

(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2008-517261

(P2008-517261A)

(43) 公表日 平成20年5月22日(2008.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4 B O 2 4
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-536221 (P2007-536221)	(71) 出願人	507123785 ユニヴェルシテ ドーベルニュ クレルモン 1 UNIVERSITE D' AUVERG NE CLERMONT 1 フランス F-63000 クレルモン- フェラン, プールバード フランソワ ミ ッテラン, 49
(86) (22) 出願日	平成17年10月13日 (2005.10.13)	(74) 代理人	110000394 特許業務法人岡田国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月12日 (2007.6.12)	(72) 発明者	バーニッチ, ニコラス フランス F-63320 リュデッセ, ルート ド サン-ジュレン, 28
(86) 国際出願番号	PCT/FR2005/002538		
(87) 国際公開番号	W02006/040481		
(87) 国際公開日	平成18年4月20日 (2006.4.20)		
(31) 優先権主張番号	0410865		
(32) 優先日	平成16年10月14日 (2004.10.14)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 クローン病の診断法及び治療法

(57) 【要約】

発明は、生体外においてクローン病を診断する方法又は、クローン病を発症する人の傾向を決定する方法に関連し、それは、前記疾患を患う被験者又はその危険のある被験者においてCD66cの過剰発現を検出することによる。発明は同様にクローン病の予防又は治療措置にも関連する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

クローン病を診断する又はクローン病を発症する人の傾向を決定する生体外における方法であって、被験者の生体サンプル中のCD66 c 受容体の発現レベルがコントロールサンプルにおける発現レベルより高いか否かを決定し、コントロールサンプルがクローン病の指標、又は被験者のクローン病を発症する傾向の指標である方法。

【請求項 2】

生体サンプルが回腸生検又は回腸生検から単離されたエンテロサイトの標品である請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

生体サンプルが血液又は排泄サンプルである請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

CD66 c 受容体の発現レベルがCD66c受容体糖タンパク質の量を測定することによって決定される請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

CD66 c 受容体タンパク質の量が、任意に標識されたCD66 c を特異的に認識する抗CD66 c 抗体に生体サンプルを接触させる段階と、形成された抗体 - CD66 c 受容体複合体を検出する段階とを含む免疫学的試験によって測定される請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

抗CD66 c 抗体がモノクローナル抗体である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

生体サンプルが回腸生検であり、免疫学的試験が免疫組織化学試験である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

生体サンプルが血液又は排泄サンプルであり、免疫学的試験がELISA試験である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

CD66 c 受容体の発現レベルが、エンテロサイトの刷子縁部位に存在するマンノースユニットの定量解析によって間接的に決定される請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

マンノースユニットの定量解析が、生体サンプルを検出可能に標識されたコンカナバリン A に接触させることと、マンノースユニットに結合したコンカナバリン A によって形成された複合体を検出することとによって行われる請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

CD66 c 受容体の発現レベルが、生体サンプル中のCD66 c の mRNA量を測定することによって決定される請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

生体サンプルが回腸生検であり、CD66 c の mRNA量がリアルタイムRT-PCRによって測定される請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

CD66 c 受容体の発現レベルが抗CD66 c 抗体の産生レベルを測定することによって決定される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 14】

試験される血液又は排泄サンプルを、任意に固定されたCD66 c 抗体又はそのエピトープ断片に接触させることと、形成される抗体 - CD66 c 受容体複合体を検出することを含む請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

特異的にCD66 c 受容体を認識する抗CD66 c 抗体の使用であって、クローン病の予防又は治療のための薬剤を製造するための使用。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

CD66c受容体タンパク質又はCD66 c 様糖タンパク質の使用であって、クローン病の予防又は治療のために、CD66c受容体と大腸菌AIEC株との間の相互作用を特異的に阻害するための薬剤を製造するための使用。

【請求項 17】

マンノシド又は一つ以上のマンノースユニットを支持する粒子の使用であって、クローン病の予防又は治療のために、CD66 c 受容体と大腸菌AIEC株との間の相互作用を特異的に阻害するための薬剤を製造するための使用。

【請求項 18】

クローン病を予防又は治療するための候補物質を生体外において探索するための方法であって、

10

(i) 試験する物質の存在下又は非存在下において、可溶型又は細胞表面で発現しているCD66 c 受容体を少なくとも一つの大腸菌AIEC株に接触させる段階と、

(ii) CD66 c 受容体と前記株との間の相互作用を特異的に阻害する物質の能力を決定し、前記物質を選択及び / 又は同定する段階と

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体外におけるクローン病の診断の分野に関する。それは、疾患の存在を診断することと、その人の病気になる傾向を決定することの両方ができる。発明は、本疾患の予防的又は治療的処置にも関する。

20

【背景技術】

【0002】

1932年にクローンらによって記述されたクローン病は、腸の免疫システムの過剰反応状態によって特徴付けられ、様々な長さの沈静期間によって中断される再燃を通じて進行する。フランスにおいて、 10^5 人あたりの年間の新規患者として発表される発症率は、 $100/10^5$ 人と概算される。2004年には、フランスで100,000症例以上が記録された。

【0003】

クローン病(CD)は、腹痛、下痢、発熱及び栄養不良によって臨床的に症状を現す。消化管以外(関節、皮膚又は眼球)の炎症の症状は、しばしば関係している。診断は、臨床状態、内視鏡、回結腸の生検及び小腸の放射線検査に基づいて行われる。臨床の、内視鏡及び解剖病理学的な(anatomo-pathological)画像は特徴を有さず、診断法の確立には、同様の画像を生じる全ての他の治療できる状態を除外することが必要である(コロンベル及びメナード、1993年(Colombel and Menard, 1993))。生体検査(biological test)がクローン病の診断及び観察のために用いられており、それは、以下のマーカー、ANCA(核周囲の抗好中球抗体(perinuclear anti-neutrophilic antibody))、ASCA(抗出芽酵母(Saccharomyces cerevisiae)抗体)、及び抗OmpC(大腸菌由来の外膜ポリンC(outer membrane porin C from E. coli))を含む。これらのマーカーはクローン病に特異的ではなく、陰性試験(negative test)はクローン病の可能性を排除できない(ナカムラら、2003年(Nakamura et al., 2003))。

30

40

【0004】

クローン病は、主要な肝胃腸病学上の問題の一つを構成しており、それは、特定の治療法が無いからである。クローン病は著しく身体を自由を奪う病気であり、コルチコイド、免疫抑制剤、栄養補助及び手術によって程度の差はあっても抑制される。クローン病は患者にとって完全に治療することがないため、治療は主に症状のデータに基づいて施され、あやふやなだけである。この治療の主な効果は、再燃を抑制し、そして再発を防ぐことである。簡潔に述べると、用いられる薬剤は、サリチル酸塩誘導体又はコルチコイドを例とする抗炎症薬及び免疫抑制剤の二つの区分に分けることができる。しかしながら、これらの治療はしばしば効果が無く、90%の症例において手術による切除を回避することがで

50

きない。最近、抗TNFモノクローナル抗体であるインフリキシマブ(infliximab)が、深刻な臨床像を呈し、従来式の治療に反応しない何人かの患者の治療に効果的であることが発見された(ルトギールツら、1999年(Rutgeerts et al., 1999)、プレゼントら、1999年(Presentet al., 1999))。しかしながらこの治療法は限界を有する。実際に、インフリキシマブで治療した患者は、しばしば抗インフリキシマブ抗体を産生し、結果的に治療に应答する期間を減じてしまう(パートら、2003年(Baert et al., 2003))。更に、この治療を施された患者の何人かは、結核、アスペルギルス症及びカンジダ症タイプの深刻な感染症を発症した(ウォーリスら、2004年(Wallis et al., 2004))。

【0005】

クローン病の原因は、未だ明確に解明されていない。クローン病の残存、維持又は悪化に影響を与える様々な因子が想定されている。それらは特に、環境、免疫、遺伝及び感染性の因子である(ポドルスキー、2002年(Podolsky 2002)シャナハン、2002年(Shanahan2002))。

【0006】

クローン病は腸の部位における免疫システムの過剰反応状態によって特徴付けられ、それはリンパ球及びマクロファージの集合及び活性化を引き起こす。クローン病を患う患者の腸粘膜に大量に放出されたインターロイキン-1(IL-1)、IL-6、IL-8及びTNFを例とする炎症誘導性サイトカインが、腸の炎症を誘導する原因であることが現在では良く知られている(デスレウモールら、1997年(Desreumaux et al., 1997))。

【0007】

多くの臨床、実験及び疫学の議論が、クローン病の病巣(lesion)の発生及び/又は維持への病原菌の関与を示唆する(サターら、1996年(Sartor et al., 1996))。病気の通常の進行、時々非常に活性化する病巣へのその分布、及び親族でない結婚したカップル及びその子供を含む家族性クローン病の発症例は、伝播可能な病原菌の役割を示す(ベネットら、1991年(Bennett et al., 1991))。

【0008】

クローン病を患う患者の回腸生検から単離した大腸菌株の解析は、クローン病の急性及び慢性の回腸の病巣が、(全植物相の100%に至るまでもが)大腸菌株によって異常にコロニーを形成されていたことを示した。これらの株は、腸の感染症の原因である様々な病原型大腸菌において従来から見つけられている毒性の遺伝子を欠損している。これらの株の大部分(80%)は、腸上皮細胞であるCaco-2への生体外における接着に強い力を有し、接着力と、腸粘膜のコロニー形成のレベルとの間の関係が確立された(ダーフエウル-ミショーら、1998年(Darfeuille-Michaud et al., 1998))。

【0009】

クローン病を患う患者の慢性の回腸病巣から単離した大腸菌株LF82は、感染細菌性病原体の全ての特徴を有している。(i)細菌は、培養液中で赤痢菌の取り込みレベルと同じレベルで上皮細胞によって取り込まれる。(ii)その能動的な侵入過程は微小管とアクチンの重合化との両方に依存する。(iii)エンドソーム系の小胞の溶解後に、宿主細胞の細胞質で生存及び増殖することが可能である。

