

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 542488

(P2002 - 542488A)

(43)公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	K 2 G 0 4 5 D 4 B 0 2 4 P 4 B 0 6 3 U 4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/7088		A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 84数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 612756(P2000 - 612756)

(86) (22)出願日 平成12年4月20日(2000.4.20)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月22日(2001.10.22)

(86)国際出願番号 PCT/US00/10888

(87)国際公開番号 W000/63702

(87)国際公開日 平成12年10月26日(2000.10.26)

(31)優先権主張番号 09/295,868

(32)優先日 平成11年4月21日(1999.4.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/130,355

(32)優先日 平成11年4月21日(1999.4.21)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザイコス インク .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
ンブリッジ イースト コンコルド アベ
ニュー 763

(71)出願人 キングス カレッジ ロンドン
KINGS COLLEGE LOND
ON
イギリス国, WC2R 2LS ロンドン, スラン
ド(番地なし)

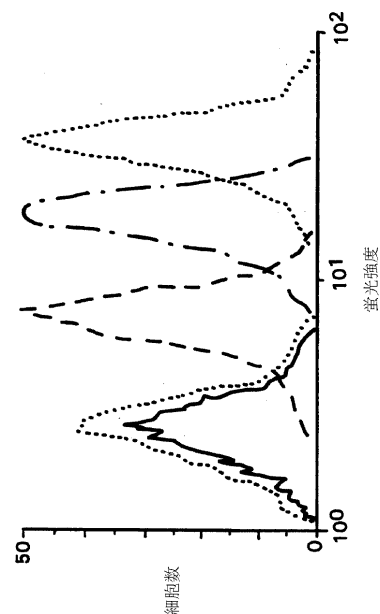
(72)発明者 ピークマン マーク
英国 ロンドン ベックウィズ ロード
12

(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外 1 名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 疾患を促進するCD4 + Tリンパ球によって認識されるペプチドエピトープ

(57)【要約】

本発明は、例えば自己免疫疾患などの、感受性が特定のクラスII MHC遺伝子の発現によって決定される疾患の発病に関係するCD4+ T細胞を活性化するペプチドエピトープを同定する方法を提供する。本発明には、そのような方法によってIA-2ポリペプチドから誘導したペプチド、改変ペプチドリガンド、および改変ペプチドリガンドの使用を含む治療方法が含まれる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の段階を含む、ポリペプチドのクラスII MHC結合断片を同定する方法：

- (a) 第一のビオチン部分に結合したリガンドを提供する段階；
- (b) 第二のビオチン部分に結合したポリペプチドを提供する段階；
- (c) クラスII MHC分子とリガンドに結合する細胞表面受容体とを発現する哺乳類の抗原提示細胞（APC）を提供する段階；
- (d) APCを（a）のビオチン結合リガンド、（b）のビオチン結合ポリペプチド、およびアビジンと接触させて、細胞表面受容体に結合する複合体を形成する段階；
- (e) APCによる複合体の内在化が起こるような条件でAPCを維持する段階；
- (f) ペプチドに結合したクラスII MHC分子をAPCから単離する段階；および
- (g) ペプチドがポリペプチドのクラスII MHC結合断片である、該ペプチドをクラスII MHC分子から溶出する段階。

【請求項2】 ペプチドのアミノ酸配列を同定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】 哺乳類のAPC上のクラスII MHC分子によるペプチドの提示が哺乳類疾患の病態に関連している、請求項1記載の方法。

【請求項4】 哺乳類のAPC上のクラスII MHC分子によるペプチドの提示が哺乳類疾患に対する保護に関連している、請求項1記載の方法。

【請求項5】 疾患が、自己免疫疾患である、請求項3記載の方法。

【請求項6】 疾患が、感染疾患または癌である、請求項3記載の方法。

【請求項7】 感染疾患が、細菌性疾患、ウイルス性疾患、または寄生虫性疾患である、請求項6記載の方法。

【請求項8】 感染疾患がらい病である、請求項7記載の方法。

【請求項9】 自己免疫疾患が、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、重症筋無力症、全身性紅斑性狼瘡、自己免疫性未成熟卵巣不全、グレーブス甲状腺炎、橋本甲状腺炎、原発性甲状腺機能低下症、小児脂肪便症、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、アジソン病、白斑、全身性硬化症、または抗糸球体基底膜疾患

である、請求項5記載の方法。

【請求項10】 自己免疫疾患がインスリン依存性糖尿病（IDDM）である、請求項5記載の方法。

【請求項11】 ポリペプチドが、プレプロインスリン、プロインスリン、またはインスリンである、請求項10記載の方法。

【請求項12】 ポリペプチドが、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD65）である、請求項10記載の方法。

【請求項13】 ポリペプチドが、IA-2チロシンホスファターゼ（IA-2）、またはフォグリン（IA-2）である、請求項10記載の方法。

【請求項14】 APCが樹状細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項15】 APCがマクロファージまたは単球である、請求項1記載の方法。

【請求項16】 APCがBリンパ球である、請求項1記載の方法。

【請求項17】 リガンドがAPC上で細胞表面受容体に結合するレクチン分子である、請求項1記載の方法。

【請求項18】 レクチン分子が、フィトラッカ・アメリカーナ（*Phytolacca americana*）由来のアメリカヤマゴボウマイトゲン（pokeweed mitogen）である、請求項17記載の方法。

【請求項19】 細胞表面受容体が、APCによって内在化されうる細胞表面分子であり、かつリガンドが細胞表面分子に結合する抗体分子である、請求項1記載の方法。

【請求項20】 細胞表面分子が免疫グロブリン分子である、請求項19記載の方法。

【請求項21】 哺乳類がヒトである、請求項1記載の方法。

【請求項22】 クラスII MHC分子がDRB1*0401、DRB1*0405、およびDRB1*0101からなる群より選択される遺伝子によってコードされる鎖を有するDR分子である、請求項10記載の方法。

【請求項23】 クラスII MHC分子が以下の(a)、(b)を有するDQ分子である、請求項10記載の方法：

(a) DQA1*0501およびDQA1*0301からなる群より選択される遺伝子によってコードされる鎖;ならびに

(b) DQB1*0302、DQB1*0201、およびDQB1*0501からなる群より選択される遺伝子によってコードされる鎖。

【請求項24】 配列VSSQFSDAAQASP (配列番号:47)を含む、アミノ酸残基26個未満の長さの単離ペプチド。

【請求項25】

VSSQFSDAAQASPSS (配列番号 :1);
 SVSSQFSDAAQASPS (配列番号 :2); SSVSSQFSDAAQASP
 (配列番号 :3); SVSSQFSDAAQASPSSHS (配列番号 :4);
 SRVSSVSSQFSDAAQASPSSHSST (配列番号 :5);
 SVSSQFSDAAQASPSSHSSTPSWC (配列番号 :6);
 VSSQFSDAAQASPSSHSSTPSWCE (配列番号 :7); および
 VSSVSSQFSDAAQASPSSHS (配列番号 :8)。

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項24記載の単離ペプチド。

【請求項26】 配列TQETRTL (配列番号:48)を含む、アミノ酸残基26個未満の長さの単離ペプチド。

【請求項27】

TQETRTLTLQFHF (配列番号 :9);
 YLKNVQTQETRTL (配列番号 :10); VQTQETRTLTLQFHF
 (配列番号:11); LKNVQTQETRTLTLQF (配列番号 :12);
 YLKNVQTQETRTLTLQ (配列番号 :13); KNVQTQETRTLTLQFH
 (配列番号:14); SFYLKNVQTQETRTLTLQFH (配列番号 :15); および
 FYLKNVQTQETRTLTLQFHF (配列番号 :16)。

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項26記載の単離ペプチド。

【請求項28】 配列AYQAEPNT (配列番号:49)を含む、アミノ酸残基26個未満の長さの単離ペプチド。

【請求項29】

AYQAEPNTCATAQ (配列番号 :17);
LCAYQAEPNTCATAQG (配列番号 :18); **LAKEWQALCAYQAEPN**
(配列番号 :19); **AYQAEPNTCATAQGE** (配列番号 :20);
WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :21); および
LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :22).

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項28記載の単離ペプチド

。

【請求項30】 配列**FEFALTAVAE**(配列番号 :50)を含む、アミノ酸残基26個未満の長さの単離ペプチド。

【請求項31】

DQFEFALTAVAE(配列番号 :33);
DQFEFALTAVAEVNAI (配列番号 :34); **FEFALTAVAEVNAILKA**
(配列番号 :35); **SKDQFEFALTAVAEVNA** (配列番号 :36);
および **SKDQFEFALTAVAEVNAILK** (配列番号 :37).

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項30記載の単離ペプチド

。

【請求項32】 配列**CTVIVMLT**(配列番号 :51)を含む、アミノ酸残基26個未満の長さの単離ペプチド。

【請求項33】

GCTVIVMLTPLVED (配列番号 :23);
CTVIVMLTPLVEDG (配列番号 :24); **ESGCTVIVMLTPLVEDG**
(配列番号 :25); **MVWESGCTVIVMLTPL** (配列番号 :26);
SGCTVIVMLTPLVEDGVK (配列番号 :27);
ESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :28); **WQMVWESGCTVIVMLT**
(配列番号 :29); **DFWQMVWESGCTVIVMLT** (配列番号 :30);
FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (配列番号 :31); および
MVWESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :32).

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項32記載の単離ペプチド

。

【請求項34】 配列**KVESSPSRSDY**(配列番号 :52)を含む、アミノ酸残基26個未満の長さの単離ペプチド。

【請求項35】

KVESSPSRSDYI (配列番号 :38);
LKVESSPSRSDY (配列番号 :39); **KLKVESSPSRSDYINAS**
(配列番号:40); **KVESSPSRSDYINASPIIEHDP** (配列番号 :41);
および **LKVESSPSRSDYINASPII** (配列番号 :42)。

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、請求項34記載の単離ペプチド

。

【請求項36】 アミノ酸配列が1～6位のアミノ酸置換を除いてIA-2の断片と同一であって、断片の長さがアミノ酸残基26個未満でAYQAEPT (配列番号:49)、VSSQFSDAAQASP (配列番号:47)、およびTQETRTL (配列番号:48) からなる群より選択される配列を含み、改変ペプチドリガンドにおいて断片のアミノ酸残基の30%以下が異なるアミノ酸残基に置換されている、改変ペプチドリガンド

。

【請求項37】 断片の配列が、

AYQAEPNTCATAQ (配列番号:17);
LCAYQAEPNTCATAQG (配列番号:18);
LAKEWQALCAYQAEPN (配列番号:19);
AYQAEPNTCATAQGEGNIK (配列番号:20);
WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号:21);
LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号:22);
VSSQFSDAAQASPSS (配列番号:1); **SVSSQFSDAAQASPS**
 (配列番号:2); **SSVSSQFSDAAQASP** (配列番号:3);
SVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号:4);
SRVSSVSSQFSDAAQASPSSHST (配列番号:5);
SVSSQFSDAAQASPSSHSTPSWC (配列番号:6);
VSSQFSDAAQASPSSHSTPSWCE (配列番号:7);
VSSVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号:8); **TQETRRLTQFHF**
 (配列番号:9); **YLKNVQTQETRRL** (配列番号:10);
VQTQETRRLTQFHF (配列番号:11); **LKNVQTQETRRLTQF**
 (配列番号:12); **YLKNVQTQETRRLTQ** (配列番号:13);
KNVQTQETRRLTQFH (配列番号:14); **SFYLKNVQTQETRRLTQFH**
 (配列番号:15); および **FYLKNVQTQETRRLTQFHF**
 (配列番号:16).

からなる群より選択される、請求項36記載の改変ペプチドリガンド。

【請求項38】 アミノ酸配列が1～6位のアミノ酸置換を除いてIA-2の断片と同一であって、断片の長さがアミノ酸残基26個未満で

CTVIVMLT (配列番号:44),
FEFALTAVAEE (配列番号:43), または **KVESSPSRSDY**
 (配列番号:52)

からなる群より選択される配列を含み、改変ペプチドリガンドにおいて断片のアミノ酸残基の30%以下が異なるアミノ酸残基に置換されている、改変ペプチドリガンド。

【請求項39】 断片の配列が、

GCTVIVMLTPLVED (配列番号 :23);
CTVIVMLTPLVEDG (配列番号 :24);
ESGCTVIVMLTPLVEDG (配列番号 :25); **MWESGCTVIVMLTPL**
(配列番号 :26); **SGCTVIVMLTPLVEDGVK** (配列番号 :27);
ESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :28); **WQMVWESGCTVIVMLT**
(配列番号 :29); **DFWQMVWESGCTVIVMLT** (配列番号 :30);
FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (配列番号 :31);
MWESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :32); **DQFEFALTAVAAEE**
(配列番号 :33); **DQFEFALTAVAAEEVNAI** (配列番号 :34);
FEFALTAVAAEEVNAILKA (配列番号 :35);
SKDQFEFALTAVAAEEVNA (配列番号 :36);
SKDQFEFALTAVAAEEVNAILK (配列番号 :37); **KVESSPSRSDYI**
(配列番号 :38); **LKVESSPSRSDY** (配列番号 :39);
KLKVESSPSRSDYINAS (配列番号 :40);
KVESSPSRSDYINASPIIEHDP (配列番号 :41); および
LKVESSPSRSDYINASPII (配列番号 :42).

からなる群より選択される、請求項38記載の改変ペプチドリガンド。

【請求項40】 以下の段階を含む、改変ペプチドリガンドを作成する方法
:

- (a) 請求項2記載の方法を実施する段階; および
- (b) ペプチドの1、2、3、4、5、または6位でアミノ酸置換を有することを除き、複合体から溶出されたペプチドの配列と同一である配列からなるAPLを合成する段階。

【請求項41】 ポリペプチドが、インスリン、プロインスリン、またはプレプロインスリンである、請求項40記載の方法。

【請求項42】 ポリペプチドが、IA-2またはIA-2'である、請求項40記載の方法。

【請求項43】 ポリペプチドが、GAD65である、請求項40記載の方法。

【請求項44】 以下の段階を含む、哺乳類においてT細胞自己反応性を減少させる方法:

- (a) 1~6位でのアミノ酸置換を除き、APLが哺乳類のクラスII MHC分子に結合する、インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、IA-2、IA-2'、またはGAD65の天然に処理された糖尿病関連ペプチド断片の配列と同一である配列

を有するAPLを提供する段階；および

(b) APLまたはAPLをコードするDNAを哺乳類に投与する段階。

【請求項45】 以下の段階を含む、ポリペプチドのクラスII MHC結合断片を同定する方法：

(a) ビオチン部分に結合したリガンドを提供する段階；

(b) アビジン部分に結合したポリペプチドを提供する段階；

(c) クラスII MHC分子とリガンドに結合する細胞表面受容体とを発現する哺乳類のAPCを提供する段階；

(d) APCを(a)のビオチン結合リガンド、および(b)のアビジン結合ポリペプチドと接触させて、細胞表面受容体に結合する複合体を形成する段階；

(e) APCによる複合体の内在化が起こるような条件でAPCを維持する段階；

(f) ペプチドに結合したクラスII MHC分子をAPCから単離する段階；および

(g) ペプチドがポリペプチドのクラスII MHC結合断片である、該ペプチドをクラスII MHC分子から溶出する段階。

【請求項46】 以下の段階をさらに含む、請求項45記載の方法：

(h) 個体のAPCがクラスII MHC分子を有する、該クラスII MHC分子によるペプチドの提示に関連した病態に対して感受性があることが疑われる個体からのCD4リンパ球を提供する段階；

(i) ペプチドが結合したクラスII MHC分子を有するAPCsの集団を提供する段階；

(j) (i)のAPCsの集団に(h)のCD4リンパ球を接触させる段階；および

(k) ペプチドが該個体の病態に関連することの指標として、CD4リンパ球がクラスII MHC結合ペプチドを認識するか否かを決定する段階。

【請求項47】 上記の提示によって、CD4+ Tリンパ球の病的反応が起こる、請求項45記載の方法。

【請求項48】 上記の提示によって、CD4+ Tリンパ球の保護的反応が起こる、請求項45記載の方法。

【請求項49】 以下の段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

(h) 個体のAPCがクラスII MHC分子を有する、該クラスII MHC分子によるペプ

チドの提示に関連した病態に対して感受性があることが疑われる個体からのCD4リンパ球を提供する段階；

(i) ペプチドが結合したクラスII MHC分子を有するAPCsの集団を提供する段階；

(j) (i)のAPCsの集団に(h)のCD4リンパ球を接触させる段階；および

(k) CD4リンパ球がクラスII MHC結合ペプチドを認識するか否かを決定する段階。

【請求項50】 上記の提示によって、CD4+ Tリンパ球の病的反応が起こる、請求項49記載の方法。

【請求項51】 上記の提示によって、CD4+ Tリンパ球の保護的反応が起こる、請求項49記載の方法。

【請求項52】 IA-2ペプチドが

VSSQFSDAAQASPSS (配列番号 :1); SVSSQFSDAAQASPS
 (配列番号:2); **SSVSSQFSDAAQASP (配列番号 :3);**
SVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号 :4);
SRVSSVSSQFSDAAQASPSSHST (配列番号 :5);
SVSSQFSDAAQASPSSHSTPSWC (配列番号 :6);
VSSQFSDAAQASPSSHSTPSWCE (配列番号 :7);
VSSVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号 :8); TQETRRLTQFHF
 (配列番号 :9); **YLKNVQTQETRTL (配列番号 :10);**
VQTQETRRLTQFHF (配列番号 :11); LKNVQTQETRRLTQF
 (配列番号 :12); **YLKNVQTQETRRLTQ (配列番号 :13);**
KNVQTQETRRLTQFH (配列番号 :14); SFYLKNVQTQETRRLTQFH
 (配列番号 :15); **FYLKNVQTQETRRLTQFHF (配列番号 :16);**
AYQAEPNTCATAQ (配列番号 :17); LCAYQAEPNTCATAQG
 (配列番号 :18); **LAKEWQALCAYQAEPNT (配列番号 :19);**
AYQAEPNTCATAQEGNIK (配列番号 :20);
WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :21);
LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :22);
GCTVIVMLTPLVED (配列番号 :23); CTVIVMLTPLVEDG
 (配列番号 :24); **ESGCTVIVMLTPLVEDG (SEQ ID NO:25);**
MVWESGCTVIVMLTPL (配列番号 :26); SGCTVIVMLTPLVEDGVK
 (配列番号 :27); **ESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :28);**
WQMVWESGCTVIVMLT (配列番号 :29); DFWQMVWESGCTVIVMLT
 (配列番号 :30); **FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (配列番号 :31);**
MVWESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :32); DQFEFALTAVAAE
 (配列番号 :33); **DQFEFALTAVAAEEVNAI (配列番号 :34);**
FEFALTAVAAEEVNAILKA (配列番号 :35);
SKDQFEFALTAVAAEEVNA (配列番号 :36);
SKDQFEFALTAVAAEEVNAILK (配列番号 :37); KVESSPSRSDYI
 (配列番号 :38); **LKVESSPSRSDY (配列番号 :39);**
KLKVESSPSRSDYINAS (配列番号 :40);
KVESSPSRSDYINASPPIEHDP (配列番号 :41); および
LKVESSPSRSDYINASPPII (配列番号 :42).

