

(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2004-526122

(P2004-526122A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53

A 6 1 K 39/108

A 6 1 P 1/04

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/569

F I

GO 1 N 33/53

A 6 1 K 39/108

A 6 1 P 1/04

GO 1 N 33/543 5 4 5 A

GO 1 N 33/569 A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁に続く

テーマコード (参考)

4 B 0 2 4

4 C 0 8 5

(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)

(85) 翻訳文提出日 平成14年11月19日 (2002.11.19)

(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)

(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)

(71) 出願人 391049541

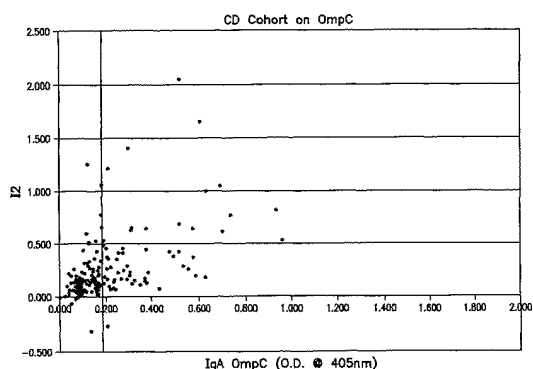
シーダーズ-サイナイ・メディカル・セン
ターCEDARS-SINAI MEDICA
L CENTERアメリカ合衆国90048カリフォルニア
州ロサンゼルス、ビバリー・ブルバ
ード8700番

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) 【要約】

本発明は、対象における I g A 抗 Omp C 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、I g A 抗 Omp C 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。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は欠如を決定することを含む、対象におけるクローン病を診断する方法であって、該 I g A 抗 O m p C 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) O m p C 抗原又はその反応性断片と O m p C 抗原に対する I g A 抗体との複合体の形成に適した条件の下で、試料を O m p C 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 I g A 抗体と接触させる工程 ; 及び
 (d) I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は欠如を検出する工程を含む、対象におけるクローン病を診断する方法であって、該 I g A 抗 O m p C 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。

10

【請求項 3】

O m p C 抗原が、実質的に配列番号 : 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 の方法。

【請求項 4】

I g A 抗 O m p C 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 I g A 抗 サッカロマイセス・セレビスエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) 抗体 (A S C A) 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 I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は I g A A S C A 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 6】

I g A A S C A 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 (P P M) 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 P P M が、A T C C # 3 8 9 2 6 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 I g A 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 I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は I g A 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。

30

【請求項 9】

I g A 抗 I - 2 ポリペプチド抗体の存在が、実質的に配列番号 : 3 のアミノ酸配列を有する I - 2 ポリペプチドとの I g A 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 I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は欠如を決定する工程 ;
 (b) 対象における I g A A S C A の存在又は欠如を決定する工程 ; 及び
 (c) 対象における I g A 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、対象におけるクローン病を診断する方法であって、I g A 抗 O m p C 抗体の存在、I g A A S C A の存在、又は I g A 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。

40

【請求項 11】

対象における核周囲抗好中球抗体 (p A N C A) 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】

クローン病を有する患者に、有効な用量な O m p C 抗原又はその寛容原性断片を投与することを含む、クローン病を有する患者において寛容を誘導する方法。

【請求項 13】

50

OmpC 抗原が、実質的に配列番号：1 のアミノ酸配列を含む、請求項 12 の方法。

【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 USPHS グラント 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。 10

【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、又は疾患と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

【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、クローン病と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。 40

【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。

【0007】

発明の概要

本発明は、I g A 抗外膜タンパク質 C (O m p C) 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、I g A 抗 O m p C 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；O m p C 抗原又はその反応性断片と O m p C 抗原に対する I g A 抗体との複合体の形成に適した条件の下で、試料を O m p C 抗原又はその反応性断片と接触させること；及び I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は欠如を検出することにより実施される。ここで、対象における I g A 抗 O m p C 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 O m p C 抗原を使用して実施される。もう一つの態様において、I g A 抗 O m p C 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

【0008】

本発明は、対象における I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は欠如、及び対象における I g A 抗サッカロマイセス・セレビスエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) 抗体 (A S C A) 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 I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は I g A A S C A 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。I g A A S C A の存在は、例えば、例えば A T C C # 3 8 9 2 6 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 (p h o s p h o p e p t i d o m a n n a n) (P P M) との反応性により決定されうる。

20

【0009】

本発明は、さらに、対象における I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は欠如、及び対象における I g A 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 I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は I g A 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、I g A 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 I g A 反応性によって決定される。

【0010】

対象における I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は欠如を決定すること；対象における I g A A S C A の存在又は欠如を決定すること；及び対象における I g A 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、I g A 抗 O m p C 抗体の存在、I g A A S C A の存在、又は I g A 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 (p A N C A) の存在又は欠如を決定する工程をさらに含む。

30

【0011】

本発明は、クローン病を有する患者に、有効な用量の O m p C 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 O m p C 抗原は、例えば、実質的に配列番号：1 のアミノ酸配列を有しうる。

40

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、外膜タンパク質 C (O m p C) に対する I g A 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 4 0 5 を越える I g A O m p C 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 I g G O m p C 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 I g A O m p C 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 I g A I - 2 反応性及び I g A A S C A 反応性 (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、I g A A

50

S C A 反応性、p A N C A 反応性、及び I - 2 ポリペプチド反応性と組み合わせられた I g A O m p C 反応性が、クローン病を有する患者の 8 6 % 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、I g A O m p C 反応性は、単独で、クローン病を有する患者の 5 5 % を検出した。これらの結果は、I g A O m p C 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。

【 0 0 1 3 】

【表 1】

CD コホート						
	計	ASCA パネル+	IgA OmpC+	pANCA	I2	追加された 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%

10

20

【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%

【 0 0 1 4 】

上記に基づき、本発明は、対象における I g A 抗 O m p C 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、I g A 抗 O m p C 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；O m p C 抗原又はその反応性断片と O m p C 抗原に対する I g A 抗体との複合体の形成に適した条件の下で、試料を O m p C 抗原又はその反応性断片と接触させること；複合体を抗 I g A 抗体と接触させること；及び I g A 抗 O m p C 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 I g A 抗 O m p C 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 O m p C 抗原を使用して実施される。もう一つの態様において、I g A 抗 O m p C 抗体は、酵素結合免疫吸着アッセイ法により検出される。

30

40

【 0 0 1 5 】

本発明の方法において有用な外膜タンパク質 C (「O m p C」) は、「ポリリン」である。ポリリンとは、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 (L o d i s h ら, M o l e c u l a r C e l l B i o l o g y, チャプター 1 4 (1 9 9 5))。

【 0 0 1 6 】

O m p C は、大腸菌のような細菌の外膜に見い出される主要ポリリン・タンパク質のうちの

50

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閥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))。

10

【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)。

20

30

【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。

40

【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。

50

【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、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。

【0024】

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))。

10

【0025】

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)。

20

【0026】

【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	10
「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			20
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	

【0027】

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。

10

【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。

20

30

【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。

40

【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

50

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・セレピシエ抗体(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・セレピシエに対するIgA反応性を意味する。

10

【0036】

抗サッカロマイセス・セレピシエ抗体(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・セレピ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)。

20

【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・セレピ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・セレピ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・セレピシエ株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。

30

40

【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・セレピシエ株ATCC#38926に

50

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) ; Poullainら, Eur. J. Clin. Microbiol., 23: 46 - 52 (1993) ; Shibatara, 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理解する。

10

【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。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PMM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ものである。

20

【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。

30

【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。I-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う。

40

【0044】

配列番号：3と実質的に同一のアミノ酸配列を有するI-2ポリペプチドは、天然に存在

50

する I - 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、I - 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を記載し、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 B L O S U M 6 2 マトリックスを使用して、C L U S T A L W により決定される) を有するポリペプチドでありうる。

【 0 0 4 5 】

対象における I g A 抗 O m p C 抗体の存在又は欠如を決定すること ; 対象における I g A A S C A の存在又は欠如を決定すること ; 及び対象における I g A 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、I g A 抗 O m p C 抗体の存在、I g A A S C A の存在、又は I g A 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。

【 0 0 4 6 】

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 A N C A 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 C D における有病率は、0 ~ 43 % であり、大部分の研究が、C D 患者の 10 ~ 30 % が A N C A を発現していると報告している (例えば、S a x o n ら , J . A l l e r g y C l i n . I m m u n o l . 86 : 202 - - 210 (1990) ; C a m b r i d g e ら , G u t 33 : 668 - 674 (1992) ; P o o l ら , G u t 3446 - 50 (1993) ; 及び B r o k r o e l o f s ら , D i a . D i s . S c i . 39 : 545 - 549 (1994) 参照) 。

【 0 0 4 7 】

本発明の方法において、場合によっては、対象における p A N C A 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、「p A N C A」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 p A N C A 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。

【 0 0 4 8 】

本発明は、クローン病を有する患者に、有効な用量の O m p C 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 O m p C 抗原には、例えば配列番号 : 1 の配列が含まれうる。

【 0 0 4 9 】

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、O m p C 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うる (例えば、T r e n t h a m ら , S c i e n c e 261 : 1727 - 1730 (1993) 参照) 。

【 0 0 5 0 】

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、O m p C 抗原又はその寛容原性断片は、所望により、寛容化 (t o l e r o g i z i n g) 分子と組み合わせられうる。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、O m p C 抗原又はその断片と組み合わせられた場

10

20

30

40

50

合に、寛容原性活性を誘導、促進、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））。

10

【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せら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せら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。

20

30

【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。

40

【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

50

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、Nandra, 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法することができる。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IL-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0.33 mgを3日間毎日静脈内投与（全用量1 mg）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

10

20

30

40

50

記載されているような I L - 1 0 欠損マウス、及び S a d l a c k ら, C e l l 7 5 : 2 5 3 - 2 6 1 (1 9 9 3) に記載されているような I L - 2 欠損マウスも、大腸炎様疾患を有し、O m p C 抗原の寛容原性断片の同定において有用である。さらに、M o m b a e r t s e t a l . , C e l l 7 5 : 2 7 5 - 2 8 2 (1 9 9 3) に記載されているような、T 細胞受容体 (T C R) α 、T C R β 、T C R $\beta \times \delta$ 、又はクラス I I 主要組織適合性複合体 (M H C) の変異を有するマウスは、炎症性腸疾患を発症し、従って O m p C 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、P o w r i e ら, I m m u n i t y 1 : 5 5 3 - 5 6 2 (1 9 9 4) 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、C D 4 5 R B C D 4 + T 細胞で再構成された S C I D 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 I B D の動物モデルも、当分野において周知である (例えば、P o d o l s k y , A c t a G a s t r o e n t e r o l . B e l g . 6 0 : 1 6 3 - 1 6 5 (1 9 9 7) ; 及び B r e g e n h o l t ら, A P M I S 1 0 5 : 6 5 5 - 6 6 2 (1 9 9 7) 参照)。従って、O m p C 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。

10

【0060】

O m p C 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、O m p C 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、G e y s e n ら, S c i e n c e 2 3 5 : 1 1 8 4 (1 9 8 7) に記載されているような、ミモトープ分解可能ピン技術 (M i m o t o p e c l e a v a b l e p i n t e c h n o l o g y) (C a m b r i d g e R e s e a r c h B i o c h e m i c a l s , W i l m i n g t o n , D E) 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 O m p C 抗原の配列 (配列番号 : 1) をカバーする 1 5 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、M i y a h a r a (前記) 1 9 9 5 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。

20

30

【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、S m i t h a n d S c o t t , M e t h o d s E n z y m o l . 2 1 7 : 2 2 8 - 2 5 7 (1 9 9 3) ; S c o t t a n d S m i t h , S c i e n c e 2 4 9 : 3 8 6 - 3 9 0 (1 9 9 0) ; 並びに H u s e の W O 9 1 / 0 7 1 4 1 及び W O 9 1 / 0 7 1 4 9 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 (e n m a s s e) でアッセイされうる。例えば、O m p C 抗原の反応性断片を同定するために、ペプチドの集団を、I g A 抗 O m p C 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。

40

【0062】

O m p C 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

50

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。

10

【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

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、1 L 培養物を15時間未満増殖させた。

20

【0066】

遠心分離 (JS-4, 2, 4 K / 15分 / 4) により細胞を採取した。必要であれば、氷冷 (ice cold) 20 mM トリス - Cl (pH 7.5) 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 (20 mM トリス - Cl (pH 7.5)、20% グリセロール、0.1 M EDTA (pH 8.0)、1 mg / 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。

30

【0067】

必要であれば、スフェロプラストを遠心分離 (JA-17, 5.5 K / 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10 mM トリス - Cl (pH 7.5)、1 mg / 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。

40

【0069】

細胞片を、遠心分離 (JA-17, 5~10 K / 10分 / 4) によりペレット化し、第2の遠心分離 (10 K / 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20 mM トリス - Cl (pH 7.5) を充填した。

