

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5603083号
(P5603083)

(45) 発行日 平成26年10月8日(2014.10.8)

(24) 登録日 平成26年8月29日(2014.8.29)

(51) Int.Cl.

F I

C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	ZNA
C12M 1/34	(2006.01)	C12M	1/34	F
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	N
A61P 1/04	(2006.01)	A61P	1/04	
A61P 29/00	(2006.01)	A61P	29/00	

請求項の数 8 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-546652 (P2009-546652)
 (86) (22) 出願日 平成20年1月28日(2008.1.28)
 (65) 公表番号 特表2010-519180 (P2010-519180A)
 (43) 公表日 平成22年6月3日(2010.6.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2008/000183
 (87) 国際公開番号 W02008/089756
 (87) 国際公開日 平成20年7月31日(2008.7.31)
 審査請求日 平成22年11月16日(2010.11.16)
 (31) 優先権主張番号 07090010.5
 (32) 優先日 平成19年1月26日(2007.1.26)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 102007004909.0
 (32) 優先日 平成19年1月26日(2007.1.26)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 509211077
 ゲーアー ジェネリック アッセイズ ゲー
 ーエムペーハー
 ドイツ, 15827 ダーレビッツ, 3
 ルードヴィヒ-エアハルト-リング
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100152319
 弁理士 曾我 亜紀
 (74) 代理人 100163544
 弁理士 平田 緑

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性大腸炎及び慢性膵炎の診断のために、膵臓の酵素原顆粒由来の糖タンパク質2 (GP2) との免疫反応を介して体液から抗体を検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

得られた排泄物、体液、血液及び/又は血清の中から、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるGP2と免疫反応を起こす自己抗体を炎症性大腸炎、クローン病又は慢性膵炎の診断を補助するために検出する方法。

【請求項2】

自己抗体がヒトのIgA抗体、IgM抗体及び/又はIgG抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

GP2がヒト起源、動物起源、組換え起源又は合成起源のものである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

検出が免疫測定法で行われる、請求項1～3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項5】

検出が免疫測定法で行われ、該免疫測定法が1つの反応物質と標識物質との直接的又は間接的な連結で行われることを特徴とする、請求項1～4のいずれか1つに記載の方法。

【請求項6】

治療が、患者の血漿中の免疫グロブリンとGP2との効率的な結合を許容する条件下で、該患者の血漿をGP2固定化カラムに通し、それにより該患者の血漿から有意量のGP2と免疫反応を起こす自己抗体を除去することを含むものである、炎症性大腸炎、クロー

10

20

ン病、又は慢性膵炎の治療用 G P 2 固定化カラムの製造における配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる G P 2 の使用。

【請求項 7】

炎症性大腸炎、クローン病及び慢性膵炎から選択される自己免疫疾患の予防、診断、治療及び/又はアフターケアに使用するための、G P 2 と免疫反応を起こす自己抗体と結合する及び/又は当該自己抗体を検出する薬剤の製造における、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる G P 2 の使用。

【請求項 8】

経口療法に使用する薬剤の製造における、請求項 7 に記載の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなる G P 2 の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組織切片を除いた、膵臓の酵素原顆粒由来の G P 2、その免疫反応性配列又は類似体との免疫反応を介して体液から抗体を検出する方法に関する。

【0002】

この方法は、G P 2 及び類似物質との免疫反応に関連する疾患の診断又は治療制御に使用することができる。したがってより具体的には、本発明は、慢性炎症性疾患又は自己免疫疾患、特にクローン病 (C D) 及び慢性膵炎 (C P) の診断又は治療制御における G P 2、その免疫反応性配列又は類似体の使用に関する。

20

【0003】

本発明は、G P 2 が炎症性大腸炎 (I B D)、好ましくは C D 及び C P における免疫過程の自己抗原であることによって、疾患関連抗体のエピトープを提示するという発見に基づいている。

【背景技術】

【0004】

G P 2 は、見掛けの分子量が 78 k D a の膵臓腺房細胞の膜糖タンパク質である。さらに、G P 2 は、腸の刷子縁細胞でリソソーム成分として、又は膵液中で遊離した非膜結合ペプチドとして検出されている。全膜タンパク質の 30% ~ 45% になるので、G P 2 は、酵素原顆粒膜の主成分である。酵素原顆粒の他の分泌膵臓タンパク質 (シンコリン、レクチン Z G 16 p、シナプトブレビン 2 及び他の硫酸マトリクスであるプロテオグリカン等) と共に、G P 2 は、顆粒膜の脂質ラフト成分であり、シンコリンは G P 2 と相互作用する。Z G 46 p 等の他のタンパク質も含まれるこれらの複合体は、垂膜性マトリクスを形成する。

30

【0005】

G P 2 は、ホスファチジルイノシトールアンカーを介して、膵臓腺房細胞の酵素原顆粒膜に結合し、例えばセレウス菌 (*B. cereus*) のホスホリパーゼ C で取り除くことができる。酵素原顆粒は、膵臓の腺房細胞における、アミラーゼ等の消化酵素のリザーバである。腺房細胞のニューロン刺激又はホルモン刺激の後に、消化酵素が膵管に分泌される。G P 2 は、酵素原顆粒膜上に局在するだけでなく、そのマトリクス、ゴルジ装置及び膵液の腺房腔中にも見られる。さらに、G P 2 は、リソソーム成分であり、そのためエンドサイトーシスに関与すると考えられる。

40

【0006】

膵臓分泌の刺激中に、G P 2 は、腺房細胞の先端膜表面へと移り、切断され、腺房腔へと放出される。膵液における比較的多量の G P 2 を考慮すると、G P 2 を分泌することができる別の細胞プールが存在するという疑いがある。タンパク質分解を介して腸で活性化する消化酵素とは対照的に、G P 2 は、切断によって腺房細胞で既に修飾されている。G P 2 の細胞内の連続タンパク質分解が、その機能に影響を与えると推測される。

【0007】

急性膵炎及び慢性膵炎における G P 2 の血清レベルの増大によって、このようなエンテ

50

ィティの血清学的診断におけるマーカーとしてのG P 2の適合性に関して議論が展開されている。ラットモデルにおいて、G P 2の血清濃度が、炎症性大腸炎の重症度と相関があることが実証されている。

【0008】

ヒト細胞株では、このような関係性が未だに確立されていないことは確かであり、自己抗体によって検出可能なG P 2のレベルは、かなりの個人差を示す。

【0009】

このような欠点があるにもかかわらず、抗体反応から炎症性大腸炎の重症度を決定するために、診断法を開発するためのアプローチの多くは、G P 2に対して指向性を有する抗体の産生及び検出に頼っている。

10

【0010】

C D及び潰瘍性大腸炎(U C)の2つは、炎症性大腸炎の中でも最も重要なものである。これらは、消化系において慢性的に再発する組織破壊性炎症過程を特徴とする。今日まで、C D及びU Cの病因及び発症機序は明らかにされていない。

【0011】

U Cにおける炎症は主に、結腸及び直腸の粘膜及び粘膜下層に現れるが、C Dは胃腸管全体の壁貫通する肉芽種性の炎症過程を特徴とする。

【0012】

遺伝的要因及び環境要因が、I B Dの進行に重要な役割を果たすと考えられる。N O D 2遺伝子における突然変異と、C Dの発症との間の相関関係が、幾つかの集団で既に確立されているとされている。同様に、回腸末端でのC Dの発症にも明らかな関連性がある。今日まで、何れの治療法(抗T N F療法を含む)においても遺伝的マーカーと治療経過との間で関係性は確立されていない。

20

【0013】

欧州におけるC Dの罹患率は、毎年100000人当たりおよそ5.6人である。ドイツにおけるC Dの有病率は、その1/500~1/800であると述べられている。

【0014】

平均すると、C Dの初期症状は30歳と比較的早くに現れる。結果として、C D患者は労働生活中に罹患し、相当する社会経済的影響がある。U C等と同様に、クローン結腸炎を伴うC D患者で癌の罹患率が増大し、治療経過が何年も続く。

30

【0015】

臨床像には、腹痛、下痢、吸収不良、膿瘍、瘻孔、胆石合併症、腎結石及びこれらに関連する合併症が含まれる。

【0016】

C D患者は、腸管外で多くの兆候を示す可能性があり、3.5%を占める膵炎は、C D患者では比較的珍しい事象である。しかしながら、急性膵炎の兆候がない高アミラーゼ血症及び高リパーゼ血症を患者の8%~17%で観察することができ、このことは無症状膵炎の割合が高いことを示している。膵管での変化及び膵臓機能の制限が幾つかの症例で説明されている。高アミラーゼ血症及び高リパーゼ血症のレベルは、C Dの活性と相関がある。原発性硬化性胆管炎の患者と同様に、胆管及び膵管での同時変化が、C D患者の4.6%で見られる。しかしながら、胆管の関与、体重減少及び膵管狭窄がより頻繁に見られる場合、C D患者における慢性膵炎は通常、U Cのものとは区別される。C Dに関連する特発性慢性膵炎の存在に関して議論されている。U C関連慢性膵炎とは対照的に、C D患者における腸症状は、膵臓症状の前に現れることが多い。柔組織での深い炎症性浸潤に関連する顕著な腺房変性によって、C Dで頻発する膵外分泌機能不全が容易に起こり得る。

40

【0017】

5-アミノサリチル酸の投与が治療として推奨されているが、この活性物質には、限定効果しかないか、又は全く効果がないことから、様々な研究でかなりの欠点が指摘されている。しかしながら、入手可能データを考慮すると、効果のない事象において治療の変更を適時開始する場合に、軽度から中程度の発作患者にそれらを使用することは、かなりの

50

正当性があると思われる。合併症のない重度の発作事象では、プレドニソロン同等物の投与を考慮すべきである。さらに発作が頻発する場合は（2回/年以上）、アザチオプリン又は6-メルカプトプリンを投与することができる。

