

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4917728号
(P4917728)

(45) 発行日 平成24年4月18日 (2012. 4. 18)

(24) 登録日 平成24年2月3日 (2012. 2. 3)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 Z N A N

A 6 1 K 39/108 (2006. 01)

A 6 1 K 39/108

A 6 1 P 1/04 (2006. 01)

A 6 1 P 1/04

GO 1 N 33/569 (2006. 01)

GO 1 N 33/569 A

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 22 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2001-585609 (P2001-585609)
 (86) (22) 出願日 平成13年5月17日 (2001. 5. 17)
 (65) 公表番号 特表2004-526122 (P2004-526122A)
 (43) 公表日 平成16年8月26日 (2004. 8. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/016032
 (87) 国際公開番号 W02001/089361
 (87) 国際公開日 平成13年11月29日 (2001. 11. 29)
 審査請求日 平成20年4月7日 (2008. 4. 7)
 (31) 優先権主張番号 09/575, 061
 (32) 優先日 平成12年5月19日 (2000. 5. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC 38926

(73) 特許権者 391049541
 シーダーズ・サイナイ・メディカル・セン
 ター
 CEDARS-SINAI MEDICA
 L CENTER
 アメリカ合衆国90048カリフォルニア
 州ロサンジェルス、ビバリー・ブールバ
 ード8700番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Omp C抗原を使用したクローン病の診断、予防、及び治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如を決定するための方法であって、
 該対象由来の試料におけるOmpC抗原に対するIgA反応性を測定することを含み、
 該IgA抗OmpC抗体の存在が、該対象がクローン病を有していることを示す、方法。

【請求項 2】

(a) 炎症性腸疾患を有すると推測される対象から試料を得る工程；
 (b) OmpC抗原又はその反応性断片とOmpC抗原に対するIgA抗体との複合体の形成に適した条件の下で、試料をOmpC抗原又はその反応性断片と接触させる工程；
 (c) 該複合体を抗IgA抗体と接触させる工程；及び
 (d) IgA抗OmpC抗体の存在又は欠如を検出する工程を含む方法であって、該対象における該IgA抗OmpC抗体の存在が、該対象がクローン病を有していることを示す、方法。

【請求項 3】

OmpC抗原が、配列番号：1と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項2の方法。

【請求項 4】

IgA抗OmpC抗体が、酵素結合免疫吸着アッセイ法により検出される、請求項2の方法。

【請求項 5】

対象におけるIgA抗サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 抗体 (ASCA) の存在又は欠如を決定することをさらに含む、請求項2の方法であって、該対象

におけるIgA抗OmpC抗体の存在又はIgA ASCAの存在が、該対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す、方法。

【請求項 6】

IgA ASCAの存在が、精製された酵母細胞壁ホスフォペプチドマンナン（PPM）との反応性により決定される、請求項5の方法。

【請求項 7】

酵母細胞壁PPMが、ATCC # 38926株から調製される、請求項6の方法。

【請求項 8】

対象におけるIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在又は欠如を決定することをさらに含む、請求項2の方法であって、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又はIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在が、該対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す、方法。

10

【請求項 9】

IgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在が、配列番号：3と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するI-2ポリペプチドとのIgA反応性によって決定される、請求項8の方法。

【請求項 10】

(a) 対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如を決定する工程；
(b) 対象におけるIgA ASCAの存在又は欠如を決定する工程；及び
(c) 対象におけるIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在又は欠如を決定する工程を含む方法であって、IgA抗OmpC抗体の存在、IgA ASCAの存在、又はIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在が、該対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す、方法。

20

【請求項 11】

対象における核周囲抗好中球抗体（pANCA）の存在又は欠如を決定することをさらに含む、請求項10の方法。

【請求項 12】

以下を含むアッセイシステム：

(a) OmpC抗原又はその反応性断片を含むプレートであって、該OmpC抗原が、配列番号：1のアミノ酸配列または配列番号：1と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、プレート；

(b) IgA抗OmpC抗体に対して特異的なインディケーター二次抗体；及び

(c) 該OmpC抗原、該IgA抗OmpC抗体および該インディケーター二次抗体の複合体の存在又は欠如を検出し、該複合体の存在が、クローン病の指標となることを示す、説明書。

30

【請求項 13】

プレートが対照をさらに含む、請求項12のアッセイシステム。

【請求項 14】

インディケーター二次抗体が酵素-標識抗体である、請求項12のアッセイシステム。

【請求項 15】

システムが酵素-標識抗体に対する基質をさらに含む、請求項14のアッセイシステム。

【請求項 16】

基質の産物が発色性である、請求項14のアッセイシステム。

【請求項 17】

以下を含むアッセイキット：

(a) OmpC抗原又はその反応性断片を含むプレートウェル；

(b) 酵素-標識抗IgA抗体；及び

(c) 患者の試料におけるIgA-抗OmpC抗体の存在又は欠如を検出し、OmpC自己抗体の存在が、クローン病の指標となることを示す、説明書。

40

【請求項 18】

キットが対照を含む、請求項17のアッセイキット。

【請求項 19】

酵素-標識抗IgA抗体がインディケーター二次抗体である、請求項17のアッセイキット。

【請求項 20】

50

キットが酵素-標識抗体に対する基質をさらに含む、請求項19のアッセイキット。

【請求項 2 1】

基質の産物が発色性である、請求項19のアッセイキット。

【請求項 2 2】

アッセイがクローン病患者の早期かつ適切な治療を促進するために行われる、請求項21のアッセイキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、米国公衆衛生総局 (United States Public Health Service) より授与されたUSP HS Grant DK46763の下で政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明における一定の

10

権利を有する。

【0002】

発明の背景

発明の領域

本発明は、一般的に、免疫学及び炎症性腸疾患の領域に関し、より具体的には細菌抗原、外膜タンパク質C (OmpC) を使用したクローン病の診断及び治療に関する。

【0003】

背景情報

炎症性腸疾患 (IBD) とは、病因が不明の2つの胃腸障害：クローン病 (CD) 及び潰瘍性大腸炎 (UC) を記載するために使用される総称である。世界中で発生しており、200万人もの人々が罹患していると報告されているIBDの経過及び予後は、極めて多様である。IBDは、主に青年期に発症し、下痢、腹痛、及び発熱を3つの最も一般的な症状とする。下痢は軽度のものから重度のものまで様々であり、そして貧血及び体重減少がIBDのさらなる一般的兆候である。IBDを有する全患者の10～15パーセントが、10年の間に手術を必要とするであろう。さらに、IBDを有する患者においては、胃腸癌発症のリスクが増大している。IBDは人生最盛期の人々を襲う消耗性疾患である場合が多く、不安及びうつを含む心理学的問題の発症率が増大しているという報告は、おそらく、驚くべき症状ではない。

20

【0004】

残念ながら、炎症性腸疾患のため利用可能な療法はほとんど存在せず、疾患の病因に関する知識の不足によって、診断及び治療の両方が妨げられている。しかしながら、明らかであるのは、遺伝学的要因、外因性誘発因子、及び内因性ミクロフローラの組み合わせが、炎症性腸疾患において見られる、免疫により媒介された腸粘膜傷害に寄与するという点である。クローン病においては、細菌が疾患の開始及び進行に関与していることが示されており：クローン病における腸の炎症においては、高頻度の抗生物質に対する応答性、及び細菌糞便流に対する感受性が顕著である。一般的な腸管内コロニー形成体及び新規な病原体が、直接的な検出、又は疾患に関連した抗微生物免疫応答により、クローン病に関与していることが示されている。さらに、多くの遺伝学的に感受性の慢性大腸炎の動物モデルでは、管腔の微生物が、その疾患にとって必要なコファクターであり；無菌環境に収容された動物は大腸炎を発症しない。しかしながら、クローン病における腸内微生物の役割の直接的及び間接的な証拠は多く存在するにもかかわらず、この疾患で見られる免疫制御異常に寄与する病原性生物及び抗原は同定されていない。

30

40

【0005】

クローン病のための現在の診断アッセイ法は、その疾患を有する患者を全て検出することはできない。従って、クローン病に関連した新規微生物抗原の同定は、現在の診断アッセイ法の感度を増加させることができる試薬を提供するであろう。さらに、そのような微生物抗原は、疾患関連T細胞エピトープを保持しているかもしれず、疾患関連免疫応答の最初の又は貢献的な誘導因子として、クローン病を治療するための効果的な寛容原性抗原となりうる。

【0006】

従って、クローン病の現在の診断アッセイ法の感度を改良するために使用されうる、この

50

疾患と関連した微生物抗原の同定が必要とされている。本発明は、この需要を満たし、関連した利点をも提供する。

【 0 0 0 7 】

発明の概要

本発明は、IgA抗外膜タンパク質C (OmpC) 抗体の存在又は欠如を決定することにより、対象におけるクローン病を診断する方法を提供する。ここで、IgA抗OmpC抗体の存在は、対象がクローン病を有していることを示す。本発明の方法は、例えば、対象から試料を得ること；OmpC抗原又はその反応性断片とOmpC抗原に対するIgA抗体との複合体の形成に適した条件の下で、試料をOmpC抗原又はその反応性断片と接触させること；及びIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如を検出することにより実施されうる。ここで、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在は、対象がクローン病を有していることを示す。一つの態様において、本発明は、実質的に配列番号：1のアミノ酸配列を有するOmpC抗原を使用して実施される。もう一つの態様において、IgA抗OmpC抗体は、酵素結合免疫吸着アッセイ法により検出される。

10

【 0 0 0 8 】

本発明は、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如、及び対象におけるIgA抗サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 抗体 (ASCA) の存在又は欠如を決定することにより、クローン病を診断する方法をさらに提供する。ここで、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又はIgA ASCAの存在は、対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す。IgA ASCAの存在は、例えば、例えばATCC # 38926株から調製されうる、精製された酵母細胞壁ホスホペプチドマンナン (phosphopeptidomannan) (PPM) との反応性により決定されうる。