【0070】

膜調製物を、100,000 g (Beckman SW 60 スイング・バケット・ローターにて35 K / 1時間 / 4) での超遠心分離によってペレット化した。1 ml 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

50

分間、上下にピペティングし、20 mM トリス - Cl (pH 7.5) 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】

4 ml が充填された 15 ml 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 20 mM トリス - Cl (pH 7.5) 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 100,000 g (Beckman SW 60 にて 35 K / 1 時間 / 4) でペレット化した。ペレットを、前記と同様に 20 mM トリス - Cl (pH 7.5) 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】

Omp C を、20 mM トリス - Cl (pH 7.5)、3% SDS、及び 0.5 M 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、100,000 g での遠心分離 (Beckman SW 60 にて 35 K / 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。

10

【0073】

次いで、抽出された Omp C 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、50 mM トリス - Cl に対するさらなる透析によって除去した。

20

【0074】

三量体の形態でポリンとして機能する精製された Omp C 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 100 kDa、およそ 70 kDa、及びおよそ 30 kDa 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 70 kDa 及びおよそ 30 kDa のバンド) のみが生じた。5 分間の煮沸によって、38 kDa の単量体が生じた。

【0075】

実施例 II

30

抗 Ig A Omp C E L I S A アッセイ法

この実施例は、患者の血清中の Ig A 抗 Omp C 抗体の直接検出のための E L I S A アッセイ法を記載する。

【0076】

Omp C 直接 E L I S A 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 Omp C を 0.25 µg / ml で含むホウ酸緩衝生理的食塩水 (pH 8.5) を、100 µl / ウェル、4 で、一夜かけてコーティングした。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、0.5% ウシ血清アルブミンを含む PBS (pH 7.4) (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 Ig A (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% Tween 20 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 (pH 7.5) でさらに 3 回洗浄した。基質溶液 (1.5 mg / ml ニナトリウム P - ニトロフェノールリン酸 (disodium P - nitrophenol phosphate) (Amresc

40

50

o ; S o l o n , O H) 、 2 . 5 m M M g C l ₂ 、 0 . 0 1 M トリス (p H 8 . 6)) を 1 0 0 μ l / ウェル添加し、1 時間発色させた後、プレート を 4 0 5 n m で読み取った。

【 0 0 7 7 】

I g A O m p C 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 7 8 】

実施例 I I I

I R A A S C A E L I S A アッセイ法

この実施例は、患者の血清中の I g A 抗サッカロマイセス・セレピシエ抗体の存在が、E L I S A 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。 10

【 0 0 7 9 】

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 F a i l l e r E u r . J . C l i n . M i c r o b i o l . I n f e c t . D i s . 1 1 : 4 3 8 - 4 4 6 (1 9 9 2) 及び K o c o u r e k a n d B a l l o u r , J . B a c t e r i o l 1 0 0 : 1 1 7 5 - 1 1 8 1 (1 9 6 9) 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 (S a c c h a r o m y c e s u v a r u m) 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 (# 3 8 9 2 6) より得た。酵母を、S a m b r o o k r a , M o l e c u l a r C l o n i n g C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s (1 9 8 9) に従い調製された 2 X Y T 培地 1 0 m l で再生させた。S . ウバルムを、3 0 で 2 ~ 3 日間増殖させた。終末 S . ウバルム培養物を、2 X Y T 寒天プレートに接種し、次に 3 0 で 2 ~ 3 日間増殖させた。単一コロニーを使用して 5 0 0 m l の 2 X Y T 培地に接種し、3 0 で 2 ~ 3 日間増殖させた。蒸留水 1 リットル当たり 2 0 g のグルコース、2 g のバクト・イースト・エキストラクト、0 . 2 5 g の M g S O ₄ 、及び 2 . 0 m l の 2 8 % H ₃ P O ₄ を添加することにより発酵培地 (p H 4 . 5) を調製した。5 0 0 m l 培養物を使用して 5 0 リットルの発酵培地に接種し、培養物を 3 7 で 3 ~ 4 日間発酵させた。 20

【 0 0 8 0 】

各 1 0 0 グラムの細胞ペーストに 5 0 m l の 0 . 0 2 M クエン酸緩衝液 (クエン酸ナトリウム 1 L 当たり 5 . 8 8 g ; p H 7 . 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 1 2 5 で 9 0 分間オートクレーブ処理し、冷却させた。5 0 0 0 r p m で 1 0 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 7 5 m l の 0 . 0 2 M クエン酸緩衝液で洗浄し、再度細胞 / クエン酸混合物を 1 2 5 で 9 0 分間オートクレーブ処理した。細胞 / クエン酸混合物を 5 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離した後、上清を保持した。 30

【 0 0 8 1 】

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 (F e h l i n g ' s S o l u t i o n) 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 1 0 0 グラム当たり 6 ~ 8 m l の 3 N H C l に溶解させた。 40

【 0 0 8 2 】

得られた溶液を、激しく攪拌しながら、1 0 0 m l 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、5 0 0 0 r p m で 1 0 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 5 m l の水を使用して、乾燥マンナン粉末を蒸留水に 50

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

【0083】

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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

10

【0084】

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、405 nmでの吸光度を分析した。

20

【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、100 ELISA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。

30

【0086】

実施例IV

IgA I-2 ELISA

この実施例は、I-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。

【0087】

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。

40

【0088】

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 μl /ウェルのGST-I-2融合ポリペプチド(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ホウ酸緩衝生理的食塩水(pH 8.5)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 μl の0.1

50

5 % ウシ血清アルブミンを含む P B S (p H 7 . 4) (B S A - P B S) で、室温で 3 0 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 1 0 0 μ l の、1 0 0 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 I g A (α 鎖特異的)、J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , W e s t G r o v e , P A] を、B S A - P B S で 1 0 0 0 倍希釈したものを I g A 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 . 0 5 % T w e e n - 2 0 / P B S で 3 回洗浄し、続いてトリス緩衝規定生理的食塩水 (p H 7 . 5) でさらに 3 回洗浄した。基質溶液 (1 . 5 m g / m l ニナトリウム P - ニトロフェノールリン酸 (A r e s c o ; S o l o n , O H) を含む 2 . 5 m M M g C l ₂、0 . 0 1 M トリス (p H 8 . 6)) を 1 ウェル当たり 1 0 0 μ l 添加し、1 時間発色させた。次いで、4 0 5 n m でプレートを分析した。

10

【 0 0 8 9 】

I g A 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

p A N C A 状態を決定するための E L I S A 及び間接免疫蛍光

この実施例は、対象の p A N C A 状態を決定するための方法を記載する。

【 0 0 9 1 】

20

A . A N C A の存在を固定化好中球 E L I S A により決定した

S a x o n ら、J . A l l e r g y C l i n . I m m u n o l . 8 6 : 2 0 2 - 2 1 0 (1 9 9 0) に記載されたようにして、A N C A 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 $\times$ 1 0 ⁵ 個の好中球をコーティングし、細胞を固定化するため 1 0 0 % 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 . 2 5 % ウシ血清アルブミン (B S A) 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 1 0 0 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 (a b ') ₂ 抗ヒト免疫グロブリン G (γ 鎖特異的) 抗体 (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h L a b s , I n c . , W e s t G r o v e , P A) を、1 0 0 0 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 4 0 5 n m 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。

30

【 0 0 9 2 】

B . A N C A 染色パターンの決定のための間接免疫蛍光アッセイ法

E L I S A により A N C A 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 (p A N C A) であるのか又は細胞質性 (c A N C A) 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 1 0 0 , 0 0 0 個の好中球を含有するガラス・スライドを、細胞遠心分離 (c y t o c e n t r i f u g a t i o n) (S h a n d o n C y t o s p i n , C h e s h i r e , E n g l a n d) により調製し、それらを 1 0 0 % メタノールで固定化し、空気乾燥させ、- 2 0 で保存した。固定化された好中球を、希釈 (2 0 倍) したヒト血清と共にインキュベートし、S a x o n ら (前記) 1 9 9 0 に記載のようにして、フルオレセイン標識 F (a b ') ₂ γ 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 (e p i f l u o r e s c e n c e) を装備したオリンパス B H - 2 顕微鏡 (O l y m p u s , L a k e S u c c e s s , N Y) を使用してスライドを検査した。

40

【 0 0 9 3 】

p A N C A 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

50

平均よりも標準偏差の２倍を超える分だけ大きいＥＬＩＳＡ反応性と組み合わせられた核周囲染色パターンと定義した。

【００９４】

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。

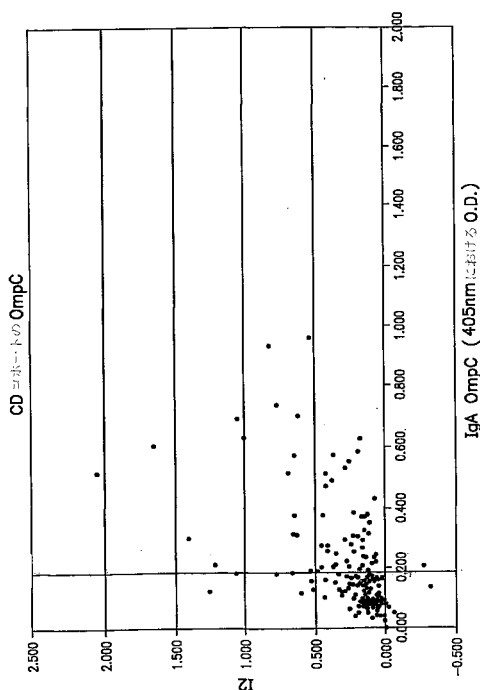
【図３】クローン病を有する患者からの血清のＩｇＡ ＯｍｐＣ反応性及びＩｇＧ ＯｍｐＣ反応性を示す図である。

【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。

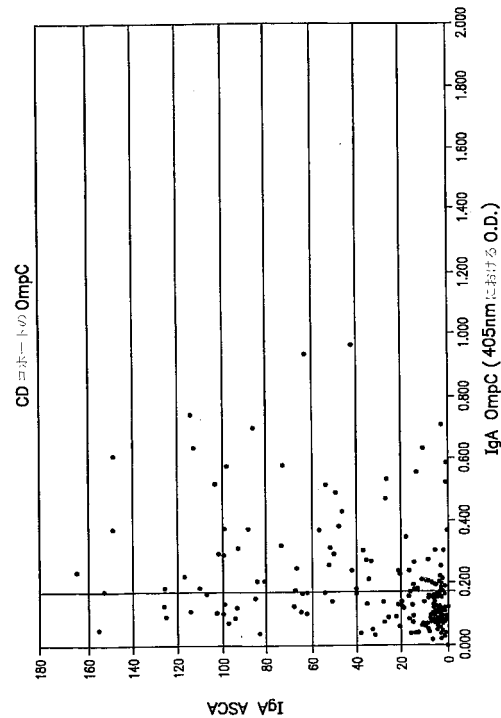
【図５】大腸菌ＯｍｐＣアミノ酸配列（配列番号：１）を示す図である。

【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。

【図１】



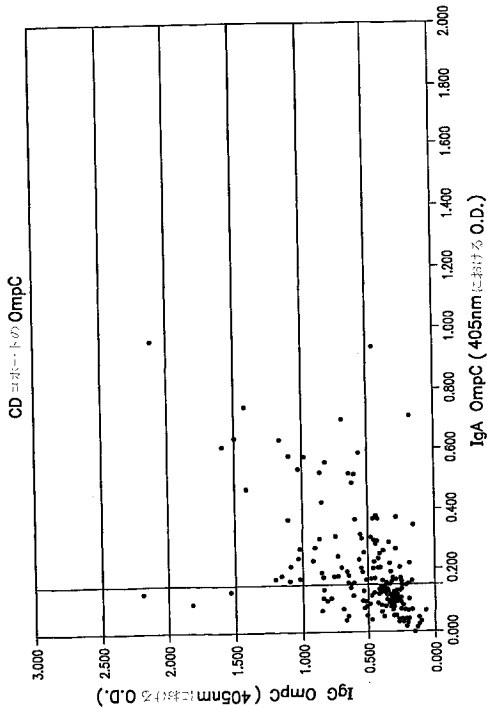
【図２】



大腸菌の387アミノ酸の外膜タンパク質C前駆体：

1 mskskvlalli pallaaqaah aaevynkqgn kldlygkvdg lhyfsdnkv dgdqymrlg
61 fkgqtdvtdg ltgygweyq iqnsaenen nswtrvafag lkfgdvgsfd ygrnygvvyd
121 vtswtvipe fgdtygadn fmgqrnfga tyrnddfigl vdglnfavq qgknpsge
181 gftsgtung :dalrcnqdg vgsitydye gfiggaiss skrtadqnta ayigndrae
241 tytgikykda nnylaacyt qtnatrvgs lqvankqnf eavagyqfif gilpalayiq
301 skgknlgrry ddedilkvyd vgaryyfakn matydykin llddqftfd agintdniva
361 lglvyqf

