / 0.83 - 0.91$ （生体指標の組込みの有無）、 $AUC_{IFX} = 0.86$ 及び $AUC_{CSA} = 0.81$ 。分類子性能であるステロイド、IFX及びCSAについてのCV値は、 $0.03 - 0.01$ （生体指標の有無）、 0.05 及び 0.08 （表2を参照のこと）であった。教師なし特性選択法のベンチマークから、各実行において類似する予後値が示された（データを示さず）。

20

【0084】

討論

我々の知る限りでは、本研究は、IBDにおける高精度な医学のためのmiRNA系のバイオマーカーを確立するための最初の研究である。臨床アウトカムにおける予測子の特定は、ASUC処置における主な課題である。ASUCのためのステロイド処置を開始した後の思わしくない臨床アウトカムを予測するための複数のスコアが確立されてきた。Travis et al.により、静脈内処置の3日目に、その日に9回以上の便又は45mg/l超CRPを含む3～8回の頻繁な便を伴う患者に対する処置は失敗であったであろうことが決定された[18]。Seo et al.により、複合活性インデックス（ $60 \times \text{血便} + 13 \times \text{腸運動} + 0.5 \times \text{赤血球沈降速度} - 4 \times \text{ヘモグロビン} - 15 \times \text{アルブミン} + 200$ ）が提唱された[19]。パイロット研究において、治療後の2週間で180点を下回るインデックスにより示されるASUCを有する全ての患者において緩和が生じた。一方、180点を上回るインデックスを有する患者の約65%は、その後に、結腸切除術を必要とした[20]。IBD UK審査からの最近の研究では、ASUCを有する420名の患者の各コホートにおけるステロイド失敗を予測するためのTravis及びHoin indexの値が分析された[11]。Travis及びHoグループにおける高リスク患者では、より低いリスクグループと比較した場合、ステロイド治療により失敗したようであった。Travisについて64.5% vs. 38.7% ($P < 0.0001$)及びHoについて66.2% vs. 46.7% vs. 36.6% ($P < 0.0001$) [11]。これらの結果から、ステロイドに対するレスポnder vs 非レスポnderを階層化するためのこれらのインデックスの限られた値が強調される。

30

40

【0085】

近年、生体指標は、ASUC臨床アウトカムに関連付けられた。Ho et al.には、便カルプロテクチンが結腸切除術を必要とした患者において有意に高かったことが示された[21]。ASUCの小児コホートにおいて、上昇した便M2-ピルバートキナーゼレベル

50

は、ステロイド応答と関連付けられた〔22〕。一方、簡易な臨床インデックスである小児UC活性インデックスは、ASUCにおける静脈内ステロイドコース後のアウトカムを予測するのにおいて、便マーカーより良好に行われた。

【0086】

多くの努力にも関わらず、現在、ASUCにおける処置に対する応答の正確な予測子は存在しない。ASUCを有する79名の患者の小児コホートにおいて、IVステロイドコースの3日目でのインターロイキン-6 (IL-6) の血漿レベルは、レスポnderと非レスポnderとの間で有意に異なっていた〔23〕。しかしながら、多変量分析において、IL-6は、ステロイド応答と関連付けられなかった。このことから、ステロイド経路の失敗よりむしろ疾患活性との関連付けが示唆される〔23〕。多剤耐性遺伝子(MDR1)のG2677T/A多型(TT遺伝子型)は、ASUCのステロイド抵抗性エピソードを有する154名の患者のコホートにおけるCSA失敗のリスクと関連付けられた〔24〕。しかしながら、この遺伝子マーカーは、検証されることも、日常の実施において使用されることもなかった。TNF- α の粘膜発現は、UCにおけるIFXに対する内視鏡及び臨床応答に逆相関した〔25〕。同じグループにおいて、IL-17A及びIFN- γ の高い発現レベルが3回のIFX注入後の緩和と有意に関連付けられたことも決定された(それぞれ、OR=5.4、 $p=0.013$ 及びOR=5.5、 $p=0.011$)〔26〕。近年、IFXの便への損失は、ASUCにおけるIFX失敗及び重篤な大腸クローン病と関連付けられた〔27〕。

【0087】

標準的な薬剤応答を予測する簡易なスコアは、ASUCを有する患者を処置するのに事足りない。このため、miRNAは、関連する候補であると考えられた。miRNAの特定の部分集合のディスレギュレーションが、UCを有する患者の炎症又は活動していない大腸粘膜において行われた研究で特定された〔28〕。複数のmiRNAの異常な発現が、複数の独立した研究において同様に特定された。これらのmiRNAの大部分は、炎症した大腸粘膜において特定された。このことから、ディスレギュレーションされた炎症プロセスにおけるその関与が示唆される(miR-21-5p、miR-155-5p、miR-146a-5p、miR-31-5p等)。興味深いことに、他の疾患、大部分がガンにおいて、一部のmiRNAが、その可能性のある予後値について研究されてきた。我々の知る限り、マイクロRNA系の予後バイオマーカーは、IBD管理について未だに確立されていない。