【0010】

LF82株の接着-侵入の表現型の特徴付け及び、大腸菌、赤痢菌及びサルモネラ菌で既に説明されている侵入の遺伝的決定基の欠損は、クローン病に関するであろう定義をされた病原性大腸菌の新規グループの存在を導き出した。それは、「接着-侵入性大腸菌(adherent-invasive E. coli)」であるためAIECと命名された(ボードーら、1999年(Boudeau et al., 1999))。これらAIEC株は、エンテロサイト(enterocyte)の刷子縁に接着することによって、患者の腸粘膜にコロニーを形成すると考えられる(ダーフエウル-ミショーら、2002年(Darfeuille-Michaud et al., 2002))。それらの有病率は、クローン病を患う患者の急性回腸病巣の部位において36.4%である(ダーフエウル-ミショーら、2004年(Darfeuille-Michaud et al., 2004))。

10

20

30

40

50

【0011】

クローン病の組織学的特徴の一つは、症例の50から87%における肉芽腫の存在である。肉芽腫の炎症は、マクロファージの殺菌力に抵抗する能力も有する侵入性細菌として振舞うサルモネラ症、エルシニア症 (yersiniosis)、又はパラツベルクリン症を例とするいくつかの細菌性感染症で見ついている。最近、肉芽腫中の大腸菌DNAの存在がクローン病を患う患者の80%において示され、大腸菌を含む感染経路が確認された (リャンら、2004年 (Ryan et al., 2004))。生体外におけるマウス又はヒトのマクロファージによるファゴサイトーシス後に、宿主細胞の完全性を保ったまま、AIEC株LF82は大きな液胞中で生存し、増殖する。感染の後に、マクロファージは大量のTNF を分泌する。こうして、AIEC株は上皮細胞に侵入できるだけでなく、それらをマクロファージの殺菌作用に抵抗できるようにする遺伝的決定基も有する (グラッセルら、2001年 (Glasse r et al., 2001))。

10

【0012】

リボタイピング解析 (ribotyping studies) では単一株の存在を示せなかったが、一方で、慢性的な病巣又は再発する場所から単離したAIEC株は、同一のリボタイピングの結果を示すか、共通のグループに属する。これらの遺伝的に相関のある株は、細菌のクロモソーム中で遺伝子の水平移動又は病原性島の挿入による病原性因子の獲得によって、同じ祖先から進化したと考えられる (マセレットら、2001年 (Masseret et al., 2001))。

20

【0013】

更に、生体外における腸の上皮細胞のモデルにおいて、I型繊毛がAIEC細菌の細胞への接着に関与しており、感染細胞による膜伸長の形成を誘導することによって細菌の能動的な内在化にも関与することが示された (ボードーら、2001年 (Boudeau et al., 2001))。

【0014】

真核細胞への細菌の接着プロセスは、アドヘシン (Adhesin) と呼ばれる細菌表面のリガンドと、細胞の受容体との間の特異的な相互作用による結果である (ビーチーら、1981年 (Beachey et al., 1981))。ここまで上述されたI型繊毛による大腸菌株の接着に関与する受容体は、GPIアンカー型 (glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored) 糖タンパク質である (ギュグノら、2000年 (Guignot et al., 2000))；ロイシュら、1990年 (Leusch et al., 1990)；マラビヤら、1999年 (Malaviya et al., 1999)；ノウィキら、1993年 (Nowicki et al., 1993))。I型繊毛のアドヘシンFimHはGPIアンカー型受容体であるCD48及びCEACAM6 (CD66c) を認識する (シンら、1999年 (Shin et al., 1999)；シンら、2000年 (Shinet al., 2000)；ソーターら、1991年 (Sauter et al., 1991)；ソーターら、1993年 (Sauter et al., 1993))。糖タンパク質CD66c (CEACAM6又は“Non-specific Cross-reacting Antigen”としてNCAとも呼ばれる) は、イムノグロブリンファミリーに属し、それは、タンパク質のN末端部位の可変領域及び、ループの形成を導くジスルフィド結合 (disulfide bridge) を含む定常領域の特徴を有する (ハマーストロム及びバラノフ、2001年 (Hammarstrom and Baranov, 2001))。CD66c は、顆粒球、マクロファージ及び多核性好中球の表面に通常発現しているが、結腸、肺及び脾臓の表皮細胞においても発現している (オーデットら、1987年 (Audette et al., 1987)；コルピングーら、1989年 (Kolbinger et al., 1989)；フォン、クライストら、1972年 (von Kleist et al., 1972)；ジャントスチエフら、2003年 (Jantscheff et al., 2003))。

30

40

【0015】

状態の深刻性及びその診断の現時点での困難性から、クローン病になりやすい性質又はクローン病の症例の早期及び信頼性の高い診断が、明らかに非常に高く望まれている。それは非常に長い待ち時間を解消するのに貢献するであろう。現時点で患者の管理と、類似した臨床画像を生じる他の全ての状態を除外した後における診断の確定との間である待ち時間は、常に患者に不利となる。

50

【 0 0 1 6 】

最後に、クローン病を予防する及び/又はこの疾患を治療することを可能にする方法も求められており、それは、現在用いられている方法より、より良い標的とされる。

【 0 0 1 7 】

従って、本発明の筆者は、クローン病の診断及び治療のための代替法の開発に着目した。発明の中心は、発明者によってなされた実証であり、クローン病を患う患者の回腸の部位におけるCD66c受容体の異常な過剰発現及び、この受容体と大腸菌AIEC株との間の注目すべきアフィニティーの実証である。発明者によって得られたデータは、一方で、受容体がエンテロサイトの刷子縁の部位で過剰発現していることを示し、他方では、AIEC型大腸菌株がこれらの受容体に対して非常に高いアフィニティーを有することを示し、この事は、AIEC細菌による回腸粘膜のコロニー化の説明となるであろう。AIEC株のCD66c受容体への接着はI型繊毛によって起こる。このAIECグループの参照株、すなわちLF82株は、大サブユニット(major subunit)FimAと、小サブユニット(minor subunit)FimI及びFimFと、アドヘシンFimHとにいくつかのアミノ酸変異を有するI型繊毛の変異体を発現する(ジェイ, ボードーら、2001年(J. Boudeau et al., 2001))。本発明の筆者は、クローン病を患う患者から単離した大腸菌株の51%が、LF82参照株のFimHに観察されたのと同様に、FimHにアミノ酸変異を有するI型繊毛の変異体を有することを見出した。それ故に、これらI型繊毛変異体は、CD66c受容体に対するこれらの株の高アフィニティーの原因であると考えられる。

【特許文献1】国際特許出願W O 01/013937号明細書

【非特許文献1】Colombel, J. F. and Mesnard, B. (1993) *Maladie de Crohn*. In: Editions Techniques, *Encycl. Med. Chir.* (Paris, France). *Gastroenterologie*, 9-057-G10, : 1-15

【非特許文献2】Nakamura RM., Matsutani M., Barry M 2003. *Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease*. *Clinic Chimica Acta* 335:9-20

【非特許文献3】Rutgeerts, P., D'Haens, G., Targan, S., Vasilias, E., Hanauer, S.B., Present, D.H., et al (1999) *Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease*. *Gastroenterology*. 117: 761-769

【非特許文献4】Present, D.H., Rutgeerts, P., Targan, S., Hanauer, S.B., Mayer, L., van Hogezaand, R.A., et al (1999) *Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease* *N Engl J Med*. 340: 1398-1405

【非特許文献5】Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., G, D.H., Carbonez, A. and Rutgeerts, P. (2003) *Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease*. *N Engl J Med*. 348: 601-608

【非特許文献6】Wallis RS., Broder MS., Wong JY., Hanson ME, Beenhouwer DO 2004. *Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists*. *Clin Infect Dis*. 38:1261-5

【非特許文献7】Podolsky DK. *Inflammatory bowel disease*. *N Engl J Med* 2002;347:417-29

【非特許文献8】Shanahan F. *Crohn's disease*. *Lancet* 2002;359:62-9

【非特許文献9】Desreumaux, P., Brandt, E., Gambiez, L., Emilie, D., Geboes, K., Klein, O., et al. (1997) *Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 113: 118-126

【非特許文献10】Sartor RB, H. C. Rath, R. K. Sellon. *Microbial factors in chronic intestinal inflammation*. *Current opinion in gastroenterology*

10

20

30

40

50

y 1996;12:327-333

【非特許文献 1 1】Bennett, R.A. Rubin, P.H. and Present, D.H. (1991) Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 100: 1638-1643

【非特許文献 1 2】Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., et al (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 115: 1405-1413

【非特許文献 1 3】Boudeau, J., A. L. Glasser, E. Masseret, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease *Infect Immun*. 67:4499-509

【非特許文献 1 4】Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:185-93

【非特許文献 1 5】Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, AL., Barnich, N., Bringer, MA., Swidsinski, A., Beaugerie, L., Colombel, JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004, 127, 412-421

【非特許文献 1 6】Ryan P., Kelly RG., Lee G., Collins JK, O'Sullivan G C., O'Connell JO., Shanahan F. 2004. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease-Detection by laser capture microdissection. *Am J Gastroenterology*, 99: 1539-43

【非特許文献 1 7】Glasser, A.L., J. Boudeau, N. Barnich, M. H. Perruchot, J. F. Colombel, and A. Darfeuille-Michaud 2001. Adherent Invasive *Escherichia coli* Strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death *Infect Immun*. 69:5529-37

【非特許文献 1 8】Masseret, E., Boudeau, J., Colombel, J.F., Neut, C., Desreumaux, P., Joly, B., et al (2001) Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut*. 48: 320-325

【非特許文献 1 9】Boudeau, J., N. Barnich, and A. Darfeuille-Michaud 2001. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells *Mol Microbiol*. 39: 1272-84

【非特許文献 2 0】Beachey, E.H. (1981) Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis*. 143: 325-345