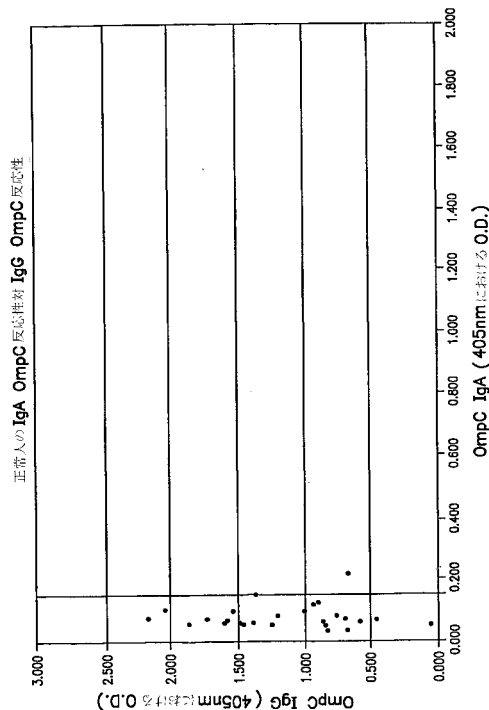
【 図 3 】



【 図 6 】

A GAT CTG GCC AGC GCC GTG GGC ATC CAG TTC GGC AGC ATC TTT CAT CAC TTC AAG AGC AAG
▶ D L A S A V G I Q S G S I F H F K S K
GAT GAG ATA TTG CGT GCC GTG ATG GAG GAA ACC ATC CAT TAC AAC ACC GCG ATG ATG CCC
▶ D E I L R A V H E I H N E A M R
GCT TCA CTG GAG GCG AGC AGC GTG CCG GTG CTG CCG GTG ATC CAC TTC CAG
▶ A S L E A S T V R E R V L I R C E
TTG CAG TCG ATC ATG GGC AGT GGC GAG GCC ATG GCG 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 GCG CAC GTG CCG GTG GAT GAT 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 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

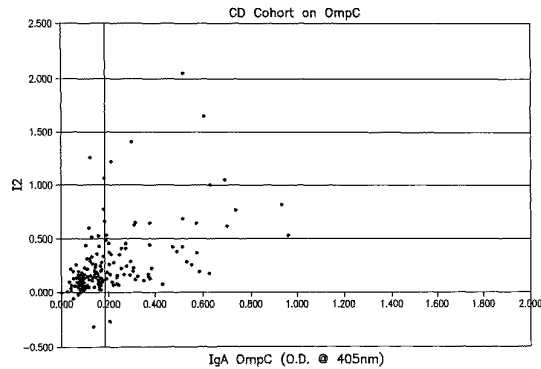
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/89361 A2

- (51) International Patent Classification: A61B
(21) International Application Number: PCT/US01/16032
(22) International Filing Date: 17 May 2001 (17.05.2001)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 09/575,061 19 May 2000 (19.05.2000) US
(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 09/575,061 (CIP) Filed on 19 May 2000 (19.05.2000)
(71) Applicants (for all designated States except US): CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER [US/US]; 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA 90048-1865 (US). THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 12th Floor, 1111 Franklin Street, Oakland, CA 94607 (US).
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): TARGAN, Stephan, R. [US/US]; 240 22nd Street, Santa Monica, CA 90402 (US). BRAUN, Jonathan [US/US]; 3924 Hilton Head Way, Tarzana, CA 91356 (US). SUTTON, Christopher, L. [US/US]; 1625 Bolus Avenue, Encinitas, CA 92024 (US).
(74) Agents: GASHLER, Andrea, L. et al.; Campbell & Flores LLP, 7th Floor, 4370 La Jolla Village Drive, San Diego, CA 92122 (US).
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, ST, SV, TH, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS, PREVENTION AND TREATMENT OF CROHN'S DISEASE USING THE OMP C ANTIGEN



(57) Abstract: The present invention provides a method of diagnosing Crohn's disease in a subject by determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject, where the presence of the IgA anti-OmpC antibodies indicates that the subject has Crohn's disease.

WO 01/89361 A2

WO 01/89361 A2



(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

1

DIAGNOSIS, PREVENTION AND TREATMENT OF CROHN'S DISEASE
USING THE OmpC ANTIGEN

This application was made with government support under USPHS grant DK46763 awarded by The United States Public Health Service. The government has certain rights in the invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates generally to the fields of immunology and inflammatory bowel disease and more specifically to the diagnosis and treatment of Crohn's disease using the bacterial antigen, outer membrane protein C (OmpC).

BACKGROUND INFORMATION

Inflammatory bowel disease (IBD) is the collective term used to describe two gastrointestinal disorders of unknown etiology: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The course and prognosis of IBD, which occurs world-wide and is reported to afflict as many as two million people, varies widely. Onset of IBD is predominantly in young adulthood with diarrhea, abdominal pain, and fever the three most common presenting symptoms. The diarrhea may range from mild to severe, and anemia and weight loss are additional common signs of IBD. Ten percent to fifteen percent of all patients with IBD will require surgery over a ten year period. In addition, patients with IBD are at increased

WO 01/89361

PCT/US01/16032

2

risk for the development of intestinal cancer. Reports
of an increased occurrence of psychological problems,
including anxiety and depression, are perhaps not
surprising symptoms of what is often a debilitating
5 disease that strikes people in the prime of life.

Unfortunately, the available therapies for
inflammatory bowel disease are few, and both diagnosis
and treatment have been hampered by a lack of knowledge
regarding the etiology of the disease. What is clear,
10 however, is that a combination of genetic factors,
exogenous triggers and endogenous microflora can
contribute to the immune-mediated damage to the
intestinal mucosa seen in inflammatory bowel disease. In
Crohn's disease, bacteria have been implicated in
15 initiation and progression of the disease: the intestinal
inflammation in Crohn's disease is notable for its
frequent responsiveness to antibiotics and susceptibility
to bacterial fecal flow. Common intestinal colonists and
novel pathogens have been implicated in Crohn's by direct
20 detection or by disease associated anti-microbial immune
responses. Furthermore, in many genetically susceptible
animal models of chronic colitis, luminal micro-organisms
are a necessary cofactor for disease; animals housed in a
germ-free environment do not develop colitis. However,
25 despite much direct and indirect evidence for a role for
enteric microorganisms in Crohn's disease, the pathogenic
organisms and antigens contributing to the immune
dysregulation seen in this disease have not been
identified.

30 Current diagnostic assays for Crohn's disease
are unable to detect all patients with the disease.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

3

Thus, identification of novel microbial antigens associated with Crohn's disease would provide reagents that can increase the sensitivity of current diagnostic assays. In addition, such microbial antigens can bear a disease related T-cell epitope and, as original or contributing inducers of the disease-related immune response, can be effective tolerogenic antigens for treating Crohn's disease.

10 Thus, there is a need for identification of microbial antigens associated with Crohn's disease that can be used to improve the sensitivity of current diagnostic assays for this disease. The present invention satisfies this need and provides related advantages as well.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a method of diagnosing Crohn's disease in a subject by determining the presence or absence of IgA anti-outer membrane protein C (OmpC) antibodies in the subject, where the presence of the IgA anti-OmpC antibodies indicates that the subject has Crohn's disease. A method of the invention can be practiced, for example, by obtaining a sample from a subject; contacting the sample with an OmpC antigen, or reactive fragment thereof, under conditions suitable to form a complex of the OmpC antigen, or reactive fragment thereof, and IgA antibody to the OmpC antigen; contacting the complex with an anti-IgA antibody; and detecting the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies, where the presence of the IgA anti-OmpC antibodies in the subject indicates that the

WO 01/89361

PCT/US01/16032

4

subject has Crohn's disease. In one embodiment, the invention is practiced using an OmpC antigen having substantially the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1. In another embodiment, the IgA anti-OmpC antibodies are
5 detected with an enzyme-linked immunosorbent assay.

The invention further provides a method of diagnosing Crohn's disease by determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject and the presence or absence of IgA anti-*Saccharomyces*
10 *cerevisiae* antibodies (ASCA) in the subject, where the presence of IgA anti-OmpC antibodies or the presence of IgA ASCA in the subject each independently indicates that the subject has Crohn's disease. The presence of IgA
ASCA can be determined, for example, by reactivity with
15 purified yeast cell wall phosphopeptidomannan (PPM), which can be prepared, for example, from ATCC strain #38926.

The invention additionally provides a method of diagnosing Crohn's disease by determining the presence or
20 absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject and the presence or absence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in the subject, where the presence of IgA anti-OmpC antibodies or the presence of IgA anti-I-2
polypeptide antibodies in the subject each independently
25 indicates that the subject has Crohn's disease. In one embodiment, the presence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies is determined by IgA reactivity against an I-2 polypeptide having substantially the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

5

Further provided by the invention is a method of diagnosing Crohn's disease in a subject by determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject; determining the presence or absence of IgA ASCA in the subject; and determining the presence or absence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in the subject, where the presence of the IgA anti-OmpC antibodies, the presence of IgA ASCA or the presence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies each independently indicates that the subject has Crohn's disease. In one embodiment, this method further includes the step of determining the presence or absence of perinuclear anti-neutrophil antibodies (pANCA) in the subject.

The invention further provides a method of inducing tolerance in a patient with Crohn's disease by administering an effective dose of an OmpC antigen, or tolerogenic fragment thereof, to the patient with Crohn's disease. An OmpC antigen useful in a method of inducing tolerance can have, for example, substantially the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the IgA OmpC reactivity and IgA I-2 reactivity of sera from patients having Crohn's disease.

Figure 2 shows IgA OmpC reactivity and IgA ASCA reactivity of sera from patients having Crohn's disease.

Figure 3 shows IgA OmpC reactivity and IgG OmpC reactivity of sera from patients having Crohn's disease.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

6

Figure 4 shows IgA and IgG OmpC reactivity of sera from normal individuals.

Figure 5 shows the *E. coli* OmpC amino acid sequence (SEQ ID NO: 1).

5 Figure 6 shows the I-2 nucleotide sequence (SEQ ID NO: 2) and predicted amino acid sequence (SEQ ID NO: 3).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is directed to the
10 exciting discovery that IgA antibodies to outer membrane protein C (OmpC) are associated with Crohn's disease. As shown in Figure 4, only a single individual without Crohn's disease ("normal") had IgA OmpC reactivity greater than 0.2₄₀₅, although many normals showed
15 significant IgG OmpC reactivity. In contrast to the normals, significant IgA OmpC reactivity was present in sera from many patients having Crohn's disease (see Figure 1). Furthermore, this reactivity was apparently distinct, in large part, from IgA I-2 and IgA ASCA
20 reactivity seen in sera from Crohn's disease patients (Figures 1 and 2). These results are summarized in Table 1, which indicates that IgA OmpC reactivity together with IgA ASCA reactivity, pANCA reactivity and I-2 polypeptide reactivity is a highly sensitive
25 diagnostic system which can detect 86% of patients with Crohn's disease. Furthermore, as shown in Table 2, IgA OmpC reactivity itself detected 55% of patients having Crohn's disease. These results indicate that IgA OmpC reactivity can be valuable in increasing the number of

WO 01/89361

PCT/US01/16032

7

Crohn's disease patients that are diagnosed with the disease, thereby facilitating earlier and more appropriate treatment.

5

TABLE 1
CD COHORT

	<u>Total</u>	<u>ASCA</u>	<u>IgA</u>	<u>pANCA</u>	<u>I2</u>	<u>Additional</u>	<u>Cumulative</u>
		<u>Panel+</u>	<u>OmpC+</u>			<u>% Detected</u>	<u>% Detected</u>
CD Cohort	153	86				56%	56%
ASCA Panel -	67		31			20%	76%
ASCA Panel -/ OmpC-	36			12		8%	84%
10 ASCA Panel -/ OmpC-/pANCA-	24				2	1%	86%
Total % Detected:						86%	86%

TABLE 2
CD COHORT

	<u>Total</u>	<u>ASCA</u>	<u>OmpC+</u>	<u>pANCA</u>	<u>I2</u>
		<u>Panel+</u>			
n:	153	86	84	36	79
15 % detected:		56%	55%	24%	52%

Based on the above, the present invention provides a method of diagnosing Crohn's disease in a subject by determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject, where the presence of the IgA anti-OmpC antibodies indicates that the subject has Crohn's disease. A method of the invention can be practiced, for example, by obtaining a sample from

20

WO 01/89361

PCT/US01/16032

8

a subject; contacting the sample with an OmpC antigen, or reactive fragment thereof, under conditions suitable to form a complex of the OmpC antigen, or reactive fragment thereof, and IgA antibody to the OmpC antigen; contacting
5 the complex with an anti-IgA antibody; and detecting the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies, where the presence of the IgA anti-OmpC antibodies in the subject indicates that the subject has Crohn's disease. In one embodiment, the invention is practiced using an
10 OmpC antigen having substantially the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1. In another embodiment, the IgA anti-OmpC antibodies are detected with an enzyme-linked immunosorbent assay.