【0088】

この予測アルゴリズムを構築するために、ASUCのエピソードで入院したUCを有する患者の遡及的で、2中心的な十分定義されたコホートを確立した。処置法、応答又は再発の評価及び定義は、CYSIFランダム化トライアル基準に従って厳密に定義された〔9〕。含まれた患者の異なる臨床アウトカム及び薬剤応答プロファイルも遡及的に特徴付けられた。アルゴリズムの予測性は、生化学及び分子サインが最初の処置前又は同処置の初日の間に得られた事実から生じる。12名の患者は、第一選択のIVステロイドの間に取得されたその生検を有した。15個の選択されたmiRNAのそれらのサインは、それらのナীবなIVステロイド患者との比較に影響を及ぼさなかった(データを示さず)。

【0089】

全体として、この予測アルゴリズムは、簡易なmiRNAサインの範囲を超える数学的アプローチを利用する。同アルゴリズムは、ニューロン判定法のDL層を使用する階層化ツールを使用する。同判定法により、複数の比較が、患者個々のデータ(ステロイドについての15-9個のマイクロRNAの粘膜発現と5つの生体値)と、所定の処置に対するそれらの応答について十分特徴付けられた患者のマトリックスの個々のデータとの間でなされる。このため、該アルゴリズムで試験された各患者について、qPCRにおいて9個のmiRNA発現と定量的挙動が処置アウトプットの水準に類似する5個の生体指標により構成されるシステムのソリューションセットを正確に捕捉する非線形式を学習させるこ

とにより、I Vステロイド、I F X及びC s Aに対するそれらの応答の可能性が得られる。当該アプローチにより、限られたセットの応答ドライバを特定するのに加えて、m i R N Aのセット全体を考慮した場合でも、分類法の性能範囲の改善、例えば、約80%~約93%（生体データについては約97%）のアウトリーチからの古典的なロジスティック回帰分析が可能となる。最近公開された他の類似する研究〔29〕とは異なり、当該方法は、少数の患者に対処した。この限界に対処するために、提唱した予測アルゴリズムの新規性は、粘膜m i R N Aのサインで構築されるだけでなく、（1）過剰適合事項を最小化するための純粋に教師なし特性選択段階、（2）ランダムフォレストアルゴリズムを使用する分類タスク及び（3）効率を改善するための生体データの付加による多目的な方法でも構築される。特に、Li et al.〔29〕におけるように、最良のm i R N Aを選択する10
のに差分的発現又はランダムフォレスト変数に頼っていない。その代わりに、当該選択アプローチは、階層的クラスタリングによる教師なし特性選択と、特定されたm i R N Aを既存の生物学的知識と合致させることによる統合的データ分析との組み合わせによる。外部知識とのこの統合により、少数の患者についての教師なし特性選択の性能が向上する。分類タスクが関係する限り、ランダムフォレストアルゴリズム（〔29〕で使用された重心アルゴリズムではない）を利用する。同ランダムフォレストアルゴリズムを、患者数が限られているため一個抜き交差検証により較正した。5つの生体データ種は、これらのデータが入院時に収集されたため、ステロイドに対する応答を予測するのに役立ったが、第二選択処置の応答予測には役立たなかったことは注目に値する。

【0090】

興味深いことに、治療前内視鏡評価における深い潰瘍形成の存在は、薬剤応答プロファイルの予測とは関連付けられず、この項目は、最終的なD L予測アルゴリズムには保持されなかった。20

【0091】

まとめると、当該研究により、A S U Cにおける第一選択及び第二選択処置に対する応答のための最初の予測ツールが提供される。当該結果から、遡及的に検証される必要がある場合でも、U Cにおける予測医療の開発を促進される。