20

【 0 0 0 9 】

本発明は、さらに、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如、及び対象におけるIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在又は欠如を決定することにより、クローン病を診断する方法を提供する。ここで、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又はIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在は、対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す。一つの態様において、IgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在は、実質的に配列番号：3のアミノ酸配列を有するI-2ポリペプチドに対するIgA反応性によって決定される。

30

【 0 0 1 0 】

対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如を決定すること；対象におけるIgA ASCAの存在又は欠如を決定すること；及び対象におけるIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在又は欠如を決定することにより、対象におけるクローン病を診断する方法が、本発明により、さらに提供される。ここで、IgA抗OmpC抗体の存在、IgA ASCAの存在、又はIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在は、対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す。一つの態様において、この方法は、対象における核周囲抗好中球抗体 (pANCA) の存在又は欠如を決定する工程をさらに含む。

【 0 0 1 1 】

本発明は、クローン病を有する患者に、有効な用量のOmpC抗原又はその寛容原性断片を投与することにより、クローン病を有する患者において寛容を誘導する方法をさらに提供する。寛容を誘導する方法において有用なOmpC抗原は、例えば、実質的に配列番号：1のアミノ酸配列を有する。

40

【 0 0 1 2 】

発明の詳細な説明

本発明は、外膜タンパク質C (OmpC) に対するIgA抗体がクローン病と関連しているという衝撃的な発見に関する。図4に示されるように、クローン病を有していない(「正常な」)個体で、 0.2_{405} を越えるIgA OmpC反応性を有していたのはただ1人であったが、多くの正常体が有意なIgG OmpC反応性を有していた。正常体とは対照的に、多くのクローン病を有する患者からの血清中に、有意なIgA OmpC反応性が存在した(図1参照)。さらに、この反応性は、クローン病患者からの血清において見られたIgA I-2反応性及びIgA ASCA反

50

応性（図1及び2）と、大部分が区別されるようであった。これらの結果は、表1に要約されており、表1は、IgA ASCA反応性、pANCA反応性、及びI-2ポリペプチド反応性と組み合わされたIgA OmpC反応性が、クローン病を有する患者の86%を検出することができる、極めて高感度の診断システムであることを示している。さらに、表2に示されるように、IgA OmpC反応性は、単独で、クローン病を有する患者の55%を検出した。これらの結果は、IgA OmpC反応性が、疾患を有すると診断されるクローン病患者の数を増加させ、それにより、より早期の、より適切な治療を容易にするのに有益であり得ることを示している。

【0013】

【表1】

CD コホート						
	計	ASCA パネル+	IgA OmpC+	pANCA	I2	追加された 検出率 (%)
						累積 検出率 (%)
CD コホート	153	86				56%
ASCA パネル -	67		31			20%
ASCA パネル -/ OmpC-	36			12		8%
ASCA パネル -/ OmpC-/pANCA-	24				2	1%
総検出率 (%) :						86%

【表2】

CD コホート					
	計	ASCA パネル+	OmpC+	pANCA	I2
n:	153	86	84	36	79
検出率 (%) :		56%	55%	24%	52%

【0014】

上記に基づき、本発明は、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如を決定することにより、対象におけるクローン病を診断する方法を提供する。ここで、IgA抗OmpC抗体の存在は、対象がクローン病を有していることを示す。本発明の方法は、例えば、対象から試料を得ること；OmpC抗原又はその反応性断片とOmpC抗原に対するIgA抗体との複合体の形成に適した条件の下で、試料をOmpC抗原又はその反応性断片と接触させること；複合体を抗IgA抗体と接触させること；及びIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如を検出することにより実施されうる。ここで、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在は、対象がクローン病を有していることを示す。一つの態様において、本発明は、実質的に配列番号：1のアミノ酸配列を有するOmpC抗原を使用して実施される。もう一つの態様において、IgA抗OmpC抗体は、酵素結合免疫吸着アッセイ法により検出される。

【0015】

本発明の方法において有用な外膜タンパク質C（「OmpC」）は、「ポリン」である。ポリンとは、大腸菌のようなグラム陰性腸内細菌を含む細菌の外膜に見い出される膜貫通型タンパク質のクラスである。大腸菌細胞の外膜中のポリンは、二糖、リン酸、及び類似の分子の通過のためのチャンネルを提供する。ポリンは、中心に孔を有するバレル形構造を形成するよう配置された同一サブユニットの三量体でありうる（Lodishら, Molecular Cell Biology, チャプター14(1995)）。

【0016】

OmpCは、大腸菌のような細菌の外膜に見い出される主要ポリン・タンパク質のうちの一つである。OmpCは、外膜タンパク質F（「OmpF」）と構造及び機能が類似している。いずれ

も、外膜中で三量体として会合して、親水性低分子の疎水性関門を介した受動拡散を可能にする水性チャンネルを形成している。しかしながら、OmpCの孔は1.1nmという直径を有しているが、OmpFの孔は1.2nmという直径を有している。この違いのため、OmpCの孔を介した拡散の速度は、OmpFの孔を介したものよりも遅い。

【0017】

ポリンの発現は、浸透圧、温度、増殖期、及び毒素濃度を含む環境的条件によって影響され得る。例えば、栄養素及び毒性分子の両方の濃度が比較的高い腸管内では、より小さい孔径を有するOmpCが、優勢なポリンである(Prattら, Mol. Micro., 20:911-917(1996))。

【0018】

本明細書において使用されるように、「OmpC抗原」又は「OmpC」という用語は、OmpCとの直線的又は三次元的な相同性を有しているタンパク質を意味する。OmpC抗原は、大腸菌のようなグラム陰性菌に由来することができ、図5に示されている大腸菌OmpC(配列番号:1)の種ホモログでありうる。自然状態では、OmpC抗原とは、低分子の通過を可能にする、細菌の外膜中で三量体構造を形成するタンパク質、又はそのようなタンパク質の前駆物質である。

【0019】

本明細書において使用されるように、OmpC抗原又はOmpCという用語は、図5に示されている大腸菌OmpC(配列番号:1)との少なくとも50%のアミノ酸同一性を有しているタンパク質を意味する。OmpC抗原は、例えば少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、又は95%の配列番号:1とのアミノ酸同一性(デフォルト・パラメーターを用いたBLOSUM 62マトリックスを使用して、CLUSTALWにより決定される)を有しうる。本発明の方法において使用するため、OmpC抗原は、例えば、実施例IVに記載されているように、スフェロプラスト溶解によって、OmpA及びOmpFが欠損している細胞から部分精製されてもよいし、又はOmpCに加えてOmpA及びOmpFを含有していてもよい多様なその他の大腸菌株から同様に調製されてもよい。OmpC抗原は、当分野において周知の方法により、ジェンバンク(GenBank)登録番号K00541として入手可能なもののようなコーディング核酸配列を発現させることにより、組換え調製されてもよい(例えば、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. New York(1999)参照)。

【0020】

本発明の方法は、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如の決定に関する。本明細書において使用されるように、「IgA抗OmpC抗体の存在」とは、同一条件下で分析された対照(標準)血清のIgA抗OmpC反応性の平均よりも標準偏差の2倍を超える分だけ大きいOmpC抗原に対するIgA反応性を意味する。

【0021】

本発明の方法は、胃腸管の任意の部分に侵しうる慢性炎症疾患であるクローン病(限局性腸炎)の診断及び治療に関する。一般的には、小腸の遠位部分(回腸)及び盲腸が影響を受ける。この疾患は、小腸、大腸、又は肛門直腸の領域に限局している場合もある。クローン病は、ときには十二指腸及び胃を侵し、比較的低頻度で、食道及び口腔も侵す。

【0022】

クローン病の臨床的発現が多様であるのは、一部には、疾患の解剖学的局在部位が様々であるためである。クローン病の最も高頻度の症状は、腹痛、下痢、及び回帰熱である。クローン病は、一般的には、例えば、腸閉塞、又は罹患腸ループ間の異常な通路であるフィステルと関連している。クローン病には、眼、関節、及び皮膚の炎症;肝疾患;腎臓結石又はアミロイドーシスのような合併症も含まれる。さらに、CDは、腸管癌のリスクの増加と関連している。

【0023】

クローン病の病理に特徴的な特質は、いくつか存在する。経壁炎症として知られているCDと関連した炎症は、腸壁の全ての層を侵す。例えば、典型的には、肥厚及び浮腫も腸壁全体に出現し、長期的な疾患においては繊維症も存在する。「スキップ病変」として知られる炎症組織のセグメントが、見かけ上正常な腸管によって隔離されている不連続な炎症も

10

20

30

40

50

、CDに特徴的である。さらに、介在組織の線状潰瘍化、浮腫、及び炎症が、CDに特有の腸管粘膜の「敷石」状所見をもたらす。

【 0 0 2 4 】

クローン病のホールマークは、一般的には粘膜下に見出される、肉芽種として知られる、離散性の炎症細胞塊の存在である。典型的な離散性肉芽種を示すクローン病例もあるし、びまん性肉芽腫性反応又は非特異的経壁炎症を示すものもある。結果として、肉芽種の欠如も疾患と矛盾しないが、離散性肉芽種の存在はCDの指標となる。従って、経壁炎症又は不連続炎症の方が、肉芽種の存在よりもむしろ好ましいクローン病の診断指標である（Rubin and Farber, Pathology（第2版）Philadelphia: J.B. Lippincott Company(1994)）。

【 0 0 2 5 】

通常、近位より遠位の方が重度である、大腸の連続的炎症を特徴とする潰瘍性大腸炎とは対照的に、クローン病は、直腸が高頻度に回避される斑点状疾患である。さらに、通常、粘膜層に限定されており、好中球を含む急性炎症性浸潤物及び陰窩膿瘍を特徴とする潰瘍性大腸炎において見られる表層炎症と、クローン病の炎症は区別される。そうではなく、クローン病は、腸壁の厚み全体を侵し、常にではないが、肉芽種が存在する場合が多い。さらに、回腸末端の関与、丸石様外観、離散性潰瘍、又はフィステルが、クローン病を示唆する。クローン病を潰瘍性大腸炎と区別するために役立つ特徴を、表3に要約する（Rubin and Farber（前記）1994）。