The outer-membrane protein C ("OmpC") useful in
15 the methods of the invention is a "porin," a class of transmembrane proteins that are found in the outer membranes of bacteria, including gram-negative enteric bacteria such as *E. coli*. The porins in the outer membrane of an *E. coli* cell provide channels for passage
20 of disaccharides, phosphate and similar molecules. Porins can be trimers of identical subunits arranged to form a barrel-shaped structure with a pore at the center (Iodish et al., Molecular Cell Biology, Chapter 14 (1995)).

OmpC is one of the major porin proteins found
25 in the outer membranes of bacteria such as *E. coli*. OmpC is similar in structure and function to outer-membrane protein F ("OmpF"). Both assemble as trimers in the outer membrane to form aqueous channels that allow the
30 passive diffusion of small, hydrophilic molecules across the hydrophobic barrier. However, OmpC pores have a

WO 01/89361

PCT/US01/16032

9

diameter of 1.1 nm, while OmpF pores have a diameter of 1.2 nm. This difference results in a slower rate of diffusion through the OmpC pores than through the OmpF pores.

5 Porin expression can be influenced by environmental conditions, including osmolarity, temperature, growth phase and toxin concentration. For example, in the intestine, where both nutrient and toxic molecule concentrations are relatively high, OmpC, with a
10 smaller pore diameter, is the predominant porin (Pratt et al., Mol. Micro., 20:911-917 (1996)).

As used herein, the term "OmpC antigen" or "OmpC" means a protein that has linear or conformational homology to OmpC. A OmpC antigen can be derived from a
15 gram-negative bacterium, such as *E. coli*, and can be a species homolog of *E. coli* OmpC (SEQ ID NO: 1), which is shown in Figure 5. In nature, an OmpC antigen is a protein that forms a trimeric structure in the outer membrane of bacteria which allows the passage of small
20 molecules, or a precursor of such a protein.

As used herein, the term OmpC antigen or OmpC means a protein that has at least 50% amino acid identity with *E. coli* OmpC (SEQ ID NO: 1) shown in Figure 5. An OmpC antigen can have, for example, at least 60%, 70%,
25 80%, 85%, 90% or 95% amino acid identity with SEQ ID NO: 1, said amino acid identity determined with CLUSTALW using the BLOSUM 62 matrix with default parameters. For use in the methods of the invention, an OmpC antigen can be partially purified, for example, by spheroplast
30 lysis from OmpA and OmpF deficient cells as described in

WO 01/89361

PCT/US01/16032

10

Example IV, or can be similarly prepared from a variety of other *E. coli* strains, which can contain OmpA and OmpF in addition to OmpC. An OmpC antigen also can be prepared recombinantly by expressing an encoding nucleic acid sequence such as that available as GenBank accession K00541 by methods well known in the art (see, for example, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. New York (1999)).

The methods of the invention relate to determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in a subject. As used herein, the "presence of IgA anti-OmpC antibodies" means IgA reactivity against an OmpC antigen that is greater than two standard deviations above the mean IgA anti-OmpC reactivity of control (normal) sera analyzed under the same conditions.

The methods of the invention relate to the diagnosis and treatment of Crohn's disease (regional enteritis), which is a disease of chronic inflammation that can involve any part of the gastrointestinal tract. Commonly the distal portion of the small intestine (ileum) and cecum are affected. In other cases, the disease is confined to the small intestine, colon or anorectal region. Crohn's disease occasionally involves the duodenum and stomach, and more rarely the esophagus and oral cavity.

The variable clinical manifestations of Crohn's disease are, in part, a result of the varying anatomic localization of the disease. The most frequent symptoms of Crohn's disease are abdominal pain, diarrhea and recurrent fever. Crohn's disease is commonly associated

WO 01/89361

PCT/US01/16032

11

with intestinal obstruction or fistula, which is an abnormal passage between diseased loops of bowel, for example. Crohn's disease also includes complications such as inflammation of the eye, joints and skin; liver
5 disease; kidney stones or amyloidosis. In addition, CD is associated with an increased risk of intestinal cancer.

Several features are characteristic of the pathology of Crohn's disease. The inflammation
10 associated with CD, known as transmural inflammation, involves all layers of the bowel wall. Thickening and edema, for example, typically also appear throughout the bowel wall, with fibrosis also present in long-standing disease. The inflammation characteristic of CD also is
15 discontinuous in that segments of inflamed tissue, known as "skip lesions," are separated by apparently normal intestine. Furthermore, linear ulcerations, edema, and inflammation of the intervening tissue lead to a "cobblestone" appearance of the intestinal mucosa, which
20 is distinctive of CD.

A hallmark of Crohn's disease is the presence of discrete aggregations of inflammatory cells, known as granulomas, which are generally found in the submucosa. Some Crohn's disease cases display the typical discrete
25 granulomas, while others show a diffuse granulomatous reaction or nonspecific transmural inflammation. As a result, the presence of discrete granulomas is indicative of CD, although the absence of granulomas also is consistent with the disease. Thus, transmural or
30 discontinuous inflammation, rather than the presence of granulomas, is a preferred diagnostic indicator of

WO 01/89361

PCT/US01/16032

12

Crohn's disease (Rubin and Farber, Pathology (Second Edition) Philadelphia: J.B. Lippincott Company (1994)).

In contrast to ulcerative colitis, which is characterized by a continuous inflammation of the colon that usually is more severe distally than proximally, Crohn's disease is a patchy disease with frequent sparing of the rectum. Furthermore, the inflammation is Crohn's disease is distinct from the superficial inflammation seen in ulcerative colitis, which is usually limited to the mucosal layer and is characterized by an acute inflammatory infiltrate with neutrophils and crypt abscesses. Instead, Crohn's disease affects the entire thickness of the bowel wall with granulomas often, although not always, present. Furthermore, involvement of the terminal ileum, a cobblestone-like appearance, discrete ulcers or fistulas suggest Crohn's disease. Characteristics that serve to distinguish Crohn's disease from ulcerative colitis are summarized in Table 3 (Rubin and Farber, *supra*, 1994).

WO 01/89361

PCT/US01/16032

13

Table 3
Characteristic Features of Crohn's disease
and ulcerative colitis

	<u>Feature</u>	<u>Crohn's</u> <u>Disease</u>	<u>Ulcerative</u> <u>Colitis</u>
5	Macroscopic		
	Thickened bowel wall	Typical	Uncommon
	Luminal narrowing	Typical	Uncommon
	"Skip" lesions	Common	Absent
	Right colon predominance	Typical	Absent
10	Fissures and fistulas	Common	Absent
	Circumscribed ulcers	Common	Absent
	Confluent linear ulcers	Common	Absent
	Pseudopolyps	Absent	Common
	Microscopic		
15	Transmural inflammation	Typical	Uncommon
	Submucosal fibrosis	Typical	Absent
	Fissures	Typical	Rare
	Granulomas	Common	Absent
	Crypt abscesses	Uncommon	Typical

WO 01/89361

PCT/US01/16032

14

As used herein, the term "subject" means any animal capable of having inflammatory bowel disease, including a human, non-human primate, rabbit, rat or mouse, especially a human. A subject can have one or
5 more symptoms of Crohn's disease or ulcerative colitis, or may be asymptomatic.

A sample useful in the methods of the invention can be obtained from any biological fluid having
10 antibodies such as, for example, whole blood, plasma, saliva, or other bodily fluid or tissue, preferably serum.

As used herein, the term "fragment" means a peptide, polypeptide or compound containing naturally
15 occurring amino acids, non-naturally occurring amino acids or chemically modified amino acids. A reactive fragment or tolerogenic fragment of an OmpC antigen also can be a peptide mimetic, which is a non-amino acid chemical structure that mimics the structure of a peptide
20 having an amino acid sequence, provided that the peptidomimetic retains preferential reactivity with IgA antibodies in sera of Crohn's disease patients or tolerogenic activity, as defined herein. Such a mimetic generally is characterized as exhibiting similar physical
25 characteristics such as size, charge or hydrophobicity in the same spatial arrangement found in its peptide counterpart. A specific example of a peptide mimetic is a compound in which the amide bond between one or more of the amino acids is replaced, for example, by a
30 carbon-carbon bond or other bond well known in the art (see, for example, Sawyer, Peptide Based Drug Design, ACS, Washington (1995)).

WO 01/89361

PCT/US01/16032

15

As used herein, the term "amino acid" refers to one of the twenty naturally occurring amino acids, including, unless stated otherwise, L-amino acids and D-amino acids. The term amino acid also refers to compounds such as chemically modified amino acids including amino acid analogs, naturally occurring amino acids that are not usually incorporated into proteins such as norleucine, and chemically synthesized compounds having properties known in the art to be characteristic of an amino acid, provided that the compound can be substituted within a peptide such that it retains reactivity with Crohn's disease sera or tolerogenic activity. Examples of amino acids and amino acid analogs are listed in Gross and Meienhofer, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Academic Press, Inc., New York (1983). An amino acid also can be an amino acid mimetic, which is a structure that exhibits substantially the same spatial arrangement of functional groups as an amino acid but does not necessarily have both the α -amino and α -carboxyl groups characteristic of an amino acid.

A reactive or tolerogenic fragment of an OmpC antigen useful in the invention can be produced or synthesized using methods well known in the art. Such methods include recombinant DNA methods and chemical synthesis methods for production of a peptide. Recombinant methods of producing a peptide through expression of a nucleic acid sequence encoding the peptide in a suitable host cell are well known in the art and are described, for example, in Ausubel et al., *supra*, 1999.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

16

A reactive or tolerogenic fragment of an OmpC antigen useful in the invention also can be produced by chemical synthesis, for example, by the solid phase peptide synthesis method of Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1964). Standard solution methods well known in the art also can be used to synthesize a reactive or tolerogenic fragment useful in the invention (see, for example, Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin (1984) and Bodanszky, Peptide Chemistry, Springer-Verlag, Berlin (1993)). A newly synthesized peptide can be purified, for example, by high performance liquid chromatography (HPLC), and can be characterized using, for example, mass spectrometry or amino acid sequence analysis.

It is understood that limited modifications can be made to an OmpC antigen without destroying its biological function. Similarly, limited modifications can be made to a reactive fragment of an OmpC antigen or a tolerogenic fragment of this antigen without destroying its reactivity or tolerogenic activity. A modification of an antigen disclosed herein that does not destroy its preferential reactivity with IgA antibodies in the sera of patients having Crohn's disease or a modification of an antigen disclosed herein that does not destroy tolerogenic activity is within the definition of an OmpC antigen. Similarly, a modification of a reactive fragment of an antigen disclosed herein that does not destroy its ability to form a complex with IgA antibodies in the sera of a patient having Crohn's disease is within the definition of a reactive fragment. Furthermore, a modification of a tolerogenic fragment of an OmpC antigen that does not destroy its ability to produce a decreased

WO 01/89361

PCT/US01/16032

17

immunological response is within the definition of a tolerogenic fragment of an OmpC antigen. A modification can be, for example, an addition, deletion, or substitution of amino acid residues; substitution of a compound that mimics amino acid structure or function; or addition of chemical moieties such as amino or acetyl groups. The activity of a modified OmpC antigen or a modified fragment of an OmpC antigen can be assayed, for example, using one of the assays for reactivity or tolerogenic activity disclosed herein.

A particularly useful modification confers increased stability. Incorporation of one or more D-amino acids is a modification useful in increasing stability of a OmpC antigen or fragment thereof. Similarly, deletion or substitution of lysine can increase stability by protecting against degradation. For example, such a substitution can increase stability and, thus, bioavailability of an OmpC antigen or a tolerogenic fragment thereof, provided that the substitution does not significantly impair reactivity or tolerogenic activity.

The invention further provides a method of diagnosing Crohn's disease by determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject and the presence or absence of IgA anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in the subject, where the presence of IgA anti-OmpC antibodies or the presence of IgA ASCA in the subject each independently indicates that the subject has Crohn's disease. The presence of IgA ASCA can be determined, for example, by reactivity with purified yeast cell wall phosphopeptidomannan (PPM),

WO 01/89361

PCT/US01/16032

18

which can be prepared, for example, from ATCC strain #38926. Methods for determining the presence of IgA ASCA are exemplified herein in Example III. As used herein, the "presence of IgA ASCA" means IgA reactivity against
5 *S. cerevisiae* that is greater than 20% of the reactivity given by reference (known positive) Crohn's disease sera.

Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) are characteristically elevated in patients having Crohn's disease although the nature of the *S. cerevisiae*
10 antigen supporting the specific antibody response in CD is unknown (Sendid et al., Clin. Diag. Lab. Immunol., 3:219-226 (1996)). These antibodies may represent a response against yeasts present in common food or drink or a response against yeasts that colonize the
15 gastrointestinal tract. Studies with periodate oxidation have shown that the epitopes recognized by ASCA in CD patient sera contain polysaccharides. Oligomannosidic epitopes are shared by a variety of organisms including different yeast strains and genera, filamentous fungi,
20 viruses, bacteria and human glycoproteins. Thus, the mannose-induced antibody responses in CD may represent a response against a pathogenic yeast organism or may represent a response against a cross-reactive oligomannosidic epitope present, for example, on a human
25 glycoprotein autoantigen. Regardless of the nature of the antigen, elevated levels of serum ASCA are a differential marker for Crohn's disease, with only low levels of ASCA reported in UC patients (Sendid et al., *supra*, 1996).

30 IgA ASCA can be detected using an antigen specific for ASCA, which is any antigen or mixture of

WO 01/89361

PCT/US01/16032

19

antigens that is bound specifically by ASCA. Although ASCA antibodies were initially characterized by their ability to bind *S. cerevisiae*, those of skill in the art will understand that an antigen specific for ASCA can be
5 obtained from *S. cerevisiae*, or can be obtained from a variety of other sources so long as the antigen is capable of binding specifically to ASCA antibodies. Accordingly, exemplary sources of an antigen specific for ASCA contemplated for use in the methods of the invention
10 include whole killed yeast cells, such as from the genera *Saccharomyces* and *Candida*, yeast cell wall phosphopeptidomannan (PPM), oligomannosides, neoglycolipids, anti-ASCA idiotypic antibodies, and the like. As described above, different species and strains
15 of yeast, including *Saccharomyces*, can be used as an antigen specific for ASCA in the methods provided herein. For example, *S. cerevisiae* strain Su1, Su2, CBS 1315 or BM 156, or *Candida albicans* strain VW32, can be used as an antigen specific for ASCA in the methods of the
20 invention.

Preparations of yeast cell wall mannans, or phosphopeptidomannans (PPM), are also contemplated herein as antigens specific for ASCA. These water soluble surface antigens can be prepared by appropriate
25 extraction techniques, including autoclaving as described in Example III or can be obtained commercially (see Lindberg et al., Gut 33:909-913 (1992)). The acid stable fraction of yeast cell wall PPM also can be useful in the methods of the invention (Sendid et al., *supra*, 1996).
30 An exemplary PPM for use in diagnosing clinical subtypes of Crohn's disease is derived from *S. cerevisiae* strain ATCC #38926.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

20

Purified oligosaccharide antigens, such as oligomannosides specific for ASCA, also are contemplated for use in the methods of the invention. For use herein, the purified oligomannoside antigens are preferably converted into neoglycolipids as described in Faille et al., Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 11:438-446 (1992). One skilled in the art understands that the reactivity of such an oligomannoside antigen with ASCA can be optimized by varying the mannosyl chain length (Frosh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1194-1198 (1985)); the anomeric configuration (Fukazawa et al., *In E. Kurstak (ed.), Immunology of Fungal Disease*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 37-62 (1989); Nishikawa et al, Microbiol. Immunol., 34:825-840 (1990); Poulain et al., Eur. J. Clin. Microbiol., 23:46-52 (1993); Shibata et al., Arch. Biochem. Biophys., 243:338-348 (1985); and Trinel et al., Infect. Immun., 60:3845-3851 (1992)); or the position of the linkage (Kikuchi et al., Planta, 190:525-535 (1993)).

An oligomannoside antigen specific for ASCA can include the mannotetraose Man(1-3)Man(1-2)Man(1-2)Man, and can be purified from PMM as described in Faille et al., *supra*, 1992. An exemplary neoglycolipid for use in the methods of the invention can be constructed by releasing the oligomannoside from its respective PPM and subsequently coupling the released oligomannoside to 4-hexadecylaniline or the like.

The invention additionally provides a method of diagnosing Crohn's disease by determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject and the presence or absence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in the subject, where the presence of IgA

WO 01/89361

PCT/US01/16032

21

anti-OmpC antibodies or the presence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in the subject each independently indicates that the subject has Crohn's disease. In one embodiment, the presence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies is determined by IgA reactivity against an I-2 polypeptide having substantially the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3.

The methods of the invention relate to determining the presence or absence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in a subject. As used herein, the "presence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies" or "IgA anti-I-2 antibodies" means IgA reactivity against an I-2 polypeptide that is greater than two standard deviations above the IgA anti-I-2 mean reactivity of control (normal) sera analyzed under the same conditions.

As used herein, the term "I-2 polypeptide" means a polypeptide having substantially the same amino acid sequence as the microbial I-2 polypeptide (SEQ ID NO: 3) shown in Figure 6. The microbial I-2 polypeptide (SEQ ID NO: 3) is a polypeptide of 100 amino acids sharing some similarity to bacterial transcriptional regulators, with the greatest similarity in the amino-terminal 30 amino acids. The I-2 encoding nucleic acid (SEQ ID NO: 2) is differentially present in involved Crohn's disease tissue, as compared to mucosa macroscopically free of disease. An I-2 polypeptide, or reactive fragment thereof, can be prepared, for example, using recombinant methods as set forth in Example IV.

An I-2 polypeptide having substantially the same amino acid sequence as SEQ ID NO: 3 can be the

WO 01/89361

PCT/US01/16032

22

naturally occurring I-2 polypeptide (SEQ ID NO: 3) or a related polypeptide having substantial amino acid sequence similarity to this sequence. Such related polypeptides include isotype variants or homologs of the amino acid sequence shown in Figure 6. As used herein, the term I-2 polypeptide generally describes polypeptides generally having an amino acid sequence with greater than about 50% identity, preferably greater than about 60% identity, more preferably greater than about 70% identity, and can be a polypeptide having greater than about 80%, 90%, 95%, 97%, or 99% amino acid sequence identity with SEQ ID NO: 3, said amino acid identity determined with CLUSTALW using the BLOSUM 62 matrix with default parameters.

Further provided by the invention is a method of diagnosing Crohn's disease in a subject by determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject; determining the presence or absence of IgA ASCA in the subject; and determining the presence or absence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in the subject, where the presence of the IgA anti-OmpC antibodies, the presence of IgA ASCA or the presence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies each independently indicates that the subject has Crohn's disease.

Previous studies have shown ANCA reactivity in a small portion of patients with Crohn's disease, although these antibodies are elevated more frequently in patients with ulcerative colitis. The reported prevalence in CD varies from 0 to 43% with most studies reporting that 10 to 30% of CD patients express ANCA (see, for example, Saxon et al., J. Allergy Clin.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

23

Immunol. 86:202--210 (1990); Cambridge et al., Gut 33:668-674 (1992); Pool et al., Gut 34:46-50 (1993); and Brokroelofs et al., Dig. Dis. Sci. 39:545-549 (1994).

In a method of the invention, the presence or
5 absence of pANCA can be optionally determined in the
subject, for example, by reactivity with fixed
neutrophil. As used herein, the term "perinuclear
anti-neutrophil cytoplasmic antibody" is synonymous with
"pANCA" and refers to an antibody that reacts
10 specifically with a neutrophil to give perinuclear to
nuclear staining or cytoplasmic staining with perinuclear
highlighting. A method for determining the presence of
pANCA in a subject is exemplified herein in Example V.

The invention further provides a method of
15 inducing tolerance in a patient with Crohn's disease by
administering an effective dose of an OmpC antigen, or
tolerogenic fragment thereof, to the patient with Crohn's
disease. An OmpC antigen useful in a method of inducing
tolerance can include, for example, the sequence SEQ ID
20 NO: 1.

As used herein, the term "effective dose" means
the amount of an OmpC antigen, or a tolerogenic fragment
thereof, useful for inducing tolerance in a patient
having Crohn's disease. For induction of oral tolerance,
25 for example, multiple smaller oral doses can be
administered or a large dose can be administered. Such
doses can be extrapolated, for example, from the
induction of tolerance in animal models (see, for
example, Trentham et al., Science 261:1727-1730 (1993)).

WO 01/89361

PCT/US01/16032

24

Various molecules are known in the art to cause, promote or enhance tolerance, and an OmpC antigen or tolerogenic fragment thereof can be combined, if desired, with a tolerogizing molecule. See, for example, U.S. Patent No. 5,268,454, and citations therein, each of which is incorporated herein by reference. As used herein, the term "tolerogizing molecule" means a molecule, compound or polymer that causes, promotes or enhances tolerogenic activity when combined with an OmpC antigen or fragment thereof. A tolerogizing molecule can be optionally conjugated to an OmpC antigen and can be, for example, polyethylene glycol. Such molecules are well known in the art (see, for example, U.S. Patent No. 5,268,454, *supra*).

An effective dose of an OmpC antigen, or a fragment thereof, for inducing tolerance can be administered by methods well known in the art. Oral tolerance is well-recognized in the art as a method of treating autoimmune disease (see, for example, Weiner, Hospital Practice, pp. 53-58 (Sept. 15, 1995)). For example, orally administered autoantigens suppress several experimental autoimmune models in a disease- and antigen-specific fashion; the diseases include experimental autoimmune encephalomyelitis, uveitis, and myasthenia, collagen- and adjuvant-induced arthritis, and diabetes in the NOD mouse (see, for example, Weiner et al., Ann. Rev. Immunol. 12:809-837 (1994)). Furthermore, clinical trials of oral tolerance have produced positive results in treating multiple sclerosis, rheumatoid arthritis and uveitis. Modes of administration include parenteral administration and subcutaneous injection (Johnson, Ann. Neurology 36(suppl.):S115-S117 (1994)).

WO 01/89361

PCT/US01/16032

25

The term "tolerogenic fragment," as used in reference to an OmpC antigen, means a peptide or polypeptide portion of the antigen that has tolerogenic activity as defined by its ability either alone, or in
5 combination with another molecule, to produce a decreased immunological response. Thus, a tolerogenic fragment of an OmpC antigen is a peptide or polypeptide that has substantially the same amino acid sequence as a portion of SEQ ID NO: 1 and tolerogenic activity as defined by
10 its ability either alone, or in combination with another molecule, to produce a decreased immunological response. A tolerogenic fragment of an OmpC antigen can have from about three amino acids to about 90 amino acids. A tolerogenic fragment of an OmpC antigen can have, for
15 example, at least 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20 or 25 amino acids. For example, a tolerogenic fragment of an OmpC antigen can have from five to fifty amino acids, from eight to fifty amino acids, or from ten to fifty amino acids. More preferably, a tolerogenic fragment has from
20 eight to twenty amino acids or from ten to twenty amino acids. Most preferably, a tolerogenic fragment has from twelve to twenty amino acids or from fifteen to twenty amino acids.

A tolerogenic fragment of an OmpC antigen can
25 be identified using one of a variety of assays, including *in vitro* assays such as T-cell proliferation or cytokine secretion assays and *in vivo* assays such as the induction of tolerance in murine models of inflammatory bowel disease. T-cell proliferation assays, for example, are
30 well recognized in the art as predictive of tolerogenic activity (see, for example, Miyahara et al., Immunol. 86:110-115 (1995) or Lundin et al, J. Exp. Med. 178:187-

WO 01/89361

PCT/US01/16032

26

196 (1993)). A T-cell proliferation assay can be performed by culturing T-cells with irradiated antigen-presenting cells, such as normal spleen cells, in microtiter wells for 3 days with varying concentrations of the fragment to be assayed; adding ³H-thymidine; and measuring incorporation of ³H-thymidine into DNA. In such an assay, a fragment of an OmpC antigen can be tested for activity, for example, at concentrations of 20 µg/ml and 40 µg/ml.

10 A tolerogenic fragment of an OmpC antigen can be identified using a T-cell cytokine secretion assay known in the art. For example, T cells can be cultured with irradiated antigen-presenting cells in microtiter wells with varying concentrations of the fragment of
15 interest and, after three days, the culture supernatants can be assayed for IL-2, IL-4 or IFN-γ as described in Czerinsky et al., Immunol. Rev. 119:5-22 (1991).

Primary T-cells for use in a T-cell proliferation assay or cytokine secretion assay, for
20 example, can be isolated from lamina propria or peripheral blood. In addition, a convenient source of T-cells for use in an *in vitro* assay for tolerogenic activity can be a T-cell line established from an IBD patient such as a Crohn's disease patient, from a murine
25 model of IBD or from a healthy animal immunized with an OmpC antigen of the invention. A preferred source of T-cells for use in identifying a tolerogenic fragment of an OmpC antigen is a Crohn's disease patient.