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、以下の段階を含む診断方法：

(a) IDDMを有する、または感受性があることが疑われる個体からのCD4リンパ球を提供する段階；

(b) APCsの集団がIA-2ペプチドに接触されており、クラスII MHC分子がIA-2ペプチドに結合している、個体によって発現されたものと同じの対立遺伝子のクラスII MHC分子をその表面に有するAPCsの集団を提供する段階；

- (c) (b) のAPCsの集団を(a)のCD4リンパ球に接触させる段階；および
 (d) 該個体がIDDMを有する、またはIDDMに対する感受性を有することの指標として、CD4リンパ球がクラスII MHC結合ペプチドを認識するか否かを決定する方法。

【請求項53】 ペプチドが、

VSSQFSDAAQASPSS (配列番号 :1); SVSSQFSDAAQASPS
 (配列番号 :2); SSVSSQFSDAAQASP (配列番号 :3);
 SVSSQFSDAAQASPSHSS (配列番号 :4);
 SRVSSVSSQFSDAAQASPSHSST (配列番号 :5);
 SVSSQFSDAAQASPSHSSTPSWC (配列番号 :6);
 VSSQFSDAAQASPSHSSTPSWCE (配列番号 :7);
 VSSVSSQFSDAAQASPSHSS (配列番号 :8); TQETRLLTQFHF
 (配列番号 :9); YLKNVQTQETRTL (配列番号 :10);
 VQTQETRLLTQFHF (配列番号 :11); LKNVQTQETRLLTQF
 (配列番号 :12); YLKNVQTQETRLLTQ (配列番号 :13);
 KNVQTQETRLLTQFH (配列番号 :14); SFYLKNVQTQETRLLTQFH
 (配列番号 :15); FYLKNVQTQETRLLTQFHF (配列番号 :16);
 AYQAEPNTCATAQ (配列番号 :17); LCAYQAEPNTCATAQG
 (配列番号 :18); LAKEWQALCAYQAEPNT (配列番号 :19);
 AYQAEPNTCATAQGEQGNIK (配列番号 :20);
 WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :21);
 LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :22);
 GCTVIVMLTPLVED (配列番号 :23); CTVIVMLTPLVEDG
 (配列番号 :24); ESGCTVIVMLTPLVEDG (配列番号 :25);
 MVWESGCTVIVMLTPL (配列番号 :26); SGCTVIVMLTPLVEDGVK
 (配列番号 :27); ESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :28);
 WQMVWESGCTVIVMLT (配列番号 :29); DFWQMVWESGCTVIVMLT
 (配列番号 :30); FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (配列番号 :31);
 MVWESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :32); DQFEFALTAVAAE
 (配列番号 :33); DQFEFALTAVAAEEVNAI (配列番号 :34);
 FEFALTAVAAEEVNAILKA (配列番号 :35);
 SKDQFEFALTAVAAEEVNA (配列番号 :36);
 SKDQFEFALTAVAAEEVNAILK (配列番号 :37); KVESSPSRSYI
 (配列番号 :38); LKVESSPSRSYI (配列番号 :39);
 KLKVESSPSRSYINAS (配列番号 :40);
 KVESSPSRSYINASPIIEHDP (配列番号 :41); および
 LKVESSPSRSYINASPII (配列番号 :42).

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する、被験者にペプチドを投与することを含む、被験者をIDDMまたはIDDMの病的症状に対して保護する方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の背景**

本発明は、免疫学的病因を有する疾患、特にCD4+ Tリンパ球を含む疾患の分野である。

【0002】

抗原提示細胞（APCs）による無傷の蛋白質抗原の内在化および蛋白質分解によるプロセッシングの後、APCs上のクラスII主要組織適合抗原複合体（MHC）分子は、抗原に由来する短い抗原性ペプチド（エピトープ）に結合して、CD4+ Tリンパ球に対して結合したペプチドを提示する[ジャーメイン（Germain, R. N.）、1994、Cell 76：287～299]。クラスII MHC遺伝子およびそれらがコードする分子は、個体によって非常に多様であり、クラスII MHC分子間の差は、どのペプチドがT細胞エピトープとして提示されるように選択されるかに対して大きな影響を及ぼす。個体によって発現されるクラスII MHC分子の型が異なること（対立遺伝子）は、広い範囲のCD4+ T細胞媒介性疾患、最も特にインスリン依存型真性糖尿病（IDDM）のような自己免疫疾患に対する個人の感受性に主要な影響を及ぼす[デービス（Davies）ら、1994、Nature 371：130～136]。有効な治療および/または予防製剤およびプロトコールを開発するためには、これらの疾患を媒介するCD4+ T細胞によって認識される抗原の抗原性エピトープを明らかにすることが重要である。

【0003】

米国特許第5,827,516号は、参照としてその全文が本明細書に組み入れられる。

【0004】**発明の概要**

本発明は、特定の疾患、特にその感受性が、定義されたクラスII MHC分子の発現によって決定される疾患の開始、促進、または悪化に関係するCD4+ Tリンパ球反応を活性化するペプチドエピトープを同定する方法を特徴とする。本方法は、ポリペプチド分子をAPCの細胞膜に人工的に結合させると、APCの抗原プロセシ

グオルガネラへその分子の輸送が促進される、という発見に基づいている。本発明には、糖尿病自己抗原、IA-2からそのような方法によって誘導したペプチドが含まれる。アミノ酸残基1～6位が野生型ペプチドの対応する残基とは異なるが、なおも野生型ペプチドと同じクラスII MHC分子に結合する変種ペプチドである、改変ペプチドリガンド(APL)も同様に、 APLを用いることを含む治療および予防方法と共に、本発明に含まれる。 APLは、 CD4 T細胞において、親の野生型ペプチドとは異なるサイトカイン産生パターンの誘発能を有する。このように、例えば、野生型ペプチドは、 Th1サイトカインの産生を誘導する可能性があるが、それに由来する APLはTh2サイトカインを誘発する可能性がある。または、野生型ペプチドは、 Th2サイトカインの産生を刺激する可能性があり、対応する APLはTh1サイトカインの産生を誘発する。

【 0 0 0 5 】

特に、本発明は、以下の段階を含む、ポリペプチドのクラスII MHC結合断片を同定する方法を特徴とする：(a) 第一のビオチン部分に結合したリガンドを提供する段階；(b) 第二のビオチン部分に結合したポリペプチドを提供する段階；(c) クラスII MHC分子と、リガンドに結合する細胞表面受容体とを発現する哺乳類の抗原提示細胞(APC)を提供する段階；(d) APCを(a) のビオチン結合リガンド、(b) のビオチン結合ポリペプチド、およびアビジンと接触させて、細胞表面受容体に結合する複合体を形成する段階；(e) APCによる複合体の内在化が起こるような条件でAPCを維持する段階；(f) ペプチドに結合したクラスII MHC分子をAPCから単離する段階；ならびに(g) ペプチドがポリペプチドのクラスII MHC結合断片である、ペプチドをクラスII MHC分子から溶出する段階。本方法はさらに、ペプチドのアミノ酸配列を同定する段階を含みうる。本方法は、哺乳類のAPC上のクラスII MHC分子によるその提示が哺乳類疾患の病態または哺乳類疾患の保護のいずれかに関連している、ペプチドの同定に適用することができる。適当な疾患には、自己免疫疾患(例えば、インスリン依存型真性糖尿病(IDDM)、多発性硬化症、リウマチ性関節炎、重症筋無力症、全身性紅斑性狼瘡、自己免疫性未成熟卵巣不全、グレーブス甲状腺炎、橋本甲状腺炎、原発性甲状腺機能低下症、小児脂肪便症、原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎、アジソン病、

白斑、全身性硬化症、もしくは抗糸球体基底膜疾患)、感染疾患(例えば、らい病のような細菌感染症、ウイルス疾患、もしくは寄生虫疾患)、または癌が含まれる。自己免疫疾患がIDDMである場合、ポリペプチドは、プレプロインスリン、プロインスリン、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD65)、IA-2チロシンホスファターゼ(IA-2)、またはフォグリン(IA-2)となりうる。方法において用いられるAPCは、樹状細胞、マクロファージ、単球、またはBリンパ球となりうる。方法に用いたリガンドは、APC上の細胞表面受容体(例えば、表面免疫グロブリン分子)に結合するレクチン分子(例えば、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)由来アメリカヤマゴボウマイトゲン)となりうる。本発明の方法によってターゲティングされる細胞表面受容体は、APCによって内在化されうる細胞表面分子(例えば、免疫グロブリン分子)となり、リガンドは細胞表面分子に結合する抗体分子となりうる。APCが由来する哺乳類は、ヒトとなり得て、クラスII MHC分子はDRB1*0401、DRB1*0405、またはDRB1*0101遺伝子によってコードされる鎖を有するDR分子となりうる。または、クラスI MHC分子は、DQA1*0501もしくはDQA1*0301遺伝子によってコードされる鎖と、DQB1*0302、DQB1*0201、もしくはDQB1*0501遺伝子によってコードされる鎖とを有するDQ分子となりうる。

【0006】

記載の方法は、以下の段階をさらに含む：(h) 個体のAPCsがクラスII MHC分子を有する、クラスII MHC分子によるペプチドの提示に関連した病態に感受性が高いことが疑われる個体からのCD4リンパ球を提供する段階；(i) ペプチドが結合したクラスII MHC分子を有するAPCsの集団を提供する段階；(j) (i)のAPCsの集団を(h)のCD4リンパ球に接触させる段階；および(k) CD4リンパ球がクラスII MHC結合ペプチドを認識するか否かを決定する段階。ペプチドの提示によって、CD4+ Tリンパ球の病的反応、またはCD4+ Tリンパ球の保護的反応のいずれかが起こりうる。

【0007】

本発明はまた、アミノ酸残基26個未満の長さであって、配列VSSQFSDAAQASP(配列番号：47)、例えば

VSSQFSDAAQASPSS (配列番号 :1); SVSSQFSDAAQASPS
(配列番号 :2); SSVSSQFSDAAQASP (配列番号 :3);
SVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号:4);
SRVSSVSSQFSDAAQASPSSHSSST (配列番号 :5);
SVSSQFSDAAQASPSSHSSSTPSWC (配列番号 :6);
VSSQFSDAAQASPSSHSSSTPSWCE (配列番号 :7);
 または**VSSVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号 :8).**

を含む単離されたペプチドを含む。単離ペプチドはまた、アミノ酸残基26個未満の長さであって、配列TQETRTL (配列番号:48)、例えば

TQETRTLTFHF (配列番号 :9); YLKNVQTQETRTL (配列番号10);
VQTQETRTLTFHF (配列番号 :11);
LKNVQTQETRTLTF (配列番号 :12); YLKNVQTQETRTLTF
(配列番号:13); KNVQTQETRTLTFH (配列番号 :14);
SFYLKNVQTQETRTLTFH (配列番号 :15); または
FYLKNVQTQETRTLTFHF (配列番号 :16).

を含みうる。その他の態様には、アミノ酸残基26個未満の長さであって、配列AYQAEPT (配列番号:49)、配列CTVIVMLT (配列番号:51)、FEFALTAVAAE (配列番号:50)、または配列KVESSPSRSDY (配列番号:52)を含む単離ペプチドが含まれる。そのようなペプチドの例は、

AYQAEPNTCATAQ (配列番号 :17);
LCAYQAEPNTCATAQG (配列番号 :18); **LAKEWQALCAYQAEPN**
 (配列番号 :19); **AYQAEPNTCATAQGEGNIK** (配列番号 :20);
WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :21);
LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :22);
DQFEFALTAVAAE (配列番号 :33); **DQFEFALTAVAAEEVNAI**
 (配列番号:34); **FEFALTAVAAEEVNAILKA** (配列番号 :35);
SKDQFEFALTAVAAEEVNA (配列番号 :36);
SKDQFEFALTAVAAEEVNAILK (配列番号 :37); **GCTVIVMLTPLVED**
 (配列番号 :23); **CTVIVMLTPLVEDG** (配列番号 :24);
ESGCTVIVMLTPLVEDG (配列番号 :25); **MVWESGCTVIVMLTPL**
 (配列番号 :26); **SGCTVIVMLTPLVEDGVK** (配列番号 :27);
ESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :28); **WQMVWESGCTVIVMLT**
 (配列番号 :29); **DFWQMVWESGCTVIVMLT** (配列番号 :30);
FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (配列番号 :31);
MVWESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :32); **KVESSPSRSDYI**
 (配列番号 :38); **LKVESSPSRSDY** (配列番号 :39);
KLKVESSPSRSDYINAS (配列番号 :40);
KVESSPSRSDYINASPIIEHDP (配列番号 :41); および
LKVESSPSRSDYINASPII (配列番号 :42).

である。

【0008】

本発明はまた、IDDM、またはIDDMの病的症状に対して被験者を保護する方法を特徴とする。保護には、被験者における病的症状の消失と共に緩和（または減少）が含まれると理解される。方法には、本明細書に開示の経路のいずれによっても本発明の上記のいかなるペプチドも被験者に投与する段階が含まれる。

【0009】

同様に、そのアミノ酸配列が、アミノ酸1～6位の置換を除いて、IA-2の断片と同一であって、断片が、アミノ酸26個未満の長さであって配列

AYQAEPN (配列番号 :49); **VSSQFSDAAQASP** (配列番号 :47);
TQETRTL (配列番号 :48); **CTVIVMLT** (配列番号 :44)
 ; **FEFALTAVAAE** (配列番号 :43); または **KVESSPSRSDY**
 (配列番号 :52).

を含む、改変ペプチドリガンドも本発明に含まれる。改変ペプチドリガンドにお

いて、断片のアミノ酸残基の少なくとも1つであるが、わずか30%が異なるアミノ酸残基に置換されている。そこから改変ペプチドリガンドを誘導することができる断片の配列には：

AYQAEPNTCATAQ (配列番号 :17);
LCAYQAEPNTCATAQG (配列番号 :18); **LAKEWQALCAYQAEPN**
 (配列番号 :19); **AYQAEPNTCATAQGE**GNIK (配列番号 :20);
WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :21);
LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :22);
VSSQFSDAAQASPSS (配列番号 :1); **SVSSQFSDAAQASPS**
 (配列番号:2); **SSVSSQFSDAAQASP** (配列番号 :3);
SVSSQFSDAAQASPSHSS (配列番号 :4);
SRVSSVSSQFSDAAQASPSHSSST (配列番号 :5);
SVSSQFSDAAQASPSHSSSTPSWC (配列番号 :6);
VSSQFSDAAQASPSHSSSTPSWCE (配列番号 :7);
VSSVSSQFSDAAQASPSHSS (配列番号 :8); **TQETRRTLQFHF**
 (配列番号 :9); **YLKNVQTQETRTL** (配列番号 :10);
VQTQETRRTLQFHF (配列番号 :11); **LKNVQTQETRRTLQF**
 (配列番号:12); **YLKNVQTQETRRTLQ** (配列番号 :13);
KNVQTQETRRTLQFH (配列番号 :14); **SFYLKNVQTQETRRTLQFH**
 (配列番号 :15); **FYLKNVQTQETRRTLQFHF** (配列番号 :16);
GCTVIVMLTPLVED (配列番号 :23); **CTVIVMLTPLVEDG**
 (配列番号:24); **ESGCTVIVMLTPLVEDG** (SEQ ID NO:25);
MVWESGCTVIVMLTPL (配列番号 :26);
SGCTVIVMLTPLVEDGVK (配列番号 :27);
ESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :28); **WQMVWESGCTVIVMLT**
 (配列番号 :29); **DFWQMVWESGCTVIVMLT** (配列番号 :30);
FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (配列番号 :31);
MVWESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :32); **DQFEFALTAVAAE**
 (配列番号 :33); **DQFEFALTAVAAEEVNAI** (配列番号 :34);
FEFALTAVAAEEVNAILKA (配列番号 :35);
SKDQFEFALTAVAAEEVNA (配列番号 :36);
SKDQFEFALTAVAAEEVNAILK (配列番号 :37); **KVESSPSRSDYI**
 (配列番号 :38); **LKVESSPSRSDY** (配列番号 :39);
KLKVESSPSRSDYINAS (配列番号 :40);
KVESSPSRSDYINASPIIEHDP (配列番号 :41); および
LKVESSPSRSDYINASPII (配列番号 :42).

が含まれる。

【0010】

本発明はまた、以下の段階を含む改変ペプチドリガンド (APL) を作製する方法を特徴とする： (a) MHCクラス分子から溶出したペプチドのアミノ酸配列を同定する段階を含む、ポリペプチドのクラスII MHC結合断片を同定する上記の方法を実施する段階；および (b) ペプチドの1、2、3、4、5、または6位でアミノ酸置換を有することを除き、溶出したペプチドと同一である配列を含むAPLを合成する段階。本方法は、ポリペプチドインスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、IA-2、IA-2、またはGAD65を用いて行うことができる。

【0011】

同様に、以下の段階を含む、哺乳類においてT細胞自己反応性を減少させる方法も本発明に含まれる： (a) APLが哺乳類のクラスII MHC分子との結合特性を有する、1～6位のアミノ酸置換を除き、インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、IA-2、IA-2、またはGAD65の天然に処理された糖尿病関連ペプチド断片の配列と同一である配列を有するAPLを提供する段階；および (b) APLまたはAPLをコードするDNAを哺乳類に投与する段階。

【0012】

本発明はまた、以下の段階を含む、ポリペプチドのクラスII MHC結合断片を同定する方法を提供する： (a) ビオチン部分と結合したリガンドを提供する段階； (b) アビジン部分と結合したポリペプチドを提供する段階； (c) クラスII MHC分子と、リガンドに結合する細胞表面受容体とを発現する哺乳類APCを提供する段階； (d) APCを (a) のビオチン結合リガンドと (b) のアビジン結合ポリペプチドに接触させて、細胞表面受容体に結合する複合体を形成する段階； (e) APCによる複合体の内在化が起こるような条件でAPCを維持する段階； (f) ペプチドに結合したクラスII MHC分子をAPCから単離する段階；および (g) ペプチドがポリペプチドのクラスII MHC結合断片である、クラスII MHC分子からペプチドを溶出する段階。本発明は、さらに以下の段階を含みうる： (h) 個体のAPCsがクラスII MHC分子を有する、クラスII MHC分子によるペプチドの提示に関連した病態に感受性があることが疑われる個体からのCD4リンパ球を提供する段階； (i) ペプチドが結合したクラスII MHC分子を有するAPCsの集団を提供する段階； (j) (i) のAPCsの集団を (h) のCD4リンパ球に接触させる段階；および (k) ペプ

チドが個体の病態に関連していることの指標として、CD4リンパ球がクラスII MHC結合ペプチドを認識するか否かを決定する段階。ペプチドの提示によって、CD4+ Tリンパ球の病的反応またはCD4+ Tリンパ球の保護的反応のいずれかが起こりうる。本来、方法は、リガンドをアビジンに、そしてポリペプチドをビオチンに結合させることによって行うことができる。

【0013】

本発明のもう一つの態様は、以下の段階を含む診断方法である；(a) IDDMを有する、またはIDDMに対して感受性があることが疑われる個体からのCD4リンパ球を提供する段階；(b) APCsの集団がIA-2ペプチドに接触されており、APCsのクラスII MHC分子がIA-2ペプチドに結合している、個体によって発現されるものと同じの対立遺伝子のクラスII MHC分子をその表面に有するAPCsの集団を提供する段階；(c) (b)のAPCsの集団を(a)のCD4リンパ球に接触させる段階；および(d) 個体がIDDMを有する、またはIDDMに対する感受性を有することの指標として、CD4リンパ球がクラスII MHC結合ペプチドを認識するか否かを決定する段階。本発明において用いられるIA-2ペプチドは、以下のアミノ酸配列を有しうる：

VSSQFSDAAQASPSS (配列番号: 1)
SVSSQFSDAAQASPS (配列番号 :2);
SVSSQFSDAAQASP (配列番号 :3); SVSSQFSDAAQASPSSHSS
(配列番号 :4); SRVSSVSSQFSDAAQASPSSHSSST (配列番号 :5)
SVSSQFSDAAQASPSSHSSSTPSWC (配列番号 :6);
VSSQFSDAAQASPSSHSSSTPSWCE (配列番号 :7);
VSSVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号 :8); TQETRLLTQFHF
(配列番号 :9); YLKNVQTQETRTL (配列番号 :10);
VQTQETRLLTQFHF (配列番号 :11); LKNVQTQETRLLTQF
(配列番号:12); YLKNVQTQETRLLTQ (配列番号 :13);
KNVQTQETRLLTQFH (配列番号 :14); SFYLKNVQTQETRLLTQFH
(配列番号 :15); FYLKNVQTQETRLLTQFHF (配列番号 :16);
AYQAEPNTCATAQ (配列番号 :17); LCAYQAEPNTCATAQG
(配列番号:18); LAKEWQALCAYQAEPNT (配列番号 :19);
AYQAEPNTCATAQEGNIK (配列番号 :20);
WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :21);
LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :22);
GCTVIVMLTPLVED (配列番号 :23); CTVIVMLTPLVEDG
(配列番号 :24); ESGCTVIVMLTPLVEDG (配列番号 :25);
MVWESGCTVIVMLTPL (配列番号 :26); SGCTVIVMLTPLVEDGVK
(配列番号 :27); ESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :28);
WQMVWESGCTVIVMLT (配列番号 :29); DFWQMVWESGCTVIVMLT
(配列番号 :30); FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (配列番号 :31);
MVWESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :32); DQFEFALTAVAAEE
(配列番号 :33); DQFEFALTAVAAEEVNAI (配列番号 :34);
FEFALTAVAAEEVNAILKA (配列番号 :35);
SKDQFEFALTAVAAEEVNA (配列番号 :36);
SKDQFEFALTAVAAEEVNAILK (配列番号 :37); KVESSPSRSDYI
(配列番号 :38); LKVESSPSRSDY (配列番号 :39);
KLKVESSPSRSDYINAS (配列番号 :40);
KVESSPSRSDYINASPPIEHDP (配列番号 :41); または
LKVESSPSRSDYINASPPI (配列番号 :42).