【0018】

ドイツでは、CD患者の全コストが、1年で1症例当たり20000EURになると推定される。間接的な費用を含むCD患者に対するコストは、ドイツで20億EURになると推測されるが、米国での両方のIBDに対する社会経済的なコストは、26億米ドルであると報告されている。

【0019】

抗TNF製剤は、CDに有効であり、慢性疾患の寛解を誘導する。しかしながら、これらの製剤は、その副作用のために不都合があり、このことがその使用が臨床状況に応じた予備薬剤にしかかなり得ない理由である。腸管外合併症として活性脊椎関節症のCD患者だけが、両方の臨床像で抗TNF療法の効果があると考えられる。

10

【0020】

これらの患者の十分な治療及び追跡検査には、明確な診断が必要になる。しかしながら、今までのところ明確な試験は利用不可能であり、このため必須成分として回結腸検査用の(ileocoloscopic)分節生検を伴うCDの臨床診断を使用し、また追跡検査は選択的な腸手術の前に示唆しなければならないために、明確な診断にはかなりの不都合が伴う。しかしながら、これは、その治療経過の間、又は新たな抗炎症療法前の何れの急性症候性の合併症(complex)で常に必要という訳ではない。初期診断中に各患者で、上部内視鏡診

20

【0021】

粘膜生検の非常に複雑且つ比較的成本が大きい組織学的研究は、診断の範囲内で別の重要な要素を構成している。このため、特に肉眼でも明らかな領域及び肉眼では明らかではない領域から生検を回収する。しかしながら、組織病理学的に異なる診断の潜在力を有効に利用するためには、直腸を含む、結腸全体の少なくとも5つの異なる解剖学的分節、回腸末端及び上部胃腸管から生検を回収する必要がある。

【0022】

CD患者における腸壁の炎症変化、並びに膿瘍、瘻孔及び狭窄を検出する高感度法として、画像化法に経腹的超音波を使用する。腸間膜動脈及び腸壁の両方での血流の検出可能な増大は、急性炎症の存在に関連する。小骨盤の経直腸超音波検査及び磁気共鳴断層撮影法(MRT)は、肛門直腸瘻及び膿瘍の診断及び分類における等しく高感度な方法として認識されている。

30

【0023】

明確な検査を利用することができないので、研究所でのCDの診断のために、多くのパラメータを収集する。C反応性タンパク質(CRP)、血小板、ヘモグロビン(Hb)/ヘマトクリット及び白血球の測定は、基礎的な診断となる。さらに、差分血球数及びアルブミン等の他のパラメータを使用する。多くの患者において、CDの急性期で、CRP、白血球の数及び急性期のタンパク質等の上述のパラメータが増大し、また追跡検査にも推奨されている。

40

【0024】

急性期中に、腸透過性、1-アンチトリプシンのクリアランス及び排泄物中のカルプロテクチンの排出が増大する。

【0025】

しかしながら、臨床データ及び組織データの収集では、CDとUCとを明確に区別することができない。しばしばこの欠点によって、分類不能大腸炎(IC)が定義されている。さらに、腸感染及び機能性疾患は、同様の症状を発現し、鑑別診断をより難しくし得る。結腸領域における臨床症状の幾らかの重複によって、IBD患者の10%~15%では、生検データからのUC又はCDへの分類が非常に困難である。外科的介入の後、IC患者は長期合併症であり、UC患者よりも頻繁に吻合が不十分になると考えられる。しかし

50

ながら、予後にIC患者がCD又はUCへと進行するか否かの区別は、疾患の予後及び経過、並びに薬物療法の選択、並びに外科的介入の時期にかなりの影響を与える。疾患経過中のより遅い時点で、さらなる臨床データに基づいてのみ、割り当てが頻繁に可能になる。例えば、CDとUCとの区別は、患者において回腸囊の吻合を予測することができるかを決定する際の基礎となる。このような外科的介入が、結腸の主な疾患（クローン結腸炎）のCD患者で示唆されることは稀であるが、この方法は、UCの事象ではより頻繁に示唆される。CD患者は、吻合機能不全の割合が有意に高く、このため任意の外科的介入には、熟考が必要である。

【0026】

内因性抗原及び食物抗原と反応する多くの抗体は、IBDの鑑別診断に関して記載されている。これらの抗体は、病原的役割が全くなく、且つ疾患の活性を反映しないと考えられる点で不都合である。それにもかかわらず、血清学的な抗体診断は、診断の際の重要な補助として利用され、特に分類不能大腸炎の事象における治療決定の基礎となる。

【0027】

細胞骨格タンパク質に対する自己抗体は、生検によって確認されたCD患者において説明されている（非特許文献1）。特にサイトケラチン18、アクチン、ビメンチン、デスミン及びトロポミオシンに対する自己抗体が見出されている。サイトケラチン18自己抗体は、疾患の活性に相関があることが見出されているが、おそらくはその低い特異性のために、IBD通常（routine）診断には受け入れられない。

【0028】

CD患者では、膵外分泌腺（PAK）の組織に対する自己抗体及びサッカロマイセス・セレヴィシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）（ASCA）由来のマンナンに対する抗体が、特徴的であるとして同定されている（非特許文献2、非特許文献3）。ヒト好中性顆粒球（ANCA）及び杯細胞（BAK）に対する自己抗体が主にUC患者で見出されている。

【0029】

PAK、ANCA及びASCAの測定は、ICの診断に有用であると見なされている。

【0030】

しかしながら、今日でさえ、免疫反応に関与する未知の自己抗原のために、依然として免疫蛍光技術（IFT）を使用して、膵臓組織、杯細胞及びヒト好中性顆粒球に対するIBD特異的自己抗体を測定している。このようにして、上記の技術を使用して、膵臓抗原に対する自己抗体が、CD患者の27%～39%で見出されている。腸管外合併症のCD患者の半分超（68%）がPAKを有し得る。しかしながら実際、この技術は、自動化することができず、このためコストが大きく且つ時間がかかるために不都合であることが分かっている。

【0031】

これに対して、酵素免疫測定法（EIA）においてレベルを増大して同様にCDに特異的なASCAを検出することができ、このため、この方法は評価に関してより主観的ではなく、自動化することができる。

【0032】

今日、別々の抗体測定は、CDの血清学的診断に対して感度が低すぎると見なされている。異なる抗体特異性を組合せることで、IBDの鑑別診断における診断感度又は特異性を大きく改善することができ、ICの予後診断が可能になる。

【0033】

EIA等の一般的な技術基盤は、パラメータを組合せるのに極めて有益である。しかしながら、前提条件の1つとして、異なる種の膵臓組織切片においてPAKで特異的に認識されるPAK自己抗原を知っている必要がある。

【0034】

過去には、CDにおいて自己抗原を同定するのに様々なアプローチが見られ、上述の比較的感度が高いPAKのために、膵臓抗原に注目が集まっている。様々な種（ヒト、ラッ

10

20

30

40

50

ト、サル)の組織切片を使用して、I F TによってP A Kを検出している。系統発生に関して、このことは、保存されたエピトープが、P A Kによって認識されたことを示唆している。Fricke et al.は、P A Kと反応する、分子量(m . w .)が8 0 0 k D aを超える複数のサブユニットから成るタンパク質複合体を説明している(非特許文献4)。しかしながら、Fricke et al.は、対応するタンパク質、並びに免疫ブロット法においてP A Kと反応性がある、分子量が1 6 k D a、1 8 k D a、1 9 k D a、2 4 k D a、2 7 k D a、2 9 k D a、3 1 k D a及び3 4 k D aのサブユニットのいずれもシークエンシング及びしたがって同定することができていない。P A Kによって認識されたタンパク質が、多くのサブグループを含む巨大タンパク質複合体であると推測している。様々な糖タンパク質を使用する阻害実験に基づき、P A Kと推定自己抗原の炭水化物鎖との反応性を排除している。

10

【0035】

Seibold et al.(非特許文献5)は、P A Kと、分子量が 10^6 D a(1 0 0 0 k D a)を超える、腭液から精製した高分子抗原との反応性を説明しており、トリプシンによる処理の際にそのP A K反応性がなくなる。P A Kとの反応性がないことは、アミラーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼA及びホスホリパーゼC、エンテロキナーゼ、カルボキシペプチダーゼA及びカルボキシペプチダーゼB、キモトリプシンA及びキモトリプシンB、キモトリプシノーゲン、エラスターゼ、トリプシン、トリプシンインヒビター、ラクトフェリン及びカレクレイン(callecrein)等の様々な膵臓タンパク質によるE L I S Aで求められている。

20

【0036】

多くの研究者らによれば、G P 2のレベルとI B Dの重症度とは相関があるが、生理学的背景は知られていない。ノックアウトマウスモデルで実証されているように、G P 2の非存在は、膵臓外分泌腺の分泌、及び酵素原顆粒の形成のいずれにも必須ではない。さらに、G P 2の2つの既知のアイソフォームの生理的機能は明らかにされていない(非特許文献6)。3 8 0アミノ酸長の短いアイソフォームである - G P 2の他に、5 3 0アミノ酸長の - G P 2が存在する。ヒトの膵臓組織で、両方のペプチドのアイソフォームを検出することができ、特に小さい - G P 2アイソフォームは、大きい - G P 2よりも力価がかなり高い。また、膵臓組織における両方の形態の転写産物の検出によって、 - G P 2に比べて - G P 2の発現が強いことが示されている。

30

【0037】

様々なアイソフォームの役割が明らかにされていない。大きい - G P 2アイソフォームと類似性の高い配列を有するペプチドは、膵臓腫瘍の形成に関与するといわれている。分析物質及びマーカーとしてのG P 2に対する抗体は、膵臓癌を診断するのに使用することを目的とし、膵臓の癌性疾患の免疫療法に使用するためのペプチド及びその核酸配列である(特許文献1)。小さい - G P 2アイソフォームに対する抗体は、膵炎のマーカーとしての使用が見出されている(特許文献2)。 - G P 2濃度の増大は、疾患の指標であるといえる。