A T-cell line can be established from a patient
30 with CD or UC, for example, by culturing T lymphocytes

WO 01/89361

PCT/US01/16032

27

with about 1 µg/ml recombinant OmpC antigen or OmpC fusion protein, in the presence of low concentrations of growth-supporting IL-2 (about 10 µg/ml). A T-cell line can be established by culturing T lymphocytes with antigen-presenting cells and feeding the cells on an alternating four to five day cycle with either IL-2 and an OmpC antigen, or IL-2 alone, as described in Nanda et al., J. Exp. Med. 176:297-302 (1992). A cell line that develops into a reliably proliferating cell line dependent on the presence of an OmpC antigen is particularly useful in identifying tolerogenic fragments. The establishment of T-cell lines from small intestinal mucosa is described, for example, in Lundin et al., *supra*, 1993. T cell lines dependent upon the presence of an OmpC antigen and useful for identifying tolerogenic fragments of an OmpC antigen can be prepared similarly.

A tolerogenic fragment also can be identified by its ability to induce tolerance *in vivo*, as indicated by a decreased immunological response, which can be a decreased T-cell response, such as a decreased proliferative response or cytokine secretion response as described above, or a decreased antibody titer to the antigen. A neonatal or adult mouse can be tolerized with a fragment of an OmpC antigen, and a T-cell response or anti-OmpC antibody titer can be assayed after challenging by immunization. For example, a neonatal mouse can be tolerized within 48 hours of birth by intraperitoneal administration of about 100 µg of a fragment of an OmpC antigen emulsified with incomplete Freund's adjuvant and subsequently immunized with I-2 polypeptide at about 8 weeks of age (see, for example, Miyahara, *supra*, 1995). An adult mouse can be tolerized intravenously with about

WO 01/89361

PCT/US01/16032

28

0.33 mg of a fragment of an OmpC antigen, administered daily for three days (total dose 1 mg), and immunized one week later with an OmpC antigen. A decreased T-cell response, such as decreased proliferation or cytokine secretion, which indicates tolerogenic activity, can be measured using T-cells harvested 10 days after immunization. In addition, a decreased anti-OmpC antibody titer, which also indicates tolerogenic activity, can be assayed using blood harvested 4-8 weeks after immunization. Methods for assaying a T-cell response or anti-OmpC antigen antibody titer are described above and are well known in the art.

A tolerogenic fragment of an OmpC antigen also can be identified using a murine model of inflammatory bowel disease. Neonatal or adult mice having IBD-like disease can be tolerized with a fragment of an OmpC antigen as described above, and the T-cell response or anti-OmpC antibody titer assayed. A decreased T-cell response or decreased antibody titer to the antigen indicates a decreased immunological response and, thus, serves to identify a tolerogenic fragment of an OmpC antigen. In addition, a tolerogenic fragment of an OmpC antigen can be identified by the ability to reduce the frequency, time of onset or severity of colitis in a murine model of IBD.

Several well-accepted murine models of inflammatory bowel disease can be useful in identifying a tolerogenic fragment of an OmpC antigen. For example, mice with targeted disruption of the gene encoding the alpha subunit of the G-protein Gi2, is a well known model exhibiting features of human bowel disease (Hornquist et

WO 01/89361

PCT/US01/16032

29

al., J. Immunol. 158:1068-1077 (1997); Rudolph et al.,
Nat. Genet. 10:143-150 (1995)). Mice deficient in IL-10
as described in Kühn et al., Cell 75:263-274 (1993), and
mice deficient in IL-2 as described in Sadlack et al.,
5 Cell 75:253-261 (1993), also have colitis-like disease
and are useful in identifying a tolerogenic fragment of
an OmpC antigen. Furthermore, mice with mutations in T
cell receptor (TCR) α , TCR β , TCR $\beta \times \delta$, or the class II
major histocompatibility complex (MHC) as described in
10 Mombaerts et al., Cell 75:275-282 (1993), develop
inflammatory bowel disease and, thus, are useful in
identifying a tolerogenic fragment of an OmpC antigen.
Similarly, a fragment can be assayed for tolerogenic
activity in a SCID mouse reconstituted with CD45RB CD4+
15 T-cells, which is a well-accepted model of inflammatory
bowel disease, as described in Powrie et al., Immunity
1:553-562 (1994). Additional animal models of IBD also
are well known in the art (see, for example, Podolsky,
Acta Gastroenterol. Belg. 60:163-165 (1997); and
20 Bregenholt et al., APMIS 105: 655-662 (1997)). Thus, a
tolerogenic fragment of an OmpC antigen can be readily
identified by an *in vitro* or *in vivo* assay disclosed
herein or by another assay well known in the art.

A reactive or tolerogenic fragment of an OmpC
25 antigen can be identified by screening a large
collection, or library, of peptides of interest or random
peptides for reactivity or tolerogenic activity. For
example, a panel of peptides spanning the entire sequence
of an OmpC antigen can be screened for reactivity or
30 tolerogenic activity as described above. Such a panel
can be a panel of 15-mer peptides spanning the sequence
of the OmpC antigen (SEQ ID NO: 1), each overlapping by

WO 01/89361

PCT/US01/16032

30

three or five residue shifts using the Mimotope cleavable
pin technology (Cambridge Research Biochemicals,
Wilmington, DE), as described by Geysen et al., Science
235:1184 (1987). The panel is subsequently screened for
5 reactivity or tolerogenic activity using one of the
assays described above (see, for example, Miyahara et
al., *supra*, 1995). A library of peptides to be screened
also can be a population of peptides related in amino
acid sequence to SEQ ID NO: 1 but having one or more
10 amino acids that differ from SEQ ID NO: 1.

Additional peptides to be screened include, for
example, tagged chemical libraries of peptides and
peptidomimetic molecules. Peptide libraries also
comprise those generated by phage display technology.
15 Phage display technology includes the expression of
peptide molecules on the surface of phage as well as
other methodologies by which a protein ligand is or can
be associated with the nucleic acid which encodes it.
Methods for production of phage display libraries,
20 including vectors and methods of diversifying the
population of peptides which are expressed, are well
known in the art (see, for example, Smith and Scott,
Methods Enzymol. 217:228-257 (1993); Scott and Smith,
Science 249:386-390 (1990); and Huse, WO 91/07141 and WO
25 91/07149). These or other well known methods can be used
to produce a phage display library which can be screened,
for example, with one of the disclosed assays for
reactivity or tolerogenic activity. If desired, a
population of peptides can be assayed for activity *en*
30 *masse*. For example, to identify a reactive fragment of
an OmpC antigen, a population of peptides can be assayed
for the ability to form a complex with patient sera

WO 01/89361

PCT/US01/16032

31

containing IgA anti-OmpC antigen reactivity; the active population can be subdivided, and the assay repeated in order to isolate the reactive fragment from the population.

- 5 A reactive or tolerogenic fragment of an OmpC antigen also can be identified by screening, for example, fragments of the polypeptide produced by chemical or proteolytic cleavage. Methods for chemical and proteolytic cleavage and for purification of the
- 10 resultant protein fragments are well known in the art (see, for example, Deutscher, Methods in Enzymology, Vol. 182, "Guide to Protein Purification," San Diego: Academic Press, Inc. (1990)). For example, a chemical such as cyanogen bromide or a protease such as trypsin,
- 15 chymotrypsin, V8 protease, endoproteinase Lys-C, endoproteinase Arg-C or endoproteinase Asp-N can be used to produce convenient fragments of an OmpC antigen that can be screened for reactivity or tolerogenic activity using one of the assays disclosed herein.
- 20 The following examples are intended to illustrate but not limit the present invention.

EXAMPLE I
PURIFICATION OF OmpC

- 25 This example describes purification of OmpC using spheroplast lysis.

OmpF^{-/-}/OmpA^{-/-} mutant *E. coli* were inoculated from a glycerol stock into 10-20ml of Luria Bertani broth supplemented with 100 µg/ml streptomycin (LB-Strep), and

WO 01/89361

PCT/US01/16032

32

cultured vigorously at 37°C for ~8 hours to log phase. This starter culture was used to inoculate one liter of LB-strep media, and the 1 L culture grown for less than 15 hours.

5 The cells were harvested by centrifugation (JS-4.2, 4K/15min/4°C). If necessary, cells were washed twice with 100 ml of ice cold 20 mM Tris-Cl pH 7.5. The cells were subsequently resuspended in ice cold spheroplast forming buffer (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 20%
10 sucrose, 0.1 M EDTA pH 8.0, 1 mg/ml lysozyme), after which the resuspended cells were incubated on ice for 20 minutes to 2 hours with occasional mixing by inversion.

 If required, the spheroplasts were centrifuged (JA-17, 5.5k/10min/4°C) and resuspended in a smaller
15 volume of spheroplast forming buffer (SFB). The spheroplast pellet was optionally frozen prior to resuspension in order to improve lysis efficiency. Hypotonic buffer was avoided in order to avoid bursting the spheroplasts and releasing chromosomal DNA, which
20 significantly decreases the efficiency of lysis.

 The spheroplast preparation was diluted 14-fold into ice cold 10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mg/ml DNase-I, and vortexed vigorously. The preparation was sonicated on ice 4 x 30 seconds at 50% power at setting 4, with a
25 pulse "On time" of 1 second, without foaming or overheating the sample.

 Cell debris was pelleted by centrifugation (JA-17, 5-10K/10min/4°C), and the supernatant removed and clarified by centrifugation a second time (10K/10

WO 01/89361

PCT/US01/16032

33

min/4°C). The supernatant was removed without collecting any part of the pellet, and placed into ultra centrifuge tubes. The tubes were filled to 1.5 millimeter from top with 20 mM Tris-Cl pH 7.5.

5 The membrane preparation was pelleted by ultra centrifugation at 100,000 g (35K/1 hour/4°C in Beckman SW 60 swing bucket rotor). The pellet was resuspended by homogenizing into 20 mM Tris-Cl pH 7.5 using a 1 ml blue pipette tip and squirting the pellet closely before
10 pipetting up and down for approximately ~10 minutes per tube.

 In a 15 ml screw cap tube filled with 4 mls, the material was extracted for 1 hour in 20 mM Tris-Cl pH 7.5 with 1% SDS, with rotation at 37°C. The preparation
15 was transferred to ultra centrifugation tubes, and the membrane pelleted at 100,000g (35K/1 hour/4°C in Beckman SW 60). The pellet was resuspended by homogenizing into 20 mM Tris-Cl pH 7.5 as before. The membrane preparation was optionally left at 4°C overnight.

20 OmpC was extracted for 1 hour with rotation at 37°C in 20 mM Tris-Cl pH 7.5, 3%SDS, and 0.5 M NaCl (SDS will precipitate if kept below 37°C). The material was transferred to ultra centrifugation tubes, and the membrane pelleted by centrifugation at 100,000g (35K/1
25 hour/30°C in Beckman SW 60). Lower temperatures were avoided since further cooling will result in extracted protein salting out of solution.

 The supernatant containing extracted OmpC was then dialyzed against more than 10,000 volumes to

WO 01/89361

PCT/US01/16032

34

eliminate high salt content. SDS was removed by detergent exchange against 0.2% Triton. Triton was removed by further dialysis against 50 mM Tris-Cl.

Purified OmpC, which functions as a porin in its trimeric form, is characterized as follows when analyzed by SDS-PAGE. Electrophoresis at room temperature resulted in a ladder of ~100 kDa, ~70 kDa, and ~30 kDa bands. Heating for 10-15 minutes at 65-70°C partially dissociated the complex and resulted in only dimers and monomers (~70 kDa and ~30 kDa bands). Boiling for 5 minutes resulted in monomers of 38 kDa.

EXAMPLE II

ANTI-IgA OmpC ELISA ASSAYS

This example describes an ELISA assay for direct detection of IgA anti-OmpC antibodies in patient sera.

The OmpC direct ELISA assay was performed as follows. Plates (Immulon 3, DYNEX Technologies, Chantilly, VA) were coated overnight at 4 C with 100 µl/well of OmpC prepared as described above at 0.25 µg/ml in borate buffered saline, pH 8.5. After three washes in 0.05% Tween 20 in phosphate buffered saline (PBS), the plates were blocked with 150 µl/well of 0.5% bovine serum albumin in PBS, pH 7.4 (BSA-PBS) for 30 minutes at room temperature (RT). The blocking solution was then discarded, and 100 µl/well of serum from Crohn's disease patients, ulcerative colitis patients and normal controls diluted 1:100 was added and incubated for 2 hours at room temperature. After washing the plates as before,

WO 01/89361

PCT/US01/16032

35

alkaline phosphatase-conjugated indicator antibody (goat anti-human IgA (α -chain specific) from Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was added to the plates at a dilution of 1:1000 in BSA-PBS, and the plates were
5 incubated at room temperature for 2 hours. The plates were subsequently washed three times with 0.05% Tween 20 in phosphate buffered saline, followed by another three washes with Tris buffered normal saline, pH 7.5. Substrate solution (1.5 mg/ml disodium P-nitrophenol
10 phosphate (Amresco; Solon, OH), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.01 M Tris, pH 8.6) was added at 100 μ l/well, and color was allowed to develop for one hour before the plates were read at 405 nm.