【0014】

本発明の「単離」ペプチドは、天然に存在する対の片方を有しない(例えば、APLのような)、またはそれが天然に伴う成分、例えば膵臓、肝臓、脾臓、卵巣、精巣、筋肉、関節組織、神経組織、胃腸管組織、または血液、血清、もしくは尿のような体液から分離もしくは精製されているペプチドである。典型的に、ペプチドは、それが天然に会合する蛋白質および天然に存在する有機分子を、乾燥

重量で少なくとも70%含まない場合に「単離された」と見なされる。好ましくは、本発明のペプチドの調製物は、乾燥重量で、本発明のペプチドの少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%である。このように、例えば、ペプチドxの調製物は、乾燥重量でペプチドxの少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、および最も好ましくは少なくとも99%である。化学合成されたペプチドは、その特性によって、それが天然に伴う成分から分離されているため、合成ペプチドは「単離されている」。

【0015】

本発明の単離ペプチドは、例えば、天然起源（例えば、ヒト組織または体液）からの抽出によって；ペプチドをコードする組換え核酸の発現によって；または化学合成によって得ることができる。それが天然において発端となる起源とは異なる細胞系において産生されるペプチドは、それが天然に伴う成分から単離されているために、「単離されている」。単離または精製の程度は、任意の適当な方法、例えばカラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって測定することができる。

【0016】

本明細書において用いられるように、「哺乳類疾患からの保護」とは、哺乳類の疾患の発症を予防すること、または哺乳類に存在する疾患の重症度を弱めることを意味する。「予防」とは、疾患の進行の部分的または完全な遮断と共に、発病の遅延を含みうる。

【0017】

本明細書において用いられるように、「天然に処理された糖尿病関連ペプチド断片」とは、哺乳類の抗原提示細胞において、蛋白質（例えば、インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、IA-2、IA-2、またはGAD65）の蛋白質分解によって産生されたペプチド断片である。哺乳類（例えば、ヒト患者）のCD4 T細胞によってそのようなペプチドが認識されれば、その哺乳類に糖尿病が存在すること、または将来に発症することを示している。

【0018】

特に明記していない限り、本明細書に記載の科学技術用語は全て本発明が属す

る技術分野の当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。矛盾がある場合には、本定義を含む本発明が優先する。本発明の実践または試験の際には、本明細書に記述の方法および材料と類似または同等の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料を以下に記載する。特に明記していない限り、これらの材料および方法は説明するためであって、制限的に解釈されない。本明細書において言及した全ての出版物、特許出願、特許およびその他の引用文献は説明するためであって、制限すると解釈されない。

【0019】

本発明のその他の特徴および長所、例えば、病的なCD4+ Tリンパ球反応を活性化するペプチドを同定する方法は、以下の説明、図面および特許請求の範囲から明らかとなると思われる。

【0020】

詳細な説明

本発明は、当該ポリペプチド (PPI) をAPCの細胞膜に人工的に結合させると、APCは、細胞内の抗原処理オルガネラ、例えばエンドソーム、ライソゾーム、およびライソゾーム特徴を有し、クラスII MHC分子に富むがクラスI MHC分子は実質的に欠損する「MHCクラスIIコンパートメント」(MITC)と呼ばれる構造の一つにPPIを輸送する、という新規発見に基づく[ピーター (Peter) ら、(1991)、Nature 349: 669~676]。次に、PPIは、蛋白質分解酵素によってペプチド断片に分解される。これらのペプチド断片のいずれかが、APCが由来する個体によって発現されるクラスII MHC分子の一つとの結合能を有すれば、抗原処理オルガネラにおいてもそのようなことが起こるのである。得られたペプチド・クラスII MHC分子複合体は細胞膜に輸送され、ここで、その特定のペプチド・クラスII MHC複合体を特異的に認識する抗原特異的受容体を有するCD4+ T細胞と相互作用するために利用できるようになる。ペプチドを、これらのAPCから単離したクラスII MHC分子から溶出することによって、PPIに由来すると共に、細胞内または細胞外起源の他のポリペプチドに由来する天然に処理された一組のペプチドを得る。次に、APCによって発現された特定のクラスII MHC分子に対して特異的であるペプチドを化学的に分離して、そのアミノ酸配列を決定する。ペプチドアミノ

酸配列をPPIの配列と比較することによって、PPIに由来する配列を同定することが可能である。このように、発見は、APCによって天然に処理され、関連するクラスII MHC分子に対して固有の結合親和性を有するペプチド断片を同定する方法を提供する。方法は、(a) 疾患、特に感受性もしくは保護が特定のタイプのクラスII MHC分子の発現に関連している疾患の発病(病態)、または(b) 疾患、特に保護もしくは重症度の減少がクラスII MHC分子の特定のタイプの発現に関連している疾患の症状の予防もしくは減少、のいずれかに関係するCD4+ T細胞を活性化する抗原であることが疑われるポリペプチドに由来するペプチドを同定するために貴重となりうる。方法は、「免疫マスフィンガープリンティング」と呼ばれる。

【0021】

記載の方法は、同定されたペプチドが(i) APCによってインビボで天然に処理されて、しかも(ii) APCにおいて、関連するクラスII分子に会合するようになるペプチドであることを保証する。

【0022】

さらに、本発明は、所定の個体における特定のCD4+ T細胞媒介性疾患を如何なる所定のペプチドとも結びつけるために本質的に重要な局面であるが、クラスII MHCタイプによって疾患の感受性または抵抗性が決定される障害において特に重要であるクラスII MHCタイプを制御する。

【0023】

PPIの断片に対応し、当該疾患に関連するクラスII MHC分子に結合する配列を有する如何なる天然に処理されたペプチドも、疾患を開始、促進、もしくは悪化させる、またはそれに対する免疫を媒介するCD4+ T細胞を活性化するペプチドとなりうる。この可能性を確認する証拠を得るために、関連するクラスII MHC分子を発現する被験者からの試験CD4+ T細胞を、本発明に従って同定したペプチドに対する反応性に関してアッセイすることができる。対照CD4+ T細胞は、同様に、クラスII MHC分子を発現するが疾患の症状を示さない被験者から得ることができる。試験CD4+ T細胞が有意な反応を示し、対照CD4+ T細胞の反応がなければ、関連するペプチドが疾患の経過(疾患の病理)または疾患に対する免疫に関係して

いることが示されるであろう。本方法の細胞反応相は、「エピトープ確認」(「EV」)と呼ばれる。

【0024】

本発明の方法を糖尿病自己抗原IA-2の細胞内部分に適用することによって、IA-2由来ペプチドを、DR4クラスII MHC対立遺伝子を発現するヒトIDDM患者において糖尿病の発病に関係しうるエピトープとして同定した。そのアミノ酸配列に基づいて、これらのペプチドをネステッド群(nested group)6個に分類する。各ネステッド群のコア領域に対応するコンセンサスペプチドを合成して、DR4発現IDDM患者または疾患症状を有しないDR4発現被験者からのCD4+ T細胞の活性化能に関して試験した。13人中9人のDR4発現IDDM患者の末梢血リンパ球において、ペプチド6個中少なくとも1個に対する有意な反応を検出した。対照被験者のT細胞はいずれも如何なるペプチドにも反応せず、DR4非発現IDDM患者8人中1人からのT細胞は、如何なるペプチドにも反応した。これらの知見は、DR4発現IDDM患者が反応するペプチド6個は、DR4分子を結合することができるコアエピトープを表し、IDDM患者において糖尿病原性CD4+ T細胞を活性化できることを示唆している。6個全てのペプチドの単離DR4との結合能を、インビトロ結合アッセイ法において確認した。

【0025】

本発明の方法は、予想されるポリペプチド抗原のアミノ酸配列(または部分的アミノ酸配列)が利用できる限り、広い範囲の疾患、特に相対的な感受性または抵抗性が特定のクラスII MHC対立遺伝子の発現に関連している疾患のいずれの発病または保護にも関係するペプチドを同定するために適用することができる。候補となる疾患には、感染疾患(例えば、トラコーマクラミジア(*Chlamydia trachomatis*)、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、らい菌(*Mycobacterium leprae*)、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、麻疹ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、および熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)によって引き起こされる疾患)、癌(例えば、黒色種、卵巣癌、乳癌、血腸癌、およびB細胞リンパ腫)[トパリアン(Topalian, S. L.)、(1994)、Curr. Opinion in Immunol. 6

: 741 ~ 745 ; トパリアン (Topalian) ら、(1996)、J. Exp. Med. 183 : 1965 ~ 1971]、および自己免疫疾患 (例えば、IDDM、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、重症筋無力症、および全身性紅斑性狼瘡) が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0026】

本発明にはまた、実施例1に記載するように、上記の方法を用いてIA-2に由来するペプチドが含まれる。免疫応答を活性化する天然に処理されたペプチドのアミノ酸残基1~6位(すなわち、1、2、3、4、5、または6位)を置換することに由来するAPLも同様に本発明に含まれる。各残基を異なる残基に置換すると、その結果、同じクラスII MHC対立遺伝子になおも結合するが、APLが由来する親ペプチドとは定性的に異なる反応をCD4+ T細胞において誘発する増強されたペプチドが得られる。このように、APLは関連する親ペプチドに対するCD4+ T細胞反応が病原性である疾患において治療的および/または予防的となる可能性を有する。本発明は、APLを用いることを含む治療および予防方法を特徴とする。本発明はまた、疾患の診断において、または免疫に基づく治療をモニターするために疾患関連ペプチドを用いることを特徴とする。

【0027】

1. ポリペプチド抗原に由来するペプチドエピトープを活性化するCD4+ T細胞を同定する方法

本発明の方法は、異なる2つの相を有する。第一の相は、「免疫マスフィンガープリンティング」(IMF)と呼ばれ、第二の相は「エピトープ確認」(EV)と呼ばれる。IMFの目的は、候補ペプチドをペプチド断片に分解することができるAPCの抗原処理コンパートメントのいずれか一つに指向することである。適当な長さ(アミノ酸残基約9~25個)であって、APCによって発現される特定のクラスII MHC分子に対して特異的結合親和性を有するいかなるペプチドも、抗原処理コンパートメントにおいてそのクラスII MHC分子に結合するであろう。次に、これらのペプチド・クラスII MHC分子複合体の大部分がAPCの細胞膜に移動する。複合体(細胞膜会合複合体および細胞内複合体のいずれも)をAPCから単離して、ペプチドを複合体から溶出する。次に、溶出したペプチドを分離して、そのアミ

ノ酸配列を決定し、配列を候補ポリペプチドの配列と比較する。

【0028】

IMFは一般的に、明確なクラスII MHC分子を発現するAPCによって産生されるペプチドの分析に適用することができる。そのような場合、方法は、基礎研究、例えばAPCの蛋白質分解性の抗原処理酵素によって「切断」部位を決定する、ポリペプチドのアミノ酸残基を同定することをねらいとした研究にとって有用となりうる。または、ポリペプチドが特定の疾患を引き起こすもしくは促進する、または疾患からの保護を媒介するCD4+ T細胞を活性化する抗原であることが疑われる場合、IMFを用いて、疾患に関連した、またはポリペプチドに由来する保護的ペプチドエピトープを同定することができる。この情報は、疾患の病因に対する基礎研究にとって、または疾患の診断薬、治療薬、もしくはワクチンの開発の基礎として有用となるであろう。

【0029】

そのアミノ酸配列が候補ポリペプチドの領域の配列とマッチするペプチドは、関連する疾患の発病またはそれに対する免疫に関係するCD4+ T細胞を活性化するペプチドである可能性が高い。そのようなペプチドに、試験および対照被験者からのCD4+ T細胞の活性化能をアッセイするEV技法を行うことができる。試験被験者からのCD4+ T細胞を活性化するが、対照被験者からの細胞を活性化しないそれらのペプチドは、関連する疾患を開始、促進、もしくは悪化、または疾患またはその病的症状からの保護を媒介することができるペプチドとして同定される。

【0030】

そのようなペプチドが同定されれば、それを化学的または組換え技術によって大量に合成することができ、下記のEV技法と類似の診断アッセイ法において用いることができる。関連するペプチドは、単独、または組み合わせて用いることができる。または、そのようなペプチドまたはそのようなペプチドの組み合わせをコードする発現ベクターを用いて、適当なAPC(下記参照)をトランスフェクトまたは形質導入することができ、これらを類似の診断アッセイ法において用いることができる。

【0031】

さらに、本発明の方法によって定義されたペプチドを含むクラスII MHC分子の多量体（例えば、二量体、三量体、四量体、五量体、または六量体）を、検出可能な標識（例えば、蛍光体、放射性核種、または規定の波長の光を吸収もしくは放出する産物を生じる反応を触媒する酵素）と結合させると、そのような複合体に対して特異的であり、従ってそれらに結合する細胞表面受容体を有する被験者（例えば、ヒト被験者）からのT細胞を定量するために用いることができる。そのようなT細胞が比較的大量に存在すれば、関連する疾患の診断となる、またはT細胞が疾患に対する免疫に関与していることを示す可能性がある。さらに、多量体結合T細胞の相対数を連続的にモニターすることは、疾患の経過または治療の有効性を確立する上で有用となりうる。そのようなアッセイ法は、HIV-1由来またはインフルエンザウイルス由来ペプチドを含むクラスI MHC分子の四量体を用いて開発されており[アルトマン(Altman)ら、(1996)、Science 274:94~96; オググ(Ogg)ら、(1998)、Science 279:2103~2106]、対応するクラスII MHC多量体も同様に有用であると予想されると思われる。そのような複合体は、単一の明確なペプチドを含むクラスII MHC分子を産生するために、当該ペプチドの存在下で集合した精製クラスII MHC分子の化学的クロスリンクによって、または既に確立された組換え技術の改変によって産生することができるであろう[カゾノ(Kazono)ら、(1994)、Nature 369:151~154; ゴーシェ(Gauthier)ら、(1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:11828~11833]。そのような多量体のクラスII MHC分子単量体は、完全長の鎖および鎖からなる天然の分子となりうる。または、それらは、鎖および鎖の細胞外ドメインまたはペプチド結合裂の「壁」および「床」を形成する鎖および鎖ドメインのいずれかを含む分子となりうる。

【0032】

1.1 IMF _____

本発明は、異なる2つのIMF方法、すなわち、IMF-1とIMF-2とを特徴とする。

【0033】

1.1.1 IMF-1 _____

IMF-1において、APCを、APCの表面上の受容体に対する固有の結合能を有する

リガンドに接触させる。候補となる受容体リガンド対を下記に示す。APCに接触させる前に、リガンドをビオチンに結合させる。リガンドが組換えDNA技術によって産生されている場合には、ビオチン結合は、実施例1において用いられるポリペプチド抗原をビオチン結合するために用いられる方法のような方法によってリガンドが産生される、細胞（例えば、細菌）において行うことができる。または、単離されたリガンドを当技術分野で既知の方法によってインビトロでビオチン結合することができる。リガンドは、1分子あたりビオチン部分少なくとも1個に結合するであろう。細胞表面受容体との結合能を保持している限り、1分子あたりビオチン部分2、3、4、6、または10個を有することができる。

【0034】

ビオチン結合リガンド (b-L) が、細胞表面上のその受容体に結合した後、非結合のb-Lを洗浄によって除去して、APCを、ビオチンに結合するポリペプチドであるアビジンに接触させる。アビジンは、卵アビジンまたはストレプトアビジンとなりうる。これはまた、ビオチン結合ドメインを少なくとも2個含む組換えアビジンとなりうる。本来のアビジンは、ビオチン結合ドメインを4個含む。

【0035】

アビジンをAPCの表面に結合したb-L上のビオチン残基に結合させた後、非結合のアビジンを洗浄によって除去し、APCを、予めビオチンに結合させた当該ポリペプチド (PPI) に接触させる。PPIのビオチン結合は、リガンドに関して記載した方法と同じ方法によって行うことができ、ビオチン結合PPI (b-PPI) は、1分子あたり同じ数のビオチン残基を含みうる。しかし、起こりうるプロセッシングの妨害を防止するために、PPIは1分子あたりビオチン部分を1個含むことが好ましいであろう。

【0036】

ビオチン結合PPI (b-PPI) がAPC上のアビジンに結合した後、非結合のb-PPIを洗浄によって除去して、APCをインキュベートする。この段階までの技法は一般的に氷中（すなわち、約4℃）で行うが、インキュベーションは、37℃で実施する。または、インキュベーションは、室温（約25℃）で行ってもよく、または25℃～37℃の温度で行ってもよい。インキュベーションは、ペプチドの最適な回収

が得られる時間に応じて、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、または6時間行ってもよい。インキュベーション後、当該クラスII MHC分子を当技術分野で既知の様々な方法の一つ、例えば、免疫沈降によって単離する。好ましくは、上記の方法を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって単離する[ゴルガ(Gorga)ら、(1987)、J. Biol. Chem. 262:16087~16094]。

【0037】

次に、単離されたクラスII MHC分子に非共有結合したペプチドをそれらから溶出させる。当技術分野で既知の多様な方法を用いることができる。好ましくは、本方法は、これまでに記述されている方法[チックズ(Chicz)ら、(1992)、Nature 358:764~768]、および本明細書の実施例1に記載されている方法であろう。

【0038】

溶出したペプチドを、可能性がある多様なクロマトグラフィー方法の一つ、例えば、逆相クロマトグラフィーによって分離する。次に、得られたペプチドを含む全ての分画を、ペプチドを断片化しない設定を用いて、マトリクス補助レーザー脱離タイムオブフライト(MALDI-TOF)質量分析法によって個別に分析する。次に、MALDI-TOFスペクトル上で得られた全ての「ピーク」に対応するペプチドに、個々のアミノ酸配列分析を行うことができる。または、同一の技法であるが、APCをb-PPIに接触させる段階を省略する方法によって得られたペプチドの試料を用いて精製された対照スペクトルでは認められないピークに対応するペプチドのみを、アミノ酸配列分析に供することができる。個々のペプチドの配列は、当技術分野で既知の手段によって得ることができる。それらは、例えば、ペプチドを質量分析計によって分析される小さい断片に断片化する機器設定を用いて、MALDI-TOFによって得ることができる。次に、ペプチドのアミノ酸配列をPPIの配列と比較する。PPIの領域と同一である配列を有するペプチドがEVの候補である。

【0039】

または、溶出したペプチドのアミノ酸配列を決定する代わりに、候補となる可能性があると思われる「標準的な」ペプチドに、MALDI-TOF質量分析を行うことができる。スペクトルにおいて、標準ペプチドと同じ位置でピークを示す試験

ペプチドは、標準ペプチドと同じ配列を有する可能性があるであろう。

【0040】

1.1.2 IMF-2 _____

IMF-2方法は、APCをAPCをb-Lアビジンに接触させる代わりにb-PPIに接触させて、IMF-2においてAPCに結合したb-Lをアビジンに結合したPPI (av-PPI) に接触させることを除いては、IMF-2方法と同一である。または、リガンドをアビジンと化学結合させて、リガンド・アビジン複合体 (L-av) を形成することができる。av-PPIとL-av結合体は、当技術分野で既知の方法によって化学的に作製することができる。または、PPIとアビジンからなる、またはリガンドとアビジンからなる融合蛋白質を標準的な組換えDNA技術によって作製することができる。いずれの場合においても、アビジン成分は、完全長のアビジンとなり得て、ビオチン結合ドメイン1、2、3または4個全てを含むアビジン分子の断片となりうる。