【 0 0 2 6 】

【表 3】

クローン病及び潰瘍性大腸炎の特徴的な特質

特質	クローン病	潰瘍性大腸炎
巨視的		
腸壁の肥厚	典型的	比較的稀
管腔狭小化	典型的	比較的稀
「スキップ」病変	一般的	なし
右大腸の優勢	典型的	なし
裂及びフィステル	一般的	なし
限局性潰瘍	一般的	なし
融合性線状潰瘍	一般的	なし
偽ポリープ	なし	一般的
微視的		
経壁炎症	典型的	比較的稀
粘膜下繊維症	典型的	なし
フィステル	典型的	稀
肉芽種	一般的	なし
陰窩膿瘍	比較的稀	典型的

【 0 0 2 7 】

本明細書において使用されるように、「対象」という用語は、ヒト、非ヒト霊長類、ウサ

10

20

30

40

50

ギ、ラット、又はマウス、特にヒトを含む、炎症性腸疾患を有しうる任意の動物を意味する。対象は、クローン病又は潰瘍性大腸炎の一つ以上の症状を有していてもよいし、又は無症候性であってもよい。

【0028】

本発明の方法において有用な試料は、例えば全血、血漿、唾液、又はその他の体液もしくは組織、好ましくは血清のような、抗体を有している任意の生物学的液体から得られうる。

【0029】

本明細書において使用されるように、「断片」という用語は、天然に存在するアミノ酸、天然には存在しないアミノ酸、又は化学的に修飾されたアミノ酸を含有している、ペプチド、ポリペプチド、又は化合物を意味する。OmpC抗原の反応性断片又は寛容原性断片は、本明細書において定義されたような、クローン病患者の血清中のIgA抗体との優先的な反応性、又は寛容原性を保持しているのであれば、アミノ酸配列を有するペプチドの構造を模倣する非アミノ酸化学構造であるペプチド・ミメティック (peptide mimetic) であってもよい。そのようなミメティックは、一般的には、その対応ペプチドにおいて見出されるのと同じ空間的配置で、サイズ、電荷、又は疎水性のような類似の物理的特徴を示すことを特徴とする。ペプチド・ミメティックの具体例は、1個以上のアミノ酸間のアミド結合が、例えば炭素-炭素結合、又は当分野において周知のその他の結合に置換されている化合物である (例えば、Sawyer, Peptide Based Drug Design, ACS, Washington(1995) 参照)。

【0030】

本明細書において使用されるように、「アミノ酸」という用語は、特記しない限りL-アミノ酸及びDアミノ酸を含む、20個の天然に存在するアミノ酸のうちの一つをさす。アミノ酸という用語は、クローン病血清との反応性又は寛容原性活性を保持するよう、ペプチド内で置換されうるのであれば、アミノ酸アナログを含む化学的に修飾されたアミノ酸、ノルロイシンのような通常はタンパク質へと取り込まれない天然に存在するアミノ酸、及びアミノ酸に特徴的であることが当分野において既知の特性を有する化学合成された化合物のような化合物もさす。アミノ酸及びアミノ酸アナログの例は、Gross and Meienhofer, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Academic Press, Inc., New York(1983)に挙げられている。アミノ酸は、アミノ酸と実質的に同一の空間的配置又は官能基を示すが、アミノ酸に特徴的な α -アミノ基及び α -カルボキシル基を必ずしも有していない構造であるアミノ酸ミメティックであってもよい。

【0031】

本発明において有用なOmpC抗原の反応性断片又は寛容原性断片は、当分野において周知の方法を使用して作製又は合成されうる。そのような方法には、ペプチド作製のための組換えDNA法及び化学合成法が含まれる。適当な宿主細胞におけるペプチドをコードする核酸配列の発現によりペプチドを作製する組換え法は、当分野において周知であり、例えばAusubelら (前記) 1999に記載されている。

【0032】

本発明において有用なOmpC抗原の反応性断片又は寛容原性断片は、化学合成、例えばMerrifieldら, J. Am. Chem. Soc. 85:2149(1964)の固相ペプチド合成法によっても作製されうる。当分野において周知の標準的な溶液法も、発明において有用な反応性断片又は寛容原性断片を合成するために使用されうる (例えば、Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin (1984) 及びBodanszky, Peptide Chemistry, Springer-Verlag, Berlin(1993)参照)。新たに合成されたペプチドは、例えば高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって精製され、例えば質量分析又はアミノ酸配列分析を使用して特徴決定されうる。

【0033】

生物学的機能を破壊することなく、限定された修飾をOmpC抗原に施しうるということが理解される。同様に、反応性又は寛容原性活性を破壊することなく、限定された修飾が、OmpC抗原

10

20

30

40

50

の反応性断片又はこの抗原の寛容原性断片に施されうる。クローン病を有する患者の血清中のIgA抗体との優先的な反応性を破壊しない、本明細書において開示された抗原の修飾、又は寛容原性活性を破壊しない、本明細書において開示された抗原の修飾は、OmpC抗原の定義に含まれる。同様に、クローン病を有する患者の血清中のIgA抗体と共に複合体を形成する能力を破壊しない、本明細書において開示された抗原の反応性断片の修飾が、反応性断片の定義に含まれる。さらに、免疫学的応答を減少させる能力を破壊しない、OmpC抗原の寛容原性断片の修飾が、OmpC抗原の寛容原性断片の定義に含まれる。修飾は、例えば、アミノ酸残基の付加、欠失、もしくは置換；アミノ酸の構造もしくは機能を模倣する化合物の置換；又はアミノ基もしくはアセチル基のような化学的部分の付加でありうる。修飾されたOmpC抗原又は修飾されたOmpC抗原の断片の活性は、例えば、本明細書において開示された反応性又は寛容原性活性に関するアッセイ法のうちの一つを使用してアッセイされうる。

10

【0034】

特に有用な修飾は、増加した安定性を付与する。1個以上のD-アミノ酸の取り込みは、OmpC抗原又はその断片の安定性の増加において有用な修飾である。同様に、リジンの欠失又は置換は、分解からの保護により安定性を増加させうる。例えば、そのような置換は、反応性又は寛容原性活性を有意に減損させないのであれば、OmpC抗原又はその寛容原性断片の安定性を増加させ、従って生物学的利用率を増加させるものでありうる。

【0035】

本発明は、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如、及び対象におけるIgA抗サッカロマイセス・セレビシエ抗体(ASCA)の存在又は欠如を決定することにより、クローン病を診断する方法をさらに提供する。ここで、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又はIgA ASCAの存在は、対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す。IgA ASCAの存在は、例えば、例えばATCC # 38926株から調製されうる、精製された酵母細胞壁ホスフォペプチドマンナン(PPM)との反応性により決定されうる。IgA ASCAの存在を決定するための方法は、本明細書の実施例IIIに例示されている。本明細書において使用されるように、「IgA ASCAの存在」とは、参照(既知の陽性)クローン病血清によって与えられた反応性の20%を超えているS.セレビシエに対するIgA反応性を意味する。

20

【0036】

抗サッカロマイセス・セレビシエ抗体(ASCA)は、クローン病を有する患者において特徴的に上昇しているが、CDにおける特異的抗体応答を支持するS.セレビシエ抗原の性質は不明である(Sendidら, *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, 3:219-226(1996))。これらの抗体は、一般的な食品又は飲料の中に存在する酵母に対する応答、又は胃腸管でコロニー形成する酵母に対する応答を表わしているのかもしれない。過ヨウ素酸酸化を用いた研究により、CD患者の血清中のASCAによって認識されるエピトープは、多糖を含有していることが示された。オリゴマンノシド・エピトープは、種々の酵母の株及び属、糸状菌、ウィルス、細菌、並びにヒトを含む様々な生物の糖タンパク質に共通して存在している。従って、CDにおけるマンノースにより誘導される抗体応答は、病原性酵母生物に対する応答を表わすかもしれないし、又は例えばヒト糖タンパク質自己抗原上に存在する交差反応性のオリゴマンノシド・エピトープに対する応答を表わすのかもしれない。抗原の性質に関わらず、血清ASCAのレベルの上昇は、クローン病のディファレンシャル・マーカーであり、UC患者においては低レベルのASCAしか報告されていない(Sendidら(前記)1996)。

30

40

【0037】

IgA ASCAは、ASCAが特異的に結合する任意の抗原又は抗原混合物である、ASCAに特異的な抗原を使用して検出されうる。ASCA抗体は、最初は、S.セレビシエとの結合能によって特徴付けられたが、当業者は、ASCAに特異的な抗原が、ASCAとの特異的な結合能を有するのであれば、S.セレビシエから得られてもよいし、又はその他の多様な起源から得られてもよいことを理解するであろう。従って、本発明の方法において使用するために企図されるASCAに特異的な抗原の起源の例には、サッカロマイセス属及びカンジダ(Candida)属のような酵母の不活化された細胞全体、酵母細胞壁ホスフォペプチドマンナン(PPM)、オ

50

リゴマンノシド、ネオグリコリピッド (neoglycolipids)、抗ASCAイディオタイプ抗体等が含まれる。前記のように、サッカロマイセスを含む種々の酵母の種及び株が、本明細書に提供された方法において、ASCAに特異的な抗原として使用されうる。例えば、S. セレビシエ株Su1、Su2、CBS1315、又はBM156、又はカンジダ・アルビカンス (Candida albicans) 株VW32が、本発明の方法において、ASCAに特異的な抗原として使用されうる。