【0038】

C Dの病原における自己免疫過程の状況を明らかにするために、及び適切な研究所の診断による明らかにされていないI B D症例の識別を援助するために、膵臓自己抗原(複数可)の必要な(即ち依然として見出すべきである)同定に関して、明示的な言及が為されている。

40

【0039】

ペプチドをC D特異的抗体の決定に利用する試みが、ランダム化ファージ提示ライブラリを使用して、ペプチドを得るという従来技術で知られている。E I Aで使用される場合、C D患者の血清の5 6 . 5 %で陽性検出を与えた4つの異なる九量体を測定した。対照群(U C、十二指腸潰瘍、健常)は、全く応答を示さないか、又は症例の6 %でしか応答を示さなかった。しかしながら、九量体の既知のペプチド配列からは、天然のC D自己抗原(複数可)に関する結論を導くことができなかった。

50

【 0 0 4 0 】

しかしながら、今日まで、対応する膵臓抗原（複数可）を同定することには成功していない（非特許文献7）。したがって、非侵襲的、特異的、定量的、迅速、容易且つ安価で実行可能な、クローン病及び慢性膵炎を診断し、且つ慢性膵炎を潰瘍性大腸炎と区別する検出測定法は依然として利用することができない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 4 1 】

【特許文献1】国際公開第01/94409号パンフレット、(CORIXA CORP [US]; Hirst Shannon K [US]; Harlocker Susan L [US]; Dillon) December 13, 2001 (2001-12-13) Compositions and methods for the therapy and diagnosis of pancreatic cancer. 10

【特許文献2】国際公開第96/17873号パンフレット、(Alphagene INC [US] June 13, 1996 (1996-06-13) Diagnosis of pancreatitis.

【 非特許文献 】

【 0 0 4 2 】

【非特許文献1】Mayet WJ, Press AG, Hermann E, Moll R, Manns M, Ewe K, Meyer zum Bueschenfelde KH. Antibodies to cytoskeletal proteins in patients with Crohn's disease. Eur J Clin Invest, 1990, 20: 516-524.

【非特許文献2】Stoecker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stoecker K, Jantschek G, Scriba PC. Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. Results of an autoantibody screening in patients with chronic inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol, 1987, 22 (suppl 139), 41-52. 20

【非特許文献3】Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MA, Robson D, Pennington CR, Parratt D. Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. BMJ, 1997, 315: 1105-1106.

【非特許文献4】Fricke H, Birkhofer A, Folwaczny C, Meister W, Scriba PC. Characterization of antigens from the human exocrine pancreatic tissue (Pag) relevant as target antigens for autoantibodies in Crohn's disease. Eur J Clin Invest, 1999, 29: 41-45.

【非特許文献5】Seibold F, Weber P, Jenss H, Wiedmann KH. Antibodies to a trypsin sensitive pancreatic antigen in chronic inflammatory bowel disease: specific markers for a subgroup of patients with Crohn's disease. Gut 1991, 32:1192-1197. 30

【非特許文献6】Fukuoka S-I. Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding a (large) and b (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. BBA 2000, 1491, 376-380.

【非特許文献7】Bossuyt X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. Clin Chem 2006, 52 (2): 171-181.

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 4 3 】

この課題は、本発明によって解決される。CD及び関連の慢性膵炎に対する自己抗原としてのGP2の驚くべき特徴に基づき、GP2を使用したIBDの診断又は治療制御のための請求項に記載の方法を開発した。本発明の有益な実施の形態は、従属項から推論することができる。 40

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 4 4 】

したがって、本発明は、自己免疫疾患の予防、診断、治療又はアフターケアにおいて、特に配列番号1:

【表 1】

10	20	30	40	50	60
100	110	120	130	140	150
160	170	180	190	200	210
220	230	240	250	260	270
280	290	300	310	320	330
340	350	360	370	380	390
400	410	420	430	440	450
460	470	480	490	500	510
520	530	540	550	560	570

10

による G P 2、その免疫反応性配列又は類似体との免疫反応を介して、排泄物、及び/又は体液、特に血液及び/又は血清から抗体を検出する方法に関する。本発明によれば、体液の定義には、ヒトの血液、血清、尿、純粋な膵液又は十二指腸液も含まれる。

20

【 0 0 4 5 】

G P 2 に対する自己抗体の決定、又は C D 若しくは慢性膵炎の血清学的診断における固相抗原としての E L I S A でのその使用は、従来技術では考慮されても、言及されてもいない。

【 0 0 4 6 】

本発明は、特に配列番号 1 による G P 2、又はこれをコードする核酸を、自己免疫疾患、特に炎症性大腸炎、並びにより好ましくはクローン病、慢性膵炎及び潰瘍性大腸炎の検出及び治療に使用することができるという驚くべき教示に関する。

【 0 0 4 7 】

別の態様において、本発明は、ヒトの I g A 抗体、I g M 抗体及び/又は I g G 抗体自己免疫疾患を検出する方法に関する。

30

【 0 0 4 8 】

本発明の方法の好ましい実施の形態において、G P 2 は、ヒト起源、動物起源、組換え起源又は合成起源のものである。G P 2 は、保存性が高いペプチドを表し、このため配列が、本発明の配列と機能的に類似していれば、任意の起源の G P 2 を有益に検出に使用することができる。抗原としての G P 2 と、自己抗体との高い結合親和性が維持される。

【 0 0 4 9 】

本発明の方法の別の好ましい実施の形態において、好ましくは 1 つの反応物質と標識物質との直接又は間接的な連結による免疫測定法で、自己抗体を検出する。これによって、この方法を、様々な研究所及び研究所の診断装置の性能及び要件に柔軟に適合させることができる。

40

【 0 0 5 0 】

有益な一実施の形態において、免疫測定法で I B D 特異的抗体を検出し、この抗体は、液相中に溶解して、好ましくは当業者に既知の従来のバッファー溶液で希釈して、又は不希釈の体液中で存在する。本発明によれば、排泄物試料を使用しても検出を行うことができる。

【 0 0 5 1 】

別の有益な実施の形態において、抗体の検出に免疫測定法を使用し、その抗体の末端で配列番号 1 による G P 2 抗原と固相との結合が予想される。試料溶液の添加の後に、それに含まれる患者の抗体を G P 2 抗原と結合する。続いて、例えば患者の血清又は排泄物が

50

ら得られ、G P 2 と結合する抗体を、標識試薬を使用して検出し、任意で定量する。抗原を固相に結合させるこの方法は、当業者には「直接測定法」として知られている。

【 0 0 5 2 】

したがって、本発明によれば、既知の酵素結合免疫測定 (E L I S A) 技術に従って、標識試薬を使用して、この方法で抗体の検出を行う。したがって本発明による標識には、光学的手段、特に発色基質、化学発光法又は蛍光色素によって測定することができる、化学反応を触媒する酵素が含まれる。

【 0 0 5 3 】

別の好ましい実施の形態において、得られる放射線を測定する放射免疫測定法 (R I A) において放射性の弱い物質で標識することによって、自己抗体を検出する。

10

【 0 0 5 4 】

本発明の別の好ましい実施の形態において、抗体と結合させるのに、可溶性又は固相結合 G P 2 分子を使用する。第 2 の反応工程では、好ましくは抗ヒト I g A 抗体、抗ヒト I g M 抗体及び / 又は抗ヒト I g G 抗体を含む群から選択される抗ヒト免疫グロブリンを利用し、当該抗ヒト免疫グロブリンは、任意の従来標識酵素、特に発色基質及び / 又は化学発光基質と、好ましくはホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼと複合体形成することができる二成分の検出可能に標識した複合体である。この実施の形態の利点は、研究施設で通常利用可能な E L I S A 技術の使用にあり、このため本発明に従って費用効率が高い検出を確立することができる。

【 0 0 5 5 】

20

本発明の別の好ましい実施の形態において、G P 2 と結合した抗体が、好ましくは抗ヒト I g A 抗体、抗ヒト I g M 抗体及び / 又は抗ヒト I g G 抗体を含む群から選択される抗ヒト免疫グロブリンと反応し、検出可能にフルオレセインイソチオシアネート (F I T C) と連結する。上述の E L I S A と酷似した F I T C 技術は、多くの場所で利用可能であり、したがって研究所の通常業務で本発明の検出を円滑且つ低コストで確立することができるシステムを表す。

【 0 0 5 6 】

本発明は、炎症性大腸炎を治療する方法にも関し、
 a) G P 2 が連結しているカラムを準備する工程と、
 b) 患者の血漿中で G P 2 と抗体とを効率的に結合させる条件下で患者の血漿をカラム
 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

30

【 0 0 5 7 】

上述の本発明の方法の好ましい実施の形態において、配列番号 1 による G P 2 は、腸組織に対して指向性を有する自己抗体を認識する。この実施の形態は、患者にストレスを伴わせることが多い外科的介入をすることなく、体液又は排泄物から単純に I B D の診断を行うことができるという有益な効果を有する。

【 0 0 5 8 】

本発明の別の好ましい実施の形態において、配列番号 1 による G P 2 は固相と結合する。スパーサーを介して、配列番号 1 による G P 2 と固相との結合を行うことができる。スパーサー機能に好適な構造及び機能的な前提条件を有するこれらの化合物は全て、配列番号 1 による G P 2 自己抗体の結合に悪影響を及ぼすように結合挙動を変えなければ、スパーサーとして使用することができる。

40

【 0 0 5 9 】

驚くべきことに好ましくは配列番号 1 による G P 2 抗原によって、G P 2、その免疫反応性配列又は類似体との免疫反応 (この免疫反応は、動物又はヒトの組織の組織切片を使用せずに行う) を介して、排泄物、及び / 又は体液、特に血液及び / 又は血清から自己抗体を検出することができるので、本発明の方法及び使用によって、クローン病の診断又は治療制御が可能になる。

【 0 0 6 0 】

50

上記の検出方法の好ましい変法において、反応物質と標識物質との直接又は間接的な連結を使用して、自己抗体を検出するのが好ましい。

【0061】

また本発明によれば、固相上で上記の検出方法を行うのが好ましく、この場合GP2抗原と固相との驚くべき安定性がある連結の結果として、ペプチドの貯留性(storability)が有益に増大する。