【0041】

1.2 EV _____

EV技法は、溶出するクラスII MHCとの結合能および様々なCD4+ T細胞集団の活性化能に関してIMFによって同定されたペプチドの試験を含む。IMFによって同定された配列と同一である、またはIMFによって同定されたペプチドのネステッド群に由来するコア配列に対応するアミノ酸配列を有するペプチドを合成する。次に、合成ペプチドを、溶出したクラスII MHCとの結合能および (a) 当該クラスII MHC分子を発現して、疾患の症状を少なくとも1つ有する試験被験者；および (b) 当該クラスII MHC分子を発現するが、疾患の症状を有しない対照被験者からのCD4+ T細胞の活性化能に関して試験する。さらなる対照被験者は、疾患の症状を有するが、当該クラスII MHC分子を発現しない被験者となりうる。いくつかの疾患（例えば自己免疫成分を有する疾患）において、試験被験者のCD4+ T細胞における反応性は、関連するペプチドが、関連する疾患を開始、促進、または悪化することができるCD4+ T細胞を活性化するエピトープであるという確証を提供するが、(b) に記述した対照被験者の細胞は提供しない。他の疾患（例えば、自己免疫成分を有しない癌または感染疾患）では、先の文章に記載した反応性と非反応性の類似のパターンは、関連するペプチドが、疾患に対する免疫を媒介、

または少なくとも疾患の症状の減少を媒介することができるCD4+ T細胞を活性化
するエピトープであることを示すであろう。

【0042】

疾患の症状を有するがクラスII MHC分子を発現しない被験者において反応がないことは、ペプチドについて記述した活性に関するさらなる証拠を提供する。一方、そのようなCD4+ T細胞における反応は、必ずしもそのような役割を除外しないが、関連する被験者によって発現されるいくつかのMHCクラスII分子と結合できること、および(ii)そのクラスII MHC分子に関連したCD4+ T細胞によって認識されうることを示唆するであろう。

【0043】

CD4+ T細胞反応は、当技術分野で既知の多様なインビトロ方法によって測定することができる。例えば、全末梢血単核球(PBMC)は、候補となる合成ペプチドと共に、または含まずに培養して、その増殖反応を、例えば、DNAへの³H]チミジン取り込みによって測定することができる。増殖するT細胞がCD4+ T細胞であることは、アッセイ法の前にPBMCからCD4+ T細胞を除去することによって、またはT細胞上のCD4+ 分子に結合する阻害抗体を加えることによって、それによって後者の増殖を阻害することによって試験することができる。いずれの場合においても、増殖反応は、CD4+ T細胞が増殖しつつある細胞である場合に限り阻害されるであろう。

【0044】

または、CD4+ T細胞は、PBMCから精製して、適当なクラスII MHC分子を発現するAPCの存在下でペプチドに対する増殖反応を調べることができる。そのようなAPCは、Bリンパ球、単球、マクロファージ、もしくは樹状細胞、または全PBMCとなりうる。APCはまた、Bリンパ球、単球、マクロファージ、または樹状細胞に由来する不死化細胞株となりうる。APCは、当該クラスII MHC分子を内因性に発現することができる、またはそれらは、そのような分子をコードするトランスフェクトしたポリヌクレオチドを発現することができる。被験者がヒトである場合、ヒトT細胞はクラスII MHC分子を発現することができるために、APCはT細胞ともなりうる。いずれにせよ、APCは、アッセイ法の前に、例えば電離放射線またはマ

イトマイシンCによる処理によって非増殖性にすることができる。

【0045】

細胞増殖を測定するもう一つの方法として、CD4+ T細胞によるサイトカイン産生を、当技術分野で既知の方法によって測定することができる。サイトカインには、インターロイキン-2 (IL-2)、IFN- γ 、IL-4、IL-5、TNF- α 、インターロイキン-3 (IL-3)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-10 (IL-10)、インターロイキン-12 (IL-12) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF β) が含まれるがこれらに限定されず、それらを測定するアッセイ法には、ELISA、および関連するサイトカインに対して反応する細胞を、試験試料の存在下での反応性 (例えば、増殖) に関して調べるバイオアッセイ法が含まれるが、これらに限定されることはない。または、CD4+ Tリンパ球によるサイトカイン産生は、細胞内免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーによって直接可視化することができる。

【0046】

特定の疾患に関連するペプチドエピトープをを同定した後、上記のEVを疾患の診断試験として用いることができる。このように、疾患を有する、または有することが疑われる被験者からのリンパ球を、記載の方法のいずれによっても適当なペプチド1つまたはそれ以上 (例えば、2、3、4、5、6、10、15、または20) に対するCD4 Tリンパ球反応に関して試験することができる。有意なCD4 Tリンパ球が検出されれば、被験者は疾患を有するまたは今後発症する可能性がある。疾患は、例えばIDDMとなりえて、ペプチドは例えば、インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、GAD65、IA-2、またはフォグリンとなりうる。適当なペプチドは例えば、下記のペプチドのいずれか (例えば、配列番号：1~42を有するペプチド) となりうる。

【0047】

さらに、本明細書に記載の疾患 (例えば、IDDM、MS、またはRAのような自己免疫疾患) のいずれかに関連すると同定されたペプチドを用いて、疾患の開始、進行、または病的症状に関連するリンパ球 (例えば、CD4+ Tリンパ球) の免疫寛容を誘導することができる。これらのリンパ球の寛容は、関連する疾患の予防お

よび/または治療に対して有用となりうる。寛容の誘導は、被験者、例えば、本明細書に記載の自己免疫疾患のいずれか、例えばIDDM、MS、またはRAを有する、有することが疑われる、または感受性がある被験者に適当なペプチドを投与することによって得ることができる。寛容の誘導におけるペプチドの有効性を調べる方法、投与方法および投与経路、ならびに投与用量はAPLに関する下記の記述と本質的に同じである。ペプチドは、本明細書に開示のいかなるポリペプチド、例えばインスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、GAD65、IA-2、またはフォグリンの断片となりうる。それらはまた、例えば、配列番号：1～42を有する断片となりうる。

【0048】

上記のEV方法の代わりとして、IMFによって同定されたペプチドは、例えば、単離されたクラスII MHC分子またはそれらをコードする核酸分子をトランスフェクトした細胞を用いて、当技術分野で既知の方法によって適当なクラスII MHC分子との結合能に関して試験することができる。そのような一つの方法を実施例2に記載する。これらの結合アッセイ法はまた、もう一つのクラスII MHC分子、すなわち、本発明のIMF方法を用いて溶出される分子以外のクラスII MHC分子との結合能を調べるために用いることができる。そのようなペプチドを用いた本発明の診断方法およびペプチドまたはそれに由来するAPLのいずれかを用いた本発明の治療方法は、そのようなもう一つのクラスII MHC分子を発現する被験者に適用することができる。

【0049】

1.3 疾患とクラスII MHC遺伝子との関連

本発明の方法は、明確なクラスII MHC分子の発現に関連し、病態または保護が活性化CD4+ T細胞の作用による疾患に関係するペプチドの分析に適用することができる。そのような疾患には、特定の感染疾患、癌、および自己免疫疾患が含まれるがこれらに限定されることはない。

【0050】

上記の基準を満たす感染疾患の例は、らい菌 (*Mycobacterium leprae*) によって引き起こされるヒトらい病である。細菌は、末梢のシュワン細胞とマクロファ

ージに感染して生き残る。この疾患は、細胞性免疫が抑制されるが、抗体反応は正常であるという特徴を有する。らい病は、コドン13がアルギニンをコードする、またはコドン70および71がアルギニンをコードするDRB1クラスII MHC分子の発現に関連している[ゼルバ(Zerva)ら、(1996)、J. Exp. Med. 183:829~836]。さらに、C型肝炎ウイルスを自発的に消失させる能力は、DQB1*0301分子の発現に関連しており、DQB1*0302は、C型肝炎ウイルス感染被験者では過小発現されているために、DQB1*0302を発現する個体は、ウイルスに対する感染から保護される可能性がある[クランプ(Cramp)ら、(1998)、J. Hepatol. 29:207~213]。さらに、悪性黒色腫に対する保護的免疫応答に関係する可能性がある黒色腫細胞特異的CD4+ T細胞は、HLA-DRB1*0401クラスII分子によって提示されるチロシナーゼエピトープを認識する[トパリアン(Topalian)ら、(1996)、上記]。他のMHCクラスII 関連疾患は上記する。

【0051】

本発明の方法を適用することができる自己免疫疾患の例には、IDDM、リウマチ性関節炎(RA)、多発性硬化症(MS)、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、および重症筋無力症(MG)が含まれるがこれらに限定されることはない。RAは、アミノ酸残基70~74位で(DRB1*0101、0401、0403、0405)モチーフQKRAA(配列番号:53)、QRRAA(配列番号:54)、またはRRRAA(配列番号:55)をコードするDRB1対立遺伝子の発現に関連している。MSはDRB1*1501、DQA1*0102、およびDQB1*0602対立遺伝子の発現に関連している。SLEは、DRB1*03、DRB1*1501、DQA1*0501、およびDQB1*0201対立遺伝子の発現に関連している。MGはDR3およびDQ2(DQA1*0501~DQB1*0201およびDQA1*0201~DQB1*0201)対立遺伝子の発現に関連している。自己免疫性卵巣不全は、57位でアスパラギン酸をコードするDQB1遺伝子に関連する。グレーブス甲状腺炎、橋本甲状腺炎、および原発性甲状腺機能低下症は全て、DR5およびDR3対立遺伝子の発現に弱い関連を示す。小児脂肪便症は、HLA-DQA1*0501、およびDQB1*0201対立遺伝子の発現に関連している。原発性胆汁性肝硬変は、DRB1*0801~DQA1*0401/0601~DQB1*04対立遺伝子の発現に関連している。自己免疫性肝炎は、DRB3*0101またはDRB1*0401対立遺伝子の発現に関連している。アジソン病は、DRB1*03、DQA1*0501、およびDQB1*0201対立遺伝子の発現に関連し

ている。白斑は、DRB1*0701およびDQ2対立遺伝子の発現に関連している。抗糸球体基底膜疾患（グッドパスチャー症候群）は、DR15およびDR4対立遺伝子の発現に関連している。

【0052】

RA、MS、およびIDDMにおける病理は、主にCD4+ T細胞依存的細胞性自己免疫応答によると考えられるが、SLEおよびMGの病理は、主にCD4+ T細胞依存的抗体媒介性自己免疫応答によるものである。RAでは、活性化CD4+ T細胞によって誘導される炎症反応は、関節滑膜に集中するが、MSでは、神経ミエリン鞘に集中し、IDDMではランゲルハンス島に存在する膵臓の細胞に集中する。SLEは、多数の臓器を含む全身性の自己免疫疾患である。MGにおいて認められる筋肉疲労は、神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体に結合する抗体が患者に発生することによる。

【0053】

1.3.1 IDDM _____

糖尿病は、血液中のグルコースレベルが異常に高い症候群である。血液中のグルコースレベルは通常、膵臓のランゲルハンス島に存在する細胞からのホルモンであるインスリンの放出によって制御される。本出願に関連する糖尿病のクラスである1型糖尿病（IDDM）は、細胞の破壊が原因で起こる。その結果、高い血液中グルコースレベルがチェックされないと、脱水、血液中の酸/塩基障害、脳の腫脹、昏睡、および死亡に至る。合成ヒトインスリンの注射による治療は、グルコースのコントロールを回復する。しかし、この治療は、一度開始すれば、細胞が再生しないために、一生の間必要である。一旦確立されると、糖尿病は、患者にとって、患者の家族、そして社会にとって大きな負担となる。インスリンの現代での用量および製剤は、血中のグルコースを妥当な範囲に維持することができるが、数年のあいだに、必然的に疾患の合併症が起こる。糖尿病の最も一般的な重度の合併症は、腎不全、失明、および神経機能の喪失である。先進諸国では、糖尿病は、長期の透析または移植を必要とする慢性腎不全の単一の主な原因である。糖尿病患者の寿命は、平均で10年短くなる。比較的一般的な疾患であるため（IDDMは、集団の1/200～1/400個体に罹患する）、これは多大な資源を消

費する；先進諸国では、糖尿病治療の費用は急性期保健診療予算の8%であると推定される。

【0054】

この背景を考慮すれば、IDDMの進行を予防できる方法があるか否かを検討することが重要である。第一に、細胞破壊が何ヶ月または何年もの間に起こって初めて、インスリンを合成する細胞が少なすぎて正常血糖を維持することができなくなり、そして患者が糖尿病と診断される。細胞障害のプロセスを停止することができれば、IDDMは進行しないであろう。第二に、現在では、単純な血液検査によって、高度の感受性（すなわち良好な「発見」率）および特異性（低い疑陽性率）でIDDMを将来発症する個体を予測することが可能である。第三に、細胞は、偶発的な免疫応答の一部として破壊され、そのあいだに細胞の正常な成分（自己抗原と呼ばれる蛋白質）が自己免疫攻撃の標的となるように思われる。細胞からの主要な自己抗原のいくつかが同定されている（下記参照）。IDDMのもう一つの重要な特徴は、疾患の発症に及ぼす強い遺伝的影響である。いくつかの遺伝子が関係しているが、最も重要なものは、ヒトMHCのクラスII遺伝子、すなわちヒト白血球抗原（HLA）遺伝子である。これらの遺伝子は、それに対する特定の個体の免疫応答の攻撃が集中する自己抗原内のペプチドセグメント（エピトープ）を選択することによって、免疫応答に対して優勢な制御を発揮する。これらのエピトープを同定することによって、前臨床段階で疾患の発症に介入する戦略を考案することが可能であろう。本発明には、そのようなエピトープを正確に同定するための新しい技術が含まれる。

【0055】

HLA遺伝子複合体は、ヒトゲノムにおいて最も多形性であり、そのために個体が異なるHLA分子を発現する可能性は高い。しかし、IDDM患者において、疾患の発症に強く関連しているクラスII HLA遺伝子の組は、非常に限られている。その結果、人種が定義された集団において、特定のクラスII HLA遺伝子は、総集団と比較して糖尿病ではかなり一般的である。下記に、北米と北欧のIDDM患者においてより一般的に認められ、したがって、疾患の発症に対して強い貢献的役割を有する可能性があるHLAクラスII遺伝子の例を示す：

クラスII HLA-DRタイプ : DRB1*0401、0405

クラスII HLA-DQタイプ : DQB1*0302、0201、0501 ;

DQA1*0501、0301。

【0056】

白人、黒人、および日本人における感受性遺伝子型を下記に示す :

白人:

DRB1*04, DQA1*0301, DQB1*0302

DRB1*04, DQA1*0301, DQB1*0201

DRB1*03, DQA1*0501, DQB1*0201

黒人におけるさらなる感受性遺伝子型:

DRB1*09, DRB1*07, DQA1*0301, DQB1*0201

日本人におけるさらなる感受性遺伝子型:

DRB1*08, DQA1*0301, DQB1*0302

DRB1*09, DQA1*0301, DQB1*0303

【0057】

重要な疑問は、HLAクラスII分子の機能は、HLA-DQA1*0301/DQB1*0302 (DQ8) を有する糖尿病患者とHLA-DQA1*0102/DQB1*0602 (DQ6) を有する非糖尿病患者とのあいだでどのように異なるか、どれがIDDMに対して保護するように思われるかという点である。異なるHLAクラスII分子が、T細胞受容体に対して異なるペプチドエピトープを選択して提示することは知られている。このように、「糖尿病促進性」のHLAクラスII分子は、危険な自己免疫応答を開始または助長するようにペプチドエピトープを選択することが起こりうる。

【0058】

北米および北欧のIDDM患者において、HLA-DRB1*0401は、IDDMに中等度に関連するが、DRB1*0405タイプは疾患の発症に対してより強い影響を有する。しかし、特定の群のHLA-DQ分子が最も強い感受性に関与している。この群には、52位でアミノ酸アルギニン⁵²を有するポリペプチド鎖 (arg52)、および57位でアスパラギン酸以外のアミノ酸⁵⁷を有するポリペプチド鎖 (非asp57) を含むHLA-DQ分子が存在する。これらの中で最も特徴が調べられているのは、HLA-DQ8 (上記参照) であり、これは典型的にHLA DRB1*0401に連鎖している (すなわち二つの遺伝子はしばしば同じ染色体上に認められる)。これらの遺伝子は、IDDMにとって最も高いリスクを与える [カリル (Khalil) ら、(1992)、Diabetes 41 : 378

~384]。IDDMに対して第一位の関係を有するarg52 /非asp57 HLA-DQ分子を発現する個体は、自身がIDDMを発症する確率が1 : 4であり ; すなわち集団のリスクの100倍である[ネポム (Nepom, G.T.)、(1995)、Annu. Rev. Med. 46 : 17 ~25]。

【0059】

1.4 種

本発明の方法は、広い範囲の哺乳類種、例えば、ヒト、ヒト以外の霊長類、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ラット、およびマウスにおいて、記述の特徴を有する疾患に適用することができる。それらは好ましくは、ヒトの疾患に適用される。

【0060】

例えば、特定のマウス系統は、RA、MS、IDDMおよびSLEのマウス型に対して感受性があることが知られている。その上、これらのマウスでは、感受性は特定のクラスII MHC遺伝子の発現に関連し、組織損傷は、活性化CD4+ T細胞またはCD4+ T細胞依存的抗体反応の作用が原因である。例えば、自然発生IDDMに対して感受性がある非肥満糖尿病 (NOD) マウスは、H-2A^{g7}分子を発現し、NODマウスのIDDMに対する感受性は、H-2A^{g7}遺伝子に連鎖している。さらに、NOD IDDMにおける組織破壊は、CD4+ T細胞によって媒介されることが知られている。さらに、マウスにおけるコラーゲン関節炎 (CIA) に対する感受性は、H-2A^a、H-2A^r、H-2A^{w3}、およびH-2A^{w17}クラスII MHC分子の発現に関連しており、CIAにおける関節の病態は、一般的にCD4+ Tリンパ球によって媒介されると考えられている。

【0061】

癌に関しては、SJLマウスの網様細胞肉腫は、活性化CD4+ T細胞によって産生されたサイトカインに対する増殖に依存し、特定のクラスII MHC分子の発現を必要とする。

【0062】

1.5 クラスII MHC分子

クラスII MHC分子は、多数の哺乳類種において同定されている。これらの種のいくつかにおいて、特定のクラスII MHC分子の発現は、特定のCD4+ T細胞媒介性

疾患に関連している（上記を参照のこと）。ヒトにおいて、例えば、クラスII MHC分子は、HLA-DR、HLA-DQ、およびHLA-DPと呼ばれ、マウスでは、H-2AおよびH-2Eと呼ばれる。全ての種において、各遺伝子の多数の対立遺伝子が存在する。

【0063】

1.6 抗原提示細胞（APC）

本発明のIMF方法に関して用いることができるAPCは、EVにおいて用いるために先に記載したAPC、すなわち、Bリンパ球、マクロファージ、単球、樹状細胞であり、ヒトではT細胞である。または、そのような細胞の不死化株を用いることができる。

【0064】

Bリンパ球APCと共に用いることができるリガンドには、アメリカヤマゴボウマイトゲン（PWM）のようなレクチン；抗原の内在化および提示のための細胞内機構の成分であるAPC表面受容体に結合する、または抗原の内在化のためのシグナル伝達に参与する抗体（またはFab、F(ab')₂、もしくはFv断片のような抗体の機能的断片）、例えば、補体受容体（CD21、CD35、CD11b/CD18、CD11c/CD18）、B細胞受容体複合体（免疫グロブリン分子を含む）、マンノース受容体、CD19、CD22、CD40、CD20、およびCD45；B細胞（例えば、可溶性CD40リガンド）およびその他のAPC上の上記の受容体のリガンド；ならびに無関係な特異性の全Ig分子、またはPPIもしくはPPIに結合したタグ（例えば、ペプチドもしくはハプテン）との結合能を有する全Ig分子、またはFc部分を含み、このようにAPC細胞膜においてFc受容体に結合することができるそのような分子の断片が含まれる。