【0038】

酵母細胞壁マンナン、又はホスフォペプチドマンナン (PPM) の調製も、ASCAに特異的な抗原として本明細書において企図される。これらの水溶性の表面抗原は、実施例IIIに記載されたようなオートクレーブ処理を含む適切な抽出技術によって調製されてもよいし、又は商業的に得られてもよい (Lindbergら, *Gut* 33:909-913(1992) 参照)。酵母細胞壁PPMの酸安定画分も、本発明の方法において有用であるかもしれない (Sendidら (前記) 1996)。クローン病の臨床サブタイプの診断において使用するためのPPMの例は、S. セレビシエ株ATCC # 38926に由来するものである。

【0039】

ASCAに特異的なオリゴマンノシドのような精製されたオリゴ糖抗原も、本発明の方法において使用するために企図される。本発明における使用のため、精製されたオリゴマンノシド抗原は、好ましくは、Failleら, *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 11:438-446(1992)に記載されたようにして、ネオグリコリピッドへと変換される。当業者は、そのようなオリゴマンノシド抗原のASCAとの反応性が、マンノシル鎖長 (Froshら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1194-1198(1985)) ; アノマー構造 (Fukazawaら, *E. Kurstak 編, Immunology of Fungal Disease*, Marcel Dekker Inc., New York, 37-62頁(1989) ; Nishikawa et al, *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) ; 及びTrinelら, *Infect. Immun.*, 60:3845-3851(1992)) ; 又は結合の位置 (Kikuchiら, *Planta*, 190:525-535(1993)) を変動させることにより最適化されうることを理解する。

【0040】

ASCAに特異的なオリゴマンノシド抗原は、マンノテトラオースMan(1→3)Man(1→2)Man(1→2)Manを含み、Failleら (前記) 1992に記載されたようにしてPMMより精製されうる。本発明の方法において使用するためのネオグリコリピッドの例は、各PPMからオリゴマンノシドを放出させ、次に放出されたオリゴマンノシドを4-ヘキサデシルアニリン等とカップリングさせることにより構築されうるものである。

【0041】

本発明は、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如、及び対象におけるIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在又は欠如を決定することにより、クローン病を診断する方法をさらに提供する。ここで、対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又はIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在は、対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す。一つの態様において、IgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在は、実質的に配列番号：3のアミノ酸配列を有するI-2ポリペプチドに対するIgA反応性によって決定される。

【0042】

本発明の方法は、対象におけるIgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在又は欠如の決定に関する。本明細書において使用されるように、「IgA抗I-2ポリペプチド抗体の存在」又は「IgA抗I-2ポリペプチド抗体」とは、同一条件下で分析された対照 (標準) 血清のIgA抗I-2反応性の平均よりも標準偏差の2倍を超える分だけ大きいI-2ポリペプチドに対するIgA反応性を意味する。

【0043】

本明細書において使用されるように、「I-2ポリペプチド」という用語は、図6に示された微生物I-2ポリペプチド (配列番号：3) と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。微生物I-2ポリペプチド (配列番号：3) は、細菌転写制御因子とのある程度の類似性を有する100アミノ酸のポリペプチドであり、最大の類似性はアミノ末端の30アミノ酸に存在する。I-2コーディング核酸 (配列番号：2) は、巨視的には疾患のない

10

20

30

40

50

粘膜と比較して、侵されたクローン病組織にディファレンシャルに存在する。1-2ポリペプチド又はその反応性断片は、例えば実施例IVに記載された組換え法を使用して調製される。

【0044】

配列番号：3と実質的に同一のアミノ酸配列を有する1-2ポリペプチドは、天然に存在する1-2ポリペプチド（配列番号：3）であってもよいし、この配列との実質的なアミノ酸配列類似性を有する関連ポリペプチドであってもよい。そのような関連ポリペプチドには、図6に示されたアミノ酸配列のイソタイプ異型又はホモログが含まれる。本明細書において使用されるように、1-2ポリペプチドという用語は、一般的に、50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の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、配列番号：3との約80%、90%、95%、97%、又は99%を超えるアミノ酸配列同一性（デフォルト・パラメーターを用いたBLOSUM 62マトリックスを使用して、CLUSTALWにより決定される）を有するポリペプチドでありうる。

10

【0045】

対象におけるIgA抗OmpC抗体の存在又は欠如を決定すること；対象におけるIgA ASCAの存在又は欠如を決定すること；及び対象におけるIgA抗1-2ポリペプチド抗体の存在又は欠如を決定することにより、対象におけるクローン病を診断する方法が、本発明によりさらに提供される。ここで、IgA抗OmpC抗体の存在、IgA ASCAの存在、又はIgA抗1-2ポリペプチド抗体の存在は、対象がクローン病を有していることをそれぞれ独立に示す。

20

【0046】

以前の研究によって、クローン病を有する患者の極一部にANCA反応性があることが示されたが、これらの抗体は潰瘍性大腸炎を有する患者においてはより高頻度に上昇している。報告されているCDにおける有病率は、0~43%であり、大部分の研究が、CD患者の10~30%がANCAを発現していると報告している（例えば、Saxonら、J.Allergy Clin.Immunol.86:202--210(1990)；Cambridgeら、Gut 33:668-674(1992)；Poolら、Gut 34:46-50(1993)；及びBrokroelofsら、Dia.Dis.Sci.39:545-549(1994)参照）。

【0047】

本発明の方法において、場合によっては、対象におけるpANCAの存在又は欠如が、例えば固定化好中球との反応性により決定されてもよい。本明細書において使用されるように、「核周囲抗好中球細胞質抗体」という用語は、「pANCA」と同義であり、好中球と特異的に反応して、核周囲が強調された、核周囲から核の染色又は細胞質の染色を与える抗体をさす。対象におけるpANCAの存在を決定するための方法は、本明細書の実施例Vに例示されている。

30

【0048】

本発明は、クローン病を有する患者に、有効な用量のOmpC抗原又はその寛容原性断片を投与することにより、クローン病を有する患者において寛容を誘導する方法をさらに提供する。寛容を誘導する方法において有用なOmpC抗原には、例えば配列番号：1の配列が含まれる。

【0049】

本明細書において使用されるように、「有効な用量」という用語は、クローン病を有する患者における寛容の誘導に有用な、OmpC抗原又はその寛容原性断片の量を意味する。経口寛容誘導の場合、例えば、比較的少ない経口用量が複数回投与されてもよいし、又は大用量が1回投与されてもよい。そのような用量は、例えば、動物モデルにおける寛容の誘導から外挿される（例えば、Trenthamら、Science 261:1727-1730(1993)参照）。

40

【0050】

様々な分子が寛容を誘導、促進、又は増強することが当分野において既知であり、OmpC抗原又はその寛容原性断片は、所望により、寛容化（tolerogizing）分子と組み合わせられる。例えば、米国特許第5,268,454号及びその中の引用物（各々、参照として本明細書に組み込まれる）を参照のこと。本明細書において使用されるように、「寛容化分子」という用語は、OmpC抗原又はその断片と組み合わせられた場合に、寛容原性活性を誘導、促

50

進、又は増強する、分子、化合物、又はポリマーを意味する。寛容化分子は、場合により、OmpC抗原と複合させられてもよく、例えばポリエチレングリコールであり得る。そのような分子は、当分野において周知である（例えば、米国特許第5,268,454号（前記）参照）。

【0051】

寛容を誘導するために有効な用量のOmpC抗原又はその断片は、当分野において周知の方法により投与されうる。経口寛容は、自己免疫疾患を治療する方法として、当分野においてよく認識されている（例えば、Weiner, *Hospital Practice*, 53-58頁（1995年9月15日）参照）。例えば、経口投与された自己抗原は、いくつかの実験的自己免疫モデルを、疾患特異的かつ抗原特異的に抑制する。その疾患には、実験的な自己免疫性の脳脊髄炎、ブドウ膜炎、及び筋無力症、コラーゲン及びアジュバントにより誘導された関節炎、並びにNODマウスにおける糖尿病が含まれる（例えば、Weinerら, *Ann. Rev. Immunol.* 12:809-837(1994)参照）。さらに、経口寛容の臨床試験は、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、及びブドウ膜炎の治療において陽性の結果を与えた。投与様式には、非経口投与及び皮下注射が含まれる（Johnson, *Ann. Neurology* 36(補遺):S115-S117(1994)）。

【0052】

OmpC抗原に関して使用されるように、「寛容原性断片」という用語は、単独で、又はもう一つの分子と組み合わされて免疫学的応答を減少させる能力により定義されるような寛容原性活性を有している抗原のペプチド部分又はポリペプチド部分を意味する。従って、OmpC抗原の寛容原性断片は、配列番号：1の一部と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、単独で、又はもう一つの分子と組み合わされて免疫学的応答を減少させる能力により定義されるような寛容原性活性を有しているペプチド又はポリペプチドである。OmpC抗原の寛容原性断片は、約3～約90個のアミノ酸を有しうる。OmpC抗原の寛容原性断片は、例えば、少なくとも5個、8個、10個、12個、15個、18個、20個、又は25個のアミノ酸を有しうる。例えば、OmpC抗原の寛容原性断片は、5～50個のアミノ酸、8～50個のアミノ酸、又は10～50個のアミノ酸を有しうる。より好ましくは、寛容原性断片は、8～20個のアミノ酸、又は10～20個のアミノ酸を有する。最も好ましくは、寛容原性断片は、12～20個のアミノ酸、又は15～20個のアミノ酸を有する。

【0053】

OmpC抗原の寛容原性断片は、T細胞増殖アッセイ法又はサイトカイン分泌アッセイ法のようなインビトロ・アッセイ法、及び炎症性腸疾患のマウス・モデルにおける寛容の誘導のようなインビボ・アッセイ法を含む多様なアッセイ法のうちの一つを使用して、同定されうる。例えば、T細胞増殖アッセイ法は、寛容原性活性を予測するものとして、当分野においてよく認識されている（例えば、Miyaharaら, *Immunol.* 86:110-115(1995)又はLundin et al, *J. Exp. Med.* 178:187-196(1993)参照）。T細胞増殖アッセイ法は、様々な濃度のアッセイされる断片と共に、マイクロタイター・ウェルにおいて、放射線を照射された正常脾細胞のような抗原提示細胞と共にT細胞を3日間培養すること；³H-チミジンを添加すること；及びDNAへの³H-チミジンの取り込みを測定することにより実施されうる。そのようなアッセイ法において、OmpC抗原の断片は、例えば20 µg/ml及び40 µg/mlの濃度で、活性に関して試験されうる。

