

(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2006-525813

(P2006-525813A)

(43) 公表日 平成18年11月16日(2006.11.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
CO7K 14/47 (2006.01)	CO7K 14/47	4B050
C12N 9/00 (2006.01)	C12N 9/00	4B063
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4C084
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-514899 (P2006-514899)
 (86) (22) 出願日 平成16年5月20日 (2004.5.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年1月20日 (2006.1.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/015752
 (87) 国際公開番号 W02005/033267
 (87) 国際公開日 平成17年4月14日 (2005.4.14)
 (31) 優先権主張番号 60/471,868
 (32) 優先日 平成15年5月20日 (2003.5.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591054174
 イェシバ・ユニバーシティ
 YESHIVA UNIVERSITY
 アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、モリス・パーク・アベニュー 1300

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1型糖尿病において罹患性病源性T細胞により標的とされる抗原ならびにこれの使用

(57) 【要約】

本発明は、1型糖尿病に対して応答性であるCD8⁺T細胞の優性リガンドの同定に基づいている。そのリガンドは、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク (IGRP) である。IGRPから、幾つかのCD8⁺T細胞結合ペプチドが同定され、これは、IGRPの配列の206~214番アミノ酸を含むペプチドを包含し、自己免疫糖尿病での病原性CD8⁺T細胞の最も罹患性のT細胞受容体に対する高い抗体結合力を持っている。本発明はこれにより、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDL L、KWCANPDWI、およびSFCKSASIPを含むオリゴペプチド組成物およびポリペプチド組成物を提供する。また、8~10アミノ酸長の、哺乳類IGRPと完全に相同なオリゴペプチド組成物も提供され、ここで該オリゴペプチドは、ヒトMHCクラスI分子に結合できる。加えて、上記した組成物を使用して哺乳類を処理する種々の方法が提供され、ここで該哺乳類は、1型糖尿病の危険性に晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている。また、膵島細胞に対して細胞毒性であるCD8⁺T細胞が、哺乳類の細胞を破壊するのを防ぐ方法も提供され、ここで本方法も、上記した組成物を使用する。更に、哺乳類が1型糖尿病の危険性に晒されているかもしくは1型糖尿病を持っているかを決定する方法が提供され、ここで本方法は、上記した組成物を使用する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Y L K T N (A / I / L / V) F L、F L W S V F W L I、(T / A) Y Y (G / T) F L N F M、L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L、K W C A N P D W I、および S F C K S A S I P からなる群から選択される配列を含む、355 アミノ酸未満の単離精製オリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90% の相同性を持つ哺乳類 I G R P に完全に相同な、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 3】

100 以下のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 4】

25 以下のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 5】

13 ~ 25 アミノ酸を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 6】

8 ~ 10 アミノ酸を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 7】

V Y L K T N V F L を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 8】

T Y L K T N L F L を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 9】

F L W S V F W L I を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 10】

T Y Y G F L N F M を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 11】

A Y Y T F L N F M を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 12】

L R L F G I D L L を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 13】

L R V L N I D L L を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 14】

S F C K S A S I P を含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 15】

抗原性担体を更に含む、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。

【請求項 16】

検出可能な標識を更に含む、請求項 6 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 17】

検出可能な前記標識が蛍光分子である、請求項 16 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 18】

検出可能な前記標識が放射性分子である、請求項 16 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 19】

検出可能な前記標識が酵素である、請求項 16 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 20】

前記オリゴペプチドに結合可能である M H C クラス I 分子を更に含む、請求項 16 に記載のオリゴペプチド。

【請求項 21】

前記オリゴペプチドに結合可能である M H C クラス I 分子を更に含む、請求項 6 に記載のオリゴペプチド。

10

20

30

40

50

- 【請求項 2 2】
前記 MHC クラス I 分子がマウス H - 2 K^d である、請求項 2 1 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 2 3】
細胞毒性分子を更に含む、請求項 2 1 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 2 4】
前記細胞毒性分子が放射性である、請求項 2 3 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 2 5】
前記オリゴペプチドに結合可能である MHC クラス II 分子を更に含む、請求項 5 に記載のオリゴペプチド。 10
- 【請求項 2 6】
細胞毒性分子を更に含む、請求項 2 5 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 2 7】
無菌医薬調製物中の、請求項 1 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。
- 【請求項 2 8】
Y L K T N V F L、T Y L K T N L F L、T Y Y G F L N F M、A Y Y T F L N F M、L R L F G I D L L、L R V L N I D L L、S F C K S A S I P、および K W C A N P D W I からなる群から選択される配列を含む、請求項 2 7 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。
- 【請求項 2 9】 20
前記オリゴペプチドもしくはポリペプチドが、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90% の相同性を持つ哺乳類 I G R P ポリペプチドである、請求項 2 8 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。
- 【請求項 3 0】
前記哺乳類 I G R P が、マウス I G R P もしくはヒト I G R P である、請求項 2 9 に記載のポリペプチド。
- 【請求項 3 1】
哺乳類を免疫寛容し、I G R P に対して反応性の C D 8⁺ T 細胞を抑制できる、請求項 2 8 に記載のオリゴペプチドもしくはポリペプチド。
- 【請求項 3 2】 30
配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90% の相同性を持つ哺乳類 I G R P に完全に相同な、8 ~ 10 アミノ酸長の単離精製オリゴペプチドであって、該哺乳類の MHC クラス I 分子に結合できるオリゴペプチド。
- 【請求項 3 3】
Y L K T N (A / I / L / V) F L、F L W S V F W L I、(T / A) Y Y (G / T) F L N F M、L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L、K W C A N P D W I、および S F C K S A S I P からなる群から選択される配列を含む、請求項 3 2 に記載の単離精製オリゴペプチド。
- 【請求項 3 4】 40
検出可能な標識を更に含む、請求項 2 5 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 3 5】
検出可能な前記標識が蛍光分子である、請求項 3 4 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 3 6】
検出可能な前記標識が放射性分子である、請求項 3 4 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 3 7】
検出可能な前記標識が酵素である、請求項 3 4 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 3 8】
前記オリゴペプチドに結合可能である MHC クラス I 分子を更に含む、請求項 3 4 に記載のオリゴペプチド。
- 【請求項 3 9】 50

前記オリゴペプチドに結合可能であるMHCクラスI分子を更に含む、請求項32に記載のオリゴペプチド。

【請求項40】

細胞毒性分子を更に含む、請求項39に記載のオリゴペプチド。

【請求項41】

前記細胞毒性分子が放射性である、請求項40に記載のオリゴペプチド。

【請求項42】

哺乳類IGRPをコード化するmRNAの少なくとも1部分に相補的なアンチセンス分子であって、ここで該哺乳類IGRPが配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%相同である、該哺乳類IGRPの翻訳を阻害できるアンチセンス分子。

10

【請求項43】

哺乳類IGRPをコード化するmRNAの1部分に特異的なリボザイムであって、ここで該哺乳類IGRPが配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%相同である、該哺乳類IGRPの翻訳を阻害するリボザイム。

【請求項44】

哺乳類IGRPをコード化するmRNAの1部分に相同なRNAi分子であって、ここで該哺乳類IGRPが配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%相同である、該哺乳類IGRPの翻訳を阻害できるRNAi分子。

【請求項45】

1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する方法であって、IGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞を抑制するのに充分、該哺乳類へとオリゴペプチドを投与することを含み、ここで該オリゴペプチドが8~10アミノ酸長であり、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、SFCKSASIP、およびYNIANWFLからなる群から選択される配列を含む方法。

20

【請求項46】

前記オリゴペプチドが細胞毒性分子を更に含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記哺乳類を、8~10アミノ酸長の第2オリゴペプチドを用いて処理することを更に含み、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、SFCKSASIP、およびYNIANWFLからなる群から選択される配列を含む、請求項45に記載の方法。

30

【請求項48】

1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する方法であって、IGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞を抑制するのに充分、該哺乳類へと請求項32に記載のオリゴペプチドを投与することを含む方法。

【請求項49】

前記オリゴペプチドが細胞毒性分子を更に含む、請求項48に記載の方法。

40

【請求項50】

前記哺乳類へと、請求項32に記載の第2オリゴペプチドを投与することを更に含む、請求項48に記載の方法。

【請求項51】

1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する方法であって、該哺乳類へと8~10アミノ酸長のオリゴペプチドを投与することを含み、該オリゴペプチドが、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞に対して、中もしくは低親和性リガンドである、方法。

【請求項52】

前記オリゴペプチドが、KYNIANWFLもしくはKYNKANAFIである、請求

50

項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

膵島 細胞に対して細胞毒性である $CD8^+$ T細胞が 細胞を破壊するのを防ぐ方法であって、該 細胞を、請求項 3 2 に記載のオリゴペプチドに特異的に結合できる化合物を用いて処理することを含む方法。

【請求項 5 4】

オリゴペプチドに結合する前記化合物が、抗体もしくはアプタマーである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記オリゴペプチドが、 $Y L K T N (A / I / L / V) F L$ 、 $Y N I A N W F L$ 、 $F L W S V F W L I$ 、 $(T / A) Y Y (G / T) F L N F M$ 、 $L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L$ 、 $K W C A N P D W I$ 、および $S F C K S A S I P$ からなる群から選択される配列を含む、請求項 5 3 に記載の方法。 10

【請求項 5 6】

前記膵島 細胞が、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類の膵臓の1部である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記哺乳類がマウスである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記哺乳類がヒトである、請求項 5 6 に記載の方法。 20

【請求項 5 9】

前記 細胞を、前記オリゴペプチドに結合できる MHC クラス I 分子を用いて処理することを更に含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記オリゴペプチドが、細胞毒性分子を更に含む、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記膵島 細胞が、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類の膵臓の1部である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記哺乳類がマウスである、請求項 6 1 に記載の方法。 30

【請求項 6 3】

前記哺乳類がヒトである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

膵島 細胞に対して細胞毒性である $CD8^+$ T細胞が哺乳類 細胞を破壊するのを防ぐ方法であって、 $I G R P$ に対して反応性の $CD8^+$ T細胞を抑制するのに充分、該 $CD8^+$ T細胞を、8 ~ 10 アミノ酸長のオリゴペプチドを用いて処理することを含み、該オリゴペプチドが、 $Y L K T N (A / I / L / V) F L$ 、 $F L W S V F W L I$ 、 $(T / A) Y Y (G / T) F L N F M$ 、 $L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L$ 、 $K W C A N P D W I$ 、 $S F C K S A S I P$ 、および $Y N I A N W F L$ からなる群から選択される配列を含む方法。 40

【請求項 6 5】

前記オリゴペプチドが、細胞毒性分子を更に含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 $CD8^+$ T細胞を、請求項 3 9 に記載の第 2 オリゴペプチドを用いて処理することを更に含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記膵島 細胞が、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類の膵臓の1部である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 8】

1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理す 50

る方法であって、該哺乳類へと、請求項 4 2 に記載のアンチセンス分子を投与することを含み、この核酸が、該哺乳類における I G R P 発現を減少させるのに充分投与される方法。

【請求項 6 9】

1 型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは 1 型糖尿病を持っている哺乳類を処理する方法であって、該哺乳類へと、請求項 4 3 に記載のリボザイムを投与することを含み、この核酸が、該哺乳類における I G R P 発現を減少させるのに充分投与される方法。

【請求項 7 0】

1 型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは 1 型糖尿病を持っている哺乳類を処理する方法であって、該哺乳類へと、請求項 4 4 に記載の R N A i 分子を投与することを含み、この核酸が、該哺乳類における I G R P 発現を減少させるのに充分投与される方法。

10

【請求項 7 1】

1 型糖尿病を持っている哺乳類を処理する方法であって、該哺乳類の膵臓中へと膵島細胞を移植することを含み、該細胞が、該哺乳類 I G R P の翻訳を特異的に阻害できるアンチセンス分子、リボザイム、もしくは R N A i 分子を発現させるベクターを用いてトランスフェクションされる方法。

【請求項 7 2】

哺乳類が 1 型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは 1 型糖尿病を持っているかを決定する方法であって：

a . 該哺乳類から、C D 8 ⁺ T 細胞を含むリンパ球サンプルを得ること；

20

b . 該リンパ球を、オリゴペプチドおよび該オリゴペプチドに結合できる M H C クラス I 分子と組み合わせること（該オリゴペプチドもしくは該 M H C 分子は検出可能な標識を更を含み、該オリゴペプチドは 8 ~ 1 0 アミノ酸長であり、Y L K T N (A / I / L / V) F L 、 F L W S V F W L I 、 (T / A) Y Y (G / T) F L N F M 、 L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L 、 K W C A N P D W I 、 S F C K S A S I P 、 および Y N I A N W F L からなる群から選択される配列を含む）；ならびに

c . いずれかの C D 8 ⁺ T 細胞が特異的に、該オリゴペプチドに結合するかを決定すること（該オリゴペプチドに結合する C D 8 ⁺ T 細胞は、該哺乳類が 1 型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは 1 型糖尿病を持っていることを指し示す）

により、該哺乳類における I G R P に対して反応性の C D 8 ⁺ T 細胞の存在を決定することを含む方法。

30

【請求項 7 3】

前記決定するステップが、細胞選別機もしくは標識細胞カウンターを用いて、標識 C D 8 ⁺ T 細胞を数えることにより実施される、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記決定するステップが、前記標識が観察され得る条件下、前記リンパ球の顕微鏡観察により実施される、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記決定するステップが、前記 C D 8 ⁺ T 細胞の活性化を測定することにより実施される、請求項 7 2 に記載の方法。

40

【請求項 7 6】

前記 C D 8 ⁺ T 細胞の活性化が、インターフェロン 産生を測定することにより測定される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

インターフェロン 産生が、E L I S p o t アッセイを使用して測定される、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

哺乳類が 1 型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは 1 型糖尿病を持っているかを決定する方法であって：

a . 該哺乳類から、C D 8 ⁺ T 細胞を含むリンパ球サンプルを得ること；

50

b. 該リンパ球を、オリゴペプチドおよび該オリゴペプチドに結合できるMHCクラスII分子と組み合わせること(該オリゴペプチドもしくは該MHC分子は検出可能な標識を更に含み、該オリゴペプチドは8~10アミノ酸であり、哺乳類IGRPと完全に相同である);ならびに

c. いずれかのCD8⁺T細胞が特異的に、該オリゴペプチドに結合するかを決定すること(該オリゴペプチドに結合するCD8⁺T細胞は、該哺乳類が1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っていることを指し示す)により、該哺乳類におけるIGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞の存在を決定することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2003年5月20日出願の米国仮出願第60/471,868号の利益を請求する。

【0002】

連邦協賛研究開発についての陳述

米国政府は本発明において、支払い済みのライセンスを持っており、限られた条件下、NIHにより承認された第P01DK52956号の支払いにより準備されるような合理的な状況において、本特許権者が他者にライセンスを付与することを要求する権利を持つ

20

【0003】

(1)本発明分野

本発明は一般的に、1型糖尿病の診断および治療に関する。より具体的には、本発明は、病原性T細胞により標的とされる膵島細胞抗原の同定に基づき、1型糖尿病の診断、予防、および治療方法を与える。

【背景技術】

【0004】

(2)関連技術の記載

参考文献

30

Aichele, P., D. Kyburz, P. Ohashi, B. Odermatt, R. Zinkernagel, H. Hengartner, and H. Pircher. 1994. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 444-448.

Alexander-Miller, M., G. Leggatt, and J. Berzofsky. 1996. Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T-lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4102-4107.

J. D. Altman et al., *Science* 274, 94 (1996).

A. Amrani et al., *Nature* 406, 739 (2000).

A. Amrani et al., *J. Immunol.* 167, 655 (2001).

B. Anderson, B. J. Park, J. Verdager, A. Amrani, P. Santamaria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9311 (1999).

40

Anderton, S., and D. Wraith. 1998. Hierarchy in the ability of T cell epitopes to induce peripheral tolerance to antigens from myelin. *Eur. J. Immunol.* 28: 1251-1261.

Arden, S., T. Zhan, S. Steegers, S. Webb, B. Bergman, R. O'Brien, and J. Hutton. 1999. Molecular cloning of a pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Diabetes.* 48: 531-540.

Arif, S., T. I. Tree, T. P. Astill, J. M. Tremble, A. J. Bishop, C. M. Dayan, B. O. Roep, and M. Peakman. 2004. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J Clin Inv*

50

est. 113: 451-463.

S. Baekkeskov et al., *Nature* 347,151 (1990).

Bielekova, B., B. Goodwin, N. Richert, I. Cortese, T. Kondo, G. Afshar, B. Gran, J. Eaton, J. Antel, J. Frank, H. McFarland, and R. Martin. 2000. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat. Med.* 6: 1167-1175.

Burke, D. H., L. Scates, K. Andrews, and L. Gold., *J. Mol. Biol.* 264, 650 (1996).

Cocca, B. A., A. M. Cline, and M. Z. Radic. 2002. Blebs and apoptotic bodies are B cell autoantigens. *J Immunol.* 169: 159-166. 10

L. Cox, E. L. Huczko, V. H. Engelhard, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, in *MHC: A Practical Approach*, N. Fernandez, G. Butcher, Eds. (Oxford Univ. Press, New York, 1997), vol.1, pp.141.

T. P. DiLorenzo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12538 (1998).

T. P. DiLorenzo et al., *Clin. Immunol.* 105, 332 (2002).

Ellington, A. D., and J. W. Szostak, *Nature* 346, 818 (1990).

Gammon et al., *Nature (London)* 319, 413 (1986).

Gross, D. A., S. Graff-Dubois, P. Opolon, S. Cornet, P. Alves, A. Bennaceur-Griscelli, O. Faure, P. Guillaume, H. Firat, S. Chouaib, F. A. Lemonnier, J. Davoust, I. Miconnet, R. H. Vonderheide and K. Kosmatopoulos. 2004. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 113: 425-433. 20

Group, D. P. T.-T. D. S. 2002. Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 346: 1685-1691.

K. Hamaguchi, H. R. Gaskins, E. H. Leiter, *Diabetes* 40, 842 (1991).

A. H. Hartemann et al., *Clin. Exper. Immunol.* 116, 225 (1999).

Hirao, I., M. Spingola, D. Peabody, and A. D. Ellington, *Mol Divers.* 4, 75 (1998).

Jaeger, J., T. Restle, and T. A. Steitz, *The EMBO Journal* 17, 4535 (1998). 30

Kappos, L., G. Comi, H. Panitch, J. Oger, J. Antel, P. Conlon, L. Steinman, and T. A. P. L. i. R. M. S. Group. 2000. Induction of a non-encephalitogenic type 2 T helper-cell autoimmune response in multiple sclerosis after administration of an altered peptide ligand in a placebo-controlled, randomized phase II trial. *Nat. Med.* 6: 1176-1182.

Karin, N., D. Mitchell, S. Brocke, N. Ling, and L. Steinman. 1994. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis by a soluble peptide variant of a myelin basic protein epitope: T cell receptor antagonism and reduction of interferon and tumor necrosis factor production. *J. Exp. Med.* 180: 2227-2237.

J. Karttunen, S. Sanderson, N. Shastri, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6020 (1992). 40

Kensch, O., B. A. Connolly, H. J. Steinhoff, A. McGregor, R. S. Goody, and T. Restle, *J Biol Chem.* 275, 18271 (2000).

R. S. Liblau, F. S. Wong, L. T. Mars, P. Santamaria, *Immunity* 17, 1 (2002).

Lieberman, S., and T. DiLorenzo. 2003. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens.* 62: 359.

Lieberman, S., A. Evans, B. Han, T. Takaki, Y. Vinnitskaya, J. Caldwell, D. Serreze, J. Shabanowitz, D. Hunt, S. Nathenson, P. Santamaria, and T. DiLorenzo. 2003. Identity of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 50

8384-8388.

Liu, G., and D. Wraith. 1995. Affinity for class II MHC determines the extent to which soluble peptides tolerize autoreactive T cells in naive and primed adult mice--implications for autoimmunity. *Int. Immunol.* 7: 1255-1263.

S. E. Martin, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, J. A. Marto, *Anal. Chem.* 72, 4266 (2000).

C. C. Martin et al., *J. Biol. Chem.* 276, 25197(2001).

McKown, K. et al., 1999. Lack of efficacy of oral bovine type II collagen added to existing therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 42: 1204-1208.

Metzler, B., and D. Wraith. 1993. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhalation but not oral administration of the encephalitogenic peptide: influence of MHC binding affinity. *Int. Immunol.* 5: 1159-1165. 10

Metzler, B., S. Anderton, S. Manickasingham, and D. Wraith. 2000. Kinetics of peptide uptake and tissue distribution following a single intranasal dose of peptide. *Immunol. Invest.* 29: 61-70.

M. Nagata, P. Santamaria, T. Kawamura, T. Utsugi, J. W. Yoon, *J. Immunol.* 152, 2042 (1994).

Nicholson, L. B., J. M. Greer, R. A. Sobel, M. B. Lees, and V. K. Kuchroo. 1995. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* 3: 397-405. 20

J. P. Palmer et al., *Science* 222, 1337 (1983).

K. C. Parker, M. A. Bednarek, J. E. Coligan, *J. Immunol.* 152, 163 (1994).

Perez-Diez, A., P. Spiess, N. Restifo, P. Matzinger, and F. Marincola. 2002. Intensity of the vaccine-elicited immune response determines tumor clearance. *J. Immunol.* 168: 338-347.

R. A. Pierce et al., *J. Immunol.* 163, 6360 (1999).

M. J. Pittet et al., *Trends. Immunol.* 23, 325 (2002).

F. Pociot, M. F. McDermott, *Genes Immun.* 3, 235 (2002).

Pozzilli, P. et al., 2000. No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes (the IMDIAB VII). *IMDIAB Group. Diabetologia.* 43: 1000-1004. 30

Princiotta, M. F., D. Finzi, S. B. Qian, J. Gibbs, S. Schuchmann, F. Buttgeriet, J. R.

Bennink, and J. W. Yewdell. 2003. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity.* 18: 343-354.

D. U. Rabin, S. M. Pleasic, R. Palmer-Crocker, J. A. Shapiro, *Diabetes* 41, 183 (1992).

H. Rammensee, J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, S. Stevanovic, *Immunogenetics* 50,213 (1999).

P. A. Reche, J. P. Glutting, E. L. Reinherz, *Hum. Immunol.* 63, 701 (2002). 40

Santamaria, P. 2001. Effector lymphocytes in autoimmunity. *Curr. Opin Immunol.* 13: 663- 669.

P. Santamaria et al., *J. Immunol.* 154, 2494 (1995).

Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, and N. Bhargava. 2000. Consequences of cell death. Exposure To necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 191: 423-434.

Schneider, D. J., J. Feigon, Z. Hostomsky, and L. Gold, *Biochemistry* 34, 9599 (1995).

D. V. Serreze, E. H. Leiter, *Curr. Dir. Autoimmun.* 4, 31(2001). 50

- D. V. Serreze et al., *Diabetes* 50, 1992 (2001).
- M. Terajima et al., *J. Exp. Med.* 197, 927 (2003).
- R. Tisch, H. McDevitt, *Cell* 85, 291 (1996).
- Toes, R., R. Offringa, R. Blom, C. Melief, and W. Kast. 1996. Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 7855-7860.
- Trentham, D. et al., 1993. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science.* 261: 1727-1730.
- J. D. Trudeau et al., *J. Clin. Invest.* 111, 217 (2003).
- Tuerk, C., and L. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6988 (1992). 10
- Tuerk, C., and L. Gold, *Science* 249: 505 (1990).
- F. S. Wong et al., *Nat. Med.* 9, 1026 (1999).
- F. S. Wong, A. K. Moustakas, L. Wen, G. K. Papadopoulos, C. A. Janeway, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5551 (2002).
- Verdaguer, J., J.-W. Yoon, B. Anderson, N. Averill, T. Utsugi, B. Park, and P. Santamaria. 1996. Acceleration of spontaneous diabetes in TCR-p-transgenic nonobese diabetic mice by α -cell cytotoxic CD8⁺ T cells expressing identical endogenous TCR- α chains. *J. Immunol.* 157: 4726-4735.
- J. Verdaguer et al., *J. Exp. Med.* 186, 1663 (1997).
- Weiner, H. 1993. Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. *Science.* 259: 1321-1324. 20
- Wraith, D. C., D. E. Smilek, D. J. Mitchell, L. Steinman, and H. O. McDevitt. 1989. Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell* 59: 247-255.
- Zeh, H., D. Perry-Lalley, M. Dudley, S. Rosenberg, and J. Yang. 1999. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo anti-tumor efficacy. *J. Immunol.* 162: 989-994.
- Zhang, Y., B. O'Brien, J. Trudeau, R. Tan, P. Santamaria, and J. P. Dutz. 2002. In situ α -cell death promotes priming of diabetogenic CD8 T lymphocytes. *J. Immunol.* 168: 1466-1472. 30
- 米国特許第5,472,841号明細書 .
- 米国特許第5,496,938号明細書 .
- 米国特許第5,503,978号明細書 .
- 米国特許第5,567,588号明細書 .
- 米国特許第5,580,737号明細書 .
- 米国特許第5,582,981号明細書 .
- 米国特許第5,637,459号明細書 .
- 米国特許第5,654,151号明細書 .
- 米国特許第5,683,867号明細書 .
- 米国特許第5,705,337号明細書 . 40
- 米国特許第5,712,375号明細書 .
- 米国特許第5,726,017号明細書 .
- 米国特許第5,773,598号明細書 .
- 米国特許第5,786,462号明細書 .
- 米国特許第6,028,186号明細書 .
- 米国特許第6,083,696号明細書 .
- 米国特許第6,110,900号明細書 .
- 米国特許第6,124,449号明細書 .
- 米国特許第6,127,119号明細書 .
- 米国特許第6,140,490号明細書 . 50

米国特許第6,147,204号明細書.

米国特許第6,168,778号明細書.

米国特許第6,171,795号明細書.

【0005】

NODマウスは、膵島炎症（インスリン炎）、次いで、インシュリン産生細胞のT細胞媒介による破壊により特徴付けられる自己免疫疾患であるヒト1型糖尿病の、広く研究されたモデルである（SerrezeおよびLeiter、2001年）。CD4⁺およびCD8⁺T細胞両方が、この病理プロセスに関しては必要とされる（SerrezeおよびLeiter、2001年）。しかしながら、CD8⁺T細胞が、初期の細胞傷害に対して応答性であるように見える（SerrezeおよびLeiter、2001年；TischおよびMcDevitt、1996年；DiLorenzoら、1998年）10
。B細胞および自己抗体の病原性はより明らかではないが、NODマウスおよびヒトにおける自己免疫糖尿病の病因へと寄与すると現在のところ信じられている自己抗体は全て、T細胞による認識によるよりもむしろ特異的自己抗体の存在に基づいて、本来同定されたものである（Palmerら、1983年；Baekkeskovら、1990年；Rabinら、1992年）。病原性CD8⁺T細胞により標的とされる細胞抗原については、僅かしか知られていない。1研究が、NODマウスにおける大多数の膵島浸潤CD8⁺T細胞の抗原標的としてインシュリンペプチドを同定したが（Wongら、1999年）、これらインシュリン反応性CD8⁺T細胞の罹患性は、その後の研究において確かめられなかった（Amraniら、2000年；Trudeauら、2003年）。NOD 20
の膵島から単離された、実質的な割合の細胞自己反応性CD8⁺T細胞が、T細胞受容体（TCR）の分断された鎖（V17-J42）を発現し、共通の細胞ペプチドの認識を示唆する（DiLorenzoら、1998年；Santamariaら、1995年）。これらのT細胞は、上述した抗原性インシュリンペプチドを認識しない（Andersonら、1999年；Serrezeら、2001年）。この罹患性T細胞集団の病原性は、8.3T細胞クローン（V17-J42発現T細胞集団の、代表的T細胞クローン）の研究を通して、良く確立されている（Amraniら、2000年；Trudeauら、2003年；Andersonら、1999年；Nagataら、1994年；Verdaguerら、1997年）。8.3似のT細胞は、NODマウスの最も初期の膵島浸潤物中に存在し（DiLorenzoら、1998年）、膵島炎症の、顕在 30
化した疾患への進展に連れ、抗体結合力の成熟が進行する（Amraniら、2000年）。与えられた如何なる時間においても、8.3似のT細胞は、膵島に関わるCD8⁺T細胞の30～40%までをも構成し得る（Trudeauら、2003年）。加えて、末梢血中の8.3似のT細胞の定量は、今日までに同定された如何なる他の単一の免疫指標とは異なり、個々のNODマウスにおける糖尿病の進行を予見する（Trudeauら、2003年）。8.3似のT細胞の罹患性および病原性は明確に確立されているが、それらのリガンドの同定は流動的なままに留まっている。8.3T細胞クローンは、クラスI主要組織適合複合体（MHC）分子H-2K^d（Nagataら、1994年）へと拘束される。人工オリゴペプチドNRP-V7およびNRP-A7は以前に、H-2K^d分子に関連して、8.3似のT細胞に結合すると示されている（Andersonら、1999年；Amraniら、2001年）。しかしながら、それらの研究は、1型糖尿病の自己免疫に 40
応答性の8.3似のT細胞の天然リガンドの同定を示唆するものではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

その疾患の診断、予防、および治療のための新たな選択肢を打ち立てるであろうから、1型糖尿病に関連する他のT細胞リガンド同様、8.3似のT細胞の前記リガンドの決定は、これゆえ望ましいものである。1型糖尿病の病因におけるこれらリガンドの精確な役割の特徴付けも、必要とされている。この発明は、これらの必要性を満たすものである。

【0007】

従って、本発明者らは、1型糖尿病に対して応答性である細胞上に存在する前記した8.3似のT細胞のリガンドを同定することに成功している。そのリガンドは、豚島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク(IGRP)であり、そのCD8⁺T細胞結合ペプチドは、IGRP配列の206~214番アミノ酸を含む(マウスに関して配列番号1;ヒトに関して配列番号2)。本発明者らはまた、特にIGRP₂₀₆₋₂₁₄に対して反応するT細胞が、高親和性リガンド、例えばIGRP₂₀₆₋₂₁₄と共に排除される場合(1型糖尿病に関与しない場合)、1型糖尿病に寄与するIGRPから他の幾つかのCD8⁺T細胞リガンドを同定してきている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

これゆえ、幾つかの実施形態において、本発明は、355アミノ酸未満の単離精製オリゴペプチドもしくはポリペプチドに関し、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、およびSFCKSASIPからなる群から選択される配列を含む。

【0009】

他の実施形態では、本発明は、無菌医薬調製品中に上記配列の少なくとも1つを含む単離精製オリゴペプチドもしくはポリペプチドに関する。

【0010】

加えて、本発明は、配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%の相同性を持つ哺乳類IGRPと完全に相同な、8~10アミノ酸長の単離精製オリゴペプチドに関し、ここで該オリゴペプチドは、ヒトMHCクラスI分子に結合できるものである。

【0011】

本発明はまた、配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%相同な哺乳類IGRPをコード化するmRNAの少なくとも1部分に相補的な、アンチセンス分子に関する。これらの実施形態では、該アンチセンス分子は、哺乳類IGRPの翻訳を阻害できるものである。

【0012】

関連した実施形態では、本発明は、配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%相同な哺乳類IGRPをコード化するmRNAの1部分に特異的な、リボザイムに関する。これらの実施形態のリボザイムは、哺乳類IGRPの翻訳を阻害する。

【0013】

他の関連した実施形態では、本発明は、配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%相同な哺乳類IGRPをコード化するmRNAの1部分に相同な、RNAi分子に関する。これらの実施形態では、該RNAi分子は、哺乳類IGRPの翻訳を阻害できる。

【0014】

本発明はまた、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する方法にも関する。該方法は、該哺乳類へと、IGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞を抑制するのに充分、オリゴペプチドを投与することを含む。これらの方法では、該オリゴペプチドは8~10アミノ酸長であり、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、SFCKSASIP、およびYNIANWFLからなる群から選択される配列を含む。

【0015】

更なる実施形態では、本発明は、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する他の方法にも関する。これらの更なる方法は、該哺乳類へと、IGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞を抑制するのに充分、オリゴペプチドを投与することを含む。これらの方法では、該オリゴペプチドは8~10アミノ酸長であり、哺乳類IGRPに完全に相同であり、当該哺乳類のMHCクラスI分子に結合できるものである。

10

20

30

40

50

【0016】

本発明は更に、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する更なる方法に関する。該方法は、該哺乳類へと、8～10アミノ酸長のオリゴペプチドを投与することを含み、ここで該オリゴペプチドは、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞に対する、中もしくは低親和性リガンドである。

【0017】

加えて、本発明は、膵島細胞に対して細胞毒性であるCD8⁺T細胞が細胞を破壊するのを防ぐ方法に関する。該方法は、該細胞を、8～10アミノ酸長のオリゴペプチドに特異的に結合でき、配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%の相同性を持つ哺乳類IGRPに完全に相同な化合物を用いて処理することを含む。これらの方法では、該オリゴペプチドは、該哺乳類のMHCクラスI分子に結合できるものである。

10

【0018】

本発明はまた、膵島細胞に対して細胞毒性であるCD8⁺T細胞が細胞を破壊するのを防ぐ他の方法にも関する。該方法は、該CD8⁺T細胞を、8～10アミノ酸長の、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、SFCKKSASIP、およびYNIANWFLからなる群から選択される配列を含むオリゴペプチド、ならびに、該オリゴペプチドに結合できるMHCクラスI分子を用いて処理することを含む。

【0019】

関連した実施形態では、本発明は、膵島細胞に対して細胞毒性であるCD8⁺T細胞が細胞を破壊するのを防ぐ更なる方法に関する。該方法は、該CD8⁺T細胞を、IGRPへの該CD8⁺T細胞の結合を防ぐのに充分、オリゴペプチドを用いて処理することを含む。これらの方法では、該オリゴペプチドは8～10アミノ酸長であり、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、SFCKKSASIP、およびYNIANWFLからなる群から選択される配列を含む。

20

【0020】

更なる実施形態では、本発明は、1型糖尿病のリスクに晒されている哺乳類を処理する他の方法に関する。該方法は、該哺乳類へと、アンチセンス分子、リボザイム、またはRNAi分子を投与することを含む。これらの実施形態では、該アンチセンス分子、該リボザイム、および該RNAi分子は、哺乳類IGRPの翻訳を、特異的に阻害できる。

30

【0021】

本発明はまた、1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する更なる方法にも関する。該方法は、該哺乳類の膵臓中へと、膵島細胞を移植することを含む。これらの実施形態では、該細胞は、哺乳類IGRPの翻訳を特異的に阻害できるアンチセンス分子、リボザイム、もしくはRNAi分子を発現するベクターを用いて、トランスフェクションされる。

【0022】

本発明はまた、哺乳類が、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っているかを決定する方法にも関する。該方法は、該哺乳類から、CD8⁺T細胞を含むリンパ球サンプルを得、該リンパ球をオリゴペプチドと組み合わせ、いずれかのCD8⁺T細胞が特異的に、該オリゴペプチドに結合するかを決定することにより、該哺乳類におけるIGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞の存在を決定することを含む。これらの方法では、該オリゴペプチドは8～10アミノ酸長であり、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、SFCKKSASIP、およびYNIANWFLからなる群から選択される配列を含む。加えて、該オリゴペプチドもしくは前記MHC分子は、検出可能な標識を更に含む。これらの方法では、該オリゴペプチドに結合するCD8⁺T細胞は、当該哺乳類が、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っていることを指し示す。

40

50

【0023】

関連した実施形態では、本発明は、哺乳類が、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っているかを決定する他の方法に関する。該方法は、該哺乳類からCD8⁺T細胞を含むリンパ球サンプルを得、該リンパ球を、哺乳類IGRPと完全に相同である8~10アミノ酸長のオリゴペプチドおよび該オリゴペプチドに結合できるMHCクラスI分子と組み合わせ、ここで、該オリゴペプチドもしくは該MHC分子が検出可能な標識を更に含み、いずれかのCD8⁺T細胞が特異的に、該オリゴペプチドに結合するかを決定することにより、該哺乳類におけるIGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞の存在を決定することを含む。これらの方法では、該オリゴペプチドに結合するCD8⁺T細胞は、当該哺乳類が、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っていることを指し示す。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

本発明は、細胞上に存在する、1型糖尿病に対して応答性である前記した8.3似のT細胞のリガンドの同定に基づいている。実施例1記載の研究(実験)により確立されたように、該リガンドは膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク(IGRP)であり、その優性CD8⁺T細胞結合ペプチドは、IGRP配列の206~214番アミノ酸を含み、マウスにおいては、共通に受け入れられているアミノ酸1文字略号を使用すれば、配列VYLKTNVFLを持っている。1型糖尿病の病原に含まれているCD8⁺T細胞に結合できる他のマウスIGRPペプチドは、FLWSVFWLI(152~160番アミノ酸);TYYGFLNFM(21~29番アミノ酸);LRLFGIDL(225~233番アミノ酸);KWCANPDWI(241~249番アミノ酸);およびSFCKSASIP(324~332番アミノ酸)である。実施例3および4参照。

20

【0025】

本明細書において使用される場合、IGRPアミノ酸配列は膵島特異的であり、配列番号1(GenBankNP067306からのマウスIGRP)もしくは配列番号2(GenBankNP066999からのヒトIGRP)に少なくとも90%同一である如何なる哺乳類天然起源アミノ酸配列をも包含する。マウスおよびヒトのIGRPアミノ酸配列はそれぞれ、配列番号1および配列番号2に限定されるものではないが、マウスもしくはヒトに天然に存在する如何なる変異体をも包含する。全ての哺乳類IGRPアミノ酸配列の同定は容易に、過度の実験を伴わずに、例えば、膵島細胞に限定され、マウスもしくはヒトIGRPの既に同定されたmRNA配列(例えばそれぞれ、GenBank目録NP021331およびNP021176に見出されるような)に高度に(つまり>90%)相同的であるmRNA配列を同定し、その発現タンパクのアミノ酸配列を求めることにより、なされ得る。

30

【0026】

実施例1に更に議論されるように、マウスIGRP₂₀₆₋₂₁₄ペプチドは、配列VYLKTNVFLを持つ。GenBankNP066999からの、ヒトでの類似配列は、TYLKTNLFLである。これゆえ、マウスおよびヒトの該配列は、第1(VとT)および第7(VとL)の位置において相違する。オリゴペプチド配列KYNKANVFL(NRP-V7)およびKYNKANAF(L)(NRP-A7)が、8.3似のT細胞の更なるリガンドであることも知られている(Anderersonら、1999年;Amraniら、2001年)。これらは、マウスおよびヒトの天然起源の配列とは、第1、第3、第5、および第7の位置において相違する。V(Val)が非極性であり、T(Thr)が極性であり、K(Lys)がプラス(+)に荷電していることから、これらの配列間での第1の位置における相違は、保存されるものではない。このことは、これらのペプチドの第1の位置が、8.3T細胞への結合に寄与しないことを指し示す。しかしながら、第7の位置における異なるこれら3アミノ酸、V(Val)、L(Leu)、およびA(Ala)は全て非極性であり、非極性残基が8.3T細胞への結合を保持するのに、その位

40

50

置に関して必要とされることを指し示している。これゆえ、天然に保存されている配列 Y L K T N (A / I / L / V) F L を持つオリゴペプチドは、8 . 3 T 細胞のリガンドであると結論できる。本明細書において使用される場合、(A / I / L / V) は、その位置のアミノ酸が、非極性アミノ酸 A、I、L、もしくは V のいずれでもあり得ることを象徴する。マウス H - 2 K^d クラス I 分子が少なくともノナマー (ノナペプチド) を必要とすることが知られているので、マウス M H C 分子および T 細胞が利用される場合、少なくとも 9 アミノ酸が好ましい。一気呵成の研究が、I G R P を除くオクタマー (オクタペプチド) のいずれもが、如何なる既知のアミノ酸配列中にも存在しないことを明らかにした。

【 0 0 2 7 】

C D 8⁺ T 細胞に結合可能であるとして同定された他の I G R P ペプチドに関しては、ヒトおよびマウスにおいて、1 5 2 ~ 1 6 0 番ペプチド (F L W S V F W L I)、2 4 1 ~ 2 4 9 番ペプチド (K W C A N P D W I)、および 3 2 4 ~ 3 3 2 番ペプチド (S F C K S A S I P) が同一である。しかしながら、マウスおよびヒトにおいて、2 1 ~ 2 9 番ペプチドおよび 2 2 5 ~ 2 3 3 番ペプチドが異なっている。2 1 ~ 2 9 番ペプチドは、マウスにおいては T Y Y G F K N F M であり、ヒトにおいては A Y Y T F L N F M であり、2 2 5 ~ 2 3 1 番ペプチドは、マウスにおいては L R L F G I D L L であり、ヒトにおいては L R V L N I D L L である。ヒトのこれらのペプチドも、C D 8⁺ T 細胞に結合可能であると予測される。

【 0 0 2 8 】

これゆえ、幾つかの実施形態では、本発明は、Y L K T N (A / I / L / V) F L、F L W S V F W L I、(T / A) Y Y (G / T) F L N F M、L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L、K W C A N P D W I、および S F C K S A S I P からなる群から選択される配列を含む、3 5 5 アミノ酸未満の単離精製オリゴペプチドもしくはポリペプチドに関する。これらのオリゴペプチドおよびポリペプチドは、1 型糖尿病に含まれているペプチド配列を含む C D 8⁺ T 細胞リガンドであることにおいても有用であり、これゆえ、診断もしくは治療といった適用に有用である。

【 0 0 2 9 】

本明細書において使用される場合、「単離精製」とは、天然に見出されると考えられるよりも高濃度で存在することを意味する。好ましくは、単離精製オリゴペプチドもしくはポリペプチドは、本調製品の少なくとも約 1 0 %、より好ましくは少なくとも約 2 5 %、更により好ましくは少なくとも約 5 0 %、尚更により好ましくは少なくとも約 7 5 %、最も好ましくは少なくとも約 9 0 % の本ペプチド成分である。

【 0 0 3 0 】

好ましい実施形態では、これらのオリゴペプチドもしくはポリペプチドは、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 9 0 % の相同性を持っている、哺乳類 (例えば、マウスおよびヒト) I G R P に完全に相同である。他の好ましい実施形態では、該オリゴペプチドもしくはポリペプチドは、1 0 0 アミノ酸以下、より好ましくは 2 5 アミノ酸以下、更により好ましくは 1 3 ~ 2 5 アミノ酸、最も好ましくは 8 ~ 1 0 アミノ酸を含むが、これは、C D 8⁺ T 細胞が一般的に、8 ~ 1 0 アミノ酸のオリゴペプチドにしか結合しないからである。

【 0 0 3 1 】

これらの実施形態では、好ましいポリペプチドもしくはオリゴペプチドは、配列 V Y L K T N V F L もしくは T Y L K T N L F L を持つ上記ペプチドを含むが、これは、それらの配列がそれぞれマウスおよびヒトからの天然起源 I G R P 中に存在しているからである。

【 0 0 3 2 】

これらの実施形態の更なる態様では、該オリゴペプチドもしくはポリペプチドはまた、免疫化プロトコールにおいて該ペプチドをより効果的に使用するために、抗原性担体を含み、I G R P に対して哺乳類を寛容し、実施例 2 に記載の実験において達成されたように、1 型糖尿病の進展を防ぐ。抗原性担体の非限定例は、不完全フロイントアジュバント (

10

20

30

40

50

Freund's adjuvant) である。Gammónら、1986年も参照。

【0033】

他の態様では、該オリゴペプチドもしくはポリペプチドは更に、検出可能な標識を含む。このように標識されたペプチドは、診断プロトコールにおいて、例えば8.3似のCD8⁺T細胞の存在を決定し、1型糖尿病を持っているかもしくはこれのリスクに晒されている哺乳類を同定するのに有用である。本発明は、如何なる特定の検出可能な標識にも限定されず、当業者は過度の実験をすることなく、如何なる特定の適用に関しても、最適な標識を選択できる。例は、蛍光部分、放射性分子、およびアッセイ可能な酵素（例えば、
- ガラクトシダーゼもしくはストレプトタビジン）を包含する。これらの検出可能な部分のいずれかを用いてペプチドを標識する方法は、よく知られている。

10

【0034】

更なる態様では、8~10アミノ酸の、同定された上記オリゴペプチドは、該オリゴペプチドに結合できるMHCクラスI分子、例えば、IGRP₂₀₆₋₂₁₄に結合するマウスH-2K^d分子と便利に組み合わせられ得る。他のペプチドのいずれかに対するMHCクラスI分子が、当業界において既知の方法を使用して、同定され得る。CD8⁺T細胞は、MHCクラスI分子を介してのみ抗原に結合するので、該オリゴペプチド-MHCクラスI混合物は、T細胞リガンドを創出するのに有用である。該MHCクラスI分子は、好ましくはテトラマーの形態で、用いられる。例えば、Altmanら、1996年；Trudeauら、2003年を参照。幾つかの適用、例えば診断では、該オリゴペプチド-MHCクラスI混合物のオリゴペプチドは更に、以前に論じたもののような、つまり、
該オリゴペプチドに共役した、検出可能な標識を含む。あるいは、もしくは、更に、該MHCクラスI分子は、検出可能な標識を用い得るであろう。

20

【0035】

CD8⁺T細胞を排除する方向の幾つかの処理方法では、該オリゴペプチドもしくは該MHCクラスI分子はまた、細胞毒性分子をも包含し得る。これらの方法では、該細胞毒性オリゴペプチド-MHCクラスI混合物は、前記した8.3似のT細胞に結合し、ここで、該細胞毒性分子が、該T細胞を殺傷する。

【0036】

本発明は、該オリゴペプチドもしくはMHCクラスI分子に結合する如何なる特定の細胞毒性分子にも、狭く限定されない。当業者であれば、これらの態様において有用な種々の細胞毒性分子を同定し得、過度の実験をすることなく、如何なる特定の適用に関してもふさわしい細胞毒性分子を選択し得るであろう。潜在的に有用な細胞毒性分子の例は、放射性分子（例えば、¹³¹I、⁹⁰Y）、および、毒性化学物質もしくはタンパク（例えば、5-フルオロウリジンもしくはリシン）を包含する。

30

【0037】

CD4⁺T細胞もまた、1型糖尿病の病理プロセスに含まれているので、そして、CD4⁺T細胞は、13~25アミノ酸であるオリゴペプチドに結合するので、MHCクラスII分子上に提示される場合のみ、MHCクラスII分子とのオリゴペプチドの混合物もまた、本発明の範囲内に入る。これらの実施形態では、該オリゴペプチドは13~25アミノ酸であり、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)Y
Y(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、およびSFCKSASIPからなる群から選択される配列を含む。前記したオリゴペプチド-MHCクラスI混合物に似て、該オリゴペプチド-MHCクラスII混合物の該オリゴペプチドもしくはMHCクラスII分子も、検出可能な標識もしくは細胞毒性分子を便利に含み得る。

40

【0038】

上記したオリゴペプチドもしくはポリペプチドのいずれもが、特に該オリゴペプチドもしくはポリペプチドが治療処理用は無菌化されるべき場合、無菌医薬調製品において有用に与えられることも見込まれる。これゆえ、幾つかの実施形態では、無菌医薬調製品中の該オリゴペプチドもしくはポリペプチドは、哺乳類を寛容し、IGRPに反応性のCD8

50

+ T細胞を抑制することができる。哺乳類 I G R P タンパク自体、つまり、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90% の相同性を持つものも、無菌医薬調製品において有用なものとして包含される。好ましくは、この哺乳類 I G R P は、マウス I G R P もしくはヒト I G R P である。

【0039】

実施例 2 および 3 に指し示されるように、I G R P 自体の一般的な特徴がそれを、1 型糖尿病に含まれている T 細胞のリガンドであるペプチドに非常に寄与できるようにするよう見える。

【0040】

これゆえ、本発明はまた、8 ~ 10 アミノ酸長の、哺乳類（例えば、マウスおよびヒト）I G R P と完全に相同な単離精製オリゴペプチドにも関し、ここで、該オリゴペプチドは、当該哺乳類の M H C クラス I 分子に結合できる。好ましくは、該オリゴペプチドは、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90% の相同性を持つ。好ましい実施形態では、該単離精製オリゴペプチドは、Y L K T N (A / I / L / V) F L 、 F L W S V F W L I 、 (T / A) Y Y (G / T) F L N F M 、 L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L 、 K W C A N P D W I 、 および S F C K S A S I P からなる群から選択される配列を含む。幾つかの好ましい実施形態では、特に該ペプチドが診断に使用されるべき場合、該オリゴペプチドは更に、前記したような検出可能な標識、例えば、蛍光分子、放射性分子、もしくは酵素を含む。他の好ましい実施形態では、該ペプチドは更に、該オリゴペプチドに結合できる M H C クラス I 分子を含む。これらのオリゴペプチドも、検出可能な該標識があってもなくても、該オリゴペプチドに結合できる M H C クラス I 分子を含み得る。以前に論じた実施形態の時のように、該オリゴペプチド - M H C クラス I 混合物もまた、該オリゴペプチドもしくは該 M H C クラス I 分子に共役した細胞毒性分子を含み得る。

【0041】

I G R P に関する機能を同定しようとする努力にも関わらず、何も見出されていない。これゆえ、膵島細胞上での I G R P の発現を抑制もしくは排除しようとする治療は、1 型糖尿病における病原性膵島細胞の破壊を抑制もしくは排除することにおいて有益なようであるが、これは、このような治療が、1 型糖尿病へと至る自己免疫反応に関する標的リガンドを排除すると思われるからである。I G R P 発現の抑制もしくは排除は、I G R P の m R N A を標的とするアンチセンス分子、リボザイム、もしくは R N A i 分子を用いた処理により、達成され得る。これらの実施形態では、該アンチセンス分子、リボザイム、もしくは R N A i 分子は、当業界において既知であるような核酸（例えば、D N A もしくは R N A ）または核酸模倣物質（例えば、ホスホロチオネート模倣物質）から構成され得る。

【0042】

これゆえ、加えて本発明は、哺乳類（例えば、マウスおよびヒト）I G R P をコード化する m R N A の少なくとも 1 部分に対して相補的なアンチセンス分子に関する。これらの実施形態では、該アンチセンス分子は、哺乳類 I G R P の翻訳を阻害できる。好ましくは、該哺乳類 I G R P が、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90% 相同である。全ての哺乳類 I G R P についてのアンチセンス分子が、例えば G e n B a n k 目録 N M 0 2 1 3 3 1 （マウス）および N M 0 2 1 1 7 6 （ヒト）において与えられるような既知の I G R P 配列情報を使用して、過度な実験なしに、デザインされ得る。

【0043】

関連した実施形態では、本発明は、哺乳類（例えば、マウスもしくはヒト）I G R P をコード化している m R N A を特異的に開裂させ、こうして当該哺乳類 I G R P の翻訳を阻害するリボザイムに関する。好ましくは、該哺乳類 I G R P が、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90% 相同である。リボザイム技術は良く確立されたものなので、当業者であれば、過度な実験をすることなく、前記したように、リボザイムをデザインできる。

【0044】

10

20

30

40

50

関連した更なる実施形態では、本発明は、哺乳類 I G R P をコード化している m R N A の 1 部分に相同であり、これゆえ哺乳類（例えば、マウスもしくはヒト）I G R P の翻訳を阻害できる R N A i 分子に関する。よく知られているように、R N A i (s i R N A を包含する) 分子は、相同遺伝子の転写もしくは翻訳に干渉する短い 2 本鎖（ダブルストランド）核酸である。以前の実施形態の時のように、該哺乳類 I G R P は、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90 % 相同である。R N A i 技術は良く確立されたものなので、当業者であれば、過度な実験をすることなく、前記したように、R N A i 分子をデザインできる。

【0045】

前記した組成物の多くが、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類（マウスのような齧歯類およびヒトを包含するが、これらに限定されない）を処理する方法において有用である。このように、前記した組成物は、ヒトを包含する哺乳類への投与用に、過度な実験をすることなく、この特定の適用にふさわしいものとして、処方され得る。加えて、適切な用量の該組成物が、標準的な用量 - 応答プロトコールを使用して、過度な実験をすることなく、求められ得る。

【0046】

従って、経口、舌、舌下、口腔、および口腔下投与用にデザインされた本組成物が、過度な実験をすることなく、当業界においてよく知られている手段により、例えば不活性稀釈剤もしくは浸食性担体を用いて、製造され得る。本組成物は、ゼラチンカプセル中に封入されるか、または、錠剤（タブレット）中へと圧縮されてもよい。経口投与による治療の目的では、本発明の医薬組成物は賦形剤と共に取り込まれてもよく、錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル (elixir)、懸濁、シロップ、ウェハウス、チューイング・ガム、および同様なものの形態で使用されてもよい。

【0047】

錠剤、小丸薬（ピル）、カプセル、トローチ、および同様なものは、バインダー、レシピエント、崩壊剤、滑剤、甘味料、および香料も含有してよい。バインダーの幾つかの例は、微結晶セルロース、ガム、トラガカント、もしくはゼラチンを包含する。賦形剤の例は、スターチもしくはラクトースを包含する。崩壊剤の幾つかの例は、アルギン酸、コーン・スターチ、および同様なものを包含する。滑剤の例は、ステアリン酸マグネシウムもしくはステアリン酸カリウムを包含する。滑り剤 (glidant) の 1 例は、コロイド二酸化ケイ素である。甘味料の幾つかの例は、スクロース、サッカリン、および同様なものを包含する。香料の例は、ペパーミント、サリチル酸メチル、オレンジ香料、および同様なものを包含する。これらの種々の組成物を調製するのに使用される材料は医薬的に純粋であり、使用量において毒性がないべきである。

【0048】

本発明の組成物は容易に、例えば、静注、筋肉内、くも膜下、もしくは皮下注射のように、非経口投与され得る。非経口投与は、本発明の組成物を溶液もしくは懸濁中へと取り込むことにより、達成され得る。このような溶液もしくは懸濁は、注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、もしくは他の合成溶媒のような無菌稀釈剤をも包含してよい。非経口処方は、例えばベンジルアルコールもしくはメチルパラベンのような抗菌剤、例えばアスコルビン酸もしくは重亜硫酸ナトリウムのような抗酸化剤、ならびに E D T A のようなキレート剤をも包含してよい。酢酸塩、クエン酸塩、もしくはリン酸塩のような緩衝剤、および、塩化ナトリウム（食塩）もしくはデキストロースのような等張性調整剤も加えられてよい。本非経口調製品は、ガラスもしくはプラスチックでできたアンプル、使い捨てシリンジ、もしくは多ドーズ・バイアル中に封じ込められ得る。

【0049】

直腸投与は、本医薬組成物を、直腸もしくはより大きな腸管中へと投与することを包含する。これは、坐薬もしくは浣腸を使用してなされ得る。坐薬処方は容易に、当業界において既知の方法により、製造され得る。例えば、坐薬処方、グリセリンを約 120 へ

と熱し、本組成物を該グリセリン中に溶かし、熱せられた該グリセリンを混合し（この後精製水が加えられてもよく）、そしてこの熱い混合物を坐薬の型中へと注ぐことにより、調製され得る。

【0050】

経皮投与は、皮膚を通した本組成物の経皮吸収を包含する。経皮（投与用）処方は、パッチ（よく知られたニコチンパッチのような）、外用剤、クリーム、ゲル、軟膏、および類似のものを包含する。

【0051】

本発明は、哺乳類へ、治療に有効な量の本組成物を、鼻から投与することを包含する。本明細書において使用される場合、「鼻から投与する」もしくは「鼻からの投与」は、本組成物を、患者の鼻道もしくは鼻腔の粘膜へと投与することを包含する。本明細書において使用される場合、組成物の鼻からの投与用の医薬組成物は、よく知られた方法、例えば鼻での噴霧、鼻用ドロップ、懸濁、ゲル、外用剤、クリーム、もしくは粉末により調製された、治療に有効な量の投与されるべき本組成物を包含する。本組成物の投与は、鼻用タンポンもしくは鼻用スポンジを使用して行われてもよい。

【0052】

従って、幾つかの実施形態では、本発明は、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する方法に関する。本方法は、IGRPに反応性のT細胞を抑制するのに充分、該哺乳類へと無菌医薬調製物中のオリゴペプチドを投与することを含む。これらの実施形態では、該オリゴペプチドは、Y L K T N (A / I / L / V) F L、F L W S V F W L I、(T / A) Y Y (G / T) F L N F M、L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L、K W C A N P D W I、S F C K S A S I P、およびY N I A N W F Lからなる群から選択される配列を含む。最後の配列は、ペプチドN R P - I 4配列であり、これは8.3 似のT細胞に対して反応することが分かっているペプチドであり、実施例3において、1型糖尿病に有効な処理であることが示される。これらの方法により抑制されるT細胞はC D 4⁺、もしくは好ましくは、C D 8⁺であり得る。これらの方法では、該オリゴペプチドもしくはポリペプチドによる処理は、当該哺乳類が、該T細胞を排除するように寛容化する。該T細胞がC D 8⁺である場合、これらの方法は細胞において、IGRPに対して反応性のT細胞を抑制するかもしくは排除すると思われる。実施例2~4参照。これらの実施形態の該オリゴペプチドもしくはポリペプチドは、前記されたものである。それらは、寛容化プロトコールとして適切なものとして、当業者により適切と考えられる如何なるサイズでもあり得、8~10量体、13~25量体、もしくは25未満、もしくは50未満、もしくは100未満、もしくは300未満のものを包含し、もしくは更により大きく、IGRPタンパク全体、不活性キャリアもしくは免疫原性キャリアに共役されたペプチドの幾つかを、包含する。T細胞活性に対して哺乳類を寛容化するプロトコールは、よく知られている。例えば、Gamm onら、1986年を参照。

【0053】

これらの方法は、他の反応性C D 8⁺ T細胞を排除するために、上に同定した1種より多いオリゴペプチドが、本処理において使用される実施形態を包含する。

【0054】

他の実施形態では、本発明は、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する更なる方法に関する。これらの方法は、該哺乳類へと、Y L K T N (A / I / L / V) F L、F L W S V F W L I、(T / A) Y Y (G / T) F L N F M、L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L、K W C A N P D W I、S F C K S A S I P、およびY N I A N W F Lからなる群から選択される配列を含む、8~10アミノ酸のオリゴペプチドを投与することを含む。これらの方法では、該オリゴペプチドに結合可能なクラスIのMHC分子も、オリゴペプチド-MHC結合を生成させるように、該オリゴペプチドと共に包含される。これらの実施形態における該オリゴペプチドおよび/または該MHCクラスI分子は更に、前記したような細胞毒性分子を含む。該オリゴ

10

20

30

40

50

ペプチド - 細胞毒性分子は、I G R P に対して反応性の T 細胞を抑制するのに充分、該哺乳類へと投与される。該ペプチド - M H C 分子 - 細胞毒性分子が 8 . 3 似の T 細胞に結合する時に、C D 8 ⁺ T 細胞の抑制が達成され、これは、該細胞毒性分子により殺傷される。前記した実施形態では、1 種より多いオリゴペプチドが投与され得る。

【0055】

これらの実施形態では、該 M H C クラス I 分子は、好ましくは 4 量体 (テトラマー) 形態で用いられる。例えば、A l t m a n ら、1996 年 ; T r u d e a u ら、2003 年を参照。しかしながら、該 M H C クラス I 分子もまた、抗原提示細胞の 1 部として存在し得る。このような組成物は特に、C D 8 ⁺ T 細胞からのサイトカイン (特に、インターフェロン) 産生を測定するのに有用である。例えば、実施例 2 および T e r a j i m a ら

10

【0056】

関連した実施形態では、本発明は、1 型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは 1 型糖尿病を持っている哺乳類を処理する更なる方法に関する。これらの方法は、該哺乳類へと、8 ~ 10 アミノ酸長のオリゴペプチドを投与することを含み、これは哺乳類 I G R P と完全に相同であり、前記したように、哺乳類 M H C クラス I 分子に結合できる。該オリゴペプチドは好ましくは、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90 % の相同性を持っている哺乳類 I G R P に完全に相同である。これらの方法では、該オリゴペプチドに結合可能な M H C クラス I 分子も、オリゴペプチド - M H C 結合を生成させるように、該オリゴペプチドと共に包含される。これらの実施形態では、該オリゴペプチドおよび/または該 M H C クラス I 分子は更に、前記したような細胞毒性分子を含む。該オリゴペプチド - 細胞毒性分子は、I G R P に対して反応性の T 細胞を抑制するのに充分、該哺乳類へと投与される。該ペプチド - M H C 分子 - 細胞毒性分子が I G R P に対して反応性の T 細胞に結合する時に、C D 8 ⁺ T 細胞の抑制が達成され、これは、該細胞毒性分子により殺傷される。これらの実施形態では、1 種より多いオリゴペプチドが投与され得る。

20

【0057】

実施例 3 に示されるように、特に有効な 1 型糖尿病の処理は、I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8 ⁺ T 細胞に対する中 ~ 低親和性結合を持つオリゴペプチドを用いるものである。これゆえ、本発明はまた、1 型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは 1 型糖尿病を持っている哺乳類を処理する更なる方法にも関する。本方法は、該哺乳類へと、8 ~ 10 アミノ酸長のオリゴペプチドを投与することを含み、ここで該オリゴペプチドが、I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8 ⁺ T 細胞に対する中 ~ 低親和性リガンドである。これらの方法に関して有用なオリゴヌクレオチドの好ましい例は、実施例 3 において利用されるとおり、K Y N I A N W F L および K Y N K A N A F L である。

30

【0058】

更なる実施形態では、本発明は、膵島細胞に対して細胞毒性である C D 8 ⁺ T 細胞が細胞を破壊するのを防ぐ方法に関する。これらの方法は、該細胞を、オリゴペプチドに結合可能な化合物を用いて処理することを含み、ここで該オリゴペプチドが 8 ~ 10 アミノ酸長であり、前記したように、哺乳類 I G R P に完全に相同である。細胞 I G R P 上の結合ドメインによる I G R P との C D 8 ⁺ T 細胞の反応は、該細胞の破壊へと至り得るのであるが、防がれ得る。該オリゴペプチドは好ましくは、配列番号 1 もしくは配列番号 2 に少なくとも 90 % の相同性を持っている哺乳類 I G R P に完全に相同である。これらの実施形態では、該オリゴペプチドに結合する化合物は、該 M H C への該オリゴペプチドの結合を防ぐか、または、C D 8 ⁺ T 細胞への該オリゴペプチド - M H C 複合体の結合を防ぐ。

40

【0059】

好ましい実施形態では、該化合物は、Y L K T N (A / I / L / V) F L 、 F L W S V F W L I 、 (T / A) Y Y (G / T) F L N F M 、 L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L 、 K W C A N P D W I 、 および S F C K S A S I P からなる群から選択される配列を含むオリゴペプチドもしくはポリペプチドに結合し得る。

50

【0060】

これらの実施形態では、該オリゴペプチドに結合可能な該化合物は、オリゴペプチド - MHC 結合数を抑制することによって、または、該オリゴペプチド - MHC 複合体に結合する T 細胞への物理的干渉を惹起することによって、細胞に結合する CD8⁺ と干渉することが可能な、如何なる化合物でもあり得る。好ましい実施形態では、該化合物は抗体もしくはアプタマーである。

【0061】

オリゴペプチドに対する抗体を調製する方法は定法であり、当業者であれば、このような抗体であれば、過度の実験を行うことなく、如何なる IGRP オリゴペプチドに対しても調製され得ると予期すると思われる。該抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、もしくは組み換え供給源からのものであり得る。本明細書において使用される場合、「抗体」は、典型的な免疫グロブリン抗原結合部位（例えば、FabもしくはFab2）を含む抗体全体の断片をも包含する。本抗体もまた、如何なる脊椎動物（例えば、マウス、ニワトリ、ウサギ、ヤギ、もしくはヒト）または組み合わされた脊椎動物（例えば、ヒト化マウス）のものであり得る。

【0062】

アプタマーは、タンパクもしくは小分子（例えば、ステロイド、薬剤等）のような、特定の標的分子に結合する 1 本鎖オリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド類似体である。これゆえ、アプタマーは、抗体に類似したオリゴヌクレオチドである。しかしながら、アプタマーは抗体よりも小さく、一般的に 50 ~ 100 nt の範囲中にある。それらの結合は、該アプタマーオリゴヌクレオチドにより形成される 2 次構造に高度に依存している。RNA アプタマーおよび 1 本鎖 DNA（もしくは類似体）アプタマー両方が知られている。例えば、Burke ら、1996 年；Ellington および Szostak、1990 年；Hiraoka ら、1998 年；Jaeger ら、1998 年；Kensch ら、2000 年；Schneider ら、1995 年；ならびに、米国特許第 5,773,598 号明細書、米国特許第 5,496,938 号明細書、米国特許第 5,580,737 号明細書、米国特許第 5,654,151 号明細書、米国特許第 5,726,017 号明細書、米国特許第 5,786,462 号明細書、米国特許第 5,503,978 号明細書、米国特許第 6,028,186 号明細書、米国特許第 6,110,900 号明細書、米国特許第 6,124,449 号明細書、米国特許第 6,127,119 号明細書、米国特許第 6,140,490 号明細書、米国特許第 6,147,204 号明細書、米国特許第 6,168,778 号明細書、および米国特許第 6,171,795 号明細書を参照。

【0063】

仮想的にどの特定の標的にも結合するアプタマーは、SELEX と呼ばれる反復プロセスを使用することにより選択され得、これは Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment を表す（Burke ら、1996 年；Ellington および Szostak、1990 年；Schneider ら、1995 年；Tuerk および Gold、1992 年；Tuerk および Gold、1990 年）。SELEX の幾つかのバリエーションが開発されており、該プロセスを向上させ、特定環境下でのその使用を可能にする。例えば、米国特許第 5,472,841 号明細書、米国特許第 5,503,978 号明細書、米国特許第 5,567,588 号明細書、米国特許第 5,582,981 号明細書、米国特許第 5,637,459 号明細書、米国特許第 5,683,867 号明細書、米国特許第 5,705,337 号明細書、米国特許第 5,712,375 号明細書、および米国特許第 6,083,696 号明細書を参照。これゆえ、IGRP オリゴペプチドを包含する如何なる特定のオリゴペプチドに対するアプタマー産生も、過度の実験を必要としない。

【0064】

加えて、これらの方法における膵島細胞は、ex vivo もしくは in vitro において処理され得る（例えば、1 型糖尿病を持っている患者体内への移植用の膵島

10

20

30

40

50

細胞に関して)。好ましい実施形態では、該膵島細胞は、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類の膵臓の一部である。本方法は如何なる特定の哺乳類を用いる使用にも限定されないが、マウスもしくはヒトが好ましい。

【0065】

本発明はまた、膵島細胞に対して細胞毒性であるCD8⁺T細胞が、細胞を破壊するのを防ぐ方法にも関する。本方法は、該CD8⁺T細胞を、8~10アミノ酸のオリゴペプチドを用いて処理することを含み、これは前記したように、Y L K T N (A / I / L / V) F L、F L W S V F W L I、(T / A) Y Y (G / T) F L N F M、L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L、K W C A N P D W I、およびS F C K S A S I Pからなる群から選択される配列を含み、前記したように、該オリゴペプチドに結合できるMHCクラスI分子を伴う。これらの実施形態における該MHCクラスI分子は、好ましくは、前記したようにテトラマー形態である。これらの実施形態では、該CD8⁺T細胞は、該オリゴペプチド-MHC複合体に結合し、該T細胞が該細胞上の該オリゴペプチド-MHCに結合するのを防ぐ。

10

【0066】

これらの方法の幾つかの実施形態では、該オリゴペプチドもしくはMHC分子が更に、前記したように細胞毒性分子を含み、このため該T細胞が該オリゴペプチド-MHC-細胞毒性分子複合体に結合すると、殺傷される。

【0067】

これらの方法における膵島細胞も、*ex vivo*もしくは*in vitro*において処理され得る(例えば、1型糖尿病を持っている患者体内への移植用の膵島細胞に関して)。好ましい実施形態では、該膵島細胞は、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類の膵臓の一部である。本方法は如何なる特定の哺乳類を用いる使用にも限定されないが、マウスもしくはヒトが好ましい。

20

【0068】

関連した実施形態では、本発明は、膵島細胞に対して細胞毒性であるCD8⁺T細胞が、細胞を破壊するのを防ぐ他の方法に関する。本方法は、該CD8⁺T細胞を、前記したように、哺乳類IGRPに完全に相同な8~10アミノ酸のオリゴペプチドを用いて処理することを含み、前記したように、該オリゴペプチドに結合できるMHCクラスI分子を伴う。これらの実施形態における該オリゴペプチドは、ヒトMHCクラスI分子に結合可能である。好ましくは、該オリゴペプチドは、配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%の相同性を持っている。

30

【0069】

これらの実施形態における該MHCクラスI分子は、好ましくは、前記したようにテトラマー形態である。これらの実施形態では、該CD8⁺T細胞は、該オリゴペプチド-MHC複合体に結合し、該T細胞が該細胞上の該オリゴペプチド-MHCに結合するのを防ぐ。

【0070】

これらの方法の幾つかの実施形態では、該オリゴペプチドもしくはMHC分子が更に、前記したように細胞毒性分子を含み、このため該T細胞が該オリゴペプチド-MHC-細胞毒性分子複合体に結合すると、殺傷される。

40

【0071】

これらの方法における膵島細胞も、*ex vivo*もしくは*in vitro*において処理され得る(例えば、1型糖尿病を持っている患者体内への移植用の膵島細胞に関して)。好ましい実施形態では、該膵島細胞は、1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っている哺乳類の膵臓の一部である。本方法は如何なる特定の哺乳類を用いる使用にも限定されないが、マウスもしくはヒトが好ましい。

【0072】

加えて、本発明は、1型糖尿病のリスクに晒されている哺乳類を処理する方法に関する。これらの実施形態の方法は、該哺乳類におけるIGRP発現を特異的に減少させること

50

ができる化合物を、該哺乳類へと投与することを含む。これらの実施形態では、該化合物は、前記したアンチセンス分子、リボザイム、およびRNAi分子からなる群から選択され、ここで該化合物は、該哺乳類におけるIGRP発現を減少させるのに充分、投与される。本方法は如何なる特定の哺乳類を用いる使用にも限定されないが、マウスもしくはヒトが好ましい。

【0073】

1型糖尿病を持っている哺乳類（ヒトを包含する）の処理の既知の方法は、当該哺乳類の膵臓中へ、膵島細胞を移植することである。しかしながら、細胞に自己反応性のCD8⁺T細胞は一般的に、移植後存在するので、移植された細胞もしばしば破壊される。本発明は、移植された細胞のこの破壊を抑制するかもしくは排除する方法を提供する。本方法は、該細胞におけるIGRP発現を抑えるかもしくは排除する核酸を発現するベクターを用いて、該細胞をトランスフェクションすることを含んでいる。トランスフェクションされた細胞は、殆どもしくは全くIGRPを発現しておらず、その後、当該哺乳類体内へと移植される。それらの細胞は殆どもしくは全く、IGRPを発現しないので、自己反応性CD8⁺T細胞は、該細胞に結合して破壊することができない。

10

【0074】

これゆえ、これらの実施形態では、本発明は、1型糖尿病を持っている哺乳類を処理する更なる方法に関する。本方法は、哺乳類の膵臓中へ、膵島細胞を移植することを含み、ここで該細胞は、核酸を発現するベクターを用いてトランスフェクションされる。該核酸は、前記したアンチセンス分子、前記したリボザイム、および前記したRNAi分子からなる群から選択される。これらの実施形態では、該核酸は、該細胞におけるIGRP発現を減少させるのに充分、発現される。

20

【0075】

これらの実施形態は、如何なる特定タイプのベクターにも限定されない。当業界においてよく知られているように、適切なベクターの例は、DNAそのままのベクターおよびウイルスベクター、例えば、アデノウィルスもしくはレンチウィルスのものを包含する。当業者は、過度の実験をすることなく、適切なベクターを選択して合成できる。

【0076】

他の実施形態に関して、本方法は、如何なる特定哺乳類を用いての使用にも限定されない。好ましい実施形態では、該哺乳類はマウスもしくはヒトである。

30

【0077】

1型糖尿病におけるIGRPの役割の発見は、幾つかの診断方法を示唆する。

【0078】

従って、幾つかの実施形態では、本発明は、哺乳類が1型糖尿病のリスクに晒されているか1型糖尿病を持っているかを決定する方法に関する。本方法は：

a. 標準的な方法（例えば、静脈穿刺）により、該哺乳類から、CD8⁺T細胞を含むリンパ球サンプルを得；

b. 該リンパ球を、前記した、Y L K T N (A / I / L / V) F L、F L W S V F W L I、(T / A) Y Y (G / T) F L N F M、L R (L / V) (F / L) (G / N) I D L L、K W C A N P D W I、およびS F C K S A S I Pからなる群から選択される配列を含む8～10アミノ酸のオリゴペプチドと組み合わせ、前記したような、該オリゴペプチドに結合できるMHCクラスI分子を伴い、ここで該オリゴペプチドもしくは該MHCクラスI分子が更に、前記したような検出可能な標識を含み；

40

c. 該オリゴペプチドに特異的に、いずれかのCD8⁺T細胞が結合するかどうかを決定する

ことにより、該哺乳類におけるIGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞の存在を決定することを含む。これらの実施形態では、該オリゴペプチドに結合するCD8⁺T細胞は、該哺乳類が1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っていることを指し示す。

【0079】

50

これらの方法は、如何なる哺乳類を用いても実施され得るが、該哺乳類は、好ましくはマウスもしくはヒトである。

【0080】

決定するステップ(c.)は、如何なる既知の手段にもより得る。幾つかの好ましい実施形態では、該決定ステップは、細胞選別機(例えば、蛍光活性化細胞選別機)もしくは標識細胞計数機(例えば、Coulterカウンター)を使用して、標識されたCD8⁺T細胞を計数することにより、実施される。他の好ましい実施形態では、該決定ステップは、該標識が観測され得る条件下、例えば、蛍光標識を使用する場合蛍光顕微鏡を用いて、もしくは、酵素標識および着色された酵素基質を使用して結合したT細胞を見えるようにする場合光学顕微鏡を用いて、該リンパ球の顕微鏡観察により、実施される。更なる好ましい実施形態では、該決定ステップは、該CD8⁺T細胞の活性化を測定することにより、好ましくは、既知の方法によりインターフェロン産生を測定することにより、例えばELISpotアッセイ(例えば、Hartemannら、1999年参照)を使用して、実施される。

10

【0081】

本発明は、哺乳類が1型糖尿病のリスクに晒されているか1型糖尿病を持っているかを決定する他の方法にも関する。本方法は：

a. 標準的な方法(例えば、静脈穿刺)により、該哺乳類から、CD8⁺T細胞を含むリンパ球サンプルを得；

b. 該リンパ球を、哺乳類IGRPに完全に相同な、8~10アミノ酸長のオリゴペプチドと組み合わせ、ここで、該オリゴペプチドが、前記したように、ヒトMHCクラスI分子に結合でき、前記したように、該オリゴペプチドに結合できるMHCクラスI分子を伴い、ここで、該オリゴペプチドもしくは該MHCクラスI分子が更に、前記したような検出可能な標識を含み；

20

c. 該オリゴペプチドに特異的に、いずれかのCD8⁺T細胞が結合するかどうかを決定する

ことにより、該哺乳類におけるIGRPに対して反応性のCD8⁺T細胞の存在を決定することを含む。これらの実施形態では、該オリゴペプチドに結合するCD8⁺T細胞は、該哺乳類が1型糖尿病のリスクに晒されているかもしくは1型糖尿病を持っていることを指し示す。

30

【0082】

好ましい実施形態では、これらの方法において使用されるオリゴペプチドは、配列番号1もしくは配列番号2に少なくとも90%の相同性を持つ。上記の他の診断方法に関して、該決定ステップは、好ましくは、細胞選別機もしくは標識細胞計数機を使用して、標識されたCD8⁺T細胞を計数することにより、または、該標識が観測され得る条件下での顕微鏡観察により、または、該CD8⁺T細胞の活性化を測定することにより、例えばELISpotアッセイを使用してインターフェロン産生を測定することにより、実施される。

【0083】

上記の全ての処理もしくは診断方法は、哺乳類を処理するための医薬品製造のための、無菌医薬調製品における二次的な医療的使用の実施形態、例えば、YLKTN(A/I/L/V)FL、FLWSVFWLI、(T/A)YY(G/T)FLNFM、LR(L/V)(F/L)(G/N)IDLL、KWCANPDWI、およびSFCKSASIPからなる群から選択される配列を含むオリゴペプチドもしくはポリペプチドの使用を示唆するものであり(ここで、該哺乳類は、1型糖尿病のリスクに晒されているか1型糖尿病を持っており、該哺乳類に、該オリゴペプチドもしくはポリペプチドを、IGRPに対して反応性のT細胞を抑制するのに充分、投与することによる)、本願請求項により示唆されるこのような二次的な医療的使用の実施形態全てが、本明細書において特定され目論まれる。

40

【0084】

50

本発明の好ましい実施形態が、以下の実施例に記載される。本願請求項の範囲内の他の実施形態は、本明細書に開示されるような本発明の明細書もしくは実施例の参酌から、当業者に明らかとなる。本願実施例と共に、本願明細書は例示的であるとのみ考えられるよう意図されており、本発明の範囲および思想は、本願請求項により指し示される。

【実施例】

【0085】

実施例1．糖尿病における罹患性病原性T細胞により標的とされた抗原の同定

本実施例の要約

CD8⁺T細胞は、自己免疫(1型)糖尿病において、インシュリン産生膵臓細胞の破壊には必須である。未だ、それらの抗原標的はかなり未知である。ここに我々は、NODマウスにおける罹患集団の病原性CD8⁺T細胞の細胞標的が、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク(IGRP)であることを明らかにする。ヒトIGRP遺伝子は、糖尿病感受性遺伝子座に位置し、このことは、IGRPが、ヒト1型糖尿病における病原性T細胞に関する抗原でもあり、これゆえ、診断および治療アプローチに関する新たな標的であることを指し示す。

10

【0086】

材料および方法

マウス

NOD/Ltマウスが、同胞交配により維持された。8.3-TCR - 遺伝子導入NODマウス(8.3-NOD)が、Verdaguerら、1997年に記載されている。全てのマウスがSPF条件下に維持され、動物愛護に関するホスピタリティガイドラインに従って使用された。

20

【0087】

MHCクラスI関連ペプチド

H-2K^d分子が、モノクローナル抗体SF1-1.1および以前に報告された(Coxら、1997年)ように抽出されたそれらの関連ペプチドを使用して、 1.4×10^{10} インターフェロン処理NIT-1膵臓細胞(Hamaguchiら、1991年)から、免疫親和性を用いて精製(イムノアフィニティ精製)された。ペプチド抽出物は、報告されているように(Pierceら、1999年)逆相HPLCを2巡行うことにより、分画された。

30

【0088】

エピトープ再構築アッセイ

8.3CTLが、報告されているように(DiLorenzoら、2002年)NRPA7ペプチドのパルスを受けたマイトマイシンC処理NOD脾臓細胞を有する8.3-NODマウスからの脾臓細胞を培養することにより、生成された。CTLは、16時間の⁵¹Cr放出細胞毒性アッセイにおいて使用され、ペプチドのパルスを受けたRMA-S/K^d標的細胞(M.Bevan、ワシントン州立大、シアトル、WA、USAにより提供)の認識に関して、報告されたような(DiLorenzoら、2002年)エフェクター：標的比=40：1において、テストされた。合成ペプチドが、図面に指し示された濃度において使用され、 7×10^8 、 6×10^8 、および 2×10^9 NIT-1-細胞当量のペプチドがそれぞれ、1次元、2次元、および3次元HPLC分画アッセイに使用された。

40

【0089】

ペプチド解析

活性な2次元分画66が、逆相マイクロキャピラリーカラムにロードされ、自家組み立てFT-ICR MS搭載のマイクロESIにより分析され、これには、ナノ流体液体クロマトグラフィーおよびオンライン・溶出液分割機が備え付けられていた(Coxら、1997年；Pierceら、1999年)。簡潔には、該マイクロキャピラリーHPLCカラムからの溶出液は、1/19がESI MS分析のためにFT-ICR MS中へと向かい、残りの18/19がエピトープ再構築アッセイ用に96穴(ウェル)プレートの

50

ウェル中へと直接投入されるよう分割された。このようにして、各ウェルは、該質量 (MS) スペクトルデータ中での1セットのスキャンに相関させることができた。CTL活性であった領域において溶出し、その活性-溶菌プロファイルに類似した溶出プロファイルを持っていたペプチドの質量 (MS) が、抗原候補としてマークされた。良い候補は、800~1,600ダルトン (Da) のデコンボリューション質量 (M+H)⁺ を持っていたが、この質量範囲が、MHCクラスI分子から溶出したペプチドの特徴であった。

【0090】

配列解析および抗原候補合成

CAD質量 (MS、マス) スペクトルが、ThermoFinniganイオントラップ (捕捉) 質量分析計 (LCQ) を使用して、選択されたペプチド候補に関して記録された。候補の質量は、クロマトグラフィーの進行が終わるまで、標的とされた。候補ペプチド (VYLKTNVFLおよびIYQKAFDLI) が、Gilsonペプチド合成機 (AMS422モデル) を使用して、標準的なFmocの化学により合成され、逆相HPLCにより>95%まで精製された。候補抗原配列は、CADスペクトルを合成ペプチドのものと比較することにより確かめられた。更なる配列の確認と、1細胞当たりのコピー数の推測は、該活性分画を分取し、抗原イオンの潤沢さを、既知濃度においてスパイクされた合成抗原を用いた同一の分取物と比較することにより、決定された。合成および天然に作られたペプチドの共溶出は更に、該抗体の同一性を確認した。

10

【0091】

合成ペプチド

NRP-A7 (KYNKANAFLL)、NRP-V7 (KYNKANVFL)、INSB₁₅₋₂₃ (LYLVCGERG)、INS-I9 (LYLVCGERI)、TUM (KYQAVTTTL)、およびG6Pアーゼ (KYCLITIFL) ペプチドが、オートメーション化 (自動化) されたペプチド合成機 (Applied Biosystems model 433A) において、Fmocの化学を利用する標準的な固相法により合成され、それらの同一性が、質量分析 (MS) により確認された。

20

【0092】

一過性トランスフェクション

COS-7細胞が、Karttunenらにより1992年に報告されたようなDEAE-デキストランプロトコルを利用して、トランスフェクションされた。前記MHCクラスI分子 (H-2K^d もしくはH-2D^b) 発現構築体用に10ng/mLのDNAが、濃縮されたIGRP発現構築体と共にもしくは図面中指し示されたようにベクター単独で使用された。別々の培養が、H-2K^d 単独でトランスフェクションされ、IGRP₂₀₆₋₂₁₄ ペプチド濃度を変動させながら、パルス処理された。8.3CTLとの共培養後、T細胞応答が、ELISAにより、IFN- の放出として測定された。

30

【0093】

T細胞受容体のトランスフェクション体

以前に単離されたNOD由来細胞自己反応性MHCクラスI拘束T細胞クローンAI4、AI12.B1.1、AI12.B1.2、AI12.B1.3、AI15.A10、AI15.F5 (DiLorenzoら、1998年) ならびに8.3 (Verdaguerら、1997年) からのT細胞受容体が、Serrezeらにより2001年に記載されたように、TCR⁺T細胞ハイブリドーマ58 (TCRの鎖およびCD8 を発現するよう操作され、H.-C. Chang, Dana Farber, Boston, MA, USAにより提供) において発現された。TCR発現が、CD3 (145-2C11) に対する抗体を使用した、成長しつつあるクローンのフロー・サイトメトリー分析により証明された。28 において終夜インキュベートされたRMA-S/K^d 細胞が、図面中に指し示された通りの濃度において、外から加えられた合成ペプチドを提示するのに使用された。このTCRトランスフェクション体によるペプチド認識が、以前に記載されたように (Serrezeら、2001年) IL-2産生により測定された。

40

50

【0094】

H - 2 K^d 安定化アッセイ

RMA - S / K^d 細胞が 28 において終夜培養され、28 において1時間、完全 D MEM においてペプチドのパルスを受け、37 において3時間、インキュベートされ、洗浄され、抗 H - 2 K^d モノクローナル抗体 SF 1 - 1 . 1 を用いて染色され、FITC 共役ポリクローナルヤギ抗マウス抗体を用いて逆染色され、フロー・サイトメトリーにより分析された。ペプチドのパルスを受けなかった細胞における H - 2 K^d の平均蛍光強度を、ペプチドのパルスを受けた細胞のものから引き算することにより、データが算出された。

【0095】

テトラマー染色およびフロー・サイトメトリー（フロー細胞計算）

脾臓関連および末梢血由来 CD 8⁺ T 細胞が、以前に記載されたように (Amrani ら、2000年; Trudeau ら、2003年) NOD マウスから単離された。テトラマーが、以前に記載されたように (Amrani ら、2000年) 調製され使用された。

【0096】

結果および議論

糖尿病原性で 8 . 3 似の CD 8⁺ T 細胞集団により天然に認識される脾臓 細胞抗原を同定するために、我々は、免疫親和性クロマトグラフィーにより、NOD 由来脾臓 細胞株 NIT - 1 から、H - 2 K^d MHC クラス I 分子を精製した。ペプチドは H - 2 K^d 分子から溶出し、逆相液体高速クロマトグラフィー (HPLC) により分画された。フラクション (分画、複数) はそれらの、ペプチドのパルスを受けた標的細胞の 8 . 3 細胞毒性 T リンパ球 (CTL) 媒介溶血を惹起する能力について、テストされた (図 1 A)。その活性ピークを構成するフラクション (複数) が貯えられ、異なる条件下のもう1つ別の回の HPLC に付された。活性な単一ピークが観察された (図 1 B)。2次元フラクション 66 が再度クロマトグラフィーに付され、その溶出液の一部が、ナノ流液体クロマトグラフィーおよびオンライン・溶出液分割器を備えたフーリエ変換イオン・サイクロトロン共鳴質量分光器 (FT - ICR MS) における電気噴霧イオン化法 (ESI) により、分析された。この分割実験に関しては、溶出液の一部が、エピトープ再構築活性の決定用に 96 穴プレート中に入れられ、残りが該質量分光器へと向けられた。8 . 3 CTL による認識に関するペプチド・フラクション・テストは、単一の活性ピークを与えた (図 1 C)。該エピトープ再構築アッセイからの溶血プロファイルを有する追加された活性フラクションにおいて観察されたイオンの潤沢さを比較することにより、候補ペプチドが同定された (図 1 D)。100 を超えるペプチド候補が、そのスキャン・ウィンドウ中に存在していた。これらのうち約 35 が、該ウィンドウ (範囲) 内に完全に溶出した。候補が、それらのイオンの潤沢さの曲線とその溶血プロファイルとの間の整合性の拡張に基づいて、ランク付けされた。最良の候補および非常に潤沢に後から溶出した1つのペプチドについての潤沢さの曲線だけが、図 1 D に示される。FT - ICR MS のミリマスレベルの精確さの能力が、< 0 . 1 の質量単位異なる共溶出ペプチドが容易に区別されるようにし、該機器の検出限界 (2 ~ 10 原子モル) が、1細胞につき僅か数個存在しているペプチド候補を検出することを可能にした (Martin ら、2000年)。

【0097】

潤沢さの曲線と溶血プロファイルとの間の整合性に基づけば、最良のペプチド候補は、最多ではないが、2つ荷電した1同位体の 548 . 845 m/z を持つものであった (図 1 D)。配列解析は VYXKTNVFX (図 1 E) を与え、ここで X は I もしくは L を表し、同一質量のアミノ酸は、この機器では差をつけられない。同様に、潤沢に後から溶出したペプチド (555 . 835⁺ m/z) の配列が、XYQKAFDXX であると決定された (S . M . Lieberman ら、データ示さず)。タンパクデータベース検索は、VYXKTNVFX および XYQKAFDXX 各々についての完全な1つの適合物を与えた (それぞれ、VYLKTNVFL および IYQKAFDLI)。これらのペプチドが合成され、エピトープ再構築アッセイにおいてテストされた。図 1 F は、VYLKTNV

10

20

30

40

50

FLが8.3により認識される天然細胞ペプチドであること、ならびに、それに対して活性化された8.3CTLが、前記した合成アゴニストNRP-A7およびスーパーアゴニストNRP-V7について(Anderstonら、1999年; Amraniら、2001年)等価用量依存的に応答し、最大値の半分の活性が約50pMのペプチド濃度において観察されたことを、明らかにするものである。約100コピーのVYLKTNVFL/H-2K^dが、1つのインターフェロン(IFN)- γ 処理NIT-1細胞につき存在している。

【0098】

完全NCBI非多重タンパクデータベースのBLASTサーチが結果的に、マウス膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク(IGRP)の206~214番残基に対応するVYLKTNVFLについての唯一の正確なヒットを与えた(Ardenら、1999年)。この抗原ペプチド源が本当にIGRPであることを確かめるために、我々は、IGRPに関する種々の濃度の発現構築物、もしくはベクターのみ、H-2K^d発現構築物と一緒に用いて、COS-7細胞をトランスフェクションさせ、8.3CTLによる認識についてテストした。ベクターのみではなくIGRPを用いてトランスフェクションされた細胞は8.3CTLを刺激し、共培養時、用量依存的にIFN γ を放出した(図1G)。この応答は、H-2K^dの発現を必要とした。H-2D^b発現構築物を用いたIGRP構築物のトランスフェクションが結果的に、ベクターのものと同様のT細胞応答プロファイルを与えた(S.M.Liebermanら、データ示さず)。我々の知識では、IGRPは以前には、NODマウスもしくは1型糖尿病患者におけるT細胞もしくはB細胞抗原としては示されていなかった。これゆえ、IGRPはNODマウスにおいて、罹患性で病原性の8.3似のT細胞集団の天然の標的であり、新たな細胞自己抗原を提示する。

【0099】

我々は以前に、若いNODマウスの早期インシュリン炎病巣から、一連の6種の、未知の抗原特異的細胞自己反応性CD8⁺T細胞クローンを単離した(AI4、AI12.B1.1、AI12.B1.2、AI12.B1.3、AI15.A10、およびAI15.F5と命名、DiLorenzoら、1998年)。我々はもっと早くに、AI12.B1.3が、8.3のものとはほぼ同一のV17-J42TCRの鎖を発現し、NRP-A7を認識することを報告していた(Serrezeら、2001年)。これゆえ、我々は、それがIGRP₂₀₆₋₂₁₄をも認識するであろうと仮定した。我々のパネル中のこのおよび他の全てのクローンがIGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性であるかどうかをテストするために、我々は、それらのIGRP₂₀₆₋₂₁₄を認識する能力をアッセイした。AI12.B1.3は、NRP-V7およびNRP-A7同様、IGRP₂₀₆₋₂₁₄を認識したが、以前に同定された抗原性インシュリンペプチド(INS_{B15-23})もしくはそのI9変異体(INS-I9)を認識しなかった(Wongら、1999年; Wongら、2002年。図2)。それで、8.3クローンタイプが唯一のものではない。罹患性V17-J42TCRの鎖を分け合う他の細胞自己反応性CD8⁺T細胞も、IGRP₂₀₆₋₂₁₄を認識する。重要なことに、AI15.F5はV17-J5TCRの鎖および8.3に類似のTCRの鎖を発現するものであり、これもまたIGRP₂₀₆₋₂₁₄およびNRP-V7に反応したが、それはNRP-A7を認識しなかった(図2)。このことは、IGRP₂₀₆₋₂₁₄に対する反応性が、V17-J42TCRの鎖を発現するT細胞に厳しく限定されないことを実証する。更に、NRP-V7を認識し、NRP-A7を認識しないAI15.F5の能力は、NRP-V7/H-2K^dテトラマーが、NRP-A7テトラマーが行うよりも大きな集団の膵島T細胞を染色するとの最近の観察(Trudeauら、2003年)と一致している。これゆえ、NRP-A7の反応性の以前の測定値(Amraniら、2000年)は、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性T細胞集団の罹病性を低く推定している。

【0100】

NOD由来糖尿病病原性CD8⁺T細胞クローンに対する唯一他の既知天然リガンドは、

10

20

30

40

50

H-2K^dにより提示されるINS B₁₅₋₂₃である(Wongら、1999年)。このインシュリンペプチドは、H-2K^dへの非常に乏しい結合しか呈さず、このことは結果的に、胸腺におけるT細胞のネガティブ・セレクションに関してペプチドの不十分な提示を与えることが、示唆されている(Wongら、2002年)。乏しいMHC結合が一般的に、自己抗原ペプチドの1特徴であるかどうかを決定するために、我々は、IGRP₂₀₆₋₂₁₄のH-2K^dに結合する能力をテストした。H-2K^d安定化アッセイにおいて、IGRP₂₀₆₋₂₁₄は良好なMHC結合を実証し、合成リガンドNRP-V7およびNRP-A7のそれに匹敵し、テストされた最高ペプチド濃度においてさえ殆ど検出できなかったINS B₁₅₋₂₃のそれより顕著に良好であった(図3)。NRP-V7およびNRP-A7のように、IGRP₂₀₆₋₂₁₄は予期されたH-2K^dアンカー残基、つまり2番目の位置のYおよび9番目の位置のLを含有する一方、INS B₁₅₋₂₃は9番目の位置においてGを持っており、これはH-2K^dへのその結合を好ましくないものにする。9番目の位置のGがIにより置き換えられると、その結果のINS-I9ペプチドは、H-2K^dへの改善された結合を示す(図3、Wongら、2002年)。更に、マウスIGRPのタンパク配列が、良好なMHC結合ペプチドをするようデザインされた幾つかの異なるアルゴリズム(SYFPEITHI(Rammenseeら、1999年)、BIMAS(Parkerら、1994年)、もしくはRANKPEP(Rechleら、2002年))により解析されると、IGRP₂₀₆₋₂₁₄は一貫して、最良のH-2K^d結合物の間にランクする(それぞれ3番目、1番目、もしくは2番目)。併せると、これらの観察は、乏しいMHCクラスI結合が、自己反応性CD8⁺T細胞により認識される自家ペプチドの要件であることを指し示す。

【0101】

最近の研究が、NRP-V7/H-2K^dテトラマーがex vivoにおいて直接、脾臓および末梢血由来NRP-V7反応性CTLを検出し定量するのに使用され得ることを実証した(Trudeauら、2003年)。しかしながら、ex vivoにおいて直接の、自己反応性T細胞を同定するテトラマー研究における天然の自己ペプチドの使用は、メラノサイト抗原特異的T細胞に関してのみ報告されている(Pettetら、2002年)。3残基だけ8.3スーパーアゴニストNRP-V7(KYNKANVFL)とは異なる天然IGRPペプチドが同様に、罹患性細胞自己反応性T細胞集団を定量するのに使用され得るかどうかを評価するために、我々は、9および20週齢の非糖尿病NODマウスの脾臓および末梢血両方からT細胞を単離し、それらをIGRP₂₀₆₋₂₁₄、NRP-V7、もしくはネガティブ・コントロール・ペプチド(TUM)テトラマーを用いて染色した。9および20週齢のマウスからのかなりの割合の脾臓T細胞がIGRP反応性であり、IGRP反応性細胞集団が末梢血中、はっきりと測定された(図4)。重要なことに、9および20週齢のマウスの脾臓および末梢血両方のサンプルについて、テトラマーにより染色されたCD8⁺T細胞集団の規模は、検出にIGRP₂₀₆₋₂₁₄が使用されてもNRP-V7テトラマーが使用されても、同様であった。これゆえ、該天然ペプチドは、ex vivoにおいて直接、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性脾臓および末梢血T細胞を検出し定量するのに使用され得る。

【0102】

1型糖尿病のような自己免疫疾患におけるCD8⁺T細胞の役割が、より広く認識されてきている(Liblauら、2002年)。しかしながら、自然に起こる自己免疫疾患におけるこれら病原性T細胞の天然リガンドについての知識は、極めて限られている。ここに我々は、IGRPを、NODマウスにおける病原性CD8⁺T細胞の罹患性集団により認識される天然ペプチド源として同定した。IGRPは、脾臓細胞において発現される(細胞においてはより低い度合い)脾臓特異的タンパクであり、約50%の同一性を、肝臓のグルコース-6-ホスファターゼ酵素(G6Pase)の触媒サブユニットと分け合う(Martinら、2001年)。重要なことに、IGRP₂₀₆₋₂₁₄は、9つの位置のうち6つにおいて、マウスG6Paseの相同的な残基(KYCLITIFL)とは異なる。従って、この肝臓G6Paseペプチドは、8.3CTLにより認識さ

れない (S. M. Liebermanら、データ示さず)。G6Paseに関するその相
同性にも関わらず、IGRPに関しての触媒活性は実証されておらず、その機能は未知で
ある (Ardinら、1999年; Martinら、2001年)。その配列から、それ
は膜9回貫通ER-residentタンパクであると予見される (Ardenら、19
99年)。そのRNAの潤沢さは、IGRPを、中~高濃度において発現される細胞遺
伝子の間とするものであり (Id.)、このタンパクは容易に免疫組織化学により、膵島
において検出され得る (Martinら、2001年)。興味をかき立てられることに、
ヒトIGRP遺伝子は、染色体2q28~32にマッピングされ (26)、糖尿病罹病性
遺伝子座IDDM7 (2q31) をオーバーラップするが (PociotおよびMcDe
rmott、2002年)、これに応答性の遺伝子は未知である。

10

【0103】

IGRP反応性T細胞集団は、最も早期のNOD膵島浸潤物であっても、これの実質的
な成分を構成し (図2) (DiLorenzoら、1998年)、その病原性が明確に確
立されている (Amraniら、2000年; Trudeauら、2003年; Ande
rsonら、1999年; Nagataら、1994年; Verdagueraら、199
7年)。これゆえ、IGRPに対する応答は、自己免疫糖尿病において、CD8⁺T細胞
による細胞破壊に至る最初の現象の1つであるように見える。今、8.3似のT細胞に
より標的とされる天然細胞抗原としてのIGRPの同定に伴って、それらの進展、活性
化、および拡大の臨床的な側面を、更に調べることができる。既に、この知識は、NOD
マウスにおけるこの病原性T細胞集団の抗体結合力の突然変異に
応答するメカニズムの解明を可能にしている (Hanら、投稿中)。加えて今や、同様な罹患性IGRP反応性T
細胞集団が、ヒト1型糖尿病の病理に関わっていることを確かめることが、可能となる。
NODマウスにおける幾つかの細胞自己抗体が、患者において同定されたものをオーバ
ーラップし (TischおよびMcDevitt、1996年)、ヒトIGRP遺伝子は
糖尿病罹病性遺伝子座へとマッピングされるので、IGRPがヒトでの疾患の進行におけ
る有意な重要性を実証するものと思われる。

20

【0104】

実施例2. IGRP₂₀₆₋₂₁₄を使用した、1型糖尿病からのNODマウスの保護
該NOD雌マウスが3.5週齢から、100μgのIGRP₂₀₆₋₂₁₄ペプチド (リン酸緩衝化生理食塩水中) を腹腔内経路で用いて処理された。40匹のマウスが、コン
トロールとして使用された。各コントロールマウスは、TUMペプチド (KYQAVTT
TL) を用いて処理された。該マウスは、最初の3回の注射については2週毎にペプチド
の注射を1回受け、次いでその後、3週毎に注射を1回受けた。26匹のコントロールマ
ウス (約65%) に対して、約25週齢において、該IGRP₂₀₆₋₂₁₄マウスの2
匹 (20%) が糖尿病を進展させた。糖尿病を進展させている2匹の該マウスは、NRP
-V7/K^dテトラマーを用いたT細胞染色により求めたところ、膵島中にIGRP<sub>20
6-214</sub>反応性T細胞を持たなかった。このことは、*in vitro*でのIGRP<sub>2
06-214</sub>およびNRP-V7を用いた刺激時に、これらのマウスからの膵島由来T細
胞がインターフェロンを産生するかどうかを求めることによって確認された。(イン
ターフェロン産生) 対 (ネガティブコントロールペプチドであるTUMを用いて刺激さ
れた細胞) において、有意な差はなかった。これら2匹のマウスの1匹において、その膵
島が、IGRP₂₀₆₋₂₁₄以外の2つのIGRPペプチドに
応答するT細胞を含有した。これらの結果は、IGRP₂₀₆₋₂₁₄に対する寛容が1型糖尿病の進展に対して
保護し、他のIGRPペプチドが1型糖尿病の進展に寄与し得ることを指し示す。

30

40

【0105】

他のIGRPペプチドが1型糖尿病の進展に寄与し得るという主張を更に裏付けること
に、本発明者らは、マウスIGRPの296~304番アミノ酸残基において存在するペ
プチドCALTSLTMMが、MHCクラスI分子H-2D^bにより提示されることをも
発見している。

【0106】

50

実施例 3 . 抗 I G R P 自己免疫操作による糖尿病予防 : 低親和性に変えられたペプチドリガンドの高い効率

本実施例の要約

抗原療法は、臓器特異的自己免疫の予防に関して、大いなる確約を保っている。しかしながら、ヒトでの限られた臨床試験がほぼ必ずや頓挫してしまっており、これは恐らく、処理の選択をガイドする原則が、よく定まっていないうえにまだからである。ここに我々は、膵島特異的グルコース - 6 - ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク (I G R P ₂₀₆₋₂₁₄) からのエピトープを認識する C D 8 ⁺ T 細胞、すなわち、マウス自己免疫糖尿病における自己反応性 T 細胞の罹患性集団の野生型または改変ペプチドリガンドの抗糖尿病特性を検証した。我々は、肥満でない糖尿病マウスにおける膵島関連 C D 8 ⁺ T 細胞が、I G R P の幾つかの更なるエピトープを認識すること、ならびに、これらの細胞が、I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 特異的寛容を誘導するよう計画されたペプチド処理プロトコール結果における役割を演じることを示す。I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8 ⁺ T 細胞を標的とする改変ペプチドリガンドは有効に糖尿病の進行を抑えられたが、低抗体結合力 I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 特異的クローンタイプを割愛した用量においてのみであった。対照的に、比較的高用量のこれらのリガンドにより、I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 T 細胞のプールの完全に近い欠損が結果的に、次に優性な I G R P エピトープ反応性 T 細胞特性体の促進された動員をもたらし、糖尿病の進行を有意に阻害しなかった。これらの結果は、臓器特異的自己免疫におけるペプチド療法が、非病原性低抗体結合力クローンタイプによる標的臓器リンパ球のニッチの占有を促す条件下では、最も有効であることを示唆する。

【 0 1 0 7 】

はじめに

溶液での自己抗原性タンパクもしくはペプチド投与は、自己免疫疾患実験モデルにおいて、自己免疫の開始および/または進展を鈍化させ得る (W r a i t h ら、1989年 ; M e t z l e r および W r a i t h、1993年 ; L i u および W r a i t h、1995年 ; A n d e r t o n および W r a i t h、1998年 ; K a r i n ら、1994年) 。しかしながら、同様な戦略を用いたヒトでの限られた臨床試験が、ほぼ必ずや頓挫してしまっている (W e i n e r、1993年 ; T r e n t h a m ら、1993年 ; M c K o w n ら、1999年 ; P o z z a l l i ら、2000年 ; D . P . T . - T . D . S . グループ、2002年 ; K a p p o s ら、2000年 ; B i e l e k o v a ら、2000年) 。このことは、処理の選択および条件をガイドする原則がよく定まっておらず、結果として、ヒトでの適用には不適切であることを示唆するものである。

【 0 1 0 8 】

それらの実験のもう片方 (c o u n t e r p a r t) とは異なり、自然な臓器特異的自己免疫疾患は結果的に、多数の抗原中の数多くのエピトープに対する複雑な応答からもたらされ、これは自然に、確率的でしばしば予見不可能な流れの中にあるものである。この複雑さは、同一エピトープを認識するリンパ球クローンが、広い範囲内の抗体結合力で抗原 / M H C と結びつき、その強度が病原性の潜在性と相関するとの事実により、複雑化されたものである (A m r a n i ら、2000年 ; S a n t a m a r i a、2001年 ; L i b l a u ら、2002年) 。従って、自己免疫の予防のための如何なる免疫における戦略の結果も、自己抗体 (単数もしくは複数)、用量、処理周期、ならびに投与経路および投与形態により、影響を受け易い。不運なことに、処理結果に対するこれら変動の個々の寄与についての我々の現時点での見解は、極めて限られている。

【 0 1 0 9 】

ヒトおよび肥満でない糖尿病 (N O D) マウス両方における 1 型糖尿病 (T 1 D) は、T リンパ球による膵臓細胞の選択的破壊から結果的にもたらされる自己免疫疾患である。ヒトおよびマウスの T 1 D は、増加するリストに挙げられた抗原に対する複雑な B 細胞および C D 4 ⁺ T 細胞応答を含んでいる (L i e b e r m a n および D i L o r e n z o、2003年) 。T 1 D の開始ははっきりと、自己反応性 C D 4 ⁺ T 細胞の動員を必要と

するが、T1Dの開始および進展はCD8⁺T細胞依存性であるとの動かし難い証拠がある(Santamariaら、2001年; Liblauら、2002年)。他の人達および我々は、NODマウスにおける全ての膵島関連CD8⁺細胞の大きな分画が、高度に相同的なTCR鎖(V17-J42)を使用するものであることを示しており(Santamariaら、1995年; Verdaguerら、1996年; Verdaguerら、1997年; DiLorenzoら、1998年)、同一のミモトープ(mimotope、NRP-A7)を認識するものである(Andersonら、1999年)。これらのT細胞は既に、NOD膵島CD8⁺の最も早期の浸潤物の重要成分であり(DiLorenzoら、1998年; Andersonら、1999年; Amraniら、2001年)、糖尿病原性であり(Verdaguerら、1996年; Verdaguerら、1997年)、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパクからのペプチド(IGRP₂₀₆₋₂₁₄)を標的とし(Liebermanら、2003年)、珍しく末梢に多い(循環CD8⁺細胞の約1/200、Liebermanら、2003年; Trudeauら、2003年)。特記すべきことに、NODマウスにおけるインシュリン炎の糖尿病への進行は、循環IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞のプールの巡繰りの拡大を、および、その膵島関連対応部(counterpart)の抗体結合力の成熟を、必ずや伴う(Amraniら、2000年)。併せて考えると、これらのデータは強力であり、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞が、マウスのT1Dの開始および/または進行において、鍵となる役割を演じるとの考えを裏付ける。興味をかき立てられることに、ヒトigrp遺伝子は、染色体2q28~32にマップピングされるが(Martinら、2001年)、T1D罹患性遺伝子座たるIDD7(2q31)(PociotおよびMcDermott、2002年)をオーバーラップし、IGRPもヒト糖尿病原性応答の標的であるかも知れないとの可能性を引き起こす。

【0110】

可溶性ペプチド(アジュバントなし)の投与は、抗体特異的T細胞寛容を誘導する有効な方法である(Aicheleら、1994年; Toesら、1996年)。以前我々は、可溶性NRP-A7ペプチドを用いた糖尿病発症前NODマウスの繰返し処理が、ペプチド/MHCに関して最高の親和性を有するTCRを発現するクローンタイプを選択的に欠損させることにより、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞サブセットの抗体結合力の突然変異を鈍化させることを示した(Amraniら、2000年)。これらの観察は、病原性T細胞集団の抗体結合力の突然変異が、自己免疫における疾患を顕在化させる良性の炎症の進行において鍵となる現象であることを示唆した。しかしながら、それらはまた、NRP-A7の抗糖尿病原としての活性が、「高抗体結合力のニッチのクローンタイプ」(NRP-A7処理により消失される)の「低抗体結合力(および潜在的に抗糖尿病原性の)クローンタイプ」による占有により媒介された可能性をも引き起こす。この仮説をテスト(検証)するために、我々はここに、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞に関して、部分的なアゴニスト活性、完全なアゴニスト活性、もしくはスーパー(本来のものを凌駕する)アゴニスト活性を有するAPLを同定し、それらの抗糖尿病原活性を、広範な用量に亘りin vivoにおいて比較した。

【0111】

我々のデータは、野生型のNODマウスが自然に、数多くのIGRPエピトープに対する高度に罹患性のCD8⁺T細胞応答を蓄積すること、ならびに、IGRP₂₀₆₋₂₁₄応答性CD8⁺T細胞サブセットを選択的に標的とすることを狙いとしたペプチド治療が、もしそれが非糖尿病原性低抗体結合力クローンタイプを欠損しない場合有効であることを示す。高用量のIGRP₂₀₆₋₂₁₄もしくは高親和性APLを用いた、ニッチの罹患性IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性T細胞の完全な欠損は、次に優性なエピトープ特異的IGRP反応性T細胞特性体の促進された動員と関連し、糖尿病の進行を鈍化させなかった。これらのデータは、自己免疫における抗原特異的免疫療法の計画のための重要な思索を喚起する。

【0112】

10

20

30

40

50

材料および方法

マウス、細胞株、および抗体

NRPA7 / IGRP₂₀₆₋₂₁₄ 反応性、H-2K^d 制限 細胞反応性 CD8⁺ T 細胞クローン NY 8.3 の TCR 再配列体を発現した 8.3 NOD マウスが、記載されている (Verdaguer ら、1997 年)。NOD マウスは、Taconic Farms (German town, NY) から購入された。抗 Lyt-2 (CD8) (53-6.7)、抗 L3T4 (IM7)、抗 V_β 8.1 / 8.2 (MR5-2)、抗 H-2K^d (SF1-1.1)、および抗 H-2D^b (KH95) mAbs が、PharMingen (San Diego, CA) から購入された。

【0113】

ペプチドおよびペプチドライブラリー

本研究用に APL を同定するのに使用されたペプチドライブラリーは、多数回合成技術および標準 FMOC 化学 (Chiron Technologies, San Diego, CA) (Amrani ら、2001 年) を利用して、調製された。第 1 回のスクリーニングは、NRP 主体のジペプチドライブラリーを使用して行われた。応答を惹起できたライブラリーは、NRP の単一アミノ酸変異体を探すことにより、解析された。部分的なアゴニスト活性、完全なアゴニスト活性、もしくはスーパーアゴニスト活性を表した代表的な APL (図 1) が、*in vivo* 実験用に選ばれた。あつらえられた特定の単一ペプチドが、rpHPLC により > 80% 純度まで精製され、イオン噴射質量分析 (Chiron Technologies, San Diego, CA) により、配列決定された。ペプチドは pH 7.4 において、40% アセトニトリル (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) 中、0.1 M の HEPES (Sigma, St. Louis, MO) 中 10 mg/mL として再懸濁され、-80 °C において分取され、使用前に PBS 中に更に再懸濁された。この再懸濁「戦略」は、Amrani ら、2000 年において使用されたものとは異なり、PBS 中での再懸濁およびマウス中への注射直前に、真空遠心分離により、ペプチド希釈ストックの濃縮を避けるものである。後者の「戦略」は結果的に、乾燥させたペプチドの再溶解における難しさのために、材料の損失を招く。H-2K^d もしくは H-2D^b に結合する IGRP ペプチドライブラリーは、Rankpep (<http://mif.dfci.harvard.edu/cgi-bin/rankpep.cgi>) および SYFPEITHI (<http://syfpeithi.bmiheidelberg.com>) を用いて IGRP アミノ酸配列をスクリーニングすることにより、計画された。> 39 のスコア (rankpep) もしくは > 25 のスコア (syfpeithi) を有すると予測された MHC 結合物から構成されたペプチドセット (pepset) が、上記のように合成、再懸濁され、10 μM において *in vitro* アッセイに使用された。

【0114】

NOD 臍島由来 CD8⁺ T 細胞株の生成

ペプチド処理 NOD マウスもしくは無操作 NOD マウスからの臍島由来 CD8⁺ T 細胞が、0.5 U/mL のタケダ rhIL-2 (24 穴プレートにおいて 10 ~ 50 臍島 / 穴) を含有する完全培地 (CM: 10% 胎児牛血清含有 RPMI 1640 培地) において臍島を培養することにより、生成された。臍島から該培地中へと移動した *in vivo* 活性化 IL-2R⁺ リンパ球が、臍島分離の 6 ~ 9 日以内に、機能に関するアッセイにおいて使用された (Amrani ら、2000 年; Anderson ら、1999 年)。

【0115】

増殖アッセイ

8.3 NOD マウスからの内因性もしくは NRP-A7 分化 (下記参照) 脾臓 CD8⁺ T 細胞 (2 × 10⁴ / 穴) が 5% CO₂ において、37 °C 3 日間、ペプチドのパルスを受け (0.01、0.1、および 1 μM) (線) 照射 (3,000 rad) された NOD 脾臓細胞 (10⁵ / 穴) と共に、2 通りインキュベートされた。培養は、培養および回収の最後の 18 時間の間、1 μCi の (³H) - チミジンのパルスを受けた。

10

20

30

40

50

【0116】

サイトカイン分泌

8.3 NODマウスからの内因性脾臓CD8⁺T細胞(2×10⁴/穴)が、37^oC 48時間、96穴プレートにおいてペプチドのパルスを受け(0.001、0.01、0.1、1および/または10μM)(線)照射されたNOD脾臓細胞(10⁵/穴)と共に、インキュベートされた。ペプチド処理NODマウスもしくは無操作NODマウスからの脾臓由来T細胞短期細胞株(2×10⁴CD8⁺T細胞/穴に調整)が同様にテストされたが、10μMのペプチドを使用した。その上清(100μL/穴)が、市販キット(Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA)を使用したELISAにより、IL-2、IL-4、および/またはIFN-γ含量について、2通りアッセイされた。 10

【0117】

テトラマーの染色

テトラマーが、Amraniら、2000年に記載されたように調製され、使用された。個々のマウスから手で拾い集められた脾臓が、0.5U/mLのタケダrhIL-2を補った完全培地中、7~9日間培養された。T細胞(20μLにつき10⁶個)が次いで、抗CD8FITC(クローンYTS169.4;0.5μg)およびテトラマー(85.5nM)を含有する洗浄媒体20μL(RPMI-1640中、0.2%重炭酸ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム、および2%FBS)中、氷上(氷浴中)45分間染色された。洗浄後、これらの細胞は、洗浄媒体中再懸濁され、フロー・サイトメータ(Becton Dickinson)を用いて分析された。平衡におけるテトラマー染色分析については、T細胞が、抗CD8FITC(クローンYTS169.4;0.5μg)および異なる濃度のテトラマー(8.55、17.1、42.75、および85.5nM)を含有する洗浄媒体20μL(RPMI-1640中、0.2%重炭酸ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム、および2%FBS)を用いて、室温において2時間染色された。洗浄後、細胞は、100μLの洗浄媒体中に再懸濁され、0.4%パラホルムアルデヒド中で固定され、フロー・サイトメータを用いて分析された。その見かけのK_d値は、蛍光単位のスキャッチャード・プロットに適合された線の傾きの反対の符号(負)の逆をプロットすることにより(CD8⁺集団のテトラマーの染色のメディアン(nM)対蛍光単位)求められた。 20 30

【0118】

H-2K^d安定化アッセイ

26において終夜培養されたRMA-SK^d細胞が4通り、96穴プレートにおいて10⁴細胞/穴にて播種され、26^oC 1時間、RPMI-1640、0.25%BSAにおいてペプチドのパルスを受け、37^oC 3時間インキュベートされ、洗浄され、抗-H-2K^d-FITCもしくは抗-H-2D^b-FITCを用いて染色され、MHCクラスI発現についての平均蛍光強度(mfi)が、フロー・サイトメトリーにより分析された(Anderersonら、1999年)。使用されたコントロールは、TUM(H-2K^dに結合するもの)、LCMV-GP33(H-2D^bに結合するもの)を包含し、ペプチドを包含しなかった。その解離定数(K_d)が、異なる濃度のペプチド(10、1、0.1、0.01、0.001μM)を使用することを除き、上記した実験を繰り返すことにより測定された。該K_d値は、RMA-SK^d細胞において、H-2K^d分子の50%を救い出すのに必要とされるペプチド濃度として計算された(10μMにおいて100%)。 40

【0119】

ペプチド処理

3~4週齢の同齢雌NODマウスが、PBS中1~100μgのペプチドを用いて腹腔内注射された。これが、7~8週まで2週間毎、その後3週毎、繰り返された。マウスは少なくとも28週齢まで、高血糖の進行についてモニターされた。APLの8.3CD8⁺T細胞寛容原活性が、8~15週齢の8.3NODマウスを、100μgのペプチドの1回のi.p.注射により処理することによって求められた。より高齢のマウス(28~ 50

30週齢)およびNRP-A7を用いたペプチド処理実験は、より若いマウスにおいて見られたものに統計的に類似した結果を与え、ペプチド処理からもたらされる遺伝子導入T細胞数の減少がマウスの齢に依存しなかったことを指し示した。マウスは処理1週後に屠られ、それらの脾臓がフロー・サイトメトリーにより、8.3CD8⁺T細胞の存在について分析された。

【0120】

統計分析

データは、1次回帰および分散分析であるMann-Whitney Uテストもしくは χ^2 (χ^2 検定)を利用して、比較された。

【0121】

結果

IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞に対するAPL

我々は第1に、NRP-A7に比較して異なる親和性をもって8.3-TCRと結合できるNRPA7を求めて探索した。この作業は、IGRP₂₀₆₋₂₁₄の発見前に首尾良く開始されたが、NRPの数多くの単一アミノ酸変異体を生成させ、それらの8.3CD8⁺T細胞応答を惹起する能力をテストすることを含むものであった(Amraniら、2001年)。NRP-I4が潜在的な「低抗体結合力」APL候補として選ばれたが、これは、それが部分的アゴニストとして振る舞ったからである。それは、内因性の8.3CD8⁺T細胞によるIFN- γ 分泌の引き金を引くことにおいては極めて効率良かったが、他の応答を誘導することにおいてはNRP-A7より有意に効率良くはなかった(図5)。NRP-V7が潜在的