【0065】

上記のリガンドが結合する受容体は以下の通りである。フィトラッカ・アメリカナ（*Phytolacca americana*）に由来するPWMは、多くの炭化水素部分に結合する。これは、蛋白質のIgファミリーのジスルフィド結合メンバー、例えばBリンパ球の抗原特異的受容体を構成する表面Ig分子に選択的に結合する。PWMが結合することができるB細胞表面上のいかなる分子も、PWMの受容体であろう。PWMの代わりに用いることができるレクチンには、以下の炭化水素結合分子が含まれる：エンドウレクチン、コンカナバリンA、レンチルレクチン、インゲンマメ（P

haseolus vulgaris) の植物性血球凝集素 (PHA)、ピーナツ血球凝集素、大豆血球凝集素、ウレックス・ユーロパエウス (Ulex europaeus) 血球凝集素-I、ドリコス (Dolichos biflorus) 血球凝集素、ビシア・ビローサ (Vicia villosa) 血球凝集素、およびエンジュ (Sophora japonica) 血球凝集素。APC表面受容体に結合する抗体またはリガンドに対する受容体は、定義によって、その例を以下に記載する、受容体そのものとなるであろう。無関係な特異性のIg分子の受容体、またはPPIもしくはPPIに結合したタグとの結合能を有するIg分子の受容体、またはFc部分を含むそのような分子の断片は、Bリンパ球、マクロファージ、および単球上のFc受容体である。

【0066】

1.7 ポリペプチド抗原

IMF法と共に用いることができるポリペプチド抗原は、既知のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはアミノ酸配列の少なくとも一部が既知であるポリペプチドとなりうる。それらは、それ自身が疾患の過程に関係していることが知られている (例えば、IDDMにおけるIA-2) もしくは疑われるポリペプチドとなりうるか、またはそれらは、疾患の過程に関係することが知られている、もしくは疑われる微生物 (例えば、らい病におけるらい菌 (M. leprae)) に由来しうる。他のポリペプチド抗原の例には、C型肝炎ウイルス、マイコバクテリアの熱ショック蛋白質、および黒色腫におけるチロシナーゼが含まれる。さらに、ポリペプチド抗原は、完全長の蛋白質となりうる、または疾患の過程に関係することが知られているもしくは疑われる蛋白質の断片 (例えば、IDDMにおけるIA-2の細胞内部分) となりうる。

【0067】

MSにおける自己抗原 (マウス実験的自己免疫脳脊髄炎) であると疑われるポリペプチドの例は、ミエリン塩基性蛋白質 (MBP)、プロテオリピッド蛋白質 (PLP)、ミエリン乏突起膠細胞蛋白質 (MOG)、および B-クリスタリンである。コラーゲンは、RAにおける自己抗原であると見なされ、MGではアセチルコリン受容体、ならびにSLEではスミス蛋白質、RNPリボ核蛋白質、およびSS-AとSS-B蛋白質が自己抗原であると見なされる。その他の自己免疫疾患およびその発生に係す

る自己抗原として関与しているポリペプチドを以下に記載する：

自己免疫性卵巣不全：3 ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ

グレーブス甲状腺炎：サイログロブリン、甲状腺ペルオキシダーゼ、および甲状腺刺激ホルモン受容体

橋本甲状腺炎：サイログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼ

原発性甲状腺機能低下症：サイログロブリンおよび甲状腺ペルオキシダーゼ

小児脂肪便症：トランスグルタミナーゼ

原発性胆汁性肝硬変：ピルビン酸デヒドロゲナーゼ

自己免疫性肝炎：チトクロームP4502D6

アジソン病：21 ヒドロキシラーゼ

白斑：チロシナーゼ

抗糸球体基底膜疾患（グッドパスチャー症候群）：IV型コラーゲン

全身性強皮症：Scl-70

【0068】

IDDMに関係することが疑われる自己抗原に関するより詳細な説明を以下に示す。

。

【0069】

IDDMに至る不適当な自己免疫反応は、膵臓の細胞における蛋白質を標的とする。IDDMに関連するいくつかの自己抗原があり、そのうち3個が主要なものであると考えられている：インスリン/プロインスリン；グルタミン酸デカルボキシラーゼ（65 kDaイソ型；GAD-65）；およびIA-2。ここにおいて、「主要な」という用語は、（a）ほとんど（すなわち、80～90%）のIDDM患者がこれらの3つのうち少なくとも1つに対して免疫応答を示す；および（b）高リスクの個体におけるIDDMの予測において、3つ全ての自己抗原に対する免疫応答は、将来のIDDMの非常に強いリスクを有する、という事実を示すために用いられる。

【0070】

インスリンは、当初プレプロインスリン（アミノ酸106個）として合成され、リーダー配列の切断によって得られた分子をプロインスリンと呼ぶ。プロインスリン（アミノ酸82個）は、鎖内ジスルフィド結合2個によってループを形成する

単一のポリペプチドである。プロインスリンのC鎖（同様にC-ペプチドとも呼ばれる、アミノ酸31個）を切断すると、ジスルフィド結合2個によって結合した2つの鎖（A、長さがアミノ酸30個、およびB、長さがアミノ酸21個）を含むインスリンの分泌型を生成する。

【0071】

自然発生的に生じたインスリンに対する抗体（インスリン自己抗体、IAA）は、当初、1983年に無処置の新たに診断された糖尿病患者において初めて同定された[パルマー（Palmer）ら、（1983）、*Science* 222：1337～1339]。典型的に、若いIDDMまたは前段階のIDDM患者の40～50%がIAAを有するが、それらは青年期および成人ではまれである。インスリン自己抗体は、ヒト、ブタ、ウシ、ラット、ヒツジ、およびニワトリインスリンと同等に良好に反応するが、単離AまたはBインスリン鎖とは反応しないことが示されており[カスターノ&アイゼンバーン（Castano, L. and Eisenbarth, G.S.）、（1990）、*Annu. Rev. Immunol.* 8：647～79]、このことは双方の鎖がこれらの自己抗体のエピトープを形成する一因となることを示唆している。最近の研究によって、A鎖とB鎖が共にエピトープの形成に関係しているより多くの証拠が提供され、A鎖のアミノ酸6個の配列と、B鎖のアミノ酸3個の配列が、インスリン自己抗体によって認識されるエピトープに含まれることを示唆している；この領域は、インスリン受容体結合ドメインとは異なる[カスターノ（Castano）ら、（1993）、*Diabetes* 42：1202～1209]。プロインスリンに対する自己抗体は、1型糖尿病の発症前の前糖尿病患者22%において検出することができる[クグリ（Kuglin）ら、（1990）、*Diabet. Med.* 7：310～314]。

【0072】

ベッケスコフ（Bakkeskov）と共同研究者は、新たに診断された糖尿病の小児の80%以上が相対分子量64 kDaの細胞自己抗原に対する自己抗体を有することを示し[ベッケスコフ（Bakkeskov）、（1982）、*Nature* 298：167-169]、自己抗体はまた、将来の糖尿病の開始に高リスクに関連して存在していた[ベッケスコフ（Bakkeskov）、（1987）、*J. Clin. Invest.* 79：926～934；アトキンソン（Atkinson）ら、（1990）、*Lancet* 335：1357～60]。64 kDa抗原をGADとして分

子が同定されたのは、1990年であった[Bekkeskov (Bakkeskov) ら、Nature 347 : 151 ~ 156]。GADは、阻害性神経伝達物質である アミノ酪酸の合成に関係する酵素であり、おそらくインスリン放出に対するシグナル伝達に何らかの役割を有する。酵素には2つのイソ型、GAD65とGAD67が存在する。これまで、ヒトランゲルハンス島において多くを占めるのはGAD65である。GAD65に対する自己抗体は、新たに発症したIDDM患者の70 ~ 80%の血清に存在する[Peterse n) ら、(1994)、Diabetes 43 : 459 ~ 467]。IAAと同様に、GAD自己抗体は、疾患の早期予測マーカーであり、IDDMを発症する高いリスクに関連している。それらは、家族の既往および免疫マーカーの存在により、IDDMを発症するリスクが高いことがわかっている個体の80%以上に存在する[De Aizpurua) ら、(1992)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 9841 ~ 9845 ; シスラー (Sei sler) ら、(1993)、J. Clin. Invest. 92 : 1394 ~ 1399]。

【0073】

初期免疫沈降実験において、64 kDa島細胞蛋白質に軽度のトリプシン処理を行うと、40 kDaおよび37 kDa蛋白質断片が形成され、これはIDDM患者の血清中に存在する自己抗体に結合する[クリスティ (Christie) ら、(1990)、J. Exp. Med. 172 : 782 ~ 794]。最も重要なことは、これらの断片に対する自己抗体は、高リスクの個体においてIDDMを非常に予測することが示された[クリスティ (Christi e) ら、(1994)、Diabetes 43 : 1254 ~ 1259]。これらの自己抗体の分子標的は現在では同定されている。40 kDa断片はIA-2の成分であり、同様に、ICA512と混同して呼ばれている[ペイトン (Payton) ら、(1995)、J. Clin. Invest. 96 : 1506 ~ 1511 ; ボニファシオ (Bonifacio) ら、(1995)、J. Immunol. 155 : 5419 ~ 5426 ; およびラビン (Rabin) ら、(1994)、J. Immunol. 152 : 3183 ~ 3188]。その後、37 kDa断片は、IA-2と85%の相同性を有するチロシンフォスファターゼであるフォグリン (IA-2) として同定された。IA-2およびフォグリンに対する自己抗体は、前糖尿病期間に出現し[ボニファシオ (Bonifacio) ら、(1998)、J. Immunol. 161 : 2648 ~ 2654]、高リスクの個体においてIDDM発症を強く予測する。IA-2は、106 kDaの大きな蛋白質として合成され、これは603 ~ 1055位で細胞内ドメインを有する。IA-2の細胞内ドメインは、IA-2に対するほぼ全ての自己

抗体反応性の標的である[カワサキ (Kawasaki) ら、(1997)、J. Clin. Endocrinol. Metab. 82 : 375 ~ 80]。

【0074】

2. ペプチド

本発明のペプチドには、クラスII MHC分子に結合して、疾患の過程または疾患に対する保護に係るCD4+ T細胞を活性化するペプチドが含まれる。クラスII MHC分子は、疾患に対する感受性または抵抗性に関連するクラスII MHC分子となりうる。疾患は、本明細書において引用したいかなる疾患となりえて、ペプチドが得られる種は、本明細書に引用したいかなる種ともなりうる。クラスII MHC分子は好ましくはヒトクラスII HLA分子、すなわち、DR、DPまたはDQ分子である。それらは、例えば、DR4またはDQ8分子に結合するペプチドとなりうる。本発明のペプチドが由来するポリペプチドは、本明細書に引用したいかなるポリペプチドともなりうる。ペプチドは一般的に、アミノ酸9 ~ 30個（例えば、13 ~ 25個）の長さである。ポリペプチドおよびクラスII MHC分子は、本明細書に記載したいかなる種に由来してもよく、疾患は、それらのいかなる種の疾患ともなりうる。

【0075】

ペプチドは、例えば、IA-2から誘導することができ、HLA-DR4分子に結合することができる。ペプチドは例えば、以下のペプチドのいずれか一つとなりうる：

VSSQFSDAAQASPSS (配列番号 :1); SVSSQFSDAAQASPS
 (配列番号 :2); **SSVSSQFSDAAQASP (配列番号 :3);**
SVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号 :4);
SRVSSVSSQFSDAAQASPSSHST (配列番号 :5);
SVSSQFSDAAQASPSSHSTPSWC (配列番号 :6);
VSSQFSDAAQASPSSHSTPSWCE (配列番号 :7);
VSSVSSQFSDAAQASPSSHSS (配列番号 :8); TQETRRLTQFHF
 (配列番号 :9); **YLKNVQTQETRTL (配列番号 :10);**
VQTQETRRLTQFHF (配列番号 :11); LKNVQTQETRRLTQF
 (配列番号 :12); **YLKNVQTQETRRLTQ (配列番号 :13);**
KNVQTQETRRLTQFH (配列番号 :14); SFYLKNVQTQETRRLTQFH
 (配列番号 :15); **FYLKNVQTQETRRLTQFHF (配列番号 :16);**
AYQAEPNTCATAQ (配列番号 :17); LCAYQAEPNTCATAQG
 (配列番号 :18); **LAKEWQALCAYQAEPNT (配列番号 :19);**
AYQAEPNTCATAQEGNIK (配列番号 :20);
WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :21);
LAKEWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :22);
GCTVIVMLTPLVED (配列番号 :23); CTVIVMLTPLVEDG
 (配列番号 :24); **ESGCTVIVMLTPLVEDG (配列番号 :25);**
MVWESGCTVIVMLTPL (配列番号 :26); SGCTVIVMLTPLVEDGVK
 (配列番号 :27); **ESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :28);**
WQMVWESGCTVIVMLT (配列番号 :29); DFWQMVWESGCTVIVMLT
 (配列番号 :30); **FWQMVWESGCTVIVMLTPLV (配列番号 :31);**
MVWESGCTVIVMLTPLVEDGV (配列番号 :32); DQFEFALTAVAE
 (配列番号 :33); **DQFEFALTAVAEVNAI (配列番号 :34);**
FEFALTAVAEVNAILKA (配列番号 :35);
SKDQFEFALTAVAEVNA (配列番号 :36);
SKDQFEFALTAVAEVNAILK (配列番号 :37); KVESSPSRSDYI
 (配列番号 :38); **LKVESSPSRSDY (配列番号 :39);**
KLKVESSPSRSDYINAS (配列番号 :40);
KVESSPSRSDYINASPPIEHDP (配列番号 :41); および
LKVESSPSRSDYINASPPI (配列番号 :42).

【0076】

ペプチドは、記載のIMD方法論を用いて調製することができる。より小さいペ
 プチド(アミノ酸50個未満の長さ)も同様に、標準的な化学的手段によって簡便
 に合成することができる。さらに、ポリペプチドおよびペプチドはいずれも、適

当なポリペプチドまたはペプチドをコードするヌクレオチド配列を用いて、標準的なインビトロ組換えDNA技術、およびインビボ組換え/遺伝子組換えによって産生することができる。当業者に周知の方法を用いて、関連するコード配列および適当な転写/翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。例えば、マニアティス (Maniatis) らの「分子のクローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」[コールドスプリングハーバー研究所、ニューヨーク州、1989]、およびアウスユベール (Ausubel) らの「分子生物学の現行プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」[グリーンパブリッシングアソシエーツ&ウィレーインターサイエンス、ニューヨーク州、1989]を参照のこと。

【0077】

多様な宿主発現ベクター系を用いて、ペプチドおよびポリペプチドを発現することができる。そのような宿主発現系は、当該ポリペプチドが産生され、その後精製される媒体を表すが、同様に、適当なヌクレオチドコード配列によって形質転換またはトランスフェクトすると、インサイチュで関連するペプチドまたはポリペプチドを産生することができる細胞も表す。これらには、 TR_{1-41} ペプチドコード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターによって形質転換した細菌、例えば大腸菌、または枯草菌 (*B. subtilis*) ; 適当なコード配列を含む組換え酵母発現ベクターによって形質転換した酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) またはピチア (*Pichia*) ; 組換えウイルス発現ベクター、例えばバキュロウイルスに感染させた昆虫細胞系 ; 組換えウイルス発現系、例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) もしくはタバコモザイクウイルス (TMV) に感染させた、または適当なコード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター、例えばTiプラスミド、によって形質転換した植物細胞系 ; または哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター、例えばメタロチオネインプロモーター、または哺乳類ウイルスに由来するプロモーター、例えばアデノウイルス後期プロモーター、もしくはワクシニアウイルス7.5 Kプロモーターを含む組換え発現構築物を有する哺乳類細胞系、例えば、COS、CHO、BHK、293もしくは3T3が含まれるがこれらに限定されることはない。

【0078】

3. APL

改変ペプチドリガンド (APL) は、CD4+ T細胞における反応を活性化する親野生型ペプチドのアミノ酸残基1～6位(すなわち、1、2、3、4、5、または6)が変化している変種ペプチドである。本発明のAPLにおいて、親野生型ペプチドのアミノ酸残基の50%未満、40%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、または5%未満を変化させることができる。このように、例えば、アミノ酸20個の長さであって、野生型ペプチドとは6位で異なる野生型ペプチドに由来するAPLにおいて、野生型ペプチドのアミノ酸の30%を変化させる。または、アミノ酸15個であって、野生型ペプチドとは3位で異なる野生型ペプチドに由来するAPLにおいて、野生型ペプチドのアミノ酸の20%を変化させる。

【0079】

APLは、親ペプチドが結合し、適当なクラスII MHC分子に結合した親ペプチドを認識するCD4+ T細胞の抗原特異的Tリンパ球受容体によって少なくともある程度認識されることが出来るクラスII MHC分子に対して少なくともある程度の結合能を保持する。しかし、APLは、親ペプチドによって活性化されたものとは定性的に異なるCD4+ T細胞の反応を活性化する。例えば、親ペプチドは、ヘルパーT細胞1 (Th1) 型反応を活性化することができ、その場合活性化CD4+ T細胞によってサイトカインであるインターロイキン-2 (IL-2)、インターフェロン (IFN-)、および腫瘍壊死因子- (TNF-) が産生されるが、この親ペプチドに由来するAPLは、その代わりにCD4+ T細胞におけるヘルパーT細胞2 (Th2) 型反応を活性化する可能性がある。Th2反応では、サイトカインインターロイキン-4 (IL-4)、インターロイキン-5 (IL-5)、およびインターロイキン-10 (IL-10) が活性化CD4+ T細胞によって産生される。または、特定の親ペプチドが所定のCD4+ T細胞においてTh2反応を誘発する場合、親ペプチドに由来するAPLは、T細胞においてTh1反応を活性化することができるであろう。いくつかのAPLは、Th1反応を、Th1およびTh2型サイトカインがいずれも産生されるTh0反応に切り替えることが示されている。さらに、APLは、CD4+ T細胞反応をTh3型反応に再度指向させることができ、この場合主に産生されるサイトカインはトランスフォーミング増

殖因子- (TGF-) である。TGF- は、広範囲の免疫応答を抑制することが示されている。

【0080】

一般的に、Th1反応は、細胞性免疫応答に関連し、およびTh2反応は抗体(すなわちB細胞)媒介性免疫応答に関連する。このように、Th1対Th2型で反応するCD4+ T細胞の相対数が、特定の個人において抗原によって産生される免疫応答の性質(細胞性対抗体媒介)を左右するであろう。

【0081】

何らかの条件、および特定の自己免疫疾患(例えば、RA、IDDM、およびMS)は、細胞性免疫応答が原因であり、このように、Th1 CD4+ T細胞反応に依存することが示されている。その他の疾患(例えば、MGおよびSLE)は、抗体(すなわち、B細胞)反応によって媒介され、このように、Th2 CD4+ T細胞反応に依存することが示されている。このように、CD4+ T細胞反応をTh1からTh2反応に指向させるように作用するAPLは、第一分類の疾患の治療または予防において有用となり得て、Th2からTh1方向にCD4+ T細胞を向ける役割を有するAPLは、第二分類の疾患の治療または予防において有用となりうる。

【0082】

APLにおけるアミノ酸置換は、根本的となりうる。例えば、陽性荷電側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン)を、陰性荷電側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸)または疎水性側鎖(例えば、イソロイシン)に置換する、およびその逆を行うことができる。さらに、かさ高い側鎖を有するアミノ酸(例えば、トリプトファン)を、小さい側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシンまたはアラニン)に置換する、およびその逆を行うことができる。または、置換は保存的となりうる。例えば、陰性荷電アミノ酸をもう一つの陰性荷電アミノ酸に(例えば、アスパラギン酸をグルタミン酸に)、または疎水性アミノ酸をもう一つの疎水性アミノ酸に(例えば、ロイシンをバリンまたはイソロイシンに)置換することができる。