【0054】

OmpC抗原の寛容原性断片は、当分野において既知のT細胞サイトカイン分泌アッセイ法を使用して同定されうる。例えば、Czerinskyら, *Immunol. Rev.* 119:5-22(1991)に記載されたようにして、様々な濃度の着目している断片と共に、マイクロタイター・ウェルにおいて、放射線を照射された抗原提示細胞と共にT細胞を培養し、3日後、IL-2、IL-4、又はIFN-γに関して培養上清をアッセイすることができる。

【0055】

T細胞増殖アッセイ法又はサイトカイン分泌アッセイ法において使用するための初代T細胞は、例えば、固有層又は末梢血より単離されうる。さらに、寛容原性活性のインビトロ・アッセイ法において使用するためのT細胞の便利な起源は、クローン病患者のようなIBD患

10

20

30

40

50

者、IBDのマウス・モデル、又は本発明のOmpC抗原で免疫感作された健康動物から樹立されたT細胞株でありうる。OmpC抗原の寛容原性断片の同定において使用するためのT細胞の好ましい起源は、クローン病患者である。

【0056】

T細胞株は、例えば、低濃度（約10 µg/ml）の増殖を支持するIL-2の存在下で、約1 µg/mlの組換えOmpC抗原又はOmpC融合タンパク質と共にTリンパ球を培養することにより、CD又はUCを有する患者から樹立されうる。T細胞株は、Nandaら、*J. Exp. Med.* 176:297-302(1992)に記載されたようにして、抗原提示細胞と共にTリンパ球を培養し、IL-2及びOmpC抗原、又はIL-2単独を4～5日周期で細胞に与えることにより樹立されうる。OmpC抗原の存在に依存して確実に増殖する細胞株へと発達する細胞株は、寛容原性断片の同定において特に有用である。小腸粘膜からのT細胞株の樹立は、例えば、Lundinら（前記）1993に記載されている。OmpC抗原の存在に依存し、OmpC抗原の寛容原性断片の同定において有用なT細胞株は、同様に調製されうる。

【0057】

前記のような増殖応答もしくはサイトカイン分泌応答の減少のようなT細胞応答の減少、又は抗原に対する抗体力価の減少であり得る免疫学的応答の減少によって示されるような、寛容をインビボで誘導する能力によっても、寛容原性断片は同定されうる。新生マウス又は成体マウスを、OmpC抗原の断片により寛容化し、免疫感作による抗原接種の後、T細胞応答又は抗OmpC抗体力価をアッセイすることができる。例えば、新生マウスを、生後48時間以内に、不完全フロイント・アジュバントで乳化されたOmpC抗原の断片約100 µgの腹腔内投与により寛容化し、次に約8週齢の時点でI-2ポリペプチドで免疫感作することができる（例えば、Miyahara（前記）1995参照）。成体マウスは、OmpC抗原の断片約0.33mgを3日間毎日静脈内投与（全用量1mg）することにより寛容化し、1週間後にOmpC抗原で免疫感作することができる。寛容原性活性を示す、増殖又はサイトカイン分泌の減少のようなT細胞応答の減少を、免疫感作の10日後に採取されたT細胞を使用して測定することができる。さらに、やはり寛容原性活性を示す、抗OmpC抗体力価の減少を、免疫感作の4～8週間後に採取された血液を使用してアッセイすることができる。T細胞応答又は抗OmpC抗原抗体力価をアッセイするための方法は、既に記載されており、当分野において周知である。

【0058】

OmpC抗原の寛容原性断片は、炎症性腸疾患のマウス・モデルを使用しても同定されうる。IBD様疾患を有する新生マウス又は成体マウスを、前記のようなOmpC抗原の断片で寛容化し、T細胞応答又は抗OmpC抗体力価をアッセイすることができる。T細胞応答の減少又は抗原に対する抗体力価の減少は、免疫学的応答の減少を示し、従ってOmpC抗原の寛容原性断片を同定するために役立つ。さらに、OmpC抗原の寛容原性断片は、IBDのマウス・モデルにおける大腸炎の頻度、発症時期、又は重度を減少させる能力によって同定されうる。

【0059】

いくつかのよく容認されている炎症性腸疾患のマウス・モデルは、OmpC抗原の寛容原性断片の同定において有用でありうる。例えば、G-タンパク質Gi2のアルファ・サブユニットをコードする遺伝子がターゲット破壊されているマウスは、ヒト腸疾患の特質を示す周知のモデルである（Hornquistら、*J. Immunol.* 158:1068-1077(1997)；Rudolphら、*Nat. Genet.* 10:143-150(1995)）。Kuhnら、*Cell* 75:263-274(1993)に記載されているようなIL-10欠損マウス、及びSadlackら、*Cell* 75:253-261(1993)に記載されているようなIL-2欠損マウスも、大腸炎様疾患を有し、OmpC抗原の寛容原性断片の同定において有用である。さらに、Mombaerts et al., *Cell* 75:275-282(1993)に記載されているような、T細胞受容体（TCR）α、TCR β、TCR β × δ、又はクラスII主要組織適合性複合体（MHC）の変異を有するマウスは、炎症性腸疾患を発症し、従ってOmpC抗原の寛容原性断片の同定において有用である。同様に、断片は、Powrieら、*Immunity* 1:553-562(1994)に記載されているような、炎症性腸疾患のよく容認されているモデルである、CD45RB CD4+T細胞で再構成されたSCIDマウスにおいて、寛容原性活性に関してアッセイされうる。さらなるIBDの動物モデルも、

当分野において周知である（例えば、Podolsky, Acta Gastroenterol. Belg. 60:163-165(1997)；及びBregenholtら, APMIS 105:655-662(1997)参照）。従って、OmpC抗原の寛容原性断片は、本明細書において開示されたインビトロもしくはインビボのアッセイ法、又は当分野において周知の他のアッセイ法によって容易に同定されうる。

【0060】

OmpC抗原の反応性断片又は寛容原性断片は、着目しているペプチド又はランダムなペプチドの大きな集合体又はライブラリーを、反応性又は寛容原性活性に関してスクリーニングすることにより同定されうる。例えば、OmpC抗原の配列全体をカバーするペプチドのパネルが、前記のような反応性又は寛容原性活性に関してスクリーニングされうる。そのようなパネルは、Geysenら, Science 235:1184(1987)に記載されているような、ミモトープ分解可能ピン技術（Mimotope cleavable pin technology）（Cambridge Research Biochemicals, Wilmington, DE）を使用した、3残基又は5残基ずつシフトしながら各々オーバーラップしているOmpC抗原の配列（配列番号：1）をカバーする15マー・ペプチドのパネルであり得る。次に、パネルは、前記のアッセイ法のうちの一つを使用して、反応性又は寛容原性活性に関してスクリーニングされる（例えば、Miyahara（前記）1995参照）。スクリーニングされるペプチドのライブラリーは、アミノ酸配列が配列番号：1と関係しているが、配列番号：1と異なるアミノ酸を1個以上有しているペプチドの集団であってもよい。

【0061】

スクリーニングされるさらなるペプチドには、例えば、ペプチド及びペプチド・ミメティック分子のタグ付加化学ライブラリーが含まれる。ペプチド・ライブラリーには、ファージ・ディスプレイ技術によって作製されたものも含まれる。ファージ・ディスプレイ技術には、ファージの表面上のペプチド分子の発現、並びにタンパク質リガンドが、それをコードする核酸に関連している、又は関連させられうる他の方法論が含まれる。ベクター及び発現されるペプチド集団の多様化法を含むファージ・ディスプレイ・ライブラリーの作製のための方法も、当分野において周知である（例えば、Smith and Scott, Methods Enzymol. 217:228-257(1993)；Scott and Smith, Science 249:386-390(1990)；並びにHuseのWO 91/07141及びWO91/07149参照）。これら又はその他の周知の方法は、例えば、開示されたアッセイ法のうちの一つによって、反応性又は寛容原性活性に関してスクリーニングされうるファージ・ディスプレイ・ライブラリーを作製するために使用されうる。所望により、ペプチドの集団は、活性に関してエン・マッセ（en masse）でアッセイされうる。例えば、OmpC抗原の反応性断片を同定するために、ペプチドの集団を、IgA抗OmpC抗原反応性を含有している患者の血清と複合体を形成する能力に関してアッセイし；活性を有する集団を分取し、集団から反応性断片を単離するためにそのアッセイを繰り返すことができる。

【0062】

OmpC抗原の反応性断片又は寛容原性断片は、例えば、化学的又はタンパク質分解的な分解により作製されたポリペプチドの断片をスクリーニングすることによっても同定されうる。化学的又はタンパク質分解的な分解、及び得られたタンパク質断片の精製のための方法は、当分野において周知である（例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 第182巻, 「タンパク質精製のガイド（Guide to Protein Purification）」, San Diego: Academic Press, Inc. (1990)参照）。例えば、臭化シアンのような化学物質、又はトリプシン、キモトリプシン、V8プロテアーゼ、エンドプロテイナーゼLys-C、エンドプロテイナーゼArg-C、もしくはエンドプロテイナーゼAsp-Nのようなプロテアーゼが、本明細書において開示されたアッセイ法のうちの一つを使用して、反応性又は寛容原性活性に関してスクリーニングされうる便利なOmpC抗原の断片を作製するために使用されうる。