【0062】

本発明は、自己免疫疾患の予防、診断、治療及び/又はアフターケアに使用する薬剤の製造における配列番号1によるGP2分子の使用にも関する。実際、本発明による使用には、例えば生検、研究所診断及び臨床的介入に基づく、より複雑且つ信頼できない手法は多くの症例で必要ではないということ、又は上記の検出のためのこのような評価基準は、それらの実施において有意に最適化することができるという有意な効果がある。

【0063】

この方法の好ましい実施の形態において、自己免疫疾患は、炎症性大腸炎(IBD)及び/又は自己免疫肝疾患の群から選択され、GP2自己抗原を使用して、特異的に、再現可能に、且つ費用効果的に、その検出を有益に行うことができる。

【0064】

本発明の別の好ましい実施の形態において、炎症性大腸炎は、クローン病、慢性膵炎及び/又は潰瘍性大腸炎である。今日まで、上記の疾患の検出又は区別は、限られた成果又は多大な努力を伴ってのみ可能であった。ここで、上記の好ましい実施の形態では、クローン病及び慢性膵炎を容易に検出し、さらには鑑別診断によって潰瘍性大腸炎と区別することができる。

【0065】

クローン病は、慢性炎症性大腸炎の群に属する。クローン病は、胃腸管全体(即ち口腔から下は肛門まで)に現れ得る、おそらくは自己攻撃性の慢性肉芽種性炎症である。疾患(Affection)は主に、下部小腸(回腸末端、疾患の約40%)及び結腸、より珍しくは食道及び口にある。クローン病は、腸粘膜の不連続な分節性疾患(いわゆる「不連続病変(skiplesions)」)、即ちこの疾患が、健常な切片で区切られた複数の腸切片中に同時に存在し得ることを特徴とする。疾患の他の指定は、限局性腸炎、終末回腸炎、限局性全腸炎及び硬化性慢性腸炎、又は一般的用語として略語CD(クローン病)、及びIBD(炎症性大腸炎)である。したがって、本発明の意図するクローン病は、以下の肉眼的変化を特徴とする任意の状態である。

ガーデンホース現象：線維化によって引き起こされる分節性狭窄。

玉石(Cobble stone)現象：深い潰瘍と交互に粘膜が炎症を起こし、これによって玉石状の外観が生じる。

炎症性凝塊腫瘍：様々な腸切片が互いに付着する。

【0066】

組織学的には、クローン病は主に、リンパ球(好酸性)、顆粒球及び炎症を起こした腸組織の生検中で認識される組織球の集積である。通常、隣接リンパ節の大きさが増大する。頻繁には、2種類に区別することができる肉芽腫が形成される：類上皮細胞肉芽腫及び小肉芽腫(より小さく、中心壊死がない)。

【0067】

しかしながら、本発明の意図するクローン病は、診断によっても特徴付けることができる。この事象では、本発明の意図するクローン病は、以下の特性の少なくとも1つを検出することができる状態である。

虫垂炎：通常、急速に右下腹部に痛みが生じる。直腸と腋窩との測定結果の温度差が1を超えることが多い。

憩室炎：通常、左下腹部に触診可能な抵抗、痛みがある。

エルシニア症：排泄物又は生検材料からの病原体の検出、抗体力価の増大。

腸結核：今日、中欧では非常に稀である。腸結核は、肺の病変に付随して起こることが

10

20

30

40

50

多い。「チーズ質の (Cheesy)」類上細胞肉芽腫が生検材料で見られる。

任意の他の侵襲的な感染性大腸炎 (サルモネラ腸炎、偽膜性大腸炎等)。

【0068】

本発明の意図する膵炎は、急性であり得るか、又は慢性経過を取り得る膵臓の炎症である。

【0069】

膵炎は通常、器官内の膵臓酵素の活性化によって誘導される。これらの酵素の機能は、器官の自己消化を誘導するように、タンパク質及び脂肪を消化することである。自己消化によって、膵臓が炎症する。重症例では、出血、重大な組織損傷、感染及び嚢胞が展開され得る。炎症腺によって、酵素が血流に入り、それにより肺、心臓及び腎臓へと達し、さらなる損傷が起こり得る。膵臓が突然炎症を起こす場合、急性膵炎を発症しているが、その後回復する。患者によっては、何回も急性膵炎を罹患するが、毎回完全に回復することもある。急性膵炎は突然起こり、多くの合併症を引き起こす重大な生死にかかわる疾患であり得るが、これらの患者は通常急性膵炎から回復する。罹患率としては、毎年、住民 100000 人当たり約 5 人 ~ 10 人が新たに疾患を患う。

【0070】

2 種類の経過が存在する。

1. 浮腫性膵炎：周辺脂肪組織における器官の腫れ及び軽い壊死を伴う無刺激性の経過。
2. 壊死性出血性膵炎：膵臓における、及び隣接域への広範な壊死及び出血、これらは、その劇症症状の結果として、膵卒中と呼ばれることが多い。

【0071】

膵臓の形態的評価、特に浮腫性膵炎と壊死性膵炎との区別は、造影剤増強コンピュータ断層撮影法を使用すると最も上手くいく。バルサザー値 (0 点 ~ 10 点) は重症度の分類に有用であることが見出された。

【0072】

急性膵炎には幾つかの原因があり得る。最も多くは、十二指腸へと繋がる胆管の開口部 (膵管の開口部でもある) において一時的又は長期間固まる胆石である (急性膵炎の約 45%)。同様に頻繁な原因としては、慢性アルコール依存症がある (約 35%)。罹患個体の約 15% では異なる誘発要因を求めることができず、これらの場合は特発性発生と呼ばれる。さらに、以下のようなより稀な原因もある。

薬物 (例えばアスパラギナーゼ、アザチオプリン、フロセミド、グルココルチコイド、抗生物質 (テトラサイクリン、スルファメトキサゾール、トリメトプリム)、鎮痙剤 (バルプロエート、カルバマゼピン)、プロポフォール等) の副作用。

感染 (例えばおたふく風邪、コクサッキーウイルス、肝炎、HIV、巨大細胞ウイルス)。

例えば副甲状腺機能高進症における血中カルシウム値の上昇。

血中脂肪 (トリグリセリド) の強い上昇。

ERCP 中の医原性。

遺伝的：嚢胞性線維症。

【0073】

最初に、(左側から全体にかけての) 上腹部 (みぞおち) における疼痛によって、急性膵炎が明らかになり、胸部に放射線を照射すると、数日後に消失する。疼痛は活発であることが多く、また長引くこともある。疼痛は突発的で且つ激しいものであるか、又は軽度の疼痛の形で始まり、(食物を消化するのに、膵臓酵素を形成している間の膵臓刺激の結果として) 食物の消化時に悪化する可能性がある。腹部が腫れ、且つ過敏になる可能性がある。触ると痛む腹部、並びに鼓腸及び (中程度の) 防護によって引き起こされるいわゆるゴム状 (rubber) 腹部は、健康診断で特徴付けられる。同様に、胸椎下部が痛む場合がある。最初に、このような疼痛は、軽度の腰痛と同じようなものであるが、続いて背部側から腹部側の膵頭域へと「針で刺したような (being pierced)」痛みの感覚がますます進

行する。

【0074】

急性膵炎患者は通常、極めて重篤そうに見え、実際に具合が悪く感じる。他の症状としては例えば、吐気、嘔吐、便秘、発熱、脈拍の加速がある。さらに重症例では、（閉塞胆管の事象における）黄疸（jaundice）（黄疸（icterus））、（閉塞門脈系の事象における）腹水（abdominal dropsy）（腹水（ascites））、胸水、敗血症のショック及び兆候が現れる。

【0075】

研究所診断において、白血球数の増加（白血球増加症）及び膵臓酵素（例えばトリプシン、アミラーゼ、リパーゼ）の濃度の増加が検出される。また、血中のカルシウム、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、重炭酸塩、糖又は脂肪の値が増大し得る。

10

【0076】

急性膵炎症例の約20%が重症である。患者は脱水状態になり、低血圧を発症する可能性がある。心不全、肺不全又は腎不全になる場合もある。最悪の症例では急性膵炎は、出血、ショックを引き起こし、死に至る場合もある。

【0077】

現行のアトランタ分類によって、軽度の急性膵炎と重度の急性膵炎との区別が為されている。

【0078】

旧式の分類では、浮腫型（初期段階）と、局所又は全身に出血がある出血型と、急性壊死型とに分けている。

20

【0079】

慢性膵炎には多くの原因があるが、70%～80%は、慢性アルコール依存症に起因し得る。女性よりも男性の方がより頻繁に慢性膵炎が現れ、30歳～40歳で発症することが多い。病原を取り除かなければ、又は輸出管が損傷されれば、急性炎症から慢性膵炎を発症する可能性もある。

【0080】

慢性膵炎には、遺伝的原因によるものもある。これらは、膵臓によって形成され、且つ組織損傷を引き起こす酵素異常に基づく。他の疾患型は、喫煙等の外的要因によって引き起こされる。

30

【0081】

初期段階の膵炎中は、医師は、急性型が関与しているか又は慢性型が関与しているかを決定することができないことが多い。これらの症状は同じであり得る。

【0082】

慢性膵炎は、慢性的な疼痛をもたらすことが多い。慢性膵炎の症例によっては、疾患が進行するにつれて、疼痛が弱まる場合がある。また慢性膵炎は、膵臓機能不全を引き起こし、その結果体重が減少し、消化が妨げられる。不十分な消化及び吸収によって、排泄物を介して、脂肪及びタンパク質が排出される。膵臓中の内分泌細胞（ランゲルハンス島）が損傷すると、糖尿病を発症する可能性がある。

【0083】

慢性膵炎を診断するのは難しいが、幾つかの高度に発達した医療技術が利用可能である。膵臓機能の血液検査は、膵臓が依然として十分な消化酵素を産生することができるか否かを判断する助けとなり得る。しかしながら、これらの医療技術が実際に受け入れられるのは稀である。