【0083】

所定のAPLが優勢にTh1、Th2、Th3、またはTh0反応を誘発するか否かを調べる

方法は、当技術分野で既知である。簡単に説明すると、当該APLを、当該クラスI MHC分子を発現する試験被験者（例えば、マウス）に、多様な投与経路、例えば、筋肉内、静脈内、皮下、皮内、腹腔内、直腸内、膈内、鼻腔内、胃内、気管内、または肺内経路のいずれかによって、投与することができる。さらに、投与は、胆汁酸塩、フシジン酸、または他の洗浄剤のような透過剤を用いることによって、経口または経皮となりうる。注射は、1回または複数回（例えば、2、3、4、6、8、または10回）行うことができる。ペプチドは、生理的に許容される溶液（例えば、生理食塩水）中で投与することができ、アジュバント（例えば、フロイントの完全もしくは不完全アジュバント、またはコレラ毒素）と共に、またはアジュバントを用いないで投与することができる。免疫化の後、インビボまたはインビトロのいずれかで、当技術分野で既知の方法によって動物にAPLを投与して、産生された個々のサイトカインレベルを測定することができる。インビボ投与の場合、血液もしくは他の体液（例えば、尿、唾液、もしくは精液）または洗浄液（例えば、鼻腔、胸腔、直腸、胃、もしくは膈内洗浄液）に分泌されたサイトカインを測定することができる。または、リンパ様細胞を投与後に動物から単離して、細胞によって産生されたサイトカインレベルを、例えば、培養して、培養上清中のサイトカインを、例えばELISAによって測定することで調べることができる。単離されたリンパ様細胞はまた、ELISPOTアッセイ法、またはそれぞれが明確な波長の光を放出する異なる蛍光体に結合している1つもしくはそれ以上のサイトカイン結合抗体による細胞内染色後の蛍光分析のようなアッセイ法によって、サイトカインを産生する細胞の相対数を調べることができる。異なる波長（すなわち、色）の蛍光を発する蛍光体は当技術分野で既知である。そのような蛍光アッセイ法を用いて、単一の細胞によって産生されるサイトカインの範囲を確認することが可能である。リンパ様細胞をインビトロで投与すると、ELISPOTアッセイ法またはELISAのようなアッセイ法も用いることができる。APLによる免疫化および投与によって、比較的低いレベルのIL-2、IFN- γ 、およびTNF- α 、そして比較的高いレベルのIL-4、IL-5、およびIL-10が得られたが、親ペプチドによる免疫化および投与によって逆のパターンが得られた場合、結論は、APLがサイトカイン産生のTh1からTh2反応パターンの切り替えに有用であるという

ことであろう。Th1反応が病原性である場合、APLによる処置は、治療的または予防的となりうる。同様に、APLおよびその親ペプチドを、Th2型反応からTh1型反応に、またはTh1型反応からTh0もしくはTh3型反応に反応をシフトさせる相対能に関しても調べることができる。

【0084】

APLはまた、ヒトボランティアにおいてプロトコールのいずれかによって試験することができる。またはリンパ様細胞を被験者（例えば、ヒト被験者）から単離して、免疫化してインビトロで投与することができる。さらに、マウスTおよびBリンパ球を遺伝的に欠損し、ヒトリンパ様細胞によって再構築したマウスである「SCID-Hu」マウスに、APLを投与することができる。これらの動物では、固有の免疫欠損により、ヒトリンパ様細胞は拒絶されず、定着するであろう。これらのマウスをAPLによって免疫化して投与すると（上記の方法論のいずれかを用いて）、そのサイトカイン反応を上記の方法のいずれかによって測定することができる。アッセイ法において検出されたサイトカインがヒト起源であることを確認するために、ヒトの種特異的試薬（例えば、抗体）をアッセイ法（例えば、ELISAまたはELISPOT）に用いることができる。さらに、マウスクラスII MHC分子によるヒトCD4+ T細胞に対するAPLの提示を除外するために、SCIDマウスをクラスI MHC「ノックアウト」マウスと交配させ、リンパ球とクラスII MHC分子の双方を欠損するマウスを作成することができる。得られたマウスをヒトリンパ様細胞によって再構築することによって、反応することができる唯一のCD4+ T細胞がヒトCD4+ T細胞であり、APLを提示することができる唯一のクラスII MHC分子がヒトリンパ様細胞表面上のヒトクラスII MHC分子である、SCID-Huマウスが提供される。またはヒトリンパ様細胞のレシピエントは、SCIDマウスと、クラスII MHCノックアウトバックグラウンドで作製したDR（例えば、DR4）またはDQ（例えば、DQ8）トランスジェニックマウスとを交配させることに由来するハイブリッドマウスとなりうる。この場合も、提示する唯一のクラスII MHC分子は、トランスジェニック親マウスによって与えられたヒトDRまたはDQ分子であろう。

【0085】

RAG-1欠損マウスは、記載のヒトマウスキメラ動物を作製するためにSCIDマウ

スの代わりに用いることができる。RAG-1欠損マウスは、SCIDマウスと同様に、TおよびBリンパ球を欠損するが、関連する変異が「漏出性」でないという長所を有する。このように、SCIDマウスはその一生の後半になって少数のリンパ球を産生するが、これはRAG-1欠損マウスでは起こらない。

【0086】

本発明のAPLは、ペプチドおよびポリペプチドに関して先に記述した方法のいずれによっても得ることができる。本発明のAPLはまた、インビボで関連するペプチドの残存を促進するために、先に記述した通りであるが、アミノ末端とカルボキシル末端のいずれかまたは双方に、遮断剤を付加することによって、インビボで用いられるように改変されたAPLを含む。これは、ペプチドの末端が、細胞またはミトコンドリアに取り込まれる前に、プロテアーゼによって分解される傾向がある状況では有用となりうる。そのような遮断剤は、投与されるペプチドのアミノおよび/またはカルボキシル末端に結合することができるさらなる近縁または無関係なペプチド配列を含みうるが、これらに限定されることはない。これは、平均的な当業者に周知の方法によって、ペプチドの合成の際に化学的に、または組換えDNA技術によって行うことができる。

【0087】

または、ピログルタミン酸もしくは当技術分野で既知の他の分子のような遮断剤を、アミノおよび/もしくはカルボキシル末端残基に結合させることができ、またはアミノ末端のアミノ基もしくはカルボキシル末端のカルボキシル基を異なる部分に置換することができる。同様に、ペプチドは投与前に薬学的に許容される「担体」蛋白質に共有結合によって、または非共有結合によってカップリングさせることができる。

【0088】

同様に重要であるのは、APLのアミノ酸配列に基づいてデザインされるペプチド模倣化合物である。ペプチド模倣化合物は、選択されたペプチドの三次元構造と実質的に同じである三次元構造（すなわち、「ペプチドモチーフ」）を有する合成化合物である。ペプチドモチーフは、ペプチド模倣体が由来するAPLと定性的に同一となるようにCD4+ T細胞を活性化することができるペプチド模倣化合物

を提供する。ペプチド模倣化合物は、細胞透過性の増加および生物学的半減期の延長のような治療的有用性を増強するさらなる特徴を有する。

【0089】

ペプチド模倣体は典型的に、部分的または完全に非ペプチドである骨格を有するが、側鎖は、ペプチド模倣体が基づくペプチドにおいて起こるアミノ酸残基の側鎖と同一である。いくつかのタイプの化学結合、例えば、エステル、チオエステル、チオアミド、レトロアミド、還元カルボニル、ジメチレン、およびケトメチレン結合がプロテアーゼ抵抗性ペプチド模倣体の構築において一般的に有用なペプチド結合置換体であることは当技術分野において周知である。

【0090】

4. APLを用いた治療方法

非病原性であるCD4+ T細胞のサイトカイン産生の誘発能を有する、および/またはAPL親ペプチドによって誘発された病原性CD4+ T細胞サイトカイン反応を抑制するAPLは、親ペプチドに対する病原性CD4+ Tリンパ球反応によって引き起こされる疾患の治療、軽減、または予防において有用となりうるであろう。

【0091】

例えば、「ペプチドx」がHLA-DR4、DQ8ハプロタイプを有する患者においてCD4+ T細胞の強力なTh1型糖尿病原性反応を誘発する場合、ペプチドxに由来するAPLによる患者の治療はその患者において治療的または軽減的となりうる。または、患者が前糖尿病性である場合、APLによる治療は、臨床疾患の発病を予防または遅らせることができるであろう。

【0092】

本発明のこれらの方法は、2つの基礎的なクラス、すなわち、インビボアプローチを用いる方法と、エクスビボアプローチを用いる方法に分類される。

【0093】

4.1 インビボアプローチ

一つのインビボアプローチにおいて、APL（ペプチドまたはペプチド模倣体）そのものを上記の経路のいずれかによって被験者に投与する。好ましくは、適当なリンパ様組織（例えば、脾臓、リンパ節、または粘膜関連リンパ様組織（MALT

)) に直接輸送する。

【0094】

必要な用量は、APLの選択、投与経路、製剤の性質、患者の疾患の性質、および主治医の判断に依存する。適した用量は、0.1~100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲である。必要な用量は、利用される多様なAPLおよび様々な投与経路の異なる効率を考慮して広く変化することが予測される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与より高い用量を必要とすることが予測されるであろう。これらの用量レベルの変動は、当技術分野で十分に理解されるように、最適化に関して標準的な経験的な経路を用いて調節することができる。

【0095】

または、APLをコードする「ミニ遺伝子」を含むポリヌクレオチドを、動物の適当な細胞に輸送することができる。ミニ遺伝子の発現は、好ましくは、例えばリンパ様組織へのポリヌクレオチドの輸送によって、被験者のリンパ様組織に向けられる。これは、例えば、マクロファージのような貪食細胞による貪食を最適にする大きさにした、ポリマーの生体分解性の微粒子またはマイクロカプセル輸送媒体を用いることによって行うことができる。例えば、直径が約1~10 μm のPLGA(ポリ-ラクト-コ-グリコリド)微粒子を用いることができる。ポリヌクレオチドをこれらの微粒子に封入して、これをマクロファージが取り込んで、細胞内で徐々に分解され、それによってポリヌクレオチドを放出する。一度放出されると、DNAが細胞内で発現される。第二のタイプの微粒子は、細胞によって直接取り込まれることを意図するのではなく、むしろ生体分解によって微粒子から放出された場合に限って細胞によって取り込まれる、核酸の徐放性容器として主に作用することを意図している。したがって、これらのポリマー粒子は、貪食を免れるために十分に大きくなければならない(すなわち、5 μm 以上、好ましくは20 μm 以上)。核酸輸送にとって有用な微粒子、それを作製する方法、およびそれを使用する方法は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,783,567号により詳しく記載されている。

【0096】

APLsによる取り込みを得るもう一つの方法は、標準的な方法によって調製した

リポソームを用いることである。ベクターは、これらの輸送媒体に単独で組み入れることができ、または組織特異的抗体と共に組み入れることができる。または、静電気または共有結合によってポリリジンに結合したプラスミドまたは他のベクターからなる分子結合体を調製することができる。ポリリジンは標的細胞上の受容体に結合することができるリガンドである[クリスチアーノ (Christian o) ら、(1995)、J. Mol. Med. 73 : 479]。または、リンパ様組織特異的ターゲティングは、Bリンパ球、Tリンパ球、または選択的に樹状細胞特異的TREのようなリンパ様組織特異的転写調節エレメント (TRE) を用いることによって行うことができる。リンパ様組織特異的TREは既知である[トンプソン (Thompson) ら、(1992)、Mol. Cell. Biol. 12 : 1043~1053 ; トッド (Todd) ら、(1993)、J. Exp. Med. 177 : 1663~1674 ; ペニックス (Penix) ら、(1993)、J. Exp. Med. 178 : 1483~1496]。

【0097】

関連するポリヌクレオチド (例えば、発現ベクター) において、開始メチオニンおよび選択的に輸送配列と共に当該APLをコードする核酸配列を、選択的に、プロモーター、またはエンハンサー・プロモーター複合体に機能的に結合させる。

【0098】

短いアミノ酸配列は、特異的細胞内コンパートメントに蛋白質をターゲティングするためのシグナルとして作用しうる。例えば、疎水性シグナルペプチド (例えば、MAISGVPLGFFIIAVLMSAQESWA (配列番号 : 43) は、ERとなる運命の蛋白質のアミノ酸末端に認められる。配列KFERQ (配列番号 : 44) (および他の近縁配列) は、細胞内ポリペプチドをライソゾームにターゲティングすることが知られているが、他の配列 (例えば、MDDQRDLISNNEQLP (配列番号 : 45)) は、ポリペプチドをエンドソームにターゲティングする。さらに、ペプチド配列KDEL (配列番号 : 46) は、ERに関する保持シグナルとして作用することが知られている。これらのシグナルペプチドのそれぞれ、またはその組み合わせを用いて、所望のように本発明のAPLを輸送させることができる。例えば、ER-ターゲティングシグナルペプチドに結合した所定のAPLをコードする構築物は、ペプチドをERに指向さ

せ、ここで、集合するとクラスII MHC分子に結合して、細胞内輸送に必須である無傷の定常鎖 (Ii) の結合を防止する。または、APL上のER保持シグナルは、クラスII MHC分子がERを離れないようにするのに役に立つ構築物を作製することができる。本発明のAPLを、代わりにエンドソームコンパートメントにターゲティングすれば、これによって、処理されたペプチドによって置換された場合に、大量のAPLが確実に存在するようになり、それによってクラスII MHC複合体に組み入れられたペプチドが、もう一つの天然に存在する不適切なペプチドではなくて本発明のAPLである可能性が増加するであろう。APLがクラスII MHCに組み入れられるために利用される可能性は、APLを無傷のIiポリペプチド配列に結合させることによって増加させることができる。IiがクラスII MHC分子をエンドソームに輸送させることは知られているため、ハイブリッドIiは、クラスII MHC分子と共にAPLの1つまたはそれ以上のコピーを有するであろう；一度エンドソームに入ると、ハイブリッドIiは、通常のエンドソームプロセスによって分解され、APLの多数のコピーまたはそれに類似の分子の双方、および開いたクラスII MHCペプチド結合裂溝を生じるであろう。ターゲティングシグナルを含むAPLをコードするDNAは、PCRまたは他の標準的な遺伝子操作または合成技術によって産生されるであろう。輸送配列は、その全文が参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第5,827,516号により詳しく記載される。

【0099】

プロモーターは、典型的に転写開始点の上流100ヌクレオチド対以内のDNA分子の領域からなるTREである。エンハンサーは、時間、位置、およびレベルに関して発現特異性を提供する。プロモーターとは異なり、エンハンサーは、プロモーターが存在すれば、転写部位から多様な距離離れて存在しても機能することができる。エンハンサーはまた、転写開始部位の下流に存在しうる。発現ベクターのコード配列は、転写終了領域に機能的に結合する。コード配列をプロモーターの制御下に置くために、プロモーターの下流(3')1ヌクレオチドから約50ヌクレオチドのあいだに、ペプチドまたはポリペプチドの翻訳読みとり枠の翻訳開始部位が位置する必要がある。

【0100】

適した発現ベクターには、プラスミド、ならびに中でもヘルペスウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、弱毒化ワクシニアウイルス、カナリアポックスウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスのようなウイルスベクターが含まれる。

【0101】

ポリヌクレオチドは、薬学的に許容される担体と共に投与することができる。薬学的に許容される担体は、ヒトへの投与に適した生物学的に適合性の媒体、例えば生理食塩水である。治療的有効量は、治療動物において医学的に所望の結果を生じることができるポリヌクレオチドの量である。医学の技術分野で周知であるように、いかなる患者の用量も、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与時間および投与経路、全身健康状態、ならびに同時投与される他の薬剤を含む多くの要因に依存する。用量は変化するが、ポリヌクレオチドの好ましい投与用量は、ポリヌクレオチド分子約 $10^6 \sim 10^{12}$ コピーである。これは、必要に応じて、反復投与することができる。投与経路は、上記の経路のいずれともなりうる。

【0102】

4.2 エクスピボアプローチ

一つのエクスピボアプローチにおいて、CD4+ Tリンパ球を含むリンパ様細胞を、被験者から単離して、インビトロでAPLに暴露する。リンパ様細胞は、1回または複数回暴露することができる（例えば、2、3、4、6、8、または10回）。リンパ様細胞によるサイトカイン産生パターンは、1回またはそれ以上の暴露後に調べることができる。所望のサイトカインがリンパ様細胞によって産生されると、それらを、本明細書に記載の経路のいずれかによって被験者に再度導入する。このエクスピボアプローチの治療的または予防的有効性は、親野生型ペプチドに対する病原性CF4+ T細胞反応をエクスピボAPL活性化リンパ球が能動的に抑制できるか否かに依存する。そのようなアプローチの価値の可能性は、Th2（またはTh0もしくはTh3）型サイトカインを産生するCD4+ T細胞が、進行中のTh1反応およびそのようなTh1反応によって引き起こされた疾患を能動的に抑制する実験によって示される[ニコルソン&ククルー (Nicholson and Kuchroo)、Curr.

Opinion in Immunol. 8: 837~842、(1996)]。

【0103】

もう一つのエクスピボ戦略は、上記のAPLコードミニ遺伝子を含むポリヌクレオチドを、被験者から得られた細胞にトランスフェクトまたは形質導入することを含みうる。次に、トランスフェクトまたは形質導入細胞を被験者に戻す。そのような細胞は好ましくはリンパ様細胞であるが、被験者において生存することができる限りAPLの起源として作用する繊維芽細胞、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、上皮細胞、内皮細胞、表皮細胞、または筋細胞を含む広い範囲のタイプとなりうるがこれらに限定されることはない。リンパ様細胞を用いることは、そのような細胞がリンパ様組織（例えば、リンパ節または脾臓）に戻ると予想され、このようにそれらが作用を発揮する、すなわち、免疫応答を活性化する部位でAPLが高濃度で産生されるという点において、特に有利となるであろう。このアプローチを用いて、APLコードポリヌクレオチドを用いる上記のインビボアプローチと同様に、APLによる能動的なインビボ免疫が得られる。インビボアプローチについて記載したものと同一遺伝子構築物および輸送配列をこのエクスピボ戦略にも用いることができる。

【0104】

エクスピボ法には、被験者から細胞を採取する段階、細胞を培養する段階、それらに発現ベクターを形質導入する段階、およびAPLの発現に適した条件で細胞を維持する段階が含まれる。これらの方法は、分子生物学の分野で既知である。形質導入段階は、リン酸カルシウム、リポフェクチン、電気穿孔、ウイルス感染、およびバイオリスティック (biolistic) 遺伝子移入を含む、エクスピボ遺伝子治療のために用いられるいかなる標準的な手段によっても行われる。または、リポソームまたはポリマー微粒子を用いることができる。次に、首尾よく形質導入された細胞を、例えばミニ遺伝子の発現または薬剤抵抗性遺伝子の発現に関して選択する。次に細胞を致死的に放射線照射して（望ましければ）、患者に注射または移植してもよい。

【0105】

本発明のこれらの方法は、本明細書に記載の疾患および種のいずれにも適用す

ることができる。特定の疾患に対して、APLが治療的または予防的であるか否かを調べる方法は、特定のAPLによって誘発されたCD4+ Tリンパ球反応のタイプを確立する上記の方法の単なる改変となりうる。治療効果を調べる場合、疾患の症状を示す試験集団（例えば、IDDM患者）を、上記の戦略のいずれかを用いて試験APLによって処置する。同様に疾患の症状を示す対照集団も同様に同じ方法論を用いてプラセボによって処置する。試験被験者において疾患症状が消失または減少すれば、APLが有効な治療物質であることが示されるであろう。

【0106】

疾患の症状を発症する前の被験者（例えば、IDDM発症のおそらく候補者であると考えられる前糖尿病患者、または適当な疾患、例えば実験的自己免疫脳脊髄炎を故意に誘導することができる実験動物）に同じ戦略を適用することによって、APLの予防薬、すなわちワクチンとしての有効性を調べることができる。この場合、疾患症状の発現が予防されるか否かを調べる。

【0107】

以下の実施例は本発明を説明するためであって制限するためではないと解釈される。

【0108】

実施例

材料および方法

エプスタイン・バー（Epstein-Barr）ウイルス（EBV）形質転換B細胞株の培養

EBV形質転換Bリンパ球株は、グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、および10%仔ウシ胎児血清（FCS）を加えたRPMI 1640培地中で、大量の細胞を得るために50～100、175 cm²フラスコにおいて増殖させた。用いたEBV形質転換細胞は、Priess細胞であり、これはIDDM許容DRB1*0401、DRB4*0101[DR4/DRw53]、DQA1*0301/DQB1*0302[DQ8]HLA遺伝子型に関してホモ接合である。細胞の約50%を2～3日毎に沈降させて採取し、ハンクス液（HBSS）によって洗浄して、計数し、HBSSに再び懸濁して、IMF技法に用いた。