【0063】

以下の実施例は、本発明を制限するのではなく、例示するためのものである。

【0064】

実施例I

OmpCの精製

10

20

30

40

50

この実施例は、スフェロプラスト溶解を使用したOmpCの精製を記載する。

【0065】

OmpF^{-/-}/OmpA^{-/-}-変異大腸菌を、グリセロール・ストックから100 µg/mlストレプトマイシンが補足されたルリア・ベルターニ・ブロス (Luria Bertani broth) (LB-Strep) へと接種し、対数増殖期までおよそ8時間37℃で活発に培養した。この開始培養物を使用して、LB-Strep培地1リットルへと接種し、1L培養物を15時間未満増殖させた。

【0066】

遠心分離 (JS-4.2、4K / 15分 / 4℃) により細胞を採取した。必要であれば、氷冷 (ice cold) 20mM トリス-Cl (pH7.5) で2回細胞を洗浄した。次に、細胞を氷冷スフェロプラスト形成緩衝液 (20mM トリス-Cl (pH7.5)、20% グリセロール、0.1M EDTA (pH8.0)、1mg/ml リゾチーム) に再懸濁させ、その後、再懸濁した細胞を、反転により時々混合しながら、氷上で20分~2時間インキュベートした。

【0067】

必要であれば、スフェロプラストを遠心分離 (JA-17、5.5K / 10分 / 4℃) し、より少量のスフェロプラスト形成緩衝液 (SFB) に再懸濁させた。場合により、溶解効率を改良するためにスフェロプラスト・ペレットを再懸濁の前に凍結させた。溶解の効率を有意に減少させる、スフェロプラストの破裂、及び染色体DNAの放出を回避するために、低張の緩衝液は避けた。

【0068】

スフェロプラスト調製物を、氷冷 10mM トリス-Cl (pH7.5)、1mg/ml DNase-I で14倍希釈し、激しくボルテックス処理した。試料を泡状化又は過熱することなく、調製物を、1秒のパルス「オンタイム (On time)」によりセッティング4で50% パワーで30秒間4回氷上で超音波処理した。

【0069】

細胞片を、遠心分離 (JA-17、5~10K / 10分 / 4℃) によりペレット化し、第2の遠心分離 (10K / 10分 / 4℃) によって上清を取り出し、清浄化した。ペレットを収集することなく上清を取り出し、超遠心分離機チューブへと置いた。チューブに、頂部から1.5ミリメートルまで20mM トリス-Cl (pH7.5) を充填した。

【0070】

膜調製物を、100,000g (Beckman SW 60 スイング・バケット・ローターにて35K / 1時間 / 4℃) での超遠心分離によってペレット化した。1mlの青色ピペット・チップを使用し、ペレットを分散させた後、直ちに1チューブ当たりおよそ10分間、上下にピペッティングし、20mM トリス-Cl (pH7.5) へホモジナイズすることにより、ペレットを再懸濁させた。

【0071】

4mlが充填された15ml スクリュー・キャップ・チューブで、材料を、37℃で、回転させながら、1% SDSを含む20mM トリス-Cl (pH7.5) の中で1時間抽出した。調製物を、超遠心分離チューブへと移し、膜を100,000g (Beckman SW 60にて35K / 1時間 / 4℃) でペレット化した。ペレットを、前記と同様にして20mM トリス-Cl (pH7.5) へとホモジナイズすることにより再懸濁させた。場合により、4℃で一夜膜調製物を放置した。

【0072】

OmpCを、20mM トリス-Cl (pH7.5)、3% SDS、及び0.5M NaClの中で37℃で回転させながら1時間抽出した (37℃未満に維持した場合、SDSは沈殿するであろう)。材料を超遠心分離チューブに移し、100,000gでの遠心分離 (Beckman SW 60にて35K / 1時間 / 30℃) によって膜をペレット化した。さらなる冷却は、抽出されたタンパク質の溶液からの塩析を引き起こすと考えられたため、低温は避けた。

【0073】

次いで、抽出されたOmpCを含有している上清を、10,000倍超の容量に対して透析し、高い塩含有量を排除した。SDSを、0.2% トリトンに対する界面活性剤交換によって除去した。トリトンは、50mM トリス-Clに対するさらなる透析によって除去した。

【0074】

三量体の形態でポリリンとして機能する精製されたOmpCは、SDS-PAGE分析により以下のように特徴決定された。室温での電気泳動によって、およそ100kDa、およそ70kDa、及びおよそ30kDaのラダーが生じた。65～70℃での10～15分間の加熱により、複合体は部分的に解離し、二量体及び単量体（およそ70kDa及びおよそ30kDaのバンド）のみが生じた。5分間の煮沸によって、38kDaの単量体が生じた。

【0075】

実施例II

抗IgA OmpC ELISAアッセイ法

この実施例は、患者の血清中のIgA抗OmpC抗体の直接検出のためのELISAアッセイ法を記載する。

10

【0076】

OmpC直接ELISAアッセイ法を、以下のように実施した。プレート（Immulon 3, DYNEX Technologies, Chantilly, VA）に、前記のようにして調製されたOmpCを0.25 µg/mlで含むホウ酸緩衝生理的食塩水（pH8.5）を、100 µl/ウェル、4℃で、一夜かけてコーティングした。0.05% Tween20を含むリン酸緩衝生理的食塩水（PBS）で3回洗浄した後、プレートを、0.5% ウシ血清アルブミンを含むPBS（pH7.4）（BSA-PBS）150 µl/ウェルで、室温（RT）で30分間ブロッキングした。次いで、ブロッキング溶液を廃棄し、100倍希釈したクローン病患者、潰瘍性大腸炎患者、及び正常対照からの血清を100 µl/ウェル添加し、室温で2時間インキュベートした。前記と同様にしてプレートを洗浄した後、アルカリホスファターゼ結合指示抗体（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PAのヤギ抗ヒトIgA（α鎖特異的））を、BSA-PBSで1000倍希釈したものをプレートに添加し、プレートを室温で2時間インキュベートした。次に、プレートを、0.05% Tween20を含むリン酸緩衝生理的食塩水で3回洗浄し、続いてトリス緩衝規定生理的食塩水（pH7.5）でさらに3回洗浄した。基質溶液（1.5mg/ml ニナトリウムP-ニトロフェノールリン酸（disodium P-nitrophenol phosphate）（Amresco ; Solon, OH）、2.5mM MgCl₂、0.01M トリス（pH8.6））を100 µl/ウェル添加し、1時間発色させた後、プレートを405nmで読み取った。

20

【0077】

IgA OmpC陽性反応性とは、被検試料と同時に分析された対照（標準）血清で得られた反応性の平均よりも標準偏差の2倍を超える分だけ大きい反応性と定義した。

【0078】

30

実施例III

IRA ASCA ELISAアッセイ法

この実施例は、患者の血清中のIgA抗サッカロマイセス・セレピシエ抗体の存在が、ELISAマイクロプレート・アッセイ法を使用して決定されうることを例証する。

【0079】

A. 酵母細胞壁マンナンの調製

酵母細胞壁マンナンを、以下のように、そしてFailleら *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11:438-446(1992) 及びKocourek and Ballouら *J. Bacteriol.* 100:1175-1181(1969) に記載されたようにして調製した。酵母サッカロマイセス・ウバルム（*Saccharomyces uvarum*）の凍結乾燥ペレットを、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（#38926）より得た。酵母を、Sambrookら *Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989) に従い調製された2X YT培地10mlで再生させた。S. ウバルムを、30℃で2～3日間増殖させた。終末S. ウバルム培養物を、2X YT寒天プレートに接種し、次に30℃で2～3日間増殖させた。単一コロニーを使用して500mlの2X YT培地に接種し、30℃で2～3日間増殖させた。蒸留水1リットル当たり20gのグルコース、2gのバクト・イースト・エキストラクト、0.25gのMgSO₄、及び2.0mlの28% H₃PO₄を添加することにより発酵培地（pH4.5）を調製した。500ml培養物を使用して50リットルの発酵培地に接種し、培養物を37℃で3～4日間発酵させた。

40

【0080】

各100グラムの細胞ペーストに50mlの0.02Mクエン酸緩衝液（クエン酸ナトリウム1L当たり

50

5.88g; pH7.0+/-0.1) を添加することにより、S.ウバルム・マンナン抽出物を調製した。細胞/クエン酸混合物を125 で90分間オートクレーブ処理し、冷却させた。5000rpmで10分間遠心分離した後、上清を取り出し保持した。次いで、細胞を75mlの0.02Mクエン酸緩衝液で洗浄し、再度細胞/クエン酸混合物を125 で90分間オートクレーブ処理した。細胞/クエン酸混合物を5000rpmで10分間遠心分離した後、上清を保持した。

【0081】

銅/マンナン複合体を沈殿させるため、等量のフェーリング溶液 (Fehling's Solution) を、攪拌しながら、合わせた上清に添加した。完全フェーリング溶液は、使用直前にフェーリング溶液Aをフェーリング溶液Bと1:1の比率で混合することにより調製した。銅複合体を沈降させ、静かに容器を傾けて沈殿物から液体を分離した。次いで、銅/マンナン沈殿複合体を、酵母ペースト100グラム当たり6~8mlの3N HClに溶解させた。

10

【0082】

得られた溶液を、激しく攪拌しながら、100mlの8:1メタノール:酢酸へと注入し、数時間かけて沈殿物を沈降させた。容器を傾けて上清を廃棄し、次いで上清が無色になるまで、およそ2~3回、洗浄過程を繰り返した。沈殿物を焼結ガラス漏斗上に収集し、メタノールで洗浄し、一夜空気乾燥させた。場合によっては、5000rpmで10分間の遠心分離により沈殿物を収集した後、メタノールで洗浄し、一夜空気乾燥させた。乾燥マンナン粉末1グラム当たりおよそ5mlの水を使用して、乾燥マンナン粉末を蒸留水に溶解させた。S.ウバルム細胞壁マンナンの最終濃度は、およそ30 µg/mlであった。