【非特許文献 2 1】Guignot, J., I. Peiffer, M. F. Bernet-Camard, D. M. L ublin, C. Carnoy, S. L. Moseley, and A. L. Servin 2000. Recruitment of CD55 and CD66e brush border-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli* that infect the human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells *Infect Immun*. 68:3554-63

【非特許文献 2 2】Leusch, H. G., S. A. Hefta, Z. Drzeniek, K. Hummel, Z. Markos-Pusztai, and C. Wagener 1990 *Escherichia coli* of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA) *FEBS Lett*. 261:405-9

【非特許文献 2 3】Malaviya, R., Z. Gao, K. Thankavel, P. A. van der Me

10

20

30

40

50

rwe, and S. N. Abraham 1999. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol- anchored molecule CD48 Proc Natl Acad Sci USA. 96:8110-5

【非特許文献 2 4】Nowicki, B., Hart, A., Coyne, K. E., Lublin, D. M. and Nowicki, S., Short consensus repeat-3 domain of recombinant decay-accelerating factor is recognized by *Escherichia coli* recombinant Dr adhesin in a model of a cell-cell interaction. J Exp Med, 178, 2115-21. (1993)

【非特許文献 2 5】Shin, J. S., and S. N. Abraham 1999, Bacteria-host cell interaction mediated by cellular cholesterol/glycolipid-enriched microdomains. Biosci Rep. 19 (5):421-32

【非特許文献 2 6】Shin, J. S., Z. Gao, and S. N. Abraham 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells Science. 289:785-8

【非特許文献 2 7】Sauter, S. L., S. M. Rutherford, C. Wagener, J. E. Shively, and S.A. Hefta 1991. Binding of nonspecific cross-reacting antigen, a granulocyte membrane glycoprotein, to *Escherichia coli* expressing type 1 fimbriae Infect Immun. 59:2485-93

【非特許文献 2 8】Sauter, S. L., S. M. Rutherford, C. Wagener, J. E. Shively, and S. A. Hefta Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from *E. coli* on non-specific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. J Biol Chem. 268 (21): 15510-6

【非特許文献 2 9】Hammarstrom, S., and V. baranov. 2001. Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? Trends in Microbiol. 9, 119-125

【非特許文献 3 0】Audette, M., F. Buchegger, M. Schreyer, and J. P. Mach 1987. Monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen (CEA) identifies two new forms of crossreacting antigens of molecular weight 90,000 and 160,000 in normal granulocytes Mol Immunol. 24:1177-86

【非特許文献 3 1】Kolbinger, F., K. Schwarz, F. Brombacher, S. von Kleist, and F. Grunert 1989. Expression of an NCA cDNA in NIH/3T3 cells yields a 110K glycoprotein, which is anchored into the membrane via glycosyl-phosphatidylinositol Biochem Biophys Res Commun. 161:1126-34

【非特許文献 3 2】von Kleist, S., G. Chavanel, and P. Burtin 1972. Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. Proc Natl Acad Sci USA. 69:2492-4

【非特許文献 3 3】Jantscheff P, Terracciano L, Lowy A, Glatz-Krieger K, Grunert F, Micheel B, Brummer J, Laffer U, Metzger U, Herrmann R, Rochlitz C, 2003. Expression of CEACAM6 in respectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. J Clin Oncol. 21:3638-46

【非特許文献 3 4】Grunert, F., S. Daniel, G. Nagel, S. von Kleist, and P. Jantscheff 1995. CD66b, CD66c and carcinoembryonic antigen (CEA) are independently regulated markers in sera of tumor patients. Int J Cancer. 63:349-55

【非特許文献 3 5】Kohler et Milstein, (1975), Nature (London), 256:495-497

【非特許文献 3 6】Harlow et al., ed., 1988 "Antibodies: a laboratory manual "

10

20

30

40

50

【非特許文献 37】Scott, J.K. and Smith, G.P., 1990 Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. Science, 249 :386-390

【非特許文献 38】Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G.1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J. Mol. Biol. 222,581-597

【非特許文献 39】Institut Pasteur Production, Marnes-la-Coquette, France

【非特許文献 40】Darfeuille-Michaud, A., D. Aubel, G. Chauviere, C. Rich, M. Bourges, A. Servin, and B. Joly 1990. Adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture Infect Immun. 58:893-902

【非特許文献 41】Knutton, S., D. R. Lloyd, D. C. Candy, and A. S. Mc Neish 1985. Adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli to human small intestinal enterocytes Infect Immun. 48:824-31

【非特許文献 42】Lafeuille, B., A. Darfeuille, S. Petit, B. Joly, and R. Cluzel 1981. [“In vitro” study of attachment to human enterocytes in “Escherichia coli” strains isolated from infants with diarrheal disease (author’s transl)] Ann Microbiol (Paris). 132B:57-6

【発明の開示】

【0018】

診断の適用 (diagnostic applications)

従って本発明の対象は、生体外でクローン病の診断又は、人のクローン病を発症する傾向の決定法であり、試験される被験者からの生体サンプル中におけるCD66c受容体の発現レベルが、クローン病の指標となるコントロールのサンプル又は、試験対象者のクローン病を発症する素因の発現レベルより高いか否かが決定される。

【0019】

発明の文中においては、「生体サンプル」は回腸生検 (ileal biopsy) 又は、回腸生検から単離されたエンテロサイトの標品であろう。「回腸生検」という表現は、例えば、手術切離 (回腸から除去される手術事項の表現であって、この場合に用いられる) 又は、内視鏡の間に得られる回腸又は回腸粘膜の一部のサンプルを意味することが理解される。生体サンプルは同様に、血液又は血清を例とする生体の流体のサンプルであるか、その代わりの排泄サンプルであろう。

【0020】

発明の方法は、回腸生検又は単離されたエンテロサイトの標品以外の生検サンプル、すなわち、特に生検サンプルが血液又は排泄サンプルである場合、について実施され、CD66cの検出を、CEA (「癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen) 」) を例とする腫瘍マーカーの (定量的又は半定量的) 検出と組合せることが有利である (グラナートら、1995年 (Grunert et al., 1995))。こうして、結腸直腸癌を患う患者とクローン病を患う患者とを直接区別することが可能である。

【0021】

発明の方法は、CD66cの絶対発現レベルの定量的な決定をして、その後平行して決定された又はそうでなければ既知であるコントロール対象中の受容体の発現レベルと比較することか、試験される生体サンプル中のコントロールサンプルと比較されるCD66c受容体の相対的な発現レベルを直接決定することの (発現の半定量的検出がこの場合用いられるであろう) いずれかを含む。「コントロール」サンプルは、「健康な」被験者若しくはクローン病を患っていない被験者、又はいかなる炎症性腸疾患 (IBD) 若しくは結腸直腸癌も罹っていない被験者からのサンプルである。これは、場合によって、外傷性又は感染性起源の小腸の炎症性病巣を有する被験者であろう。クローン病の進行を決定するために、被験者のCD66cの発現レベルを決定すること及び、例えば数週間後に被験者に二回目の試験を行うことによって薬剤の効果又は疾患の進行を制御することが有効であろう。この場合、二回目の試験の結果は、一回目の試験の結果及び、通常は「健康な」被験者から得ら

10

20

30

40

50

れた結果とも比較される。このように「コントロール」サンプルは、同一試験の被験者又は「健康な」被験者のいずれかを指す。

【 0 0 2 2 】

「被験者」又は「患者」は哺乳類、好ましくはヒトであり、性別、年齢及び全身の状態は関係ない。子供も含まれる。試験の被験者は無症状であるか、クローン病を発症する危険性があると考えられる者であろう。

【 0 0 2 3 】

「診断」の用語は、その発症の段階に関わらずクローン病の感染の決定及び確認を指す。これは特に早期診断又は再発の診断であろう。

【 0 0 2 4 】

CD66c 受容体の発現レベルは、様々な方法で決定されるであろう。それは特に、CD66c 受容体を解析すること又はその転写レベルを決定することによって決定されるであろう。転写レベルは、受容体をコードする mRNA の量とも言える。それもまた、CD66c が豊富にあるマンノースユニットの検出及び / 又は定量によって決定されるであろう。CD66c 受容体の発現を検出及び / 又は定量するための様々な方法が、以下に説明される。

【 0 0 2 5 】

第一の実施形態においては、CD66c 受容体の発現レベルが CD66c 受容体タンパク質の量を測定することによって決定され、それは一般に、サンプル中に存在する CD66c 受容体と選択的に相互作用できる結合パートナーに生体サンプルを接触させることによる。一般に結合パートナーは抗体であり、ポリクローナル又はモノクローナル、好ましくはモノクローナルであろう。これは、特許出願 W O 01/013937 に記載されるペプチド、及び以下の表 1 に記載されるペプチドの一つを例とする CD66c 受容体のペプチド断片でもであろう。

表 1 :

ペプチド名	ペプチドの配列
CD66c-1	STPFNVAEGKEVL
CD66c-2	LAHNLQPQRIGYSW
CD66c-3	KGERVDGNSLIVGY
CD66c-4	VGIVIGTQQATPG
CD66c-5	ATPGPAYSGRETIY
CD66c-6	LLIQNVTQNDTGFY
CD66c-7	VIKSDLVNEEATGQ
CD66c-8	EATGQFHVYPELPK
CD66c-9	NNSNPVEDKDAVAF
CD66c-10	PEVQNTTYLWWVNG
CD66c-11	NGQSLPVSPRLQLS
CD66c-12	LQLSNGNMTLTLLS
CD66c-13	TLLSVKRNDAGSYE

【 0 0 2 6 】

抗体

「抗体」の用語は、あらゆる全長の抗体又は（遺伝子操作によって又はそうではなく得られた）抗体の機能性断片を指し、それらは、前記抗体を抗原性複合物の少なくとも一つの抗原性決定基に結合させることができる少なくとも一つの抗原性組合せ領域（antigenic combination site）を有する又はから成る。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂ 断片、及び一本鎖可変断片（scFv 鎖）が挙げられるであろう。