【0109】

ビオチン結合ポリペプチド抗原

組換え抗原を大腸菌において作製した。IA-2の細胞内部分 (IA-2ic) は、ピンポイントベクター (プロメガ社、マディソン、ウィスコンシン州) を用いて作製し、これは、単一のリジン残基でビオチン標識したリーダー配列に、N末端でカップリングした融合蛋白質を産生する。これによって、単量体アビジンカラムを用いた精製を行うことができ、同様に、抗原輸送系 (ADS) において用いられる当該抗原のビオチン結合型を生成された (下記参照)。IA-2icをコードするcDNAを含むピンポイントベクターは、ロンドンのキングスカレッジのクリスティ博士 (M. Christie) によって寄贈された [ペイトン (Payton) ら、(1995)、J. Clin. Invest. 96: 1506~1511]。IA-2icを精製する条件は既に確立されている [ペイトン (Payton) ら、(1995)、上記]。簡単に説明すると、大腸菌株JM109細胞をIA-2ic cDNAを含むピンポイントベクターによって形質転換した。コロニーを、最小培地 / アガロースプレート上にサブクロニングして、単一のコロニーを採取して、2 μ M d-ビオチンおよび100 μ g/mlアンピシリンを含む最小培地において振とうしながら37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。培養の A_{600} 値が0.5に達した際に、これを、2 μ M d-ビオチンを含むLB培地に移して (10倍希釈)、37 $^{\circ}$ Cで振とうしながら1時間培養した。蛋白質発現は、100 μ Mイソプロピル -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を用いて増殖の対数期において誘導した。37 $^{\circ}$ Cで3~5時間振とうした後、4 $^{\circ}$ C、8,000 gで細胞を回収した。細胞ペレットを細胞ペレット緩衝液 (CPB; 10 mMベンザミジンおよび1 mMフェニルメチルスルホニルフルオリドを含む100 mMリン酸緩衝液、pH 7.2) 中に再び懸濁した。次に、細胞を氷中で溶解して、ライソザイム (1 mg/ml)、トライトンX-100 (0.1%)、およびデオキシリボヌクレアーゼ (200 U/ml) の組み合わせによる処置を用いて、可溶性蛋白質を放出させた。細胞片を遠心 (4 $^{\circ}$ C、14,000 gで15分間) によって除去した後、ビオチン結合融合蛋白質を、製造元の説明書に従って調製し、CPBで平衡にしたアビジン樹脂カラム (ソフトリンク、プロメガ社、マディソン、ウィスコンシン州) に流速8 ml/時間で通過させることによって、上清から精製した。十分にカラムを洗浄した後、ビオチン結合融合蛋白質を過剰量の5 μ M d-ビオチンを用いて溶出して、G-25カラム (ファルマシア社) を用いて、遊離のd-ビオチンから分離して、アミコンB15濃縮器を用いて15 kDa分子量の「カットオフ値」

を用いて10～100倍濃縮した。典型的に>90%である純度は、SDS-PAGE法およびアビジンペルオキシダーゼを発色段階に用いるウェスタンブロット分析によって評価した。

【0110】

ヒト豚島から抽出したRNAから得たGAD65 cDNAを、発現がビオチン結合タグ配列の下流のT7プロモーターによって制御され、ヒスチジン精製タグがピンポイントベクターに基づいてデザインされる、pET 12ベクター（ストラタジーン社）にクローニングした。このpET12ベクター系は、融合蛋白質の発現を、大腸菌BLR（DE3）pLysSのプロテアーゼ欠損株において誘導することができるという長所を有する。

【0111】

GAD65は、以下のように作製した。BLR（DE3）pLysS細菌を、ベクターを含むGAD65 cDNAによって形質転換して、コロニーをLBに採取して、 A_{600} 値が0.6～1.0に達するまで225 rpmで振とうしながら37℃で増殖させた。細胞を新鮮なLBに再び懸濁して、25倍希釈で播種して、 A_{600} 値が0.4となるまで同じ条件で増殖させ、2 mM IPTGによって30℃で3時間誘導した。遠心によって得られた細菌ペレットを8 M塩酸グアニジン（GuHCl）、50 mM NaH_2PO_4 、10 mMトリス、0.1%トライトンX-100、50 mM 2-メルカプトエタノール（2-ME）、pH 8.0中に再び懸濁して、超音波処理して、4℃で40,000 gで1時間遠心した。上清を2-MEを含まない10倍量の8 M GuHCl緩衝液に対して透析して、その後50%ニッケル樹脂スラリーに加えて、室温で1時間揺り動かした。ニッケル樹脂をカラムに再び懸濁して、ニッケル樹脂の製造元（キアゲン社、ドイツ）によって提供された緩衝液に、5 mM 2-MEと0.1%トライトンX-100を加えた尿素緩衝液によって洗浄した。蛋白質は、pH 5.9およびpH 4.5の尿素緩衝液を用いて溶出して、50 μM ピリドキサルリン酸、20 mMグルタミン酸ナトリウム、0.05%トライトンX-100、5 mM 2-ME、および2 M L-アルギニンを含む4 M尿素に対して透析した。次に調製物を、2.5 mMグルタチオン、50 μM ピリドキサルリン酸を含むドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（0.1%）ゲル泳動緩衝液に対して透析した。透析は、SDSの10倍低い濃度を含む同一の緩衝液に対して繰り返した。次に、4 mM ヘペス、20 mMグルタミン酸ナト

リウム、50 μ Mピリドキサルリン酸、2.5 mMグルタチオンを含む溶液に対して透析を行った。最後の透析はグルタミン酸ナトリウムを含まない同じ緩衝液に対して行った。この段階で、黄色のビオチン結合GAD65を4 で保存するか、または凍結乾燥した。

【0112】

ヒトプレプロインスリンcDNAは、スタイナー博士(D. Steiner)博士から寄贈され、GAD65に関して先に記述したようにクローニングした。ビオチン結合プレプロインスリンは、GAD65の産生および精製に関して記述した条件と類似の条件で産生および精製した。

【0113】

抗原輸送系(ADS)

ADSに関して、回収して洗浄したPriess細胞を 5×10^7 個/mlで、b-PMW(300 ng/ml)を加えた冷HBSS中に懸濁させ、氷中で30分インキュベートした。HBSSによって洗浄した後、細胞を、0.5 mg/mlアビジンを含むHBSS中で 5×10^7 個/mlで再び懸濁して、氷中で30分インキュベートした。洗浄後、細胞を10~40 μ g/mlビオチン結合IA-2icを含むHBSS中に再び懸濁して、氷中で30分間インキュベートした。洗浄後、細胞を、予め加温したRPMI 1640/10%FCS(1×10^6 個/ml)に再び懸濁して、5%CO₂中で37 で6時間培養した。細胞を沈降させて、HLA分子の精製を実施するまで-80 で保存した。

【0114】

HLAクラスII精製

DR4分子の精製は、これまでに記述されているように実施した[ゴルガ(Gorga)ら、(1987)、J. Biol. Chem. 262:16087~16094]。ADSから得て-80 で保存した細胞ペレットを融解して、低張緩衝液中でホモジナイズした。粗膜分画を高速遠心によって調製して、NP40に可溶化した。洗浄剤溶可溶性分画を、MHCクラスI分子(mAb W6/32)、DR分子(mAb LB3.1またはmAb L243)、およびDQ3ファミリー分子(mAb IVD12)にそれぞれ結合するモノクローナル抗体に結合させた、プロテインAセファロースまたはアフィゲル10マトリクス材料を含む一連のイムノアフィニティカラムに通過させた。これらのmAbのそれぞれは、表示のBリン

パ球株の細胞上のHLAクラスIまたはクラスII分子の本来の二量体構造を認識する。イムノアフィニティカラムは、50 mMグリシン、pH 11.5 / 0.1%デオキシコール酸ナトリウムによって溶出して、直ちに中和して、10 mMトリス、pH 8.0/0.1%デオキシコール酸ナトリウムに対して透析した。蛋白質の純度はSDS-PAGE法によって評価して、BCAアッセイ法によって定量した。

【0115】

ペプチド分析

HLAクラスII蛋白質試料は全て、ペプチドを抽出する前に限外濾過装置（アミコン・セントリコン10）を用いて100 μ lに濃縮した。天然に処理されたペプチド範囲は、記述のように、10%酢酸800 μ lを加えて、70 $^{\circ}$ Cで15分インキュベートすることによってHLAクラスII分子から酸溶出した[チックス (Chicz) ら、(1993)、J. Exp. Med. 178 : 24~47]。ペプチドは、セントリコン10装置による限外濾過によって残りのHLA蛋白質から分離した。酸抽出したペプチドを含む「フロースルー」分画は、セイバント・スピードバックによって約20~30 μ lの容積に濃縮して、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。次に、酸抽出したペプチド混合物を、これまでに記載されているとおりであるが[チックス (Chicz) ら、(1993)、上記]、軽微な改変を加えた逆相クロマトグラフィーによって分離した。簡単に説明すると、分離は、マイクロボアC18カラム (1.0 \times 250 mm ; バイダック、ヘスペリア、カリフォルニア州) を用いて流速50 μ l/分で実施した。カラム溶出液は、2%がマトリクス補助レーザー脱離タイムオブフライト (MALDI-TOF) 質量分析試料プレートに直ちにローディングされて、残りの98%が回収されて、-20 $^{\circ}$ Cで保存されるように分けた。試料は、マトリクス (-シアノ-4-ヒドロキシシナム酸、10 mg/mlの50%アセトニトリル / 0.1%トリフルオロ酢酸) 0.4 μ Lを加えることによって質量分析のために調製し、風乾させた。マススペクトルは、直線および反射モードの双方で、一段階拡張長反射材タイムオブフライト質量分析計 (ボヤガー・エリートXL : パーセプティブバイオシステムズ、フラミンガム、マサチューセッツ州) を用いて、128人のスキャンからのイオンシグナルを平均することによって最適なレーザー強度で得た。質量変換までの時間は、合成ペプチドを用いた外部較正によって実施した。

【0116】

天然に処理されたHLA関連ペプチドの低レベルをシークエンシングするための、データ依存的衝突補助解離 (CAD) によるマイクロキャピラリー液体クロマトグラフィー・質量分析 (LC-MS) アプローチは、先に記述したMALDI-TOFアプローチによって決定されるターゲティングされたペプチド質量を直接シークエンシングするために開発された。逆相クロマトグラフィーによって分離したペプチド分画は、取り扱いを容易にするために、そして二次元逆相分離を用いることができるように、最終容積を5~20 μl に希釈する。得られたペプチド溶液は、ポリマー逆相支持体の小さい支持床 (0.5~1.0 μL) を用いてペプチドを捕獲することによって予め濃縮することができる。これによってまた、捕獲物を水溶液で洗浄することによる親水性混入物の除去が容易となる。その後、ペプチドを捕獲相からキャピラリー上に逆流させて (内径75 μm および1~7 μm の100~200 C18または非多孔性材料で5~15 cmを充填する)、非直線勾配を用いて分離を行う。移動相の流速~0.5 $\mu\text{L}/\text{分}$ は、ポンプからの流れを枝分かれさせて、バランスカラムを用いることによって行う。ペプチド検出は、 μ -エレクトロスプレーMSによる。エレクトロスプレーを行うために必要な電圧をキャピラリーカラムの頭部に適用して、ペプチドがキャピラリーから溶出する際にペプチドを質量分析装置に直接エレクトロスプレーする。CAD実験は、データ依存的モードで、ユーザー設定閾値より豊富に存在するイオンを用いて誘発する。動的排除を用いて、所定のイオンが多数のCAD実験によって分析されないように、アッセイ進行の際に除外リストを作製することによって、最大のペプチド範囲 (すなわち、ユーザーが単一のペプチド反応に関してユーザーが決定した回数のCAD実験を行った後、CADによって軽微な反応を分析する) を確保する。所定のイオンが除外リストに記載される時間は、クロマトグラフィー分離の品質に依存する。これは、実験的に決定しなければならない。このように、分離したアイソバリック反応を分析してもよい。この方法を用いて、1 fmol以上のペプチドのシークエンシング感度を得ることができる。

【0117】

エピトープ確認 (EV)

同定されたペプチドエピトープがIDDMに関連することを確立するために(すなわち、それらがDR4分子を発現するIDDM患者またはプレIDDM患者のCD4+ T細胞によって認識されるが、DR4分子を発現する非糖尿病対照のCD4+ T細胞によっては認識されない)、質量分析によってIA-2icに由来すると同定されたペプチドに基づくアミノ酸配列を有する合成ペプチドを用いて、T細胞増殖アッセイを行った。ペプチドは、アプライドバイオシステムズ社のシナジー(SYNERGY)ペプチドシンセサイザーによってFmoc化学を用いて合成し、ラジカル圧縮モジュールを備えたウォーターズ2690アライアンスシステム上で調製的RP-HPLCによって精製した。全ての合成ペプチドに関してアミノ酸配列および90%以上の純度が、MALDI-MSおよび分析的HPLCによって確認された。最近発症した(診断から<6ヶ月)IDDM患者および適当なHLA DR4分子を発現する健康対照者からの末梢血単核球を、密度勾配遠心によって分離し、96ウェルU底プレートのウェルにおいて、RPMI 1640/10%ブールした正常AB血清150 μ l中でペプチド10 μ g/mlの濃度と共に5日間培養した後、0.5 μ Ciの 3 H-チミジン/ウェルによってパルスして、フィルター上に回収して、放射活性計数を1分間あたりのカウント数(cpm)として測定した。試験群に対して同じウェル12個を作製した。結果は、ペプチドを有しない培養から得たcpmに対する、ペプチドを含む培養から得たcpmの比である刺激指数(SI)として表記した(それぞれの場合についてウェル12個の平均cpm)。データは同様に、「陽性培養ウェル」の分画に関しても分析した。陽性培養ウェルは、ペプチドを含むウェルであり、ペプチドを有しない培養から得た平均cpm+2SDより大きなcpmが得られた。T細胞反応は、SIが>2.0で、>40%のウェルが陽性である場合に有意であると見なされた。

【0118】

結合アッセイ法:

IMFによって同定されたコア領域6個に基づくアミノ酸配列を有する合成ペプチドを、本質的にこれまでの記載通りに実施した結合阻害アッセイ法において単離HLA-DR4分子との結合能に関して調べた[チックズ(Chicz)ら、(1997)、J. Immunol. 159: 4935~4942]。簡単に説明すると、HLA-DR4の免疫精製調製物のアリコート(最終濃度10 μ g/ml)を、0.2 ml試験管においてビオチン結合HLA-DR4

結合ペプチド（クラスII MHC定常鎖の残基98～117位からなる）（「指示ペプチド」）（1 μM）と試験ペプチドの様々な濃度と共にインキュベートした。室温で一晩インキュベートした後、各試験管の内容物を、抗HLA-DR4抗体で予めコーティングした96ウェルプラスチックマイクロタイタープレートのウェルに移した。マイクロタイタープレートを室温で60分間揺り動かした後、非結合物質を激しく洗浄することによって除去した。各ウェル中の結合した標準物質ペプチドの相対量は、ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼを加えて、洗浄し、色素発生性のアルカリフォスファターゼ基質を加えた後に発色を測定することによって決定した。

【0119】

実施例1. Bリンパ球によるIA-2icの天然のプロセッシングに由来するHLA DR4結合ペプチドの分析

記載のADSによって、親ポリペプチドの天然の取り込み後にAPCによって産生されたペプチドと類似のペプチドを産生するか否かを確立するために、破傷風毒素（TT-）特異的Cd4+ T細胞株（NG2）を作製した。NG2細胞は、ビオチン結合TTが記載のADSを用いて抗原プロセッシングオルガネラに向けられるAPCと共に培養すると、正常なAPCおよびTTと共に培養した場合（平均cpm = 8427）と類似の高レベルの^[3H]-チミジン取り込みを示した（培養3日後で平均cpm = 7750）。TTを有しないAPCを用いて得られたバックグラウンドの値は、2528 cpmであった。ADSを行った後、Priess細胞のアリコート₃₇を0、1、3、または6時間インキュベートして、その後、ウサギ抗TT（「抗-TT」）抗血清およびFITCヤギ抗ウサギIg（「FARIG」）によって連続的に処理して、フローサイトメトリー分析（図1）を行うことによってその表面上のTTの有無を調べた。FARIGによって処置したが抗TTによって処置していない（-）バックグラウンド試料と比較すると、TTの表面発現は0時間で高く（）、1時間（）および3時間（）までに消失し、6時間（）までに完全に消失した。この実験は、ADSによって輸送された蛋白質が迅速に内在化されて、HLAクラスII抗原プロセッシング経路に向けられること、そして関連するペプチドエピトープが反応性CD4+ Tリンパ球に提示されることを示している。

【0120】

島 (islet) 自己抗原IA-2icを、上記の抗原輸送系 (ADS) を用いて、Priess E BV形質転換Bリンパ球の表面にターゲティングした。第一段階において、Priess EBV形質転換B細胞 $5 \sim 10 \times 10^7$ 個をb-PWMと共にインキュベートした。非結合のb-PWMを洗浄して除去した後、アビジンを細胞懸濁液に加えて、b-PWMとb-IA-2icとの間に架橋を形成した。

【0121】

ビオチン結合IA-2icをパルスした後、細胞を37℃で1～6時間インキュベートして、内在化、プロセッシング、および提示を行った。細胞の対照集団には、b-PWMおよびアビジンのみをパルスした。HLA-DR4 (0401) 分子は、各細胞ペレットから精製して、結合したペプチドを溶出して、RP-HPLCによって分離し、分画100個それぞれをMALDI-TOFによって分析した。RP-HPLC分析は非常に再現性が高く、IA-2icパルスおよび対照HLA-DR調製物からのクロマトグラフィー軌跡は、96～99%の類似性指標を示した。サブトラクティブアプローチを用いて、IA-2ic由来ペプチドを同定した。ビオチン結合IA-2icパルスおよび対照調製物からの同等のRP-HPLC分画のマスマスペクトルを重ねて、双方に共通する質量を今後の分析から除外した。そのようなプロファイルの例を図2に示す。IA-2icをパルスしたPriess細胞から単離したHLA-DR4 (0401) ペプチド範囲のマスマスペクトルを、対照Priess細胞から単離したペプチド範囲のスペクトルと比較して、IA-2icに由来するペプチドに対応する新規m/z (質量対荷電比) 値を同定した。図2において、m/z値約1747と1822を有するピークは、IA-2icパルスおよび対照Priess細胞の双方からのペプチド混合物から得たスペクトルに認められるが、1779.75および1935.8のm/z値を有するピークはIA-2icパルスPriess細胞からのペプチド混合物について得られたスペクトルに限って認められた。

【0122】

実験は、1試料あたり3個ずつ行った。認められた約3000 m/zのうち、新規質量85個がIA-2icから可能性がある天然に処理されたペプチドとして当初同定された。より高い解像度およびよりストリンジェントな質量の精度を用いるその後の質量分析によって、IA-2icに由来する候補合成ペプチドに対応する質量を有する

24 m/z値が明らかになった。これらの合成ペプチドに質量分析を行った。質量の同定は非常に再現性が高く、同じ質量24個が、3つの異なるB細胞調製物および3つの異なるRP-HPLC分離において同定された。同じ質量は、B細胞を、抗原を1時間および6時間内在化、処理および提示させた場合に認められたが、DR4分子のよりよいペプチドローディングは1時間で認められた。質量の配列を表1に示す。各配列は、ペプチドのネステッドのセット6個の中の1個のメンバーであった。ネステッドのセットは、同じコア領域周辺に基づくペプチドの群であるが、NおよびC末端で多様に切断または伸長されている。コア領域6個全てがHLA-DR4 (0401) 結合にとって好ましいことが知られているアミノ酸を含んだ。配列番号：10、配列番号：13、および配列番号：25を有するペプチドの配列は、関連するMALDI-TOF分離材料の試料に適用した上記のCAD方法論を用いて確認した。これまでに記載されたコア領域のそれぞれからのいくつかのペプチドに対応する部分的配列も得られている。