40

【0084】

また、超音波検査、ERCP及びコンピュータ断層撮影法を使用して、膵臓の異常を認識することができる。

【0085】

また、糖尿病及び消化不良が見られる、より段階が進行した慢性膵炎では、医師は、診断のために血液、尿及び排泄物の検査を行ってもよい。

50

【 0 0 8 6 】

慢性膵炎の治療は、鎮痛剤の処方及び食事の変更を伴う。膵臓酵素を含有する薬物を摂取することによって、患者の脂肪及びタンパク質の低下を抑えることができる。この結果、栄養が改善し、体重が増加する。血糖値を制御するために、インスリン又は他の薬剤を処方することもある。

【 0 0 8 7 】

慢性膵炎の症例によっては、手術を行い、拡張及び鬱血した膵管から変性部位 (strain) を取り出すことによって疼痛を緩和することもある。

【 0 0 8 8 】

本発明の別の好ましい実施の形態において、G P 2 は、肝疾患、原発性硬化性胆管炎及び / 又は自己免疫腸炎 (enteritides) を検出するのに使用する。最も驚くべきことに、G P 2 自己抗原は、I B D の特異的検出だけでなく、様々な肝疾患の検出にも好適である。

10

【 0 0 8 9 】

本発明の意図する胆管炎は、肝内胆管の炎症を表す。胆管炎は、特に胆石、狭窄、腫瘍又は寄生虫感染症による胆管の閉塞を含む様々な原因によって誘導される可能性がある。胆管炎は、急性化膿性胆管炎と、非化膿性破壊性胆管炎と、慢性硬化性胆管炎とに区別される。

【 0 0 9 0 】

急性化膿性胆管炎：急性胆管炎は通常、細菌、主に大腸菌、エンテロコッカス (Enterococcus) 種又はクレブシエラ (Klebsiella) 種によるコロニー形成中の感染によって発症する。上腹部の片側性疼痛、発熱及び悪寒戦慄が症状として現れる。さらに、重度の化膿性胆管炎によって、ショック状態、中枢神経系の障害、及び腎機能不全が起こる。治療は、胆汁流を回復させる、胆管における内視鏡的介入 (内視鏡的逆行性胆道膵管造影法 (E R C P) 又は経皮経肝胆管ドレナージ (P T C D) 等)、及び通常抗生作用を伴う。

20

【 0 0 9 1 】

非化膿性破壊性胆管炎：この型の胆管炎は慢性経過を取り、原発性胆汁性肝硬変とも称される。罹患個体の 9 5 % は女性であり、発症ピークは、4 0 歳 ~ 6 0 歳である。診断に関して、ほとんどの患者の血中で、抗ミトコンドリア抗体 (A M A) が見られ、このため自己免疫学的発症が推測される。臨床的に患者は、掻痒、黄疸及び高コレステロール血症を特徴とする。さらなる経過中では、肝移植によってのみ患者を助けることが可能である。

30

【 0 0 9 2 】

慢性硬化性胆管炎：慢性硬化性胆管炎は、最も珍しい胆管炎症であり、原発型と二次硬化型とに分けられる。原発型は既存の遺伝的素因の存在下での感染を通じて発症して (H L A - B 8 抗原との関連性が求められている)、男性が女性の 2 倍頻繁に罹患する。症例の最大 9 0 % で、p - A N C A が見られる。二次型は、既存の免疫不全症候群に基づいて発症する。破壊性胆管炎等では、最終段階で肝移植が必要になる。

【 0 0 9 3 】

本発明の意図する自己免疫腸炎は、特に慢性炎症性大腸炎によって引き起こされる、任意の型の腸炎を含む。また、本発明の意図する自己免疫腸炎は、サルモネラ、大腸菌、コレラ若しくはチフス病原菌、又は真菌、原虫、毒性物質によって引き起こされるものだけでなく、任意のアレルギー性腸炎又は任意の型の光線性腸炎、エルシニア腸炎又は細菌性赤痢も含む。

40

【 0 0 9 4 】

本発明の別の好ましい実施の形態において、G P 2 ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 による配列と、少なくとも 6 0 %、好ましくは 7 0 %、より好ましくは 8 0 %、特に好ましくは 9 0 % の相同性を有する。即ち、本発明は、好ましくは配列番号 1 による配列と 6 0 %、7 0 %、8 0 %、特に好ましくは 9 0 % の相同性を有するペプチド全てに関する。これらの相同体は、欠失、付加、置換、転位、反転及び / 又は挿入で修飾することが

50

できることが理解されている。より具体的には、この修飾は、機能的に類似する相同ペプチドに関する。本発明の意図するところによると、ペプチドは、上述の疾患に関連する自己抗体と特異的に相互作用する場合、機能的に類似している。

【0095】

したがって、本発明は、開示のペプチド、及び機能的に類似して使用することができる相同体に関する。相同体/機能的類似体に関して、ポリペプチドを実質的に変更せず、付加、欠失又は置換による修飾を行うことができることは、当業者に理解されている。修飾アミノ酸配列は、本質的に同じ方法で、配列番号1による配列と同じ機能を達成し、同じ結果が得られれば、実質的に変更されていない。

【0096】

例えば、機能的に類似したペプチドは、配列番号2

【表2】

MPHLMERMVGSGLLWLAIVSCLTQASAVQRYGNPIEASSYGLDLDCCAPGTPEAHVCF
DPCQNYTLDEPFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGGGVRMSETCVQVHRCQTDAP
MWINGTHPALGDGITHIACAIWVSGNCCPWKTEVLVKACPGGYHYRLEGTPVWNLRYC
TVPRKDPSTVEDKCKEACRPEEECLAINSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPCDCCGPREIKVYK
VIXKLLGLGLGEEVIAYLRDPNCSIIQTEERNWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSL
VNDFIIRDITLINFQCAYPELDMKVSLOAALQPIVSSI NVSVQNGGEFIVRMALFCQDQNYNP
YEGDAVELSVESVLYVGAILEEQSDTSRFNLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDS
TIHVEENGQSSESRSFVQMFMFAGHYDLVFLHCEHLCDSLNECCGPPSCRSQRSEVPAI
DLARVLDLGPITRRGAQSPGVAMNGTPTSTAGFLVAVWPMVLLTVLLAWLF

10

【0097】

又は配列番号3

【表3】

MPHLMERMVGSGLLWLAIVSCLTQASAVQRYGNPIEASSYGLDLDCCAPGTPEAHVCF
DPCQNYTLDEPFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGGGVRMSETCVQVHRCQTDAP
MWINGTHPALGDGITHIACAIWVSGNCCPWKTEVLVKACPGGYHYRLEGTPVWNLRYC
TVPRKDPSTVEDKCKEACRPEEECLAINSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPCDCCGPREIKVYK
VIXKLLGLGLGEEVIAYLRDPNCSIIQTEERNWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSL
VNDFIIRDITLINFQCAYPELDMKVSLOAALQPIVSSI NVSVQNGGEFIVRMALFCQDQNYNP
YEGDAVELSVESVLYVGAILEEQSDTSRFNLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDS
TIHVEENGQSSESRSFVQMFMFAGHYDLVFLHCEHLCDSLNECCGPPSCRSQRSEVPAI
DLARVLDLGPITRRGAQSPGVAMNGTPTSTAGFLVAVWPMVLLTVLLAWLF

20

【0098】

又は配列番号4

【表4】

MPHLMERMVGSGLLWLAIVSCLTQASAVQRYGNPIEASSYGLDLDCCAPGTPEAHVCF
DPCQNYTLDEPFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGGGVRMSETCVQVHRCQTDAP
MWINGTHPALGDGITHIACAIWVSGNCCPWKTEVLVKACPGGYHYRLEGTPVWNLRYC
TVPRKDPSTVEDKCKEACRPEEECLAINSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPCDCCGPREIKVYK
VIXKLLGLGLGEEVIAYLRDPNCSIIQTEERNWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSL
VNDFIIRDITLINFQCAYPELDMKVSLOAALQPIVSSI NVSVQNGGEFIVRMALFCQDQNYNP
YEGDAVELSVESVLYVGAILEEQSDTSRFNLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDS
TIHVEENGQSSESRSFVQMFMFAGHYDLVFLHCEHLCDSLNECCGPPSCRSQRSEVPAI
DLARVLDLGPITRRGAQSPGVAMNGTPTSTAGFLVAVWPMVLLTVLLAWLF

30

【0099】

又は配列番号5

【表5】

MPHLMERMVGSGLLWLAIVSCLTQASAVQRYGNPIEASSYGLDLDCCAPGTPEAHVCF
DPCQNYTLDEPFRSTENSAGSQGCDKNMSGWYRFVGGGVRMSETCVQVHRCQTDAP
MWINGTHPALGDGITHIACAIWVSGNCCPWKTEVLVKACPGGYHYRLEGTPVWNLRYC
TVPRKDPSTVEDKCKEACRPEEECLAINSTWGCFCRQDLNSSDVHSLQPCDCCGPREIKVYK
VIXKLLGLGLGEEVIAYLRDPNCSIIQTEERNWVSVTSPVQASACRNILERNQTHAIYKNTLSL
VNDFIIRDITLINFQCAYPELDMKVSLOAALQPIVSSI NVSVQNGGEFIVRMALFCQDQNYNP
YEGDAVELSVESVLYVGAILEEQSDTSRFNLVLRNCYATPTEDKADLVKYFIIRNSCSNQRDS
TIHVEENGQSSESRSFVQMFMFAGHYDLVFLHCEHLCDSLNECCGPPSCRSQRSEVPAI
DLARVLDLGPITRRGAQSPGVAMNGTPTSTAGFLVAVWPMVLLTVLLAWLF

40

であり得る。

【0100】

より具体的には、上記で特定した免疫疾患の診断のために、上述のペプチドを特許請求する。上述の配列は、本質的に同じ方法で本質的に同じ機能を達成し、且つ配列番号1と本質的に同じ結果を与える。したがって、上述の配列は、本発明による教示、即ち特に炎症性大腸炎の予防、診断、治療及び/又はアフターケアにおける薬物としてのGP2分子の使用によってカバーされる。