【 0 0 2 7 】

10

20

30

40

50

「捕捉抗体 (capture antibody)」の用語は、好ましく固相に固定された抗体又は抗体の一部を意味するものと理解される。それは、アフィニティー結合によって生体サンプル中に存在するCD66c抗原を保持することができる。

【0028】

生体サンプル中の抗原の存在は、「検出手段」によって明らかにされる。抗原の検出に関して、発明は特に、少なくとも一つの「検出抗体」を用いた検出を提供する。そのような標識された検出抗体は、捕捉抗体によって認識される領域とは異なるエピトープ領域を認識することによるアフィニティー結合によって、捕捉された抗原に結合することができる。

【0029】

「標識された」の用語は、(酵素、放射線、蛍光色素及び発光化合物などによる)直接の標識と、(例えばそれらが直接標識された抗体による、又は、限定するのではないが、標識されたアビジン-ビオチンのペアなどを例とする標識された「アフィニティーペア」の試薬を用いた)間接的な標識の両方を指す。

【0030】

「抗原断片」の表現は、免疫された動物において、CD66cにのみほぼ特異的な抗体の合成を誘導できるCD66cのあらゆる部分を意味するものと理解される。

【0031】

「特異的に」の用語は、それが抗原に対する抗体の認識又は特定の結合を指す時には、抗体が他の抗原とほぼ相互作用することなくその抗原と相互作用することを意味する。

【0032】

本発明で用いられる抗CD66c抗体は、その抗原に特異的な抗体である。それらは、好ましくはモノクローナル抗体又は単一特異的 (monospecific) ポリクローナル抗体であり、それらは一つのエピトープのみを特異的に認識するとも言える。

【0033】

発明との関係において有益な、モノクローナル抗体若しくは単一特異的ポリクローナル血清、又はゲノムライブラリをスクリーニングすることによって得られる抗体の生成は、従来式の技術である。

【0034】

抗CD66cポリクローナル抗体は、とりわけウサギ、マウスなどを例とする動物に可溶性CD66c受容体、又はその抗原断片を用いて免疫し、回収して、その後例えば受容体を含む免疫吸着によって得られる抗血清を除去する (depleting) ことによって、得られるであろう。それは、当業者にとって周知の方法である。

【0035】

いくつかのモノクローナル抗体が、開発されて市販されている。従って、抗CD66cモノクローナル抗体のクローン9A6 (スイスのジェノバ (Genovac)) 又は、イノジェネックス、メナリニ ダイアグノスティクス (InnoGenex, Menarini Diagnostics) (フランスのアンソニー (Anthony)) の抗CD66cモノクローナル抗体を用いることができる。

【0036】

一般に、他のモノクローナル抗体は、コーラーとミルステイン (Kohler and Milstein) (1975年) によって示されたリンパ球の融合及びハイブリドーマの培養の従来式の方法によって得られるであろう。モノクローナル抗体を調製する他の方法も知られている (ハーロウら、編、1988年「抗体：研究室マニュアル」(Harlow et al., ed., 1988 "Antibodies: a laboratory manual"))。モノクローナル抗体は、(マウス、ラット、ウサギ又はヒトでさえも、及び同類のものを例とする) 哺乳類に免疫し、ハイブリドーマをもたらすリンパ球融合技術を用いて調製されるであろう (コーラーとミルステイン、1975年 (Kohler and Milstein, 1975)) 。

【0037】

この慣習的な技法の代わりとなる技法も存在する。例えば、ハイブリドーマによってクローン化された核酸を発現させることによって、モノクローナル抗体を生成することが可

10

20

30

40

50

能である。抗体用 cDNA をベクターに導入することによるファージディスプレイ法によっても、抗体の生成は可能である。それは一般に、(大腸菌用の FUSE5 を例とする、スコット、1990 年 (Scott, 1990)) ファージの表面に遺伝子ライブラリ V を提示する線状ファージである。これらの抗体ライブラリを構築するプロトコルは、マークスら (Marks et al.,) (1991 年) の文献に記載されている。

【0038】

本発明の方法において、生体サンプル中の CD66 c の検出に有用なキット及び試薬が、多数の生体サンプルに適用できる発明の簡単な実際の実施のために提供されるであろう。

【0039】

生体サンプル中の CD66 c の検出用キットは、上述したような抗体を少なくとも一つ含むであろう。

【0040】

免疫学的試験

こうして、CD66 c 受容体糖タンパク質の量は、生体サンプルを任意に標識された抗 CD66 c 抗体と接触させることと、形成される抗体 - CD66 c 受容体の複合体を検出することを含む免疫学的試験によって測定される。前記抗 CD66 c 抗体は、特異的に CD66 c を認識する。

【0041】

例えば、CD66 c の存在は、例えば競合、直接反応又はサンドイッチ式によるイムノアッセイを含む標準的な電気泳動及び免疫診断法を用いて検出されるであろう。前記アッセイは、特にウエスタンブロット、凝集試験 (agglutination test)、エライザ (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA))、アビジン/ビオチン型アッセイ、放射免疫アッセイ、免疫電気泳動、及び免疫沈降などを含む。一般に反応は、蛍光色素、化学発光色素、又は放射性分子若しくは酵素マーカー、又は代替りの染色液を例とするマーカーの可視化を含む。

【0042】

発明による診断法は、固相又は均一相；一段階又は二段階；サンドイッチ法又は競合法を非限定的な例とする当業者に周知の様々な態様で実施されるであろう。

【0043】

好適な実施形態によると、捕捉抗体は固相に固定される。固相の非限定的な例として、デンマークのヌンク (Nunc, Denmark) 社から市販されているものを例とするマイクロプレート、特にポリスチレンのマイクロプレートを用いることができる。ディナル又はメルク - ユーロラボ (フランス) (Dyna or Merch-Eurolab (France)) から (エスタポール (商標) (EstaporTM) のブランド名で) 販売されている物を例とする固形の粒子又は、ビーズ若しくは常磁性ビーズ又は、代替りのポリスチレン若しくはポリプロピレンのテストチューブなどを用いることも可能である。

【0044】

二つの (捕捉及び検出) 抗体間におけるサンドイッチ式イムノアッセイ様式は、生体サンプルが例えば血液又は排泄サンプルを例とする生体の流体である場合に、生体サンプル中に存在する抗原を検出するのに特に有利である。

【0045】

競合による抗原検出のためのイムノアッセイ様式も可能である。他のイムノアッセイ法も想定されていると共に、当業者にとって周知であろう。

【0046】

ELISA 法、放射免疫アッセイ、又は他の検出法が用いられることによって、形成される抗原 - 抗体の複合体の存在が検出されるであろう。

【0047】

好適な実施形態によると、生体外でクローン病を診断する方法は、血液又は排泄サンプルについての例えば ELISA 試験型の免疫学的試験を含む。従って、固定された捕捉抗体 CD66abce と血液又は排泄物の様々な希釈物を伴う免疫プレートアッセイ (immunologica

10

20

30

40

50

l plate assay) を用いることが可能である。CD66 c 抗原は、特異的な検出抗体、すなわち、例えば酵素又は蛍光色素に結合されている標識された抗CD66 c 抗体によって検出される。抗CD66 c 抗体は、例えばダコー (DAKO) (Kat4Cクローン、デンマークのダコー) のマウス抗ヒトCD66abceモノクローナル抗体であろう。固定された抗体の代わりにコンカナバリン A (concanavalin A) を用いることで、そのマンノースユニットによって抗CD66 c 受容体を捕捉する事もできる。

【0048】

あるいは、CD66 c 受容体の発現レベルは、抗CD66 c 抗体の産生レベルを測定することによって決定されるであろう。抗CD66 c 抗体の発現レベルは、好ましくは血液又は排泄サンプルにおいて、サンプルを任意に固定されたCD66 c 抗原又はそのエピトープ断片に接触させ、形成された抗体 - CD66 c 受容体の複合体を検出することによって決定されるであろう。従って、固定されたCD66 c 抗原及び、血液又は排泄物の様々な希釈物を伴う免疫プレートアッセイを用いることが可能であり、抗CD66 c 抗体は、例えば酵素又は蛍光色素に結合されている、標識された抗IgG若しくは抗IgA、或いは抗IgM抗体によって検出される。

10

【0049】

他の実施形態によると、発明の方法は、回腸生検に対して行われる免疫組織化学試験 (immunohistochemical test) を含む。

【0050】

例えば、固定された回腸生検の切片は、抗CD66 c 抗体を用いて標識され、その後、蛍光色素又はペルオキシダーゼ若しくはアルカリホスファターゼ型の酵素に結合された二次抗体を用いて検出されるであろう。CD66 c 受容体の発現は、顕微鏡観察又は電子読取の後に解釈され、疾患の進行ステージを示す (発現が見られない) 0 から (細胞質及び刷子縁部位で非常に高発現の) 4 の間の解剖病理学的スコアに従って分類されるであろう。

20

【0051】

或いは標識試験は、回腸生検から単離されたエンテロサイトの標品を、検出できるように例えばFITC又はアレクサフルオル (Alexa Fluor) 488若しくは647型の蛍光色素で直接標識された抗CD66 c 抗体に接触させることによって行われるであろう。クローン病の場合、エンテロサイトの刷子縁の部位に過剰発現しているCD66 c 受容体の特異的な標識が、こうして可視化される。

【0052】

マンノースユニットの検出

発明の他の実施形態によると、CD66 c 受容体の発現レベルは、エンテロサイトの刷子縁の部位に存在するマンノースユニットの定量的な検出によって間接的に決定される。この種の試験は、特に回腸生検又は単離されたエンテロサイトの標品に対して行うのが実用的である。

30

【0053】

それは、エンテロサイトの刷子縁の部位で高度にマンノース化されたCD66 c 受容体の過剰発現を容易に実証することができる。例えば、マンノースユニットの定量的又は半定量的な検出は、検出できるように標識されたコンカナバリン A を例とするレクチンに生体サンプルを接触させ、マンノースユニットに結合したコンカナバリン A によって形成された複合体を検出することによって行われるであろう。例えば、コンカナバリン A はFITCを例とする蛍光色素に結合されるであろう。