【0083】

20

B. S.ウバルム・マンナンELISAプレートの調製

以下のようにして、S.ウバルム細胞マンナンELISAプレートを、抗原で飽和化した。前記のようにして精製されたS.ウバルム・マンナンを、リン酸緩衝生理的食塩水/0.2%アジ化ナトリウム (PBS-N3) で100 µg/mlの濃度に希釈した。マルチ・チャンネル・ピペッターを使用して、100 µg/ml S.ウバルム・マンナンを、1ウェル当たり100 µl、コスター96穴ハイ・バインディング (hi-binding) プレート (カタログ番号3590; Costar Corp., Cambridge, MA) のウェルに添加した。最低12時間、4 で抗原をプレートにコーティングした。プレートの各ロットを、使用前に、先のロットと比較した。プレートを最大1ヶ月間2~8 で保存した。

【0084】

30

C. 患者の血清の分析

患者の血清を、抗IgG反応性又は抗IgA反応性について2連で分析を行った。非特異的抗体結合を阻害するため、前記のようにして抗原で飽和化されたマイクロタイター・プレートを、室温でリン酸緩衝生理的食塩水/0.05%Tween-20と共に45分間インキュベートした。次に、IgAに関しては、80倍に希釈した患者の血清を添加し、室温で1時間インキュベートした。ウェルをPBS/0.05%Tween-20で3回洗浄した。次いで、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgA (Jackson ImmunoResearch, Westgrove, PA) の1000倍希釈物を添加し、マイクロタイター・プレートを室温で1時間インキュベートした。p-ニトロフェノールリン酸を含むジエタノールアミン基質緩衝液の溶液を添加し、10分間発色を進行させた。自動EMAXプレート・リーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を使用して、405nmでの吸光度を分析した。

40

【0085】

確立されたクローン病の診断を有する患者からプールされた血清の標準結合を、結合に関する標準参照として使用し、100ELISA単位として設定した。被検患者の血清での結果を、参照CD血清の標準結合に対する割合 (%) として表した。ASCA陽性とは、参照CD活性の20%を超えるIgA ASCA反応性と定義した。

【0086】

実施例IV

IgA 1-2 ELISA

この実施例は、1-2ポリペプチドがELISA分析を使用して決定されうることを例証する。

50

【 0 0 8 7 】

A. GST-I-2融合タンパク質

全長I-2コーディング核酸配列（配列番号：3）をGST発現ベクターpGEXへとクローニングした。大腸菌における発現の後、タンパク質をGSTカラムで精製した。精製されたタンパク質は、銀染色により予想分子量を有することが示され、ウェスタン・ブロッティングでは抗GST反応性を有していた。

【 0 0 8 8 】

B. ELISA分析

I-2ポリペプチド（配列番号：3）と結合するヒトIgA抗体を、本質的には以下のような直接ELISAアッセイ法により検出した。プレート（Immulon 3; DYNEX Technologies; Chantilly, VA）に、100 μ l / ウェルのGST-I-2融合ポリペプチド（5 μ g/ml ホウ酸緩衝生理的食塩水（pH8.5）中）を4 で一晩コーティングした。0.05% Tween-20を含むリン酸緩衝生理的食塩水（PBS）で3回洗浄した後、プレートを、1ウェル当たり150 μ lの0.5% ウシ血清アルブミンを含むPBS（pH7.4）（BSA-PBS）で、室温で30分間ブロッキングした。次いで、ブロッキング溶液を、1ウェル当たり100 μ lの、100倍希釈したクローン病又は正常対照の血清と交換した。次いで、プレートを室温で2時間インキュベートし、前記と同様にして洗浄した。アルカリホスファターゼ結合二次抗体 [ヤギ抗ヒトIgA（ α 鎖特異的）、Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA] を、BSA-PBSで1000倍希釈したものをIgAプレートに添加した。プレートを室温で2時間インキュベートした後、0.05% Tween-20 / PBSで3回洗浄し、続いてトリス緩衝規定生理的食塩水（pH7.5）でさらに3回洗浄した。基質溶液（1.5mg/ml ニナトリウムP-ニトロフェノールリン酸（Aresco; Solon, OH）を含む2.5mM $MgCl_2$ 、0.01M トリス（pH8.6））を1ウェル当たり100 μ l添加し、1時間発色させた。次いで、405nmでプレートを分析した。

【 0 0 8 9 】

IgA I-2陽性反応性とは、被検試料と同時に分析された対照（標準）血清で得られた反応性の平均よりも標準偏差の2倍を超える分だけ大きい反応性と定義した。

【 0 0 9 0 】

実施例V

pANCA状態を決定するためのELISA及び間接免疫蛍光

この実施例は、対象のpANCA状態を決定するための方法を記載する。

【 0 0 9 1 】

A. ANCAの存在を固定化好中球ELISAにより決定した

Saxonら, *J. Allergy Clin. Immunol.* 86:202-210(1990)に記載されたようにして、ANCAを検出するために、固定化好中球酵素結合免疫吸着アッセイ法を使用し、全ての試料を盲検的に分析した。マイクロタイター・プレートに、1ウェル当たり 2.5×10^5 個の好中球をコーティングし、細胞を固定化するため100%メタノールで処理した。非特異的抗体結合をブロッキングするため、細胞を0.25% ウシ血清アルブミン（BSA）を含むリン酸緩衝生理的食塩水と共にインキュベートした。次に、対照血清及び暗号化された血清を100倍希釈したものをウシ血清 / リン酸緩衝生理的食塩水ブロッキング緩衝液へと添加した。アルカリホスファターゼ結合ヤギF(ab')₂抗ヒト免疫グロブリンG（ γ 鎖特異的）抗体（Jackson ImmunoResearch Labs, Inc., West Grove, PA）を、1000倍希釈したものを、好中球結合抗体を標識するために添加した。p-ニトロフェノールリン酸基質溶液を添加し、陽性対照ウェル内の405nmにおける吸光度が、ブランク・ウェル内の吸光度よりも0.8~1.0光学濃度単位だけ大きくなるまで、発色を進行させた。

【 0 0 9 2 】

B. ANCA染色パターンの決定のための間接免疫蛍光アッセイ法

ELISAによりANCA陽性であった試料に対し、優勢な染色パターンが核周囲性（pANCA）であるのか又は細胞質性（cANCA）であるのかを決定するため、間接免疫蛍光染色を実施した。スライド1枚当たりおよそ100,000個の好中球を含有するガラス・スライドを、細胞遠心分離（cytocentrifugation）（Shandon Cytospin, Cheshire, England）により調製し、そ

れらを100%メタノールで固定化し、空気乾燥させ、-20℃で保存した。固定化された好中球を、希釈(20倍)したヒト血清と共にインキュベートし、Saxonら(前記)1990に記載のようにして、フルオレセイン標識F(ab')₂γ鎖特異的抗体を用いて反応を可視化した。エピフルオレセンス(epifluorescence)を装備したオリンパスBH-2顕微鏡(Olympus, Lake Success, NY)を使用してスライドを検査した。

【0093】

pANCA陽性とは、被検試料と同時に分析された対照(標準)血清で得られた反応性の平均よりも標準偏差の2倍を超える分だけ大きいELISA反応性と組み合わされた核周囲染色パターンと定義した。

【0094】

10

括弧内又はそれ以外の前掲の雑誌論文、参照、及び特許引用物は、全て、既に言及又は注記されたものも、参照として本明細書に組込まれる。

【0095】

前記の実施例を参照しつつ本発明を説明したが、本発明の本旨から逸脱することなく、様々な修飾を施しうることを理解されたい。従って、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ制限される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 クローン病を有する患者からの血清のIgA OmpC反応性及びIgA I-2反応性を示す図である。

【図2】 クローン病を有する患者からの血清のIgA OmpC反応性及びIgA ASCA反応性を示す図である。

20

【図3】 クローン病を有する患者からの血清のIgA OmpC反応性及びIgG OmpC反応性を示す図である。

【図4】 正常個体からの血清のIgA OmpC反応性及びIgG OmpC反応性を示す図である。

【図5】 大腸菌OmpCアミノ酸配列(配列番号:1)を示す図である。

【図6】 I-2ヌクレオチド配列(配列番号:2)及び推定アミノ酸配列(配列番号:3)を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Cedars-Sinai Medical Center
The Regents of the University of California

<120> Diagnosis, Prevention and Treatment of
Crohn's Disease Using The OmpC Antigen

<130> FP-PM 4713

<150> US 09/575,061

<151> 2000-05-19

<160> 3

10

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 367

<212> PRT

<213> E. Coli

<400> 1

```

Met Lys Ser Lys Val Leu Ala Leu Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala
 1              5              10              15
Gly Ala Ala His Ala Ala Glu Val Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys Leu
      20              25              30
Asp Leu Tyr Gly Lys Val Asp Gly Leu His Tyr Phe Ser Asp Asn Lys
      35              40              45
Asp Val Asp Gly Asp Gln Thr Tyr Met Arg Leu Gly Phe Lys Gly Glu
      50              55              60
Thr Gln Val Thr Asp Gln Leu Thr Gly Tyr Gly Gln Trp Glu Tyr Gln
      65              70              75              80
Ile Gln Gly Asn Ser Ala Glu Asn Glu Asn Asn Ser Trp Thr Arg Val
      85              90              95
Ala Phe Ala Gly Leu Lys Phe Gln Asp Val Gly Ser Phe Asp Tyr Gly
      100             105             110
Arg Asn Tyr Gly Val Val Tyr Asp Val Thr Ser Trp Thr Asp Val Leu
      115             120             125
Pro Glu Phe Gly Gly Asp Thr Tyr Gly Ser Asp Asn Phe Met Gln Gln
      130             135             140
Arg Gly Asn Phe Gly Ala Thr Tyr Arg Asn Thr Asp Phe Phe Gly Leu
      145             150             155             160
Val Asp Gly Leu Asn Phe Ala Val Gln Tyr Gln Gly Lys Asn Gly Asn
      165             170             175
Pro Ser Gly Glu Gly Phe Thr Ser Gly Val Thr Asn Asn Gly Arg Asp
      180             185             190
Ala Leu Arg Gln Asn Gly Asp Gly Val Gly Gly Ser Ile Thr Tyr Asp
      195             200             205
Tyr Glu Gly Phe Gly Ile Gly Gly Ala Ile Ser Ser Ser Lys Arg Thr
      210             215             220
Asp Ala Gln Asn Thr Ala Ala Tyr Ile Gly Asn Gly Asp Arg Ala Glu
      225             230             235             240