IgA OmpC positive reactivity was defined as
15 reactivity greater than two standard deviations above the mean reactivity obtained with control (normal) sera analyzed at the same time as the test samples.

EXAMPLE III

IgA ASCA ELISA ASSAY

20 This example demonstrates that the presence of IgA anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies in patient sera can be determined using an ELISA microplate assay.

A. Preparation of yeast cell wall mannan

Yeast cell wall mannan was prepared as follows
25 and as described in Faille et al. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11:438-446 (1992) and in Kocourek and Ballou et al., J. Bacteriol 100:1175-1181 (1969). A lyophilized pellet of yeast *Saccharomyces uvarum* was

WO 01/89361

PCT/US01/16032

36

obtained from the American Type Culture Collection (#38926). Yeast were reconstituted in 10 ml 2X YT medium, prepared according to Sambrook et al., Molecular Cloning Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). *S. uvarum* were grown for two to three days at 30°C. The terminal *S. uvarum* culture was inoculated on a 2X YT agar plate and subsequently grown for two to three days at 30°C. A single colony was used to inoculate 500 ml 2X YT media, and grown for two to three days at 30°C.

10 Fermentation media (pH 4.5) was prepared by adding 20 gm glucose, 2 gm bacto-yeast extract, 0.25 gm MgSO₄ and 2.0 ml 28% H₃PO₄ per liter distilled water. The 500 ml culture was used to inoculate 50 liters of fermentation media, and the culture fermented for three to four days

15 at 37°C.

S. uvarum mannan extract was prepared by adding 50 ml 0.02 M citrate buffer (5.88 gm/l sodium citrate; pH 7.0+/-0.1) to each 100 grams of cell paste. The cell/citrate mixture was autoclaved at 125°C for ninety minutes and allowed to cool. After centrifuging at 5000 rpm for 10 minutes, the supernatant was removed and retained. The cells were then washed with 75 ml 0.02 M citrate buffer and the cell/citrate mixture again autoclaved at 125°C for ninety minutes. The cell/citrate

20 mixture was centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes, and the supernatant retained.

In order to precipitate copper/mannan complexes, an equal volume of Fehling's Solution was added to the combined supernatants while stirring. The

30 complete Fehling's solution was prepared by mixing Fehling's Solution A with Fehling's Solution B in a 1:1

WO 01/89361

PCT/US01/16032

37

ratio just prior to use. The copper complexes were allowed to settle, and the liquid decanted gently from the precipitate. The copper/mannan precipitate complexes were then dissolved in 6-8 ml 3N HCl per 100 grams yeast
5 paste.

The resulting solution was poured with vigorous stirring into 100 ml of 8:1 methanol:acetic acid, and the precipitate allowed to settle for several hours. The
10 supernatant was decanted and discarded; then the wash procedure was repeated until the supernatant was colorless, approximately two to three times. The precipitate was collected on a scintered glass funnel, washed with methanol and air dried overnight. On some
15 occasions, the precipitate was collected by centrifugation at 5000 rpm for 10 minutes before washing with methanol and air drying overnight. The dried mannan powder was dissolved in distilled water, using approximately 5 ml water per gram of dry mannan powder.
20 The final concentration of *S. uvarum* cell wall mannan was approximately 30 µg/ml.

B. Preparation of *S. uvarum* mannan ELISA plates

S. uvarum cell mannan ELISA plates were saturated with antigen as follows. Purified *S. uvarum*
25 mannan prepared as described above was diluted to a concentration of 100 µg/ml with phosphate buffered saline/0.2% sodium azide (PBS-N3). Using a multi-channel pipettor, 100 µl of 100 µg/ml *S. uvarum* mannan was added per well of a Costar 96-well hi-binding plate (catalogue
30 number 3590; Costar Corp., Cambridge, MA). The antigen was allowed to coat the plate at 4° C for a minimum of 12

WO 01/89361

PCT/US01/16032

38

hours. Each lot of plates was compared to a previous lot before use. Plates were stored at 2-8° C for up to one month.

C. Analysis of patient sera

- 5 Patient sera were analyzed in duplicate for anti-IgG or anti-IgA reactivity. Microtiter plates saturated with antigen as described above were incubated with phosphate buffered saline/0.05% Tween-20 for 45 minutes at room temperature to inhibit nonspecific
- 10 antibody binding. Patient sera were subsequently added at a dilution of 1:80 for IgA and incubated for 1 hour at room temperature. Wells were washed three times with PBS/0.05% Tween-20. Then a 1:1000 dilution of alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgA (Jackson
- 15 Immunoresearch, Westgrove, PA) was added, and the microtiter plates incubated for 1 hour at room temperature. A solution of p-nitrophenol phosphate in diethanolamine substrate buffer was added, and color development allowed to proceed for 10 minutes.
- 20 Absorbance at 405 nm was analyzed using an automated EMAX plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

- Standard binding of pooled sera from patients with an established diagnosis of Crohn's disease was used as a standard reference for binding and set to be 100
- 25 ELISA units. Results with test patient sera were expressed as a percentage of the standard binding of the reference CD sera. ASCA-positivity was defined as IgA ASCA reactivity that was greater than 20% of the reference CD sera.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

39

EXAMPLE IVIgA I-2 ELISA

This example demonstrates that the I-2 polypeptide can be determined using ELISA analysis.

5 A. GST-I-2 fusion protein

The full-length I-2 encoding nucleic acid sequence (SEQ ID NO: 3) was cloned into the GST expression vector pGEX. After expression in *E. coli*, the protein was purified on a GST column. The purified
10 protein was shown to be of the expected molecular weight by silver staining, and had anti-GST reactivity upon western analysis.

B. ELISA analysis

Human IgA antibodies that bind the I-2
15 polypeptide (SEQ ID NO: 3) were detected by direct ELISA assays essentially as follows. Plates (Immulon 3; DYNEX Technologies; Chantilly, VA) were coated overnight at 4°C with 100 µl/well GST-I-2 fusion polypeptide (5 µg/ml in borate buffered saline, pH 8.5). After three washes in
20 0.05% Tween 20 in phosphate buffered saline (PBS), the plates were blocked with 150 µl/well of 0.5% bovine serum albumin in PBS, pH 7.4 (BSA-PBS) for 30 minutes at room temperature. The blocking solution was then replaced
25 with 100 µl/well of Crohn's disease or normal control serum, diluted 1:100. The plates were then incubated for 2 hours at room temperature and washed as before. Alkaline phosphatase conjugated secondary antibody [goat anti-human IgA (α-chain specific), Jackson

WO 01/89361

PCT/US01/16032

40

ImmunoResearch, West Grove, PA] was added to the IgA plates at a dilution of 1:1000 in BSA-PBS. The plates were incubated for 2 hours at room temperature before washing three times with 0.05% Tween 20/PBS followed by another three washes with Tris buffered normal saline, pH 7.5. Substrate solution (1.5 mg/ml disodium P-nitrophenol phosphate (Aresco; Solon, OH) in 2.5 mM MgCl₂, 0.01 M Tris, pH 8.6) was added at 100 µl/well, and color allowed to develop for one hour. The plates were then analyzed at 405 nm.

IgA I-2 positive reactivity was defined as reactivity greater than two standard deviations above the mean reactivity obtained with control (normal) sera analyzed at the same time as the test samples.

15

EXAMPLE V**ELISA AND INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE FOR DETERMINING pANCA STATUS**

This example describes methods for determining the pANCA status of a subject.

20 **A. Presence of ANCA was determined by fixed neutrophil ELISA**

A fixed neutrophil enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect ANCA as described in Saxon et al., J. Allergy Clin. Immunol. 86:202-210 (1990), and all samples were analyzed in a blinded fashion. Microtiter plates were coated with 2.5 x 10⁵ neutrophils per well and treated with 100% methanol to fix the cells. Cells were incubated with 0.25% bovine serum albumin (BSA) in

WO 01/89361

PCT/US01/16032

41

phosphate-buffered saline to block nonspecific antibody binding. Next, control and coded sera were added at a 1:100 dilution to the bovine serum/phosphate-buffered saline blocking buffer. Alkaline phosphatase conjugated goat F(ab')₂ anti-human immunoglobulin G (γ-chain specific) antibody (Jackson ImmunoResearch Labs, Inc., West Grove, PA) was added at a 1:1000 dilution to label neutrophil bound antibody. A p-nitrophenol phosphate substrate solution was added and color development was allowed to proceed until absorbance at 405 nm in the positive control wells was 0.8-1.0 optical density units greater than the absorbance in blank wells.

B. Indirect immunofluorescence assay for determination of ANCA staining pattern

Indirect immunofluorescent staining was performed on samples that were ANCA-positive by ELISA to determine whether the predominant staining pattern was perinuclear (pANCA) or cytoplasmic (cANCA). Glass slides containing approximately 100,000 neutrophils per slide were prepared by cytocentrifugation (Shandon Cytospin, Cheshire, England) and they were fixed in 100% methanol, air-dried, and stored at -20°C. The fixed neutrophils were incubated with human sera were diluted (1:20), and the reaction was visualized with fluorescein-labeled F(ab')₂ γ chain-specific antibody as described in Saxon et al., *supra*, 1990. The slides were examined using an epifluorescence-equipped Olympus BH-2 microscope (Olympus, Lake Success, NY).

pANCA positivity was defined as a perinuclear staining pattern combined with ELISA reactivity greater

WO 01/89361

PCT/US01/16032

42

than two standard deviations above the mean reactivity
obtained with control (normal) sera analyzed at the same
time as the test samples.

All journal article, reference, and patent
5 citations provided above, in parentheses or otherwise,
whether previously stated or not, are incorporated
herein by reference.

Although the invention has been described with
reference to the examples above, it should be understood
10 that various modifications can be made without departing
from the spirit of the invention. Accordingly, the
invention is limited only by the following claims.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

43

We claim:

1. A method of diagnosing Crohn's disease in a subject, comprising determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in said subject,
5 where the presence of said IgA anti-OmpC antibodies indicates that said subject has Crohn's disease.
2. A method of diagnosing Crohn's disease in a subject, comprising the steps of:
 - 10 (a) obtaining a sample from a subject suspected of having inflammatory bowel disease;
 - (b) contacting the sample with an OmpC antigen, or reactive fragment thereof, under conditions suitable to form a complex of the OmpC antigen, or
15 reactive fragment thereof, and IgA antibody to the OmpC antigen;
 - (c) contacting said complex with an anti-IgA antibody; and
 - (d) detecting the presence or absence of IgA
20 anti-OmpC antibodies,
 where the presence of said IgA anti-OmpC antibodies in said subject indicates that said subject has Crohn's disease.
3. The method of claim 2, wherein said OmpC
25 antigen comprises substantially the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

44

4. The method of claim 2, wherein IgA anti-OmpC antibodies are detected with an enzyme-linked immunosorbent assay.

5. The method of claim 2, further comprising
5 determining the presence or absence of IgA anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies (ASCA) in said subject,

wherein the presence of IgA anti-OmpC antibodies or the presence of IgA ASCA in said subject
10 each independently indicates that said subject has Crohn's disease.

6. The method of claim 5, wherein the presence of IgA ASCA is determined by reactivity with purified yeast cell wall phosphopeptidomannan (PPM).

15 7. The method of claim 6, wherein said yeast cell wall PPM is prepared from ATCC strain #38926.

8. The method of claim 2, further comprising determining the presence or absence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in said subject,

20 wherein the presence of IgA anti-OmpC antibodies or the presence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in said subject each independently indicates that said subject has Crohn's disease.

9. The method of claim 8, wherein the presence
25 of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies is determined by IgA reactivity with an I-2 polypeptide having substantially the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

45

10. A method of diagnosing Crohn's disease in a subject, comprising the steps of:

(a) determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in said subject;

5 (b) determining the presence or absence of IgA ASCA in said subject;

(c) determining the presence or absence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies in said subject, where the presence of said IgA anti-OmpC

10 antibodies, the presence of IgA ASCA or the presence of IgA anti-I-2 polypeptide antibodies each independently indicates that said subject has Crohn's disease.

11. The method of claim 10, further comprising determining the presence or absence of perinuclear
15 anti-neutrophil antibodies (pANCA) in said subject.

12. A method of inducing tolerance in a patient with Crohn's disease, comprising administering an effective dose of an OmpC antigen, or tolerogenic fragment thereof, to said patient with Crohn's disease.