40

【0054】

RNA試験

発明の他の実施形態によると、CD66 c の発現レベルが、生体サンプル中のCD66 c のmRNA量を測定することによって決定される。

【0055】

遺伝子の転写レベルを決定する方法は周知である。例えば、(エンテロサイト又は回腸生検の標品を例とする) サンプル中に含まれる核酸は、一般に、溶解酵素又は、核酸に結合する樹脂による化学試薬を用いることを例とする標準的な方法によって最初に抽出され

50

る。そして、抽出されたmRNAは、(例えばノーザンブロット解析による)ハイブリダイゼーション及び/又は、特異的なオリゴヌクレオチドプライマを用いた逆転写後の増幅(RT-PCR)によって検出される。用いることができる特異的なプライマの例が以下に示される:

CD66c F: 5' CCTGCAGATTGCATGTCCCC (SEQ ID No. 1)

CD66c R 5' CCAATACGATTCTGGGGCAGG (SEQ ID No. 2)。

【0056】

特別な例としての実施形態においては、生体サンプルが回腸生検又は単離したエンテロサイトの標品であり、CD66cのmRNA量が、好ましくは全RNAの抽出後に、リアルタイムRT-PCRで測定される。

10

【0057】

治療的応用

発明の別の面では、クローン病の予防又は治療のための療法を提供する。これらの方法は、CD66c受容体が、クローン病を患う患者において過剰発現しており、且つエンテロサイトの刷子縁への大腸菌AIEC菌の結合に必須であることの実証に基づく。それ故に、CD66c受容体と大腸菌AIEC株との間の相互作用を特異的に阻害するあらゆる薬剤が、クローン病の予防又は治療に有用である。

【0058】

従って、発明はCD66c受容体及び大腸菌AIEC株間の相互作用を特異的に阻害する薬剤の使用にも関係し、それは、クローン病を予防又は治療するための薬剤の製造のためである。

20

【0059】

この薬剤は、CD66c受容体を特異的に認識し、この受容体の大腸菌AIEC株との結合を防ぐ抗CD66c阻害抗体であろう。

【0060】

若しくは、前記薬剤は、CD66c受容体糖タンパク質又はCD66cをミミックする合成糖タンパク質であろう。

【0061】

それは、特許出願WO 01/013937に記載されるペプチド及び、上に示されるペプチドの一つを例とするCD66c受容体のペプチド断片でもあろう。

30

【0062】

薬剤は、D-マンノース、メチル-D-マンノースを例とするマンノシド(mannoside)又は、一つ以上のマンノースユニットを支持する粒子でもあろう。従ってその名のとおり、マンノシドの用語は、D-マンノースと、加水分解によってD-マンノースを放出することができる化合物とを含み、その化合物は、例えば加水分解によってD-マンノースを放出する(ホモ又はヘテロサッカライドである)ポリサッカライド及びオリゴサッカライド、及びAIEC株のアドヘシンFimHと相互作用できるD-マンノースのあらゆる誘導体である。一つ以上のマンノースユニットを支持する粒子は、例えば不活性なビーズ若しくは粒子、又は生きている若しくは死んでいる細胞であろう。

【0063】

より詳細には、用いられる薬剤は、CD66c受容体とAIEC株のアドヘシンFimHとの間の相互作用を特異的に妨げる薬剤であろう。

40

【0064】

更に、発明はクローン病の予防又は治療のための候補物質を生体外においてスクリーニングする方法を提供し、それは、

(i)細胞表面で発現したCD66c受容体を、試験する物質の存在下又は非存在下において、少なくとも一つの大腸菌AIEC株と接触させること、

(ii)CD66c受容体と前記株との間の相互作用を特異的に阻害する物質の能力を決定し、前記物質を選択及び/又は同定すること

を含む。

50

【 0 0 6 5 】

候補物質は、自然若しくは合成の化合物、又は化合物の混合物を含むあらゆる種類のものであろう。物質は、構造的に明らか、又は例えば生体抽出物の形態である未知の構造であろう。

【 0 0 6 6 】

大腸菌AIEC株とCD66c受容体との間の結合を阻害する候補物質の能力を決定するために、標準的な競合試験が、CD66c受容体を発現している培養細胞に対して行われるであろう。これは、例えば受容体を過剰発現させるために遺伝的に軽質転換した細胞、又はクローン病を患う患者の回腸生検から単離したエンテロサイトであろう。それらは、単層に培養された（HT29、Caco-2、T84、intestine-407細胞を例とする）腸上皮細胞であろう。候補物質が同定されている化合物である場合、それは、例えば放射線又は（蛍光色素を例とする）非放射線マーカーで標識されるであろう。

10

【 0 0 6 7 】

その後、CD66c受容体に特異的に結合したマーカーは、例えば 10^{-10} から 10^{-5} Mの様々な濃度の前記候補物質存在下において定量されるであろう。或いは、接着試験によって、CD66c受容体に対する候補物質及び大腸菌AIEC菌間の競合を観測することも可能である。

【 0 0 6 8 】

CD66c受容体と大腸菌AIEC株との間の相互作用を特異的に阻害する薬剤は、好ましくは経口投与用の薬用組成物の形態で考案されるであろう。

20

【 0 0 6 9 】

これらの組成物は、即座の又は制御されて放出されるタブレット、カプセル又は顆粒の形状を例として、例えば経口投与されるであろう。

【 0 0 7 0 】

経口投与用の固形組成物は、活性のある材料に、充填剤及び、適切な場合には結合剤、分解促進剤、潤滑剤、着色料又は味の矯正剤を添加すること、及び混合物をタブレット、コートされたタブレット、顆粒、粉末又はカプセルの形状にすることによって調製される。

【 0 0 7 1 】

充填剤の例には、ラクトース、コーンスターチ、スクロース、グルコース、ソルビトール、クリスタリンセルロース及び二酸化ケイ素が含まれ、結合剤の例には、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、エチルセルロース、メチルセルロース、アカシア、トラガカントゴム、ゼラチン、セラック、水酸化プロピルセルロース、水酸化プロピルメチルセルロース、クエン酸カルシウム、デキストリン及びペクチンが含まれる。

30

【 0 0 7 2 】

潤滑剤の例には、ステアリン酸マグネシウム、滑石、ポリエチレングリコール、シリカ及び硬化した植物油が含まれる。着色料は、薬剤への使用が認可された物のいずれかであろう。

【 0 0 7 3 】

味の矯正剤の例には、ココアパウダ、ハーブ状のミント、アロマパウダ、オイル状のミント、ボルネオール、及びシナモンパウダが含まれる。タブレット又は顆粒は、糖又はゼラチンなどでコートするのに適しているであろう事が理解されるべきである。

40

【 0 0 7 4 】

クローン病の予防又は治療を目的とした治療薬の投与に効果的な用量及び投与量は、薬の性質、患者の大きさ、疾患のステージ、用いられている特定の治療用組成物及び担当医の観察及び結論を例とする多くの因子に基づく。

【 0 0 7 5 】

例えば経口投与の場合、タブレット又はカプセルを例とする適切で可能な投与量は、1日あたり体重の約 0.1 mg/kg から約 100 mg/kg の間、好ましくは1日あたり体重の約 0.5 mg/kg から約 50 mg/kg の間、より好ましくは1日あたり体重の

50

約 1 mg / kg から約 10 mg / kg の間、そして更に好ましくは 1 日あたり体重の約 2 mg / kg から 5 mg / kg の間の活性物質である。

【 0 0 7 6 】

上述のように用いられるであろう経口による 1 日あたりの投与量の範囲を示すために、10 kg から 100 kg の代表的な体重が考慮される場合、適切な投与量は、1 日あたり約 1 - 10 mg から 1000 - 10000 mg の間、好ましくは 1 日あたり約 5 - 50 mg から 500 - 5000 mg の間、更に好ましくは 1 日あたり約 10 . 0 - 100 . 0 mg から 100 . 0 - 1000 . 0 mg の間、そしてより好ましくは、1 日あたり約 20 . 0 - 200 . 0 mg から約 50 . 0 - 500 . 0 mg の間の活性材料であろう。

【 0 0 7 7 】

これらの投薬量の範囲は、投与される患者に対する 1 日あたりの活性材料の合計量を表す。1 回分が投与される 1 日あたりの投与の回数は、特に薬物動態学的要因によって広く変化するであろう。

【 0 0 7 8 】

以下の図及び実施例は、その範囲を限定することなく発明を説明する。

【 0 0 7 9 】

実施例

実施例 1 : クローン病に関する AIEC 菌に対する特異的な受容体としての CD66 c の同定 :

A . 細菌株及び培養

クローン病を患う患者由来の慢性の回腸病巣から単離された大腸菌 LF82 株が、基準の株 (接着性 - 侵入性大腸菌) として用いられている。この株は、ジェイ , ボードーら (J. Boudeau et al.) の文献 (1999 年) で説明されている。それは、培養中の腸上皮細胞に接着及び侵入して、エンドソーム系の小胞の溶解後に宿主細胞の細胞質で増殖する。それは、炎症誘導性サイトカインである TNF の大量分泌を誘導することによって、マウスのマクロファージ J774-A1 中で生存及び増殖することができる。それは、マウスの腹膜のマクロファージ及びヒトの単球由来のマクロファージ中でも増殖する。

【 0 0 8 0 】

LF82 株の変異体も用いられており、それらは、ジェイ , ボードーらの文献 (2001 年) で説明されるように、I 型繊毛をコードする fim オペロンの fimA 遺伝子 (変異体 52D11) 又は fimH 遺伝子 (変異体 ZG2) へのトランスポゾン Tn5phoA の挿入によって I 型繊毛を発現しない。

【 0 0 8 1 】

細菌は、LB 培地 (Luria-Bertani (LB) broth) 中、又は MH 寒天プレート (Mueller-Hinton (MH) agar plate) 上で培養される (Institut Pasteur Production, Marnes-la-Coquette, France) 。