50

【 0 1 0 1 】

結果として、本発明の意図するアミノ酸配列、即ちペプチドは、多くの付加的なアミノ酸、スペーサー、又は自己抗体との相互作用に関して好適にさせる他の構築物を、好ましくはこれらが自己抗体に対するエピトープを表すような方法で含み得る。したがって、本発明の配列は、抗体エピトープに関連するペプチドに限定されず、それどころか炎症性大腸炎の診断が可能であるような方法で、自己抗体と特異的に相互作用する分子及びその全ての断片を表す。したがって、本発明の意図するところによると、用語エピトープ、ペプチド及びアミノ酸配列を、好ましい実施の形態で同義的に使用することができる。

【 0 1 0 2 】

機能的に類似したペプチドを調製する様々な方法が従来技術に開示されている。このよ
10
うな方法を使用して、本発明のペプチドを基として設計したペプチドは、本発明による教示に含まれる。例えば、機能的に類似したペプチドを生成する1つの方法は、PNAS USA 1998, Oct. 13, 9521, 12179-84、国際公開第99/6293号パンフレット及び/又は国際公開第02/38592号パンフレットに記載されており、上記の教示は本発明の開示に援用される。即ち、本発明のペプチドを基にして上述の方法を使用して生成した、ペプチド、ペプチド断片、又はペプチドを含む構造物は全て、本発明の目的を達成しさえすれば、特に病原性自己抗体と相互作用しさえすれば本発明のペプチドである。例えば、これらの自己抗体は、受容体を活性化するアゴニスト自己抗体であり得る。

【 0 1 0 3 】

本発明の別の好ましい実施の形態において、分子は、
20
-アミノカルボン酸、並びにそのホモオリゴマー及びヘテロオリゴマー、
、
-アミノカルボン酸及びその分岐ホモオリゴマー又はヘテロオリゴマー；他のアミノ酸、並びに直鎖及び分岐ホモオリゴマー又はヘテロオリゴマー；アミノ-オリゴアルコキシアルキルアミン；マレインイミドカルボン酸誘導体；アルキルアミンのオリゴマー；4-アルキルフェニル誘導体；4-オリゴアルコキシフェニル誘導体又は4-オリゴアルコキシフェノキシ誘導体；4-オリゴアルキルメルカプトフェニル誘導体又は4-オリゴアルキルメルカプトフェノキシ誘導体；4-オリゴアルキルアミノフェニル誘導体又は4-オリゴアルキルアミノフェノキシ誘導体；4-
30
(オリゴアルキルベンジル)フェニル誘導体又は4-(オリゴアルキルベンジル)フェノキシ誘導体、並びに4-(オリゴアルコキシベンジル)フェニル誘導体又は4-(オリゴアルコキシベンジル)フェノキシ誘導体；トリチル誘導体；ベンジルオキシアリアル誘導体又はベンジルオキシアルキル誘導体；キサンテン-3-イルオキシアルキル誘導体；
- (4-アルキルフェニル)アルカン酸誘導体又は
- (4-アルキルフェノキシ)アルカン酸誘導体；オリゴアルキルフェノキシアルキル誘導体又はオリゴアルコキシフェノキシアルキル誘導体；カルバミン酸誘導体；アミン；トリアルキルシリル誘導体又はジアルキルアルコキシシリル誘導体；アルキル誘導体又はアリアル誘導体又はそれらの組合せの群から選択されるリンカー又はスペーサーを含む。

【 0 1 0 4 】

本発明の別の好ましい実施の形態において、排泄物、及び/又は体液、特に血液及び/
40
又は血清における直接若しくは間接的な自己抗体検出のための可溶性自己抗原又は固相結合自己抗原としてGP2分子を使用し、この場合配列番号1によるGP2分子の使用が特に有益であることが見出された。

【 0 1 0 5 】

本発明の別の好ましい実施の形態において、本願による配列、又はそれから生成することが
50
できるペプチドを固定化する。より具体的には、固相結合した配列番号1によるGP2分子を、有機ポリマー、無機ポリマー、合成ポリマー及び/又は混合ポリマー、好ましくはアガロース、セルロース、シリカゲル、ポリアミド及び/又はポリビニルアルコールに結合させる。本発明の意図するところによると、固定化は、例えば国際公開第99/56126号パンフレット又は国際公開第02/26292号パンフレットに従って、特定の担体上にペプチドを固定する様々な方法及び技法を伴うことが理解される。例えば、固定化は、特に保存中若しくは単一バッチ用途における生物学的曝露、化学的曝露又は物理

的曝露によって、ペプチドの活性を低減又は逆修飾しないようにペプチドを安定化することに役立ち得る。ペプチドの固定化は、技術的又は臨床的に通常の条件下で繰り返し使用することができ、さらに試料、好ましくは血液成分を本発明によるペプチドの少なくとも1つと連続して反応させることができる。特に、ペプチドと、他のペプチド若しくは分子又は担体との結合を伴う様々な固定化技法によって、これを達成することができ、対応する分子(具体的に当該ペプチド)の(特に自己抗体との相互作用を媒介する活性中心における)三次元構造を変更しないような方法で進められる。有益には、このような固定化の結果として患者の自己抗体に対する特異性は失われない。本発明の意図するところによると、固定化には3つの基礎的な方法を使用することができる。

(i) 架橋：架橋では、それらの活性に悪影響を与えることなく、ペプチドを互いに固定する。有益には、このような架橋の結果として、ペプチドは可溶性ではなくなる。

(ii) 担体との結合：例えば担体との結合は、吸着、イオン結合又は共有結合を介して進行する。このような結合は、微生物細胞又はリボソーム又は他の膜性の閉構造若しくは開構造内で行ってもよい。有益には、ペプチドは、このような固定によっては悪影響を受けない。例えば、担体結合ペプチドは、臨床的診断又は治療で有利に複合使用又は連続使用することが可能である。

(iii) 封入：特に本発明の意図する封入は、ゲル、原線維又は線維の形態の半透膜で進行する。有益には、自己抗体又はその断片との相互作用が依然として可能なように、半透膜によって周囲試料溶液から封入ペプチドを分離する。不活性化又は帯電した無機担体若しくは有機担体上での吸着のような様々な方法が固定化に利用可能である。例えば、このような担体は、多孔質ゲル、酸化アルミニウム、ベントナイト、アガロース、でんぷん、ナイロン又はポリアクリルアミドであり得る。固定化は、しばしば疎水性相互作用及びイオン結合を伴って、物理的結合力を介して進行する。有益には、このような方法は取扱いが容易であり、ペプチドの立体配座にほとんど影響を与えない。有益には、例えばイオン交換樹脂、特にSephadexによって、ペプチドの荷電群と担体との間の静電結合力の結果として、結合を改善することができる。

【0106】

別の方法は、担体材料との共有結合である。さらに、担体は、アミノ酸側鎖との等極結合を形成する反応基を有し得る。ペプチドにおける好適な基は、カルボキシ基、ヒドロキシ基及びスルフィド基、並びに具体的にリシンの末端アミノ基である。芳香族基は、ジアゾカップリングの可能性を与える。シランによる処理によって、顕微鏡的な多孔質ガラス粒子の表面を活性化することができ、続いてペプチドと反応させる。例えば、プロモシアノゲンで、天然ポリマーのヒドロキシ基を活性化し、続いてペプチドと連結することができる。有益には、多数のペプチドをポリアクリルアミド樹脂と直接共有結合することができる。三次元ネットワークにおける封入は、イオンチャンネル型ゲル又は当業者に既知の他の構造におけるペプチドの封入を含む。より具体的には、マトリクスの孔は、天然であるので、ペプチドを維持することができ、標的分子との相互作用が可能になる。架橋において、二官能性物質との架橋によって、ペプチドをポリマー凝集体に変換する。このような構造物は、ゼラチン状で容易に変型可能であり、特に様々な反応器での使用に適している。架橋において、ゼラチン等の他の不活性成分を添加することによって、機械的特性及び結合特性の有益な改良が可能になる。微小封入において、膜によってペプチドの反応量が制限される。例えば、界面重合の形態で微小封入を行うことができる。微小封入中の固定化によって、ペプチドが、不溶性及びしたがって再利用可能になる。本発明の意図するところによると、固定化ペプチドは、その再利用を可能にする条件下にあるこれらのペプチド全てである。化学的手段、生物学的手段又は物理的手段によってペプチドの運動性及び可溶性を制限することによって、特に血液成分から自己抗体を取り除く際、プロセスのコストが有益に少なくなる。

【0107】

本発明の別の好ましい実施の形態において、可溶性又は固相結合した、配列番号1によるGP2分子の他に、プロテインA、プロテインG、抗ヒト免疫グロブリン又はL-トリ

10

20

30

40

50

プトファンを含む群から選択される非特異的な吸着分子を利用する。

【0108】

本発明の別の好ましい実施の形態において、配列番号1によるGP2分子が、
a) 配列番号1によるGP2分子と機能的に類似するのに、配列番号1によるGP2分子と十分な相同性があるアミノ酸配列を有する分子と、
b) a)の分子であって、欠失、付加、置換、転位、反転及び/又は挿入によって修飾し、且つa)の分子と機能的に類似する、a)の分子とを含む群から選択される。

【0109】

驚くべきことに、相同的且つ修飾された、配列番号1によるGP2分子の使用は、多くの利点に係する。実際、b)による変化は、安定性が増大した分子を得ることを可能にし、これによって研究所の日常の通常業務における利点をもたらされることが見出された。

10

【0110】

本発明の別の好ましい実施の形態において、b)で特定した分子が、a)で特定した分子と少なくとも40%の相同性がある。研究所の日常の通常業務において、当該40%の相同性には、概してa)による分子よりも長く保存可能であるだけでなく、温度変動に対する許容が増大するという驚くべき効果がある。