20 13. The method of claim 12, wherein said OmpC antigen comprises substantially the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

WO 01/89361

PCT/US01/16032

1/5

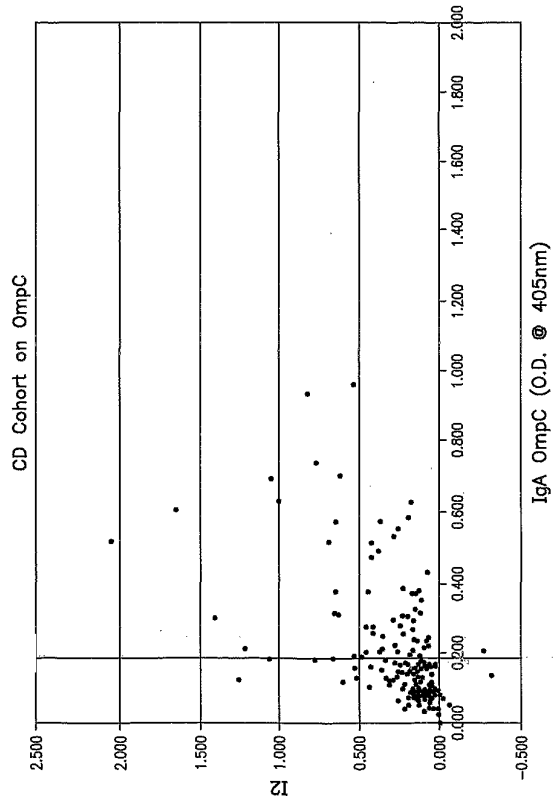
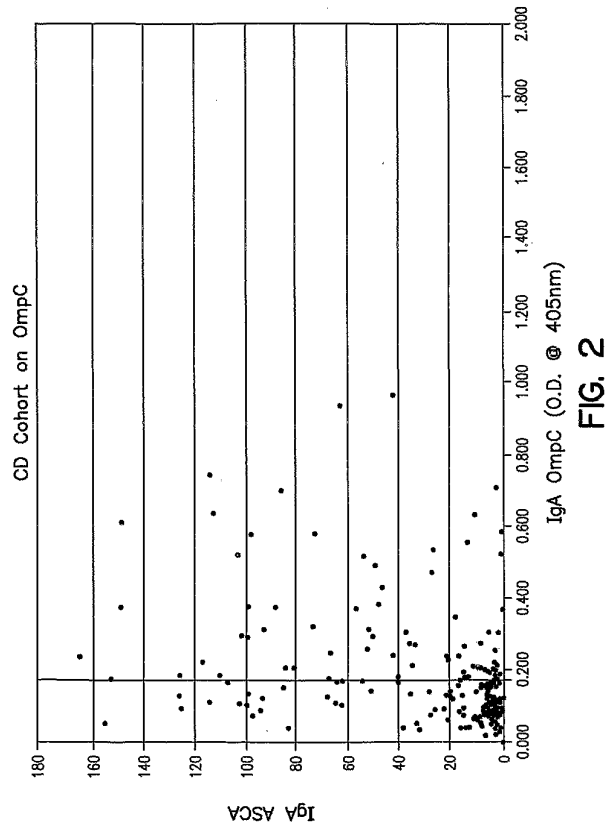


FIG. 1

WO 01/89361

PCT/US01/16032

2/5





WO 01/89361

PCT/US01/16032

4/5

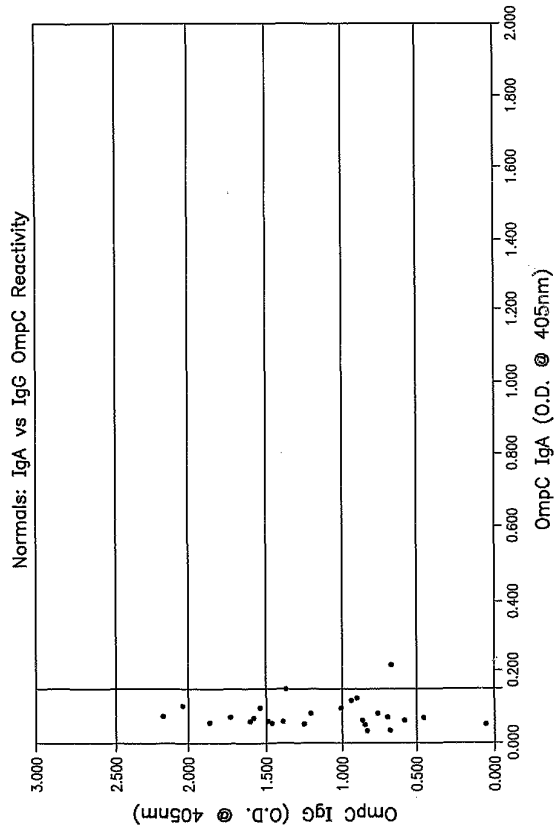


FIG. 4

WO 01/89361

PCT/US01/16032

E. coli 367 amino acids outer membrane protein c precursor:
1 mkskylalli pallaagaah aaevnykdgn kldlygkydg lhyfsdnkdv dgdqymrlg
61 fkgqtqvtdq ltgygweyq iqgnseanen nswtrvafag lkfqdvgsfd ygrnygvvyd
121 vtswtvipe fgdtygsdn imdgrnfga tyntdfifgl vdglnfavq gqknqpsge
181 gftsgvtmng rdalrqnqdg vgsitydye gfgiggaiss skrtdaqnta ayigndrae
241 tytggilkyda mniyaaqyt qtnatrvygs lgwankqnf eavaqyqfde glrpslaylq
301 skgknlgrgy ddedilkvyd vgatyyfukn mstyvdykin llddngftird agintdniva
361 lglvyqf

FIG. 5

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

FIG. 6

WO 01/89361

PCT/US01/16032

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 CmpC Antigen

<130> FP-PM 4713

<150> US 09/575,061

<151> 2000-05-19

<150> 3

<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
```

WO 01/89361 PCT/US01/16032

Thr Tyr Thr Gly Gly Leu Lys Tyr Asp Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala
 245 250 255
 Ala Gln Tyr Thr Gln Thr Tyr Asn Ala Thr Arg Val Gly Ser Leu Gly
 260 265 270
 Trp Ala Asn Lys Ala Gln Asn Phe Glu Ala Val Ala Gln Tyr Gln Phe
 275 280 285
 Asp Phe Gly Leu Arg Pro Ser Leu Ala Tyr Leu Gln Ser Lys Gly Lys
 290 295 300
 Asn Leu Gly Arg Gly Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Leu Lys Tyr Val Asp
 305 310 315 320
 Val Gly Ala Thr Tyr Tyr Phe Asn Lys Asn Met Ser Thr Tyr Val Asp
 325 330 335
 Tyr Lys Ile Asn Leu Leu Asp Asp Asn Gln Phe Thr Arg Asp Ala Gly
 340 345 350
 Ile Asn Thr Asp Asn Ile Val Ala Leu Gly Leu Val Tyr Gln Phe
 355 360 365

<210> 2
 <211> 302
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> Microbial organism from the human gut

<221> CDS
 <222> (2)...(302)

<400> 2
 a gat ctg gcc agc gcc gtg ggc atc cag tcc ggc agc atc ttt cat cac 49
 Asp Leu Ala Ser Ala Val Gly Ile Gln Ser Gly Ser Ile Phe His His
 1 5 10 15
 ttc aag agc aag gat gag ata ttg cgt gcc gtg atg gag gaa acc atc 97
 Phe Lys Ser Lys Asp Glu Ile Leu Arg Ala Val Met Glu Glu Thr Ile
 20 25 30
 cat tac aac acc gcg atg atg cgc gct tca ctg gag gag gcg agc acg 145
 His Tyr Asn Thr Ala Met Met Arg Ala Ser Leu Glu Glu Ala Ser Thr
 35 40 45
 gtg cgc gaa cgc gtg ctg gcg ctg atc cgc tgc gag ttg cag tcg atc 193
 Val Arg Glu Arg Val Leu Ala Leu Ile Arg Cys Glu Leu Gln Ser Ile
 50 55 60
 atg gcc gcc agt gcc gag gcc atg gcc gtg ctg gtc tac gaa tgg cgc 241
 Met Gly Gly Ser Gly Glu Ala Met Ala Val Leu Val Tyr Glu Trp Arg
 65 70 75 80
 tcg ctg tcg gcc gaa gcc cag gcg cac gtg ctg gcc ctg cgt gac gtg 289
 Ser Leu Ser Ala Glu Gly Gln Ala His Val Leu Ala Leu Arg Asp Val
 85 90 95
 tat gag cag atc t 302

WO 01/89361
Tyr Glu Gln Ile
100

PCT/US01/16032

<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

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

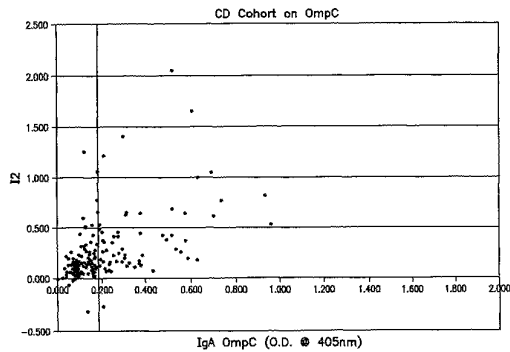
PCT

(10) International Publication Number
WO 01/89361 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, 33/543, 33/564, C12Q 1/68, C07H 21/02
- (21) International Application Number: PCT/US01/16032
- (22) International Filing Date: 17 May 2001 (17.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/575,061 19 May 2000 (19.05.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 09/575,061 (CIP) Filed on 19 May 2000 (19.05.2000)
- (71) Applicants (for all designated States except US): CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER [US/US]; 8700 Beverly Boulevard, Los Angeles, CA 90048-1865 (US). THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 12th Floor, 1111 Franklin Street, Oakland, CA 94607 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): TARGAN, Stephan, R. [US/US]; 240 22nd Street, Santa Monica, CA 90402 (US). BRAUN, Jonathan [US/US]; 3924 Hilton Head Way, Tarzana, CA 91356 (US). SUTTON, Christopher, L. [US/US]; 1625 Eolus Avenue, Encinitas, CA 92024 (US).
- (74) Agents: GASHLER, Andrea, L. et al.; Campbell & Flores LLP, 7th Floor, 4370 La Jolla Village Drive, San Diego, CA 92122 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, ST, SV, SZ, TH, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS, PREVENTION AND TREATMENT OF CROHN'S DISEASE USING THE OMP C ANTIGEN



(57) Abstract: The present invention provides a method of diagnosing Crohn's disease in a subject by determining the presence or absence of IgA anti-OmpC antibodies in the subject, where the presence of the IgA anti-OmpC antibodies indicates that the subject has Crohn's disease.

WO 01/89361 A3

WO 01/89361 A3



patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
28 March 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/16032
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53, 33/543, 33/564; C12Q 1/68; C07H 21/02 US CL : 435/6, 7.1, 7.21, 7.24, 436/506, 508 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) U.S. : 435/6, 7.1, 7.21, 7.24, 7.25, 7.31, 7.32, 7.9, 7.95, 961, 965, 975; 436/506, 508, 513, 518, 573 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,691,151 A (BRAUN et al.) 25 November 1997 (25.11.1997), see Abstract, columns 2 and 5-22.	1-2, 4, 8, 10-12
Y	US 5,932,429 A (TARGAN et al.) 03 August 1999 (03.08.1999), see Abstract and columns 1-15.	1-13
Y	US 5,874,233 A (TARGAN et al.) 23 February 1999 (23.02.1999), see columns 2-14.	1-13
Y	US 5,916,748 A (TARGAN et al.) 29 June 1999 (29.06.1999), see columns 2-14.	1-13
Y	US 5,968,741 A (PLEVY et al.) 19 October 1999 (19.10.1999), see columns 1-12.	2-7, 10-13
Y/P	US 6,218,129 B1 (WALSH et al.) 17 April 2001 (17.04.2001), see Abstract and columns 1-13.	2-7, 10-13
Y	US 6,033,864 A (BRAUN et al.) 07 March 2000 (07.03.2000), see Abstract and columns 1-3.	10-11
A	US 5,681,699 A (ROTTER et al.) 28 October 1997 (28.10.1997), see entire document.	1-13
☐ 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 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 on 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 publication date		
"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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 September 2001 (04.09.2001)		Date of mailing of the international search report 27 DEC 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Charlotte K. Gabel Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
 // C 1 2 N 15/00 C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(71)出願人 592130699
 ザ・レジエンツ・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 カリフォルニア州 94607 オークランド フランクリン ストリート 1
 111 12ス フロア

(74)代理人 100102978
 弁理士 清水 初志

(74)代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲

(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

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA31 CA04 HA15
 4C085 AA02 BA21 BB11 CC07 DD62 GG04 GG08

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	JP2004526122A	公开(公告)日	2004-08-26
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		
[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 C12N15/09 G01N33/543 G01N33/569 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.ZNA.D A61K39/108 A61P1/04 G01N33/543.545.A G01N33/569.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/HA15 4C085/AA02 4C085/BA21 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/DD62 4C085/GG04 4C085/GG08		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	09/575061 2000-05-19 US		
其他公开文献	JP4917728B2		
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。