```

20

30

10

20

30

Tyr Glu Gln Ile
100

<210> 3

<211> 100

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

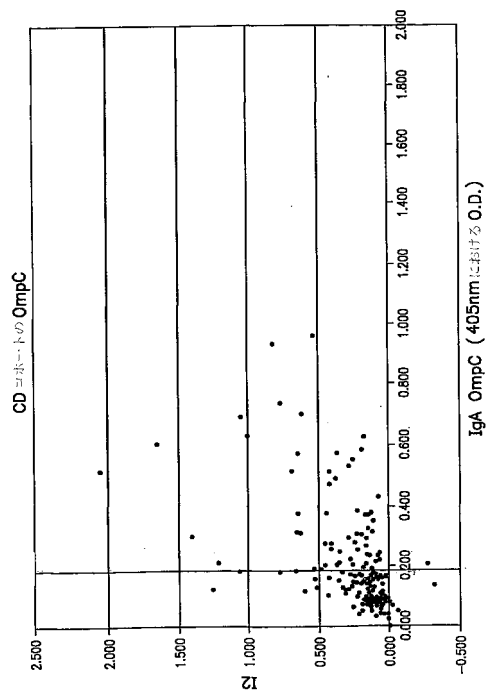
<223> Microbial organism from the human gut

<400> 3

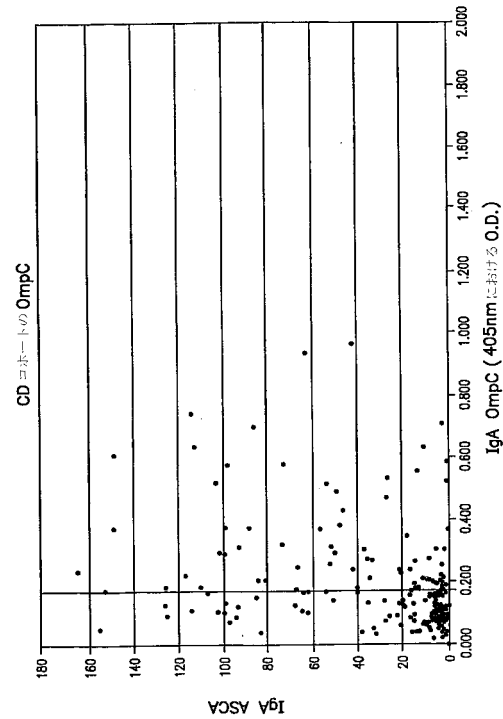
Asp Leu Ala Ser Ala Val Gly Ile Gln Ser Gly Ser Ile Phe His His
1 5 10 15
Phe Lys Ser Lys Asp Glu Ile Leu Arg Ala Val Met Glu Glu Thr Ile
20 25 30
His Tyr Asn Thr Ala Met Met Arg Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ser Thr
35 40 45
Val Arg Glu Arg Val Leu Ala Leu Ile Arg Cys Glu Leu Gln Ser Ile
50 55 60
Met Gly Gly Ser Gly Glu Ala Met Ala Val Leu Val Tyr Glu Trp Arg
65 70 75 80
Ser Leu Ser Ala Glu Gly Gln Ala His Val Leu Ala Leu Arg Asp Val
85 90 95
Tyr Glu Gln Ile
100

10

【図1】



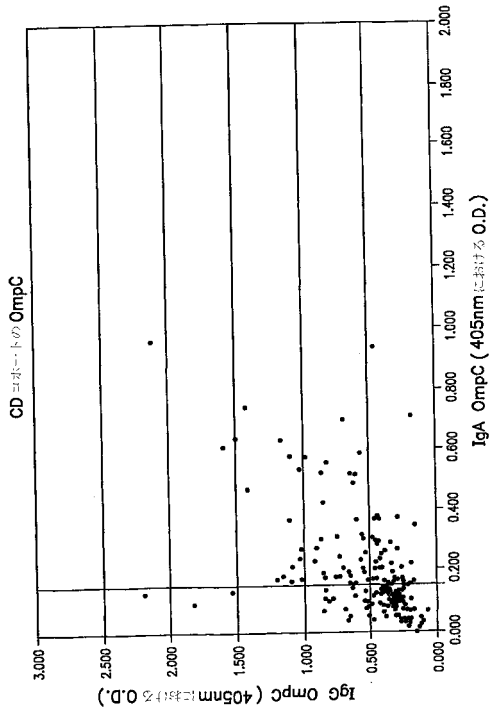
【図2】



大腸菌の387アミノ酸の外膜タンパク質C前駆体：

1 mkskvialli pallaaqaah aaevyrkdgñ kldlygkvda lhyfsdnkv dddqymrlg
61 fkgccvtdq llyggyweyd lgnasenen nswtrvafag lkfgdvgsd yzynygvryd
121 vswccvipe fggotygsdn fmgqrniga tyrnidifgi vqgnfavq gqngnpgae
181 gftgvtmg rdaalrqndg yggilydye gfgigals skrdagnta ayigndgae
241 tytgikyda mnyiaacyt qynatrvgs lgvankagñi eavaygñf gfrpelayiq
301 skgnlgr-gy ddeilikyvd vgaityfnkn mstyvayxin lldngftid aglnedniya
361 lglivyqf

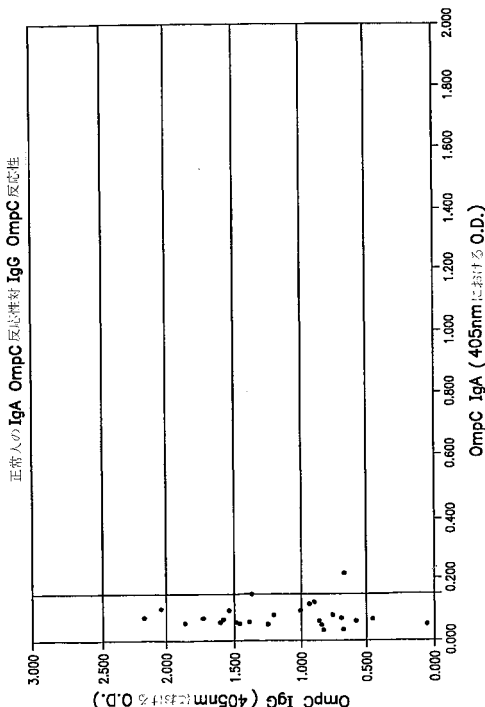
【図 3】



【図 6】

A GAT CTG GCC AGC GCC CTG GGC ATC CAG TCC GGC AGC ATC TTCT CAT CAC TTC AAG AGC AAG
▶ D L A S A V G I O S G S I F H F K
GAT GAG ATA TTG CGT GCC CTG ATG GAG GAA ACC ATC CNT TAC AAC ACC GCG ATG ATG CCG K
▶ D E I L R A V M E E T I H M N A H R
GCT TCA CTG GAG GCG AGC ACG GTG CCG GAA CCG GTG CTG CCG CTG ATC CAC TTC GAG
▶ A S L E A S T V R E R V L A L I R C E
TTG CAG TCG ATC ATG GGC GGC AGT GGC GAG GCC ATG CCG GTG CTG GTC TAC GAA TGG CCG
▶ L Q S I M G S G E A M A V L V Y E W R
TCG CTG TCG GCC GAA GGC CAG CCG CAC GTG CCG GTG CCG GTG TAT GAG CAG ATC T
▶ S L S A E G Q A H V L A L R D V Y E Q I

【図 4】



フロントページの続き

(73)特許権者 592130699

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
The Regents of The University of California
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94607, オークランド, フランクリン ストリート 11
11, 5 ティーエイチ フロア

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(72)発明者 ターガン ステファン アール.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンタ モニカ 22nd ストリート 240

(72)発明者 ブラウン ジョナサン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ターザナ ヒルトン ヘッド ウェイ 3924

(72)発明者 サットン クリストファー エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 エンシニータ エオラス アベニュー 1625

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 米国特許第06033864 (US, A)

米国特許第05691151 (US, A)

INFECTION AND IMMUNITY, 2000年 3月, Vol.68, No.3, p.1542-1548

CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, 1996年 3月, Vol.3, No.2, p.219-226

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 1983年, Vol.258, No.11, p.6932-6940

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

G01N 33/53-33/579

A61K 39/108

A61P 1/04

C12N 15/09

专利名称(译)	使用OmpC抗原诊断，预防和治疗克罗恩病		
公开(公告)号	JP4917728B2	公开(公告)日	2012-04-18
申请号	JP2001585609	申请日	2001-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	雪松-西奈医学中心 加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	雪松 - 西奈医疗中心 该Rejentsu大学加州		
当前申请(专利权)人(译)	雪松 - 西奈医疗中心 加州大学董事会		
[标]发明人	ターガンステファンアール ブラウンジョナサン サットンクリストファーエル		
发明人	ターガン ステファン アール. ブラウン ジョナサン サットン クリストファー エル.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/108 A61P1/04 G01N33/569 C12N15/09 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	A61P1/04 G01N33/56972 G01N33/6854 G01N2333/195 G01N2333/245 G01N2333/395 G01N2469/20 Y10S435/849 Y10S435/965 Y10S435/973 Y10S436/811		
FI分类号	G01N33/53.ZNAN A61K39/108 A61P1/04 G01N33/569.A C12N15/00.A		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	09/575061 2000-05-19 US		
其他公开文献	JP2004526122A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了通过确定受试者中IgA抗OmpC抗体的存在或不存在来诊断受试者中克罗恩病的方法。此处，IgA抗OmpC抗体的存在表明受试者患有克罗恩病。

【 図 2 】