【0092】

参考文献

この出願全体を通して、種々の参考文献には、本発明が属する技術水準が記載されている。これらの参考文献の開示は、参照により本開示に組み入れられる。30

【表 2】

- 1 Ordas I, Eckmann L, Talamini M, *et al.* Ulcerative colitis. *Lancet* 2012;**380**:1606-19.
- 2 Edwards FC, Truelove SC. The Course and Prognosis of Ulcerative Colitis. *Gut* 1963;**4**:299-315.
- 3 Grainge MJ, West J, Card TR. Venous thromboembolism during active disease and remission in inflammatory bowel disease: a cohort study. *Lancet* 2010;**375**:657-63.
- 4 Truelove SC, Jewell DP. Intensive intravenous regimen for severe attacks of ulcerative colitis. *Lancet* 1974;**1**:1067-70.
- 5 Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; preliminary report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1954;**2**:375-8.
- 6 D'Haens G, Lemmens L, Geboes K, *et al.* Intravenous cyclosporine versus intravenous corticosteroids as single therapy for severe attacks of ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2001;**120**:1323-9.
- 7 Van Assche G, D'Haens G, Noman M, *et al.* Randomized, double-blind comparison of 4 mg/kg versus 2 mg/kg intravenous cyclosporine in severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003;**125**:1025-31.
- 8 Jarnerot G, Hertervig E, Friis-Liby I, *et al.* Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2005;**128**:1805-11.
- 9 Laharie D, Bourreille A, Branche J, *et al.* Ciclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel, open-label randomised controlled trial. *Lancet* 2012;**380**:1909-15.
- 10 Randall J, Singh B, Warren BF, *et al.* Delayed surgery for acute severe colitis is associated with increased risk of postoperative complications. *Br J Surg* 2010;**97**:404-9.
- 11 Lynch RW, Churchhouse AM, Protheroe A, *et al.* Predicting outcome in acute severe ulcerative colitis: comparison of the Travis and Ho scores using UK IBD audit data. *Aliment Pharmacol Ther* 2016;**43**:1132-41.

- 12 Winter J, Jung S, Keller S, *et al.* Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009;**11**:228-34.
- 13 Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2013;**93**:98-104.
- 14 Simpson LJ, Ansel KM. MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity. *J Clin Invest* 2015;**125**:2242-9.
- 15 Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, *et al.* MicroRNAs: new players in IBD. *Gut* 2015;**64**:504-17. 10
- 16 Dignass A, Eliakim R, Magro F, *et al.* Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 1: definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2012;**6**:965-90.
- 17 Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, *et al.* Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N Engl J Med* 1994;**330**:1841-5.
- 18 Travis SP, Farrant JM, Ricketts C, *et al.* Predicting outcome in severe ulcerative colitis. *Gut* 1996;**38**:905-10. 20
- 19 Seo M, Okada M, Yao T, *et al.* An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992;**87**:971-6.
- 20 Seo M, Okada M, Yao T, *et al.* Evaluation of the clinical course of acute attacks in patients with ulcerative colitis through the use of an activity index. *J Gastroenterol* 2002;**37**:29-34.
- 21 Ho GT, Lee HM, Brydon G, *et al.* Fecal calprotectin predicts the clinical course of acute severe ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2009;**104**:673-8. 30
- 22 Turner D, Leach ST, Mack D, *et al.* Faecal calprotectin, lactoferrin, M2-pyruvate kinase and S100A12 in severe ulcerative colitis: a prospective multicentre comparison of predicting outcomes and monitoring response. *Gut* 2010;**59**:1207-12.
- 23 Wine E, Mack DR, Hyams J, *et al.* Interleukin-6 is associated with steroid resistance and reflects disease activity in severe pediatric ulcerative colitis. *J Crohns Colitis* 2013;**7**:916-22.
- 24 Daniel F, Lorient MA, Seksik P, *et al.* Multidrug resistance gene-1 polymorphisms and resistance to cyclosporine A in patients with steroid resistant ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;**13**:19-23. 40

25 Olsen T, Goll R, Cui G, *et al.* TNF-alpha gene expression in colorectal mucosa as a predictor of remission after induction therapy with infliximab in ulcerative colitis. *Cytokine* 2009;**46**:222-7.

26 Rismo R, Olsen T, Cui G, *et al.* Mucosal cytokine gene expression profiles as biomarkers of response to infliximab in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2012;**47**:538-47.

27 Brandse JF, van den Brink GR, Wildenberg ME, *et al.* Loss of Infliximab Into Feces Is Associated With Lack of Response to Therapy in Patients With Severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 2015;**149**:350-5 e2.

28 Van der Goten J, Vanhove W, Lemaire K, *et al.* Integrated miRNA and mRNA expression profiling in inflamed colon of patients with ulcerative colitis. *PLoS One* 2014;**9**:e116117.

29 Li J, Chen Z, Tian L, *et al.* LncRNA profile study reveals a three-lncRNA signature associated with the survival of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* 2014;**63**:1700-10.

Deng, L.; Yu, D. (2014). "Deep Learning: Methods and Applications". *Foundations and Trends in Signal Processing*. **7 (3–4): 1–199. doi:10.1561/20000000039.