【0111】

本発明の別の好ましい実施の形態において、b)で特定した分子が、a)で特定した分子と少なくとも60%、好ましくは70%、より好ましくは80%、特に好ましくは90%の相同性がある。b)による分子全てに関して、この変異体の利点は、保存寿命が最も長いという十分驚くべき特性である。

20

【0112】

本発明の別の好ましい実施の形態において、配列番号1によるGP2分子が直鎖形態、又は2つのシステインが存在する場合、ジスルフィド架橋を介してペプチド環化を進行させて、若しくは任意で側鎖、末端のC及びNを介して進行するアミド環化によって、若しくはこれらの可能な方法の組合せによって、環状形態で存在する。上述の方法では、GP2分子のこの変異体は、様々な変性バッファの存在下でGP2分子の安定性を増大させることができる。

【0113】

別の態様において、本発明は、炎症性大腸炎、特にクローン病、慢性膵炎及び/又は潰瘍性大腸炎の治療用のGP2が連結しているカラムの製造における配列番号1によるGP2の使用であって、当該治療が、患者の血漿中でGP2と免疫グロブリンとを効率的に結合させる条件を選択して、患者の血漿をカラムに通し、それにより患者の血漿から有意量の免疫グロブリンを取り出す、通すこと、及びこのようにして得られた血漿を患者に戻すことを含む、配列番号1によるGP2の使用に関する。上記の使用には、急性症例において、IBD患者の血液から極めて迅速に免疫グロブリンを取り出すことができるという有益な効果がある。

30

【0114】

別の態様において、GP2、その免疫反応性配列又は類似体に対する免疫反応に関連する疾患の診断又は治療制御に使用する薬物の製造における、GP2、その免疫反応性配列又は類似体を使用する免疫原に関する。また驚くべきことに、上記のGP2の配列によって、医師の指示に従って患者に摂取又は使用され得る取扱いが容易な薬剤の製造が可能になり、このため入院治療が必要なくなる。

40

【0115】

好ましい実施の形態において、本発明は、慢性炎症性疾患又は自己免疫疾患、特にクローン病、慢性膵炎及び/又は潰瘍性大腸炎等の炎症性大腸炎の診断又は治療制御における上述の免疫原の使用に関する。この実施の形態の利点は、コンピテンスの診断及び治療センターにアクセスすることがほとんどない自己免疫炎症性大腸炎の患者でさえも、取扱いが容易な薬剤を得て、主治医の管理の下で使用することができることである。

50

【0116】

好ましくは、本願のG P 2の配列番号1、その免疫反応性配列、類似体又は断片を、薬剤の製造における治療的に活性のある物質として使用し、これらの物質に対する免疫反応に関連する疾患の経口療法に適用する。本発明の意図する治療的に活性のある物質としての使用は、医療分野全体で治療的に活性のある物質から生成することができるアミノ酸配列又はペプチドの使用を示唆する。有益には、G P 2は、十分に安定で、且つ吸収性のペプチドであり、このため薬剤として経口経路でも患者に投与することができる。

【0117】

本発明は、慢性炎症性疾患又は自己免疫疾患、特にクローン病、慢性膵炎及び/又は潰瘍性大腸炎等の炎症性大腸炎の治療のために、任意で薬学的に許容可能な担体と共に、配列番号1によるG P 2分子を少なくとも1つ含む薬学的組成物にも関する。

10

【0118】

特に、薬学的組成物を薬物として使用することができる。このため例えば、内因性のペプチド分解構造物、例えば血清プロテアーゼによる破壊を防ぐように、環化又は当業者に既知の他の手法によって、ペプチド又はアミノ酸配列全体を修飾することができる。本発明によるペプチド又はタンパク質(配列番号1)を使用することによって、自己抗体の*in vivo*又は*ex vivo*中和が可能になる。*in vivo*中和では、薬物を患者に直接投与し、*ex vivo*中和では、例えば管循環形態で、例えばループを介して血液を体外へと導き、続いて薬物と接触させた後、自己抗体を中和して、生物体、即ち患者に戻す。治療目的及び予防目的の組成物、並びに診断剤として有用な薬学的組成物が、本発明の意図する薬物と見なされる。

20

【0119】

本発明によれば、本明細書で同義的に使用する薬物又は薬学的組成物は、ヒトの身体の上で、又はヒトの体内で適用することによって、疾患、病気、身体的欠陥又は病理学的罹患を治療、緩和又は回避することを目的とする物質及び物質の製剤である。本発明によれば、医療用補助剤は、薬物の製造における活性成分として使用する物質である。薬学分野の補助剤は、薬物又は薬学的組成物を好適に配合するのに有用であり、その後必要に応じて製造過程でのみ取り出すことができるか、又は薬学的に耐容性がある担体として薬学的組成物の一部になり得る。薬学的に耐容性がある担体の例は以下に挙げられる。薬物製剤又は薬学的組成物の製剤は任意で、薬学的に耐容性がある担体及び/又は希釈剤と併用する。好適な薬学的に耐容性がある担体の例は、当業者に既知であり、例えばリン酸緩衝生理食塩水、水、油/水エマルション等のエマルション、様々な種類の洗浄剤、滅菌溶液等を含む。このような担体を含む薬物又は薬学的組成物は、既知の従来方法によって配合することができる。これらの薬物又は薬学的組成物は、好適な用量、例えば1日に患者1人当たり1 μg ~ 10 gの範囲のペプチド又はタンパク質で個体に投与することができる。1 mg ~ 1 gの用量が好ましい。回数が少なく、且つ可能な限り少ない用量、好ましくは単回用量の投与が好ましい。様々な経路、例えば静脈内、腹腔内、直腸内、胃腸内、結節内、筋肉内、局所だけでなく、皮下、皮内若しくは皮膚上、又は粘膜を介しても投与を行うことができる。本発明のペプチドをコードする核酸の投与は、例えばウイルスベクターを介して遺伝子療法で行うこともできる。臨床的な要素に従って担当医が、投与の用量及び経路の種類を決定することができる。当業者に知られているように、用量の種類は、大きさ、身体表面、年齢、性別、又は患者の一般的な健康状態等の様々な要素だけでなく、投与する特定の作用物質、投与の時期及び種類、及び並行して投与する可能性がある他の薬剤にも応じて変わる。また当業者は、薬物の要求濃度を決定するために、本発明のペプチドを使用して、初めに自己抗体の濃度を診断することができることも知っている。

30

40

【0120】

より具体的には、薬学的組成物又は薬物は、好適な溶液又は投与形態で、1つ又は複数の本発明のペプチド又はタンパク質、及び/又はこれをコードする核酸分子が含まれる薬理的物質を含む。その投与は、単独で、或いは薬物若しくは薬学的組成物に関連して記

50

載した適切な補助剤と共に、或いは1つ又は複数の補助剤（例えばQS-21、GPI-0100又は他のサポニン、モンタニド補助剤等の水-油エマルジョン、ポリリシン、ポリアルギニン化合物、CpG等のDNA化合物、デトックス、チフスワクチン又はBCGワクチン等の微生物ワクチン、リン酸カルシウム等の塩、及び/又は効果を高める他の好適な材料、好ましくはインターロイキン、例えばIL-2、IL-12、IL-4等の免疫刺激性分子及び/又はGM-CSF等の成長因子）と併用して行うことができる。これらは、既知の方法に従って、本発明のペプチド又は認識分子と混合し、好適な配合及び用量で投与する。配合、用量及び好適な成分は当業者に既知である。

【0121】

また薬学的組成物又は薬物が、2つ以上の本発明の薬学的組成物又は薬物の組合せ、及び同時又は別々に適時好適に投与又は適用される他の薬物との組合せ（抗体療法、化学療法又は放射線療法等）であり得るのは明らかである。薬物又は薬学的組成物の製造は、それ自体が既知の方法に従って進行する。

10

【0122】

本発明の好ましい実施の形態で想定されるように、医薬品の薬学的担体は、充填剤、崩壊剤、結合剤、保湿剤、希釈剤、溶解遅延剤、吸収促進剤、湿潤剤、吸収剤及び/又は滑剤を含む群から選択される。驚くべきことは、実際有益なことに、多数の薬学的担体がGP2に適しており、このため投与形態の薬物を患者の要望に大部分適合することができることを見出された。

【0123】

本発明は、配列番号1によるGP2分子を含む、自己免疫疾患を判断する診断キットにも関する。診断キットは、任意でキットの内容物の組合せに関する、及び/又は炎症性大腸炎、特にクローン病、慢性膵炎及び/又は潰瘍性大腸炎の検出のための配合を与える取扱説明書を含む。例えば、取扱説明書は、取扱説明書冊子、又は言及した物質が使用される方法の種類に関する情報を使用者に与える他の媒体の形であり得る。情報は、必ずしも取扱説明書冊子の形である必要がないことは明らかであり、例えばインターネットを介して情報が与えられてもよい。患者に対する、このようなキットの1つの有益な効果は、例えば医師が直接対処することなく、旅行中であっても、患者が実際の疾患状態を判断し、したがって任意で食事及び活動を適合させることができることである。

20

【0124】

本発明は、炎症性大腸炎、特にクローン病、慢性膵炎及び/又は潰瘍性大腸炎の治療用の配列番号1によるGP2分子を含む、クロマトグラフィ、特にアフエレーシス療法用の装置にも関する。原則として、急性炎症の従来の治療は、薬物治療を使用した、できる限り迅速な腸炎症の制御を想定している。本発明によるクロマトグラフィ装置の利点は、患者に薬物を投与する必要はないが、代わりに薬物相互作用及び器官の損傷の危険性を伴わずにアフエレーシスカラム上で、抗体由来の患者の血液を精製し、それにより炎症の中心からの拡大が妨げられることである。

30

【0125】

好ましい実施の形態において、配列番号1によるGP2分子は、クロマトグラフィシステム内の固相に結合する。GP2分子は、自己抗体に対して驚くほど高い親和性を有しており、固相上で良好な固定化を示し、そのため本発明の装置を、患者の体液から自己抗体を取り除くのに、又は自己抗体を中和するのに使用することができる。この方法は、免疫吸着療法及びアフエレーシス療法という用語で当業者に既知である。免疫吸着法を用いて、患者の血液から免疫グロブリンを取り出す。