【0123】

【表1】 HLA-DR4 (0401) から溶出したIA-2由来ペプチドについて実験的に認められ計算された質量

1次T細胞アッセイ法において
用いられた合成ペプチド

対応するIA-2c配列

残基

計算値
m/z

実測値
m/z

1469.31	1468.65	657-671	VSSQFSDAAQAQSPSS (配列番号 :1)	654-674	VSSQFSDAAQAQSPSS (配列番号 :18)
1469.31	1468.65	656-670	SVSSQFSDAAQAQSP (配列番号 :2)		
1469.31	1468.65	655-669	SSVSSQFSDAAQAQSP (配列番号 :3)		
1866.76	1866.80	656-674	SVSSQFSDAAQAQSPSSHSS (配列番号 :4)		
2397.16	2397.08	652-675	SRVSSVSSQFSDAAQAQSPSSHSSST (配列番号 :5)		
2441.48	2441.02	656-679	SVSSQFSDAAQAQSPSSHSSSTP (配列番号 :6)		
2485.29	2483.03	657-680	VSSQFSDAAQAQSPSSHSSSTP (配列番号 :7)		
1367.44	1367.57	718-730	AYQAEPNTCATAQ (配列番号 :17)	709-732	LAKWQALCAYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :22)
1640.86	1640.68	716-731	LCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :18)		
1935.92	1935.91	709-725	LAKWQALCAYQAEPNT (配列番号 :19)		
1965.83	1965.88	718-736	AYQAEPNTCATAQGE (配列番号 :20)		
1968.75	1968.84	713-730	WQALCAYQAEPNTCATAQ (配列番号 :21)		
1489.64	1489.75	802-815	GCTIVVNLTPLVED (配列番号 :23)	797-817	MVWESGCTIVVNLTPLVEDGV (配列番号 :32)
1489.64	1489.75	803-816	CTVIVVNLTPLVEDS (配列番号 :24)		
1762.88	1762.85	800-816	ESGCTIVVNLTPLVEDG (配列番号 :25)		
1779.85	1780.19	797-812	MVWESGCTIVVNLTP (配列番号 :26)		
1861.16	1860.97	801-818	SGCTIVVNLTPLVEDGVK (配列番号 :27)		
1861.16	1860.97	800-817	ESGCTIVVNLTPLVEDGV (配列番号 :28)		
1883.44	1882.88	795-810	MQWVWESGCTIVVNL (配列番号 :29)		
2144.95	2144.97	793-810	DFWQWVWESGCTIVVNL (配列番号 :30)		
2341.17	2339.15	794-813	FWQWVWESGCTIVVNLPLV (配列番号 :31)		

発現し、2人は、0403対立遺伝子および0405対立遺伝子の双方を発現した。0401、0403、および0405遺伝子は、類似のDR鎖をコードし、57位(0405ではSがD)、71位(0403および0405ではRがK)、74位(0403ではEがA)、および86位(0403ではVがG)のみが異なる[マーシュ(Marsh, S.G.), Tissue Antigens 51:467~507, (1998)]。これらのHLA-DR4タイプのペプチド結合モチーフは既知で類似であり、全てが、IA-2icコアペプチド領域6個に結合すると予想される。ペプチドのいずれかに暴露した場合に、非DR4 IDDM患者8人中1人のみからのT細胞が増殖したが、対照被験者からのT細胞(全て0401)はいずれもいかなるペプチドにも反応しなかった。コア領域6個中6個全てからのペプチドがT細胞反応を誘発したが、最も反応する患者からのT細胞は、単一のペプチドに対して増殖した。

【0125】

全体として、これらのデータは、IA-2icの天然のプロセッシングによって産生されたペプチドの分析にIMF方法を適用した結果、特にHLA DR4発現IDDM患者からのCD4+ Tリンパ球によって認識され、このように、IDDM疾患プロセスに関与している可能性があるペプチドの特徴付けが得られた。この知見は、IDDMの病因に関する知識の重要な進歩を表し、IDDMの治療および/または予防物質、例えばAPLの開発の基礎を提供する。類似の方法論は、感受性が特定のクラスII MHC分子の発現に連鎖している他の疾患(上記参照)のCD4+ Tリンパ球媒介性発病に係するペプチドを同定する場合にも同様に成功しうると予想される。

【0126】

【表2】 溶出したIA-2ペプチドに対するIDDM患者および対照被験者からのT細胞反応

症例	年齢 (歳)	期間 (週)	DRBI 遺伝子型	IA-2 自己抗体	IA-2ペプチドに対するT細胞反応				
					654-674	709-732	955-975	797-817	854-872
HLA-DR4 IDDM患者									
S(G)	17	8	0401, 0101	+				POS	
G(G)	26	12	0401, 1302	+	POS				
K(G)	28	28	0401, 1101	+	POS				
ML	29	3	0401, 0403	-					POS
EW(B)	29	16	0401/0401	+				POS	
RW(B)	20	4	0401/0401	+	POS				
TH(B)	19	4	0401/0301	-			POS		
DC(I)	6	4	0403, 0403	+		POS	POS		
GR	13	<1	0403, 0403	+	POS			POS	POS
NC(B)	36	16	0401/0404	+					
HW	15	12	0401/0401						
LG(G)	16	4	0401, 0301	+					
RM	24	1	0401, 1302						
IDDM患者 (非DR4)									
JD	28	4	0102, 0301	-	POS			POS	POS
FQ	20	25	0301	-					
MI	16	12	1201, 1301	+					
ML(I)	10	12	0101, 1101	-					
ST(I)	13	2	0301, 1301	+					
OA	23	1	1101, 1301	-					
RM	24	25	0301, 0301	-					
JH(B)	33	20	0301/08	-					
HLA-DR4 対照									
TL(G)	36	-	0401, 0101	-					
JB	17	-	0401/0101	-					
B(G)	30	-	0401, 1302	-					
MR	24	-	0401, 1301	-					
PH	40	-	0401, 14	-					
VB	16	-	0401, 0403	-					
AZ	24	-	0401, 02	-					
CF(G)	30	-	0401, 0701	-					

【0127】

実施例2. 単離HLA-DR4分子に対するコンセンサスペプチドの結合

実施例1において記述されたIMFによって定義されたコア領域6個のコンセンサスペプチド6個の提示能を調べるために、結合阻害アッセイ法を実施した(図3)。R1は、IA-2の残基797~817位からなるペプチドであった; R2は、IA-2の残基854~872位からなるペプチドであった; R3はIA-2の残基753~771位からなるペプチドであった; R4は、IA-2の654~674位からなるペプチドであった; R5は、IA-2の残基709~732位からなるペプチドであった; R6は、IA-2の残基995~975位からなるペプチドであった; およびIi-cは、指示ペプチド(すなわち、クラスII MHC定常鎖の残基98~117位からなるペプチド)と同じであった。図3に示すデータは、R4とR5がHLA-DR4分子に強く結合すること; Ii-c、R1、およびR6は、中間の結合能で結合すること; ならびにR2とR3は弱く結合することを示している。これらの知見は、実施例1に記載のIMFおよびEV技法から予測されるように、コン

センサスペプチド6個(R1、R2、R3, およびR4~R6)全てがDR4分子に結合することを確認する。このように、このタイプの結合アッセイ法、または当技術分野で既知の他のアッセイ法(例えば、結合阻害アッセイ法よりむしろ直接結合)を、実施例1に記載の方法に対するさらなるまたは代替りのEV技法として用いることができる。

【0128】

本発明は、現在好ましい態様に関して記述してきたが、様々な改変を行うことができ、それらも本発明の精神に含まれると理解すべきである。従って、本発明は特許請求の範囲によってのみ制限される。

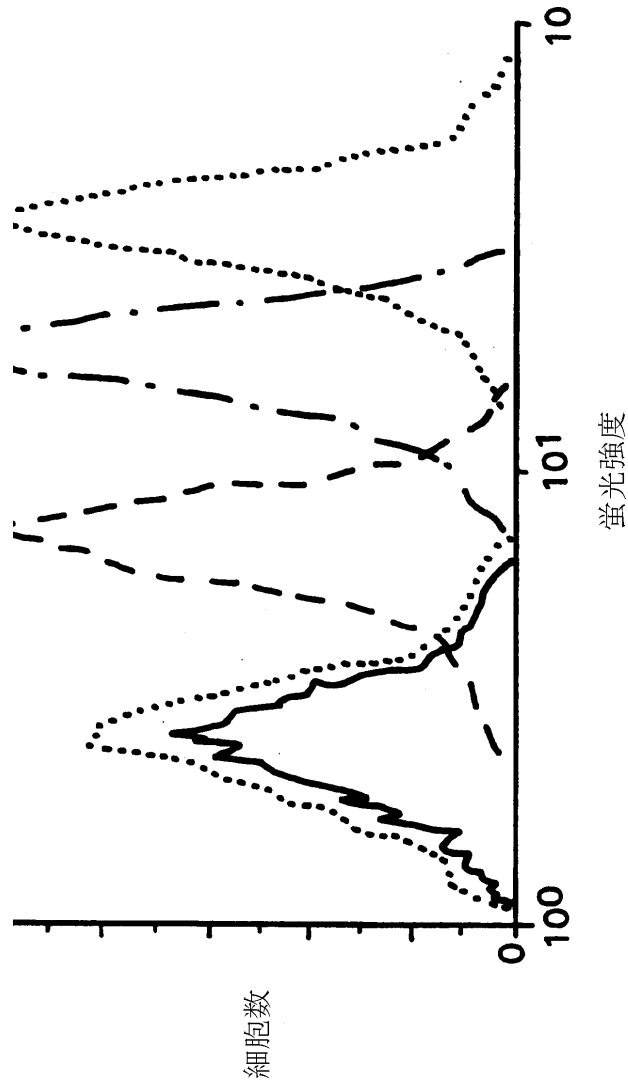
【図面の簡単な説明】

【図1】 ポリペプチド抗原として破傷風毒素を用いて抗原輸送系(ADS)に供した後様々な時間での、破傷風毒素特異的ウサギ抗体およびウサギ免疫グロブリンに対して特異的なFITC結合ヤギ抗体によって染色したPriess細胞の蛍光活性化フローサイトメトリープロフィールを示すヒストグラムである。

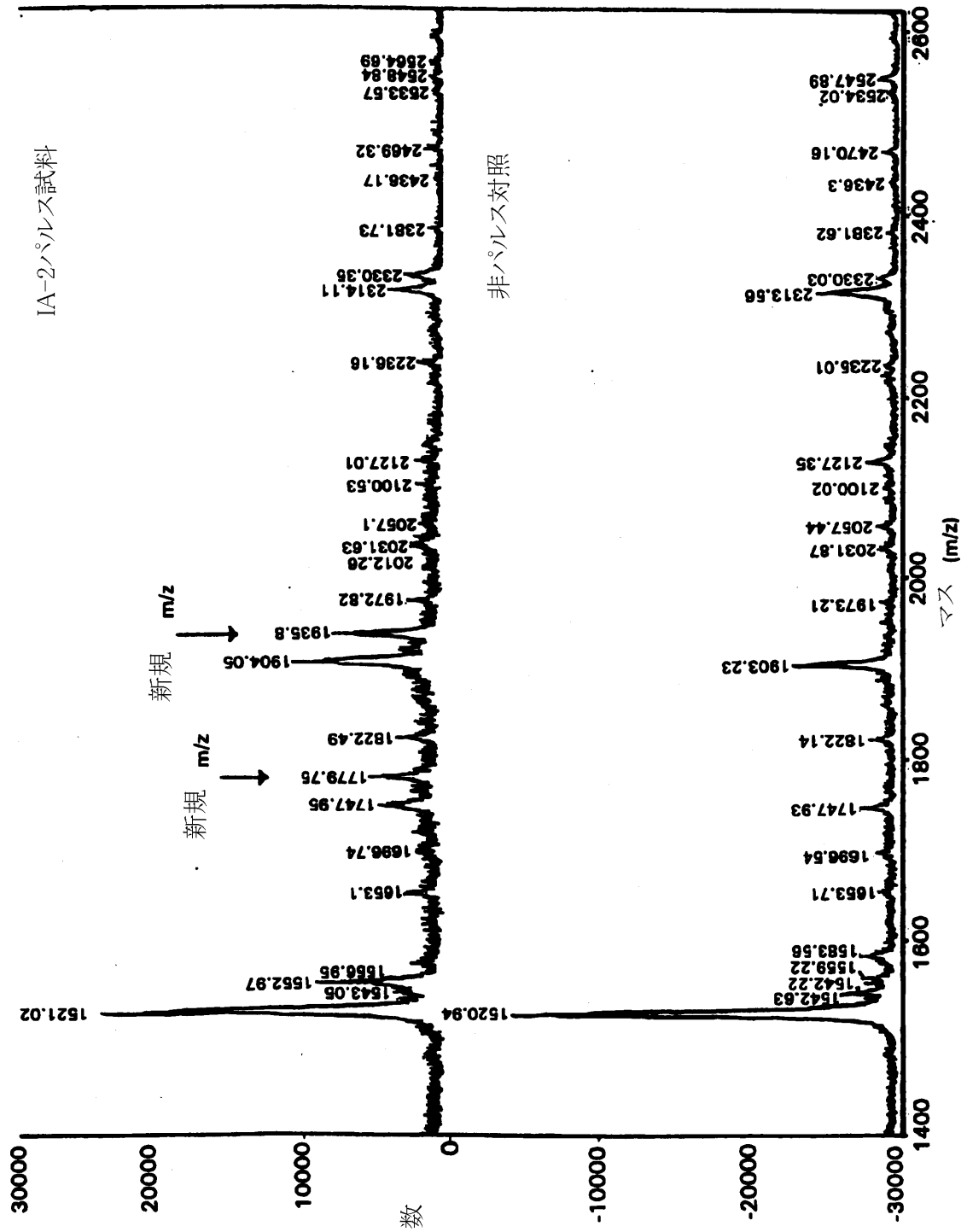
【図2】 Priess細胞の個々のアリコート、を、ビオチン結合IA-2icへの暴露を含む免疫マスフィンガープリンティング(IMF)技法の全ての段階、またはビオチン結合IA-2icへの暴露を除くIMF技法の全ての段階によって処理した、IMF技法によって得られたペプチドの2つの混合物に由来する2つの適切に配置したMALDI-TOFスペクトルを示す図である。

【図3】 ペプチド6個(IMFによって同定されたIA-2のコア領域6個に基づくアミノ酸配列を有する)の、単離HLA DR4分子に対する定常鎖(Ii)ペプチドの結合の相対的阻害能を示す一連の折れ線グラフである。

【图1】



【図2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/10888
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
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) IPC 7 G01N C07K		
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, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EMBASE, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HONEYMAN, M.C. ET AL.: "T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents." MOL. MED., vol. 4, no. 4, 1998, pages 231-239, XP000938317 figure 1	24-39
P,X	WO 99 55849 A (COULSON BARBARA SUE ;HONEYMAN MARGO CAROLE (AU); INST MEDICAL W &) 4 November 1999 (1999-11-04) the whole document figure 1 claims	28-33
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 September 2000		Date of mailing of the international search report 09/10/2000
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) 340-8016		Authorized officer Hoekstra, S

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/10888

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>STEVENS, E.J. AND PEAKMAN, M.: "Enhanced T cell proliferation and increased responder frequency following delivery of antigen to the antigen-presenting cell; B cell dependency and use in detection of autoreactive cells"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 215, 1998, pages 59-70, XP002147848 abstract; figure 1</p> <p>---</p>	1-43, 45-53
Y	<p>US 5 827 516 A (VIGNALI DARIO A A ET AL) 27 October 1998 (1998-10-27) the whole document column 2, line 22 - line 28</p> <p>---</p>	1-43, 45-53
X	<p>LOHMANN, T. ET AL.: "T-cell reactivity to DR*0401- and DQ*0302-binding peptides of the putative autoantigen IA-2 in type 1 diabetes."</p> <p>EXP. CLIN. ENDOCRINOL. DIABETES, vol. 107, no. 3, 1999, pages 166-171, XP000938310</p> <p>peptide: kewqalcAYQYEPNT (711-725)</p> <p>peptide: kdqFEFALTAVAE (955-967)</p> <p>table 2</p> <p>---</p>	28-31
T	<p>PEAKMAN, MARK ET AL: "Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 eluted from HLA-DR4"</p> <p>J. CLIN. INVEST. (1999), 104(10), 1449-1457,</p> <p>XP002147849</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-54
A	<p>NIJMAN H W ET AL: "CHARACTERIZATION OF CYTOTOXIC T LYMPHOCYTE EPITOPES OF A SELF-PROTEIN, P53, AND A NON-SELF-PROTEIN, INFLUENZA MATRIX: RELATIONSHIP BETWEEN MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX PEPTIDE BINDING AFFINITY AND IMMUNE RESPONSIVENESS TO PEPTIDES"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, US, RAVEN PRESS, NEW YORK,</p> <p>vol. 14, no. 2, 1993, pages 121-126, XP002015226</p> <p>ISSN: 1053-8550</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/10888

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HONEYMAN, M.C. ET AL.: "Strategies for identifying and predicting islet autoantigen T-cell epitopes in insulin-dependent diabetes mellitus" ANN MED, vol. 29, no. 5, 1997, pages 401-404, XP000938321 the whole document -----	1-54

1

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 44 and 53 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the peptides.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 44,53

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/10888

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9955849 A	04-11-1999	AU 3399999 A	16-11-1999
US 5827516 A	27-10-1998	CA 2142007 A	03-03-1994
		EP 0671926 A	20-09-1995
		US 5880103 A	09-03-1999
		JP 8504177 T	07-05-1996
		WO 9404171 A	03-03-1994

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 K	38/00	A 6 1 K	48/00	4 H 0 4 5
	48/00	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	1/16		3/10	
	3/10		5/14	
	5/14		13/00	
	13/00		17/00	
	17/00		21/04	
	21/04		25/00	
	25/00		27/02	
	27/02		29/00	1 0 1
	29/00		31/04	
	31/04		31/08	
	31/08		31/12	
	31/12		33/00	
	33/00		35/00	
	35/00		43/00	1 1 1
	43/00	C 0 7 K	7/06	
C 0 7 K	7/06		7/08	
	7/08	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 N	15/09	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	K
G 0 1 N	33/15			Z
	33/50		33/566	
	33/566		33/68	Z N A
	33/68	C 1 2 N	15/00	A
	Z N A	A 6 1 K	37/02	

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

(72)発明者 チツ ローマン エム.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベルモント コテージ ストリート 4

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA34 AA40 CA18 DA36
DA77 DA78 FB02 FB03
4B024 AA11 BA31 CA04 DA02 EA02
GA11 HA01 HA15 HA17
4B063 QA01 QA18 QQ79 QR59 QR69
QR77 QR80 QS24 QS32
4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA17
BA03 BA17 BA18 BA19 BA35
BA44 BA46 CA01 CA04 CA05
CA13 CA17 CA49 CA53 CA59
MA17 MA22 MA23 MA24 MA38
MA52 MA66 NA14 ZA022
ZA752 ZA812 ZA892 ZB152
ZB262 ZB332 ZB352 ZB372
ZC062 ZC352 ZC412
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01
MA04 MA17 MA22 MA23 MA24
MA38 MA52 MA66 NA14 ZA02
ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZB15
ZB26 ZB33 ZB35 ZB37 ZC06
ZC35 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA30 BA14 BA15
BA16 BA17 CA40 DA37 DA86
EA22 EA27 EA29 EA50 EA51
EA52 FA20 FA74

专利名称(译)	由促进CD4 + T淋巴细胞的疾病识别的肽表位		
公开(公告)号	JP2002542488A	公开(公告)日	2002-12-10
申请号	JP2000612756	申请日	2000-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	Zaikosuinku 伦敦国王学院		
申请(专利权)人(译)	Zaikosu油墨. 伦敦大学国王学院		
[标]发明人	ピークマンマーク チツローマンエム		
发明人	ピークマン マーク チツ ローマン エム.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P13/00 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K7/06 C07K7/08 C12N9/16 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P13/00 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/4713 C12N9/16 G01N33/68 G01N33/6878		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.D G01N33/53.P G01N33/53.U A61K31/7088 A61K48/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P13/00 A61P17/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P43/00.111 C07K7/06 C07K7/08 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.K G01N33/50.Z G01N33/566 G01N33/68.ZNA C12N15/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA34 2G045/AA40 2G045/CA18 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QR59 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B063/QS32 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA03 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/BA46 4C084/CA01 4C084/CA04 4C084/CA05 4C084/CA13 4C084/CA17 4C084/CA49 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA38 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB372 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA24 4C086/MA38 4C086/MA52 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZB35 4C086/ZB37 4C086/ZC06 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA37 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA27 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/EA52 4H045/FA20 4H045/FA74		
优先权	09/295868 1999-04-21 US 60/130355 1999-04-21 US		
其他公开文献	JP2002542488A5		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明提供了鉴定激活与疾病如自身免疫疾病有关的疾病发病机理的 CD4 + T细胞的肽表位的方法，所述疾病的易感性由某些II类MHC基因的表达决定。本发明包括通过此类方法衍生自IA-2多肽的肽，修饰的肽配体和涉及使用修饰的肽配体的治疗方法。