10

20

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/064496

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

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

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, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN DER GOTEN J ET AL: "P055 Integrated mirNA and gene expression profiling in patients with ulcerative colitis before and after infliximab treatment", JOURNAL OF CROHN'S AND COLITIS, vol. 8, 1 February 2014 (2014-02-01), XP028617987, ISSN: 1873-9946, DOI: 10.1016/S1873-9946(14)60177-X the whole document	1-18
A	WO 2009/120877 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; KWON JOHN H [US]; WU FENG [US]) 1 October 2009 (2009-10-01) claims 19-26 and tab. 4 and 5 ----- -/--	1-18

☒ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 July 2017

Date of mailing of the international search report

19/07/2017

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

Lapopin, Laurence

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/064496

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIN FUJIOKA ET AL: "Serum microRNA levels in patients with Crohn's disease during induction therapy by infliximab", JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, vol. 29, no. 6, 15 June 2014 (2014-06-15), pages 1207-1214, XP055305443, AU ISSN: 0815-9319, DOI: 10.1111/jgh.12523 abstract and tab. 3 -----	1-18
A	JIANG WEIWEI ET AL: "Molecular Analysis of Inflammatory Bowel Disease: Clinically Useful Tools for Diagnosis, Response Prediction, and Monitoring of Targeted Therapy", MOLECULAR DIAGNOSIS AND THERAPY, ADIS INTERNATIONAL LTD., NZ, vol. 19, no. 3, 1 June 2015 (2015-06-01), pages 141-158, XP009191789, ISSN: 1177-1062 abstract, p. 152 chap. 4.2 and tab. 3 -----	1-18
X	NAVES: "DOP013 Pre-treatment differential microRNA expression profile in ulcerative colitis patients according to their response to corticosteroids", JOURNAL OF CROHN'S AND COLITIS, 1 February 2014 (2014-02-01), page S20, XP002762281, the whole document -----	1-18

Information on patent family members

PCT/EP2017/064496

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009120877 A2	01-10-2009	US 2011117111 A1 WO 2009120877 A2	19-05-2011 01-10-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 38/13 (2006.01)	A 6 1 K 38/13	
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844	Z
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813	Z

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(71)出願人 591140123
 アシスタンス ピュブリクーオピトー ドゥ パリ
 ASSISTANCE PUBLIQUE – HOPITAUX DE PARIS
 フランス国, 75004 パリ, アベニュー ビクトリア 3番地

(71)出願人 514058706
 ユニヴェルシテ・ドゥ・ボルドー
 フランス・F-33000・ボルドー・プランス・ペイ・ベルラン・35

(71)出願人 517262069
 セアッシュユ・ドゥ・ボルドー
 CHU DE BORDEAUX
 フランス国、エフ-33400 タランス、リュ・デュベルナ 12

(71)出願人 505429360
 ユニヴェルシテ パリ 13
 UNIVERSITE PARIS 13
 フランス、エフ-93430 ヴィルタヌーズ、アヴェニュー ジャン・バプティスト クレマン、
 99
 99, avenue Jean-Baptiste Clement, F-93430 Vill
 etaneuse, FRANCE

(74)代理人 110001508
 特許業務法人 津国

(72)発明者 オジェドゥニ、エリク
 フランス国、75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 16、ファキュルテ・ドゥ・メドシ
 ース・クサヴィエ・ビシャ

(72)発明者 トレトン、クサヴィエ
 フランス国、75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 16、ファキュルテ・ドゥ・メドシ
 ース・クサヴィエ・ビシャ

(72)発明者 ブニーク、ヨーラム
 フランス国、75018 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 16、ファキュルテ・ドゥ・メドシ
 ース・クサヴィエ・ビシャ

(72)発明者 モリラ、イアン
 フランス国、93430 ヴィルタヌーズ、アヴェニュー・ジャン・バプティスト・クレマン 99、
 ユニヴェルシテ・パリ・トレーズ・エルアジェア／アンフラムス

(72)発明者 ラーリー、ダヴィド
 フランス国、33076 ボルドー、リュ・レオ・セーニャ 146、ユニヴェルシテ・ボルドー

・セガレン、アンセルム・ユ 8 5 3

(72)発明者 ヴェンラブ, ジル

フランス国、7 5 2 3 0 パリ・セデックス 0 5、リュ・ドゥルム 4 5、エコール・ノルマル
・シュペリウル・ドゥ・パリ、ユエムエール 8 5 4 8

(72)発明者 ユザン, マチュー

フランス国、7 5 8 7 0 パリ、リュ・アンリ・ユシャール 1 6ーベペ 4 1 6、ファキュルテ・
ドゥ・メドシーヌ・シテ・クサヴィエ・ビシャ、アンセルム・ユ 1 1 4 9

F ターム(参考) 2G045 AA25 CB01 DA14

4B063 QA05 QA19 QQ03 QQ08 QQ52 QR35 QR56 QR72 QR77 QR82

QS34 QS36 QX02

4C084 AA01 AA02 DA11 NA05 ZA661 ZA662

4C085 AA14 CC23 EE01

4C086 AA01 AA02 DA10 MA01 MA04 NA05 ZA66