【 0 0 8 2 】

B . CD を患う患者及び健康なコントロール由来の回腸サンプル

エンテロサイトが手術による回腸部位から単離された。その部位は、12 人のクローン病を患う患者 (CD の患者) 及び、炎症性の腸疾患 (IBD) を有さない 7 人の被験者から手術又は内視鏡生検によって得られた。サンプルは、回収直後に 10 % グリセロール及び 10 % DMSO (dimethyl sulfoxide) (ミズーリ州セントルイスのシグマ , ケミカル , カンパニー (Sigma Chemical Company)) を含む MEM (modified Eagle ' s medium) (ドイツ、ベルリンのセロメド , バイオクロム (Seromed, Biochrom)) 中において - 80 で凍結された。

【 0 0 8 3 】

C . 生体外における単離したエンテロサイトへの接着

接着試験は、ダーフエウル - ミショーら (Darfeuille-Michaud et al.) (1990 年) 、エス , ヌットンら (S. Knutton et al.) (1985 年) 及びビー , ラフィーユら (B. Lafeuille et al.) (1981 年) の文献に説明されるように行われた。凍結された腸のサンプルは、PBS で 3 回洗浄され、そして回腸粘膜は、0 . 25 M の EDTA を含む PBS バッ

10

20

30

40

50

ァー中でエンテロサイトを分離するために、カバーガラスによって剥された。約 10^5 個の単離されたエンテロサイトが、10%牛胎児血清 (FCS, セロメド (Seromed)) を含む MEM 培地中で 10^8 個の大腸菌細胞と混合された。穏やかに攪拌しながら 37 で 2 時間培養した後に、エンテロサイトは (pH 7.2 の) PBS で 3 回洗浄された。細菌の接着は、1000 倍の倍率の位相差顕微鏡下で試験されることによって定量された。カウントは、30 から 50 個のエンテロサイトの刷子縁に接着している大腸菌の数を決定するために、二重盲検デザイン (double blind design) に従って行われた。接着指数は、一つのエンテロサイトの刷子縁に接着している細菌の数として表される。

【0084】

患者から得られるエンテロサイトの場合、観測される接着指数は、コントロールが 0.096 から 0.511 であるのに対し、0.542 から 1.999 の範囲であった (表 2)。

表 2 : エンテロサイトに対する細菌の接着指数

クローン病の患者	接着指数 ^a	
	平均	標準偏差
患者 1	1.999	0.459
患者 2	1.429	0.106
患者 3	1.352	0.101
患者 4	1.599	0.294
患者 5	1.459	0.196
患者 6	1.426	0.417
患者 7	0.768	0.167
患者 8	0.542	0.090
患者 9	0.551	0.083
患者 10	1.404	0.092
患者 11	1.056	0.347
患者 12	0.708	0.337
患者 13	1.017	0.117
健康な被験者		
被験者 1	0.208	0.084
被験者 2	0.096	0.021
被験者 3	0.133	0.030
被験者 4	0.380	0.020
被験者 5	0.240	0.030
被験者 6	0.222	0.028
被験者 7	0.511	0.035

^a 1 個のエンテロサイトの刷子縁に接着している細菌の平均値。

【0085】

1 より大きい接着指数は、刷子縁に対する効果的な接着の指標として考えられる (エス, ヌットンら (1985年); ビー, ラフィーユら (1981年))。実験において、1

より大きい指数が、13人中9人のCDの患者由来のエンテロサイトで観測され、それは69%である。そして、コントロールでは、1より大きい指数は観測されなかった。エンテロサイトの刷子縁に接着するLF82株の能力は、コントロールよりCDの患者から単離されたエンテロサイトに対する方が著しく高い(P=0.006)。この事は、CDの患者が回腸のエンテロサイトの刷子縁に位置する受容体を発現しており、前記受容体がAIECであるLF82株の接着に関与するであろう考察を導き出した。

【0086】

D. エンテロサイトの刷子縁における結合されていないマンノース残基の存在の解析
I型繊毛に位置するアドヘシンFimHは、レクチンとして機能し、宿主細胞の表面に発現する糖脂質又は糖タンパク質のマンノース化ユニットを認識する。これに基づいて、マンノース残基に特異的に結合するコンカナバリンA (ConA) が、CDの患者及びコントロールのエンテロサイトの刷子縁において、結合していないマンノース残基の存在を探索するために用いられた。単離されたエンテロサイトは、50 µg/mlのConA-FITC (FITCで標識されたConA、シグマ) を含むPBS中で1時間培養された。4回の洗浄後、エンテロサイトは400倍の倍率の蛍光顕微鏡下で観察された。

10

【0087】

観察は、レクチンがCDの患者のエンテロサイトの刷子縁に結合していることを示した。一方、コントロールのエンテロサイトへのレクチンの結合は観察されず、それは、CDの患者のエンテロサイトの刷子縁における高度にマンノース化された分子の発現を示しており、それはコントロールでは観察されない。

20

【0088】

E. 外科的切離によって得られた回腸サンプルにおけるCD66cの発現
炎症性の粘膜及び健康な粘膜のサンプルが、20人のCDの患者及び20人のコントロールそれぞれに対する外科的切離によって得られた。AFA (アルコール-ホルマリン-酢酸 (alcohol-formalin-acetic acid)) によって固定され、その後にパラフィンに包埋された断片と、4 µm厚切片的の標品とを用いることで、免疫標識は、抗CD66c抗体での免疫標識用の自動装置 (ベンタナ メディカル システム (Ventana Medical System)) によって行われた。それには、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体に基づく方法を用いた。切片は、圧力釜において圧力下で3分間熱処理されることによって、エピトープを露出させることができた。

30

【0089】

抗CD66cモノクローナル抗体のクローン9A6 (ジェノバック (Genovac)、スイス) は、1:50の希釈で抗体として用いられた。

【0090】

切片はメイヤー (Mayer) のヘマトキシリンで染色された。

【0091】

結果は、図1及び図2に示されている。健康な被験者の85%が、このCD66c抗原による標識を有さない。一方で、クローン病を患う患者は、上皮細胞の刷子縁の部位でCD66c受容体の過剰発現を示した。この発現は、高度の炎症及び潰瘍を呈する粘膜の場合において非常に高い。

40

【0092】

実施例2：細菌の接着に対する阻害試験

A. D-マンノースによる阻害アッセイ

I型繊毛によるエンテロサイトの刷子縁への大腸菌LF82株の接着に対するD-マンノースの阻害力が試験された。接着試験は、10% FCS含有MEM中において2% (w/v) D-マンノース (シグマ) 存在下で行われ、その処理は、3人のCDの患者 (A、B及びC) から得られたエンテロサイトに対して上述のように行われた。結果は表3に示されている。

表3：

クローン病の患者	マンノース非存在下における接着指数	2%マンノース存在下における接着指数 (相対値 %) ^a
患者 A	1.010	0.028 (2.7%)
患者 B	1.511	0.032 (2.1%)
患者 C	1.800	0.025 (1.4%)

10

^a 100%を表すと規定されたD-マンノース非存在下と比較した場合の、2% D-マンノース存在下における野生型LF82株の接着力の割合。

【0093】

D-マンノースの添加は、クローン病を患う患者のエンテロサイトの刷子縁へのLF82株の接着指数に顕著な減少をもたらす。

【0094】

LF82株の変異体、すなわちI型繊毛を発現していない変異体52D11及びアドヘシンFimHを発現していない変異体ZG2も試験された。これらの変異体は、表4に示される結果が証明するように、刷子縁へ接着するためのそれらの能力を失っていた。

表4：

20

菌株	不活遺伝子	患者Dのエンテロサイト に対する 接着指数 ^a (相対値 %) ^b	患者Eのエンテロサイト に対する 接着指数 ^a (相対値 %) ^b
変異株 52D11	<i>fimA</i>	0.100 (7.0)	0.150 (10.6)
変異株 ZG2	<i>fimH</i>	0.095 (6.7)	0.050 (3.6)
野生型 LF82 株		1.426 (100)	1.404 (100)

30

^a エンテロサイトの刷子縁に接着している細菌の平均値。

^b 100%を表すと規定された野生型LF82株の接着力と比較した、変異型の接着力の割合。

【0095】

これらの結果は、I型繊毛、及びより詳細にはLF82株のアドヘシンFimHが、クローン病を患う患者の回腸のエンテロサイトの刷子縁への接着に關与することを裏付ける。

【0096】

40

B. 抗体による阻害試験

試験されたモノクローナル抗体は、抗CD66cモノクローナル抗体(フランス、アンソニー(Anthony)のイノジェネックス、メナリニダイアグノスティクス(InnoGenex, Menarini Diagnostics))及び抗CD48モノクローナル抗体(フランス、ルペレエンブリーヌ(Le Perray en Yvelines)のペリクラスター、テブ(PeliCluster, Tebu))。これらの抗体は、10%FCS含有MEM中に1/100希釈で用いられる。

【0097】

エンテロサイトは、37℃で30分間抗体で前処理される。その後LF82菌が加えられ、接着試験が上述のように行われる。

【0098】

50

結果は表 5 に示される。

表 5 :

クローン病 の患者	各抗体存在下におけるエンテロサイトに 対する接着(相対値 % ^a)		
	抗体無し	抗 CD48 抗体	抗 CD66c 抗体
患者 F	1.450 ± 0.212	1.378 ± 0.174 (95.0)	0.200 ± 0.067 (13.8)
患者 G	1.145 ± 0.115	0.850 ± 0.050 (74.2)	0.100 ± 0.033 (8.7)
患者 H	1.016 ± 0.116	1.027 ± 0.027 (101.1)	0.267 ± 0.067 (26.3)
患者 I	1.283 ± 0.117	1.516 ± 0.051 (118.2)	0.283 ± 0.050 (22.0)

^a 100%を表すと規定された抗体非存在下におけるエンテロサイトによって得られた値と比較した場合の、様々な抗体と前処理した後のエンテロサイトの刷子縁へのLF82株の接着率。

【0099】

抗CD66c抗体を用いた前処理は、LF82株の接着に劇的な減少をもたらす。一方で、抗CD48抗体は接着に影響を与えず、この事はCD66c抗体で観察された障害の特異性を示す。これらの結果は、CDの患者の回腸粘膜に対するLF82株の接着が、腸上皮細胞の刷子縁の部位で過剰発現しているCD66c受容体へのI型繊毛の結合に關与することを裏付ける。

【0100】

書誌参照

- Audette, M., F. Buchegger, M. Schreyer, and J. P. Mach 1987. Monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen (CEA) identifies two new forms of crossreacting antigens of molecular weight 90,000 and 160,000 in normal granulocytes *Mol Immunol.* 24:1177-86
- Baert, F., Noman, M., Vermeire, S., Van Assche, G., G, D.H., Carbonez, A. and Rutgeerts, P. (2003) Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med.* 348: 601-608
- Beachey, E.H. (1981) Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis.* 143: 325-345
- Bennett, R.A. Rubin, P.H. and Present, D.H. (1991) Frequency of inflammatory bowel disease in offspring of couples both presenting with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 100: 1638-1643
- Boudeau, J., A. L. Glasser, E. Masseret, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease *Infect Immun.* 67:4499-509
- Boudeau, J., N. Barnich, and A. Darfeuille-Michaud 2001. Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells *Mol Microbiol.* 39: 1272-84
- Colombel, J. F. and Mesnard, B. (1993) *Maladie de Crohn.* In: Editions Techniques, *Encycl. Med. Chir. (Paris, France).* Gastroenterologie, 9-057-G10, : 1-15
- Darfeuille-Michaud, A., D. Aubel, G. Chauviere, C. Rich, M. Bourges, A. Servin, and B. Joly 1990. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*

10

20

30

40

50

- li to the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture *Infect Immun.* 58:893-902
- Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* 2002; 292:185-93
- Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., et al (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 115: 1405-1413
- Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, AL., Barnich, N., Bringer, MA., Swidsinski, A., Beaugerie, L., Colombel, JF. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004, 127, 412-421
- Desreumaux, P., Brandt, E., Gambiez, L., Emilie, D., Geboes, K., Klein, O., et al. (1997) Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 113: 118-126
- Glasser, A.L., J. Boudeau, N. Barnich, M. H. Perruchot, J. F. Colombel, and A. Darfeuille-Michaud 2001. Adherent Invasive *Escherichia coli* S strains from Patients with Crohn's Disease Survive and Replicate within Macrophages without Inducing Host Cell Death *Infect Immun.* 69:5529-37
- Grunert, F., S. Daniel, G. Nagel, S. von Kleist, and P. Jantscheff 1995. CD66b, CD66c and carcinoembryonic antigen (CEA) are independently regulated markers in sera of tumor patients. *Int J Cancer.* 63:349-55
- Guignot, J., I. Peiffer, M. F. Bernet-Camard, D. M. Lublin, C. Carnoy, S. L. Moseley, and A. L. Servin 2000. Recruitment of CD55 and CD66e brush border-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli* that infect the human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells *Infect Immun.* 68:3554-63
- Hammarstrom, S., and V. baranov. 2001. Is there a role for CEA in innate immunity in the colon? *Trends in Microbiol.* 9, 119-125
- Jantscheff P, Terracciano L, Lowy A, Glatz-Krieger K, Grunert F, Michel B, Brummer J, Laffer U, Metzger U, Herrmann R, Rochlitz C, 2003. Expression of CEACAM6 in respectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol.* 21:3638-46
- Kohler et Milstein, (1975), *Nature (London)*, 256:495-497
- Kolbinger, F., K. Schwarz, F. Brombacher, S. von Kleist, and F. Grunert 1989. Expression of an NCA cDNA in NIH/3T3 cells yields a 110K glycoprotein, which is anchored into the membrane via glycosyl-phosphatidylinositol *Biochem Biophys Res Commun.* 161:1126-34
- Knutton, S., D. R. Lloyd, D. C. Candy, and A. S. McNeish 1985. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to human small intestinal enterocytes *Infect Immun.* 48:824-31
- Lafeuille, B., A. Darfeuille, S. Petit, B. Joly, and R. Cluzel 1981. ["In vitro" study of attachment to human enterocytes in "*Escherichia coli*" strains isolated from infants with diarrheal disease (author's transl)] *Ann Microbiol (Paris).* 132B:57-6
- Leusch, H. G., S. A. Hefta, Z. Drzeniek, K. Hummel, Z. Markos-Pusztai, and C. Wagener 1990 *Escherichia coli* of human origin binds to carcinoembryonic antigen (CEA) and non-specific crossreacting antigen (NCA)

FEBS Lett. 261:405-9

- Malaviya, R., Z. Gao, K. Thankavel, P. A. van der Merwe, and S. N. Abraham 1999. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48 Proc Natl Acad Sci USA. 96:8110-5
- Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G.1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J. Mol. Biol. 222,581-597
- Masseret, E., Boudeau, J., Colombel, J.F., Neut, C., Desreumaux, P., Joly, B., et al (2001) Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. Gut. 48: 320-325 10
- Nakamura RM., Matsutani M., Barry M 2003. Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. Clinica Chimica Acta 335:9-20
- Nowicki, B., Hart, A., Coyne, K. E., Lublin, D. M. and Nowicki, S., Short consensus repeat-3 domain of recombinant decay-accelerating factor is recognized by *Escherichia coli* recombinant Dr adhesin in a model of a cell-cell interaction. J Exp Med, 178, 2115-21. (1993)
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 2002;347:417-29
- Present, D.H., Rutgeerts, P., Targan, S., Hanauer, S.B., Mayer, L., van Hogezand, R.A., et al (1999) Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease N Engl J Med. 340: 1398-1405 20
- Rutgeerts, P., D'Haens, G., Targan, S., Vasilias, E., Hanauer, S.B., Present, D.H., et al (1999) Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. Gastroenterology. 117: 761-769
- Ryan P., Kelly RG., Lee G., Collins JK, O'Sullivan GC., O'Connell J O., Shanahan F. 2004. Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease-Detection by laser capture microdissection. Am J Gastroenterology, 99: 1539-43
- Sartor RB, H. C. Rath, R. K. Sellon. Microbial factors in chronic intestinal inflammation. Current opinion in gastroenterology 1996;12:327-333 30
- Sauter, S. L., S. M. Rutherford, C. Wagener, J. E. Shively, and S.A. Hefta 1991. Binding of nonspecific cross-reacting antigen, a granulocyte membrane glycoprotein, to *Escherichia coli* expressing type 1 fimbriae Infect Immun. 59:2485-93
- Sauter, S. L., S. M. Rutherford, C. Wagener, J. E. Shively, and S. A. Hefta Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from *E. coli* on non-specific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein. J Biol Chem. 268 (21): 15510-6 40
- Scott, J.K. and Smith, G.P., 1990 Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. Science, 249 :386-390
- Shanahan F. Crohn's disease. Lancet 2002;359:62-9
- Shin, J. S., and S. N. Abraham 1999, Bacteria-host cell interaction mediated by cellular cholesterol/glycolipid-enriched microdomains. Biosci Rep. 19 (5):421-32
- Shin, J. S., Z. Gao, and S. N. Abraham 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells Science. 289:785-8
- von Kleist, S., G. Chavanel, and P. Burtin 1972. Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoemb 50

ryonic antigen. Proc Natl Acad Sci USA. 69:2492-4

Wallis RS., Broder MS., Wong JY., Hanson ME, Beenhouver DO 2004. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. Clin Infect Dis. 38:1261-5

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】図1は、クローン病の炎症性腸疾患又は出血性直腸結腸炎型疾患を患っていない被験者（1A及び1B）、及びクローン病を患っている被験者（1C及び1D）の回腸粘膜の一部を表す。図1A及び1Cは、粘膜の炎症の無い部分であり、図1B及び1Dは、浸潤した多核性好中球の存在によって示されるように、粘膜の炎症を伴う部分である。図1Aは抗CD66c抗体による標識を示さず、これは、この糖タンパク質が健康な組織には発現していないことを示す。クローン病を患っていない被験者由来の炎症の兆候を示す組織（図1B）でさえも、CD66c抗体による標識は観察されないことが注目されるべきである。前記被験者の腸の炎症は、（小腸穿孔の術後の癒着である）外傷を原因とする。従って、回腸部位の糖タンパク質CD66cの存在は、粘膜の炎症状態とは結びつかない。図1Cは、クローン病を患う患者のエンテロサイトの刷子縁部位におけるCD66cの発現を示す。この発現は、潰瘍になっていない粘膜部位において、炎症の非存在下で観察される。図1Dは、クローン病を患う患者の炎症及び病巣となっている領域における、エンテロサイトの刷子縁部位でのCD66cの高発現と、このタンパク質の細胞質での発現を示す。免疫標識は、色原体（chromogen）に結合したアビジン - ビオチンペルオキシダーゼ複合体によって標識された抗CD66c抗体を用いて行われる。

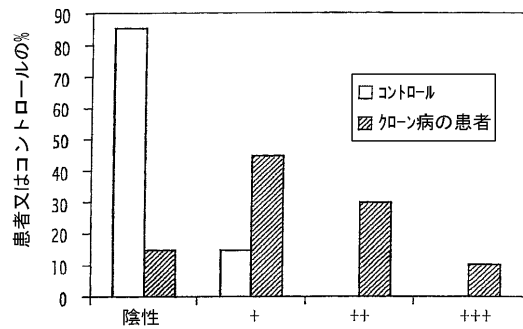
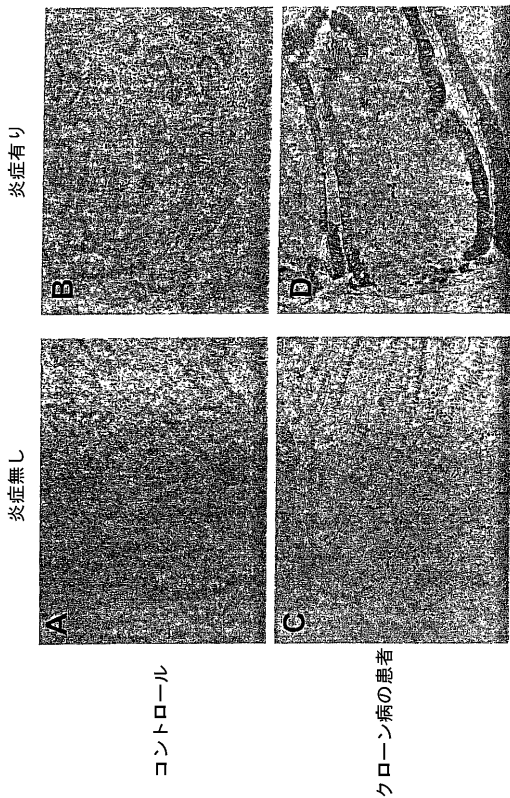
10

20

【図2】図2は、（図1のプロトコルに従って）抗CD66c抗体による標識を示す患者又はコントロールの被験者の割合を示すグラフである。標識は、強度に応じて - から +++ で評価されている。健康な被験者の15%のみに対して、クローン病を患う患者の85%が回腸部位でCD66c受容体を異常に発現している。

【図1】

【図2】



【配列表】

2008517261000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/FR2005/002538
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 G01N33/567 A61K39/395 A61K38/17 C12Q1/68 A61K31/70 A61K31/70		
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) G01N A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/002117 A (ASTION DEVELOPMENT A/S; WEIDNER, MORTEN, SLOTH) 9 January 2003 (2003-01-09) claims 4,5,20,21,48,66	17
X	US 2004/005304 A1 (BRUDNAK MARK A) 8 January 2004 (2004-01-08) claims 17,25,42,50	17
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 26 June 2006		Date of mailing of the international search report 13/07/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J-E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2005/002538

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAUTER SYBILLE L ET AL: "Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from Escherichia coli on nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 21, 1993, pages 15510-15516, XP002328260 ISSN: 0021-9258 cited in the application the whole document	1-14
A	BOUDEAU JEROME ET AL: "Type 1 pili-mediated adherence of Escherichia coli strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 5, March 2001 (2001-03), pages 1272-1284, XP002328261 ISSN: 0950-382X cited in the application the whole document	1-14
A	WO 03/070266 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE; MCGILL UNIVERSITY; MAYER, LLOYD; STANN) 28 August 2003 (2003-08-28) paragraphs [0004], [0006], [0009], [0023], [0030]; example 4	15,16
A	US 6 290 959 B1 (WU XUE-RU ET AL) 18 September 2001 (2001-09-18) claims	18
A	WO 97/39356 A (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER; PROMETHEUS) 23 October 1997 (1997-10-23) claims page 27, line 5 - page 30, line 24 example V	1-14
P,X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; April 2005 (2005-04), BARNICH NICOLAS ET AL: "E. coli colonization of the ileal mucosa in patients with Crohn's disease involves type I pili and expression of the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CEACAM6" XP002386968 Database accession no. PREV200600211501 abstract -/--	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2005/002538

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>& GASTROENTEROLOGY, vol. 128, no. 4, Suppl. 2, April 2005 (2005-04), page A501, ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-GASTROENTEROLOGICAL-ASSOCIATION/D IGEST IVE-DISEASE-WEEK; CHICAGO, IL, USA; MAY 14 -19, 2005 ISSN: 0016-5085</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2005/002538

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03002117	A	09-01-2003	NONE	
US 2004005304	A1	08-01-2004	NONE	
WO 03070266	A	28-08-2003	AU 2002367696 A1	09-09-2003
US 6290959	B1	18-09-2001	NONE	
WO 9739356	A	23-10-1997	AU 2991697 A CA 2251567 A1 EP 0906573 A1 IL 126534 A	07-11-1997 23-10-1997 07-04-1999 25-07-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/002538

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. G01N33/68 A61K31/70	G01N33/567 A61K31/70	
A61K39/395	A61K38/17	
C12Q1/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Bases de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
	no. des revendications visées	
X	WO 03/002117 A (ASTION DEVELOPMENT A/S; WEIDNER, MORTEN, SLOTH) 9 janvier 2003 (2003-01-09) revendications 4,5,20,21,48,66	17
X	US 2004/005304 A1 (BRUDNAK MARK A) 8 janvier 2004 (2004-01-08) revendications 17,25,42,50	17
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	
<input checked="" type="checkbox"/>	Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe	
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
C document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets	
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
26 juin 2006	13/07/2006	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Stricker, J-E	

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2005/002538

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	SAUTER SYBILLE L ET AL: "Identification of the specific oligosaccharide sites recognized by type 1 fimbriae from Escherichia coli on nonspecific cross-reacting antigen, a CD66 cluster granulocyte glycoprotein" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 21, 1993, pages 15510-15516, XP002328260 ISSN: 0021-9258 cité dans la demande le document en entier	1-14
A	BOUDEAU JEROME ET AL: "Type 1 pili-mediated adherence of Escherichia coli strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 5, mars 2001 (2001-03), pages 1272-1284, XP002328261 ISSN: 0950-382X cité dans la demande le document en entier	1-14
A	WO 03/070266 A (MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE; MCGILL UNIVERSITY; MAYER, LLOYD; STANN) 28 août 2003 (2003-08-28) alinéas [0004], [0006], [0009], [0023], [0030]; exemple 4	15,16
A	US 6 290 959 B1 (WU XUE-RU ET AL) 18 septembre 2001 (2001-09-18) revendications	18
A	WO 97/39356 A (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER; PROMETHEUS) 23 octobre 1997 (1997-10-23) revendications page 27, ligne 5 - page 30, ligne 24 exemple V	1-14
P,X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; avril 2005 (2005-04), BARNICH NICOLAS ET AL: "E. coli colonization of the ileal mucosa in patients with Crohn's disease involves type I pili and expression of the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CEACAM6" XP002386968 Database accession no. PREV200600211501 abrégé	1-18

5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n° PCT/FR2005/002538
--

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
	& GASTROENTEROLOGY, vol. 128, no. 4, Suppl. 2, avril 2005 (2005-04), page A501, ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-GASTROENTEROLOGICAL-ASSOCIATION/D IGEST IVE-DISEASE-WEEK; CHICAGO, IL, USA; MAY 14 -19, 2005 ISSN: 0016-5085	

5

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2005/002538

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03002117	A	09-01-2003	AUCUN	
US 2004005304	A1	08-01-2004	AUCUN	
WO 03070266	A	28-08-2003	AU 2002367696 A1	09-09-2003
US 6290959	B1	18-09-2001	AUCUN	
WO 9739356	A	23-10-1997	AU 2991697 A	07-11-1997
			CA 2251567 A1	23-10-1997
			EP 0906573 A1	07-04-1999
			IL 126534 A	25-07-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	(2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 1 1	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)		C 1 2 N	15/00		A
A 6 1 K 45/00	(2006.01)		A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P 1/04	(2006.01)		A 6 1 P	1/04		

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

(72) 発明者 ダルフェウイール - ミシヨール, アルレット

フランス F - 6 3 6 7 0 ラ ロッシュ ブランシュ, ルート ド シャノナ, 4 5, ル ムーラン

(72) 発明者 グラッサー, アン - リーズ

フランス F - 6 3 1 7 0 オビエア, シュマン デ グラビ, 3 5

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CA25 CA26 CB03 CB04 CB21 DA14 DA36 DA77
 FB02 FB03 FB07
 4B024 AA01 AA11 CA02 CA12 HA14
 4B063 QA05 QA18 QA19 QQ06 QQ08 QQ43 QQ53 QR08 QR32 QR56
 QR62 QR75 QR77 QS36 QX02
 4C084 AA17 NA14 ZA682 ZC022

专利名称(译)	克罗恩病的诊断和治疗		
公开(公告)号	JP2008517261A	公开(公告)日	2008-05-22
申请号	JP2007536221	申请日	2005-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	单威赛引用多贝尔新克莱蒙 - 1 UNIV DAUVERGNE CLERMONT 1		
申请(专利权)人(译)	Universite电奥弗涅克莱蒙1		
[标]发明人	バーニッチニコラス ダルフェウイルミシヨールレット グラッサーアンリーズ		
发明人	バーニッチ,ニコラス ダルフェウイル-ミシヨール,アルレット グラッサー,アン-リーズ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 C12Q1/68 C12Q1/02 A61P43/00 C12N15/09 A61K45/00 A61P1/04		
CPC分类号	A61K31/70 A61P1/00 A61P1/04 A61P43/00 C07K16/2803 C07K2317/76 G01N33/567 G01N33/6893 G01N2333/705 G01N2500/00 G01N2800/065 Y02A50/473 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N2333/70596		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12Q1/68.A C12Q1/02 A61P43/00.111 C12N15/00.A A61K45/00 A61P1/04		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB21 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/CA12 4B024/HA14 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA682 4C084/ZC022		
优先权	2004010865 2004-10-14 FR		
其他公开文献	JP4896883B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种体外诊断克罗恩病的方法或一种确定患有克罗恩病的人的倾向的方法，该方法包括检测患有所述疾病或有患所述疾病风险的受试者中CD66c的过表达。通过这样做。本发明还涉及克罗恩病的预防或治疗措施。

ペプチド名	ペプチドの配列
CD66c-1	STPFNVAEGKEVL
CD66c-2	LAHNLPQNRIGYSW
CD66c-3	KGERVDGNSLIVGY
CD66c-4	VGYVIGTQQATPG
CD66c-5	ATPGPAYSGRETIY
CD66c-6	LLIQNVTQNDTGFY
CD66c-7	VIKSDLVNEEATGQ
CD66c-8	EATGQFHVPELPK
CD66c-9	NNSNPVEDKDAVAF
CD66c-10	PEVQNTTYLWVWVNG
CD66c-11	NGQSLPVSPRLQLS
CD66c-12	LQLSNGNMTLTLIS
CD66c-13	TLLSVKRNDAGSYE