40

【0126】

有益には、入院治療及び通院治療として、この免疫吸着治療を行うことができる。装置、特にいわゆる吸着装置は、体外血液循環部分であると想定することができる。このため、患者の主な血管、特に腕静脈から血液を連続又は不連続的に採取し、濾過又は遠心分離を使用して、細胞性成分及び体液性成分等の単一成分に分離する。特に、このようにして得られた1つの必須血液成分は血漿である。有益には、血漿を本発明の装置に流した後、

50

自己抗体を吸着させ、前に分離した血液成分、具体的に細胞性成分と共に、特に腕又は脚の別の静脈を通して患者に戻すことができる。ペプチドをセファロースマトリクス上に固定化することも想定することができる。マトリクスは、容量が10ml～400mlのコンテナに入れることができる。その後、患者の血漿を、自己抗体が結合するマトリクス上に流すことができ、これにより血漿から自己抗体を取り除くことが可能になる。

【0127】

当業者は、例えば、(i)再生可能な吸着カラム、(ii)二重カラム及び(iii)使い捨てカラムの形態でこのような固相固定ペプチドを与える様々な方法を知っている。通常試験を使用することで当業者は、処理の効率を高くする多様な洗浄溶液及び溶離溶液を容易に求めることができる。本発明による教示、特に本発明のペプチドを与えること
10

【0128】

本願による教示は、以下の特性に関して注目に値する。

従来技術からの脱却

課題の新たな領域

本発明で解決される課題の解決のための長く満たされていない緊急の必要性の存在

これまでの当該技術分野の徒労

解決策が単純であることが発明につながる活性を示す(特にこの解決策がより複雑な教
20

示に取って代わっているため)

科学技術の発展が、異なる方向性に進んでいる

発展を合理化することの達成

論争中の課題の解決に対する当該技術分野の誤った考え(先入観)

技術的進歩、例えば改良、性能向上、経費削減、獲得が困難な時間、材料、作業工程、コスト、又は未処理材料の節約、信頼性の向上、欠陥除去、優れた品質、自由なメンテナンス、効率上昇、収率増大、技術範囲の拡大、さらなる手段の供給、第2のアプローチの作製、新たな分野の創造、初めての課題解決、予備手段、代替法、合理化の範囲、自動化若しくは小型化、又は利用可能な薬物範囲の充実

幸運に恵まれた選択(様々な可能性の中から選択しており、その結果は予想可能なもの
30

ではなかったが、特許性のある幸運に恵まれた選択となっている)

従来技術文献における誤り

未発達な(Young)技術分野

組合せ発明、即ち驚くべき効果を達成するように、幾つかの既知の要素を組合せている

ライセンスの問題

当該技術分野での賞賛

経済的な成功

【0129】

特にこれらの特性は、本発明の好ましい実施形態に当てはまる。

【0130】

限定を意図せずに、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0131】

方法

ラットの脾臓からのGP2の精製

酵素原顆粒(ZG)の獲得及びZG膜の精製

以下の作業工程は全て、氷浴中、又は4℃に冷やしながら行った。4匹の成長ウイスターラットの脾臓(約2.4gの組織)を機械的に大きさを削減し、ポッターホモジナイザにおいて、10倍量の氷冷した0.3Mのサッカロース溶液に漬けた(1000rpmで
50

2回及び1300rpmで2回)。その後、浸漬材料をガーゼ布で濾過した。500gで10分間の遠心分離によって、細胞塊及び核を取り出した。3000gで10分の遠心分離を用いて、酵素原顆粒(下部の白色固体ペレット)及びミトコンドリア(上部の淡く褐色がかったペレット)を上清から沈降させた。ミトコンドリアをバッファーA(10mMのモルフォリノプロパンスルホン酸(MOPS)、pH6.8)で慎重に洗い流し、ボルテックスミキサー(vortexer)を使用して、2mlの0.1M炭酸ナトリウム溶液、1mMフルオロリン酸ジイソプロピル(DFP)中で酵素原顆粒を再懸濁した。顆粒を氷浴中で1時間溶解した。不連続なサッカロース勾配(0.3M/1M)で溶解バッチを層状にし、20000gで90分間遠心分離した。密度境界面におけるバンドとして、膜画分が集積した。バンドを吸い出し、得られた溶液を0.3M臭化ナトリウムに調整した。20000gで60分の遠心分離によって、膜を堆積させた。

10

【0132】

GP2の可溶化

超音波を用いて、得られた膜ペレットを、0.5mlのバッファーB(20mMモルホリノエタンスルホン酸(MES)、pH7.0、80mM KCl、45g/mlサポニン)中に再懸濁した後、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼC(セレウス菌)を添加し、37℃で1時間のインキュベーションによって、GP2を膜から取り出した。遠心分離(20000g、60分)によって膜をペレット化し、限外濾過を用いて、可溶性GP2を含む上清を約1:5に濃縮した。

20

【0133】

GP2抗体を求めるための酵素結合免疫測定法(ELISA)

マイクロタイタープレート(Maxisorb, Nunc, Roskilde)を、10µg/mlのラットGP2のコーティングバッファー溶液(100mM炭酸Na、pH9.6)で、50µl/ウェル、4℃で一晩コーティングした。洗浄バッファー(10mMリン酸Na、150mM NaCl、0.1% Tween 20、pH7.4)でマイクロタイタープレートを洗浄した後、室温(RT)で30分間、ウェルを300µlの遮断溶液(洗浄バッファー、1%ウシ血清アルブミン(BSA)、pH7.4)とインキュベートした。その後、洗浄バッファーでウェルを3回洗浄し、希釈バッファー(10mMリン酸Na、150mM NaCl、1%RSA)中で100倍希釈した、1つのウェル当たり50µlのヒト血清試料を室温で60分間、インキュベートした。希釈バッファーで3回洗浄した後、ウェルに、50µlの共役溶液(抗ヒトIgGペルオキシダーゼ、ヒツジ、1µg/ml、希釈バッファー)を入れ、室温で30分間、インキュベートした。その後、ウェルをさらに3回洗浄し、1つのウェル当たり50µlの基質溶液(テトラメチルベンジジン)を分注した。室温で10分インキュベートした後、50µlのクエンチング溶液(0.3M硫酸)を添加することによって基質反応を終わらせた。マイクロタイタープレート光度計を用いて、450nm及び620nmで二重に(bichromatically)、各ウェル中の溶液の光学密度を測定した後、EIAstarソフトウェアプログラムを使用して、コンピュータに基づき評価した。

30

【0134】

膵臓抗原抗体を求めるための間接的免疫蛍光法(IIF)

市販のサル膵臓切片(Euroimmun, Lubeck)を使用して、IIFによって膵臓抗原抗体を求めた。血清試料を希釈バッファーで40倍、80倍及び160倍に希釈した。試薬支持体のそれぞれの反応パッド上に、25µlの希釈血清をピペティングし、組織切片を有する顕微鏡スライドを室温で30分間、インキュベートした。その後、スライドをリン酸バッファーで1分間洗浄した。20µlの標識抗血清(抗ヒトIgG FITC)を、洗浄した試薬支持体のそれぞれのパッド上でピペティングし、室温で30分間、スライド上で組織切片とインキュベートした。もう1回、リン酸バッファーで1分間洗浄した後、封入剤を用いて、スライド上にカバーガラスを置いた。蛍光顕微鏡を用いて、蛍光評価を行った。

40

【配列表】

50

0005603083000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I
A 6 1 K 35/14	(2006.01)	A 6 1 K 35/14
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 1/18	(2006.01)	A 6 1 P 1/18
C 0 7 K 16/06	(2006.01)	C 0 7 K 16/06

(72)発明者 ロッゲンブック, ダーク
ドイツ, 1 5 8 2 7 ダーレビッツ, 3 ルードヴィヒ エアハルト リング

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第96/017873(WO, A1)
米国特許第05663315(US, A)
国際公開第2006/022643(WO, A1)
米国特許出願公開第2002/0082207(US, A1)
PEETER M, AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, 米国, 2001年 3月 1日, V96 N3,
P730-734
Xavier Bossuyt, Serologic Markers in Inflammatory Bowel Disease, Clinical Chemistry,
2006年, Vol.52, No.2, Page.171-181

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
A 6 1 P 1 / 1 6
A 6 1 P 1 / 1 8
A 6 1 P 2 9 / 0 0
A 6 1 P 3 7 / 0 6
C 1 2 M 1 / 3 4
C 0 7 K 1 6 / 0 6
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	用于炎症性肠病和慢性胰腺炎的诊断，通过与胰腺酶颗粒衍生的糖蛋白2 (GP 2) 的免疫反应检测体液抗体的方法		
公开(公告)号	JP5603083B2	公开(公告)日	2014-10-08
申请号	JP2009546652	申请日	2008-01-28
申请(专利权)人(译)	GEA通用Asseizu有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	GEA通用Asseizu有限公司		
[标]发明人	ロッケンブックダーク		
发明人	ロッケンブック,ダーク		
IPC分类号	C07K14/47 C12M1/34 G01N33/53 A61P1/04 A61P29/00 A61K35/14 A61P37/06 A61P1/16 A61P1/18 C07K16/06 A61K35/16		
CPC分类号	A61K35/16 A61K38/00 A61K38/1709 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P29/00 B01D15/00 B01D15/3809 B01J20/3242 C07K14/4733 G01N33/564 G01N2800/065 G01N2800/067		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C12M1/34.F G01N33/53.N A61P1/04 A61P29/00 A61K35/14 A61P37/06 A61P1/16 A61P1/18 C07K16/06		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	2007090010 2007-01-26 EP 102007004909 2007-01-26 DE		
其他公开文献	JP2010519180A5 JP2010519180A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种通过与胰腺酶原颗粒，免疫反应性序列或其类似物（不包括组织切片）的GP2免疫反应来检测体液抗体的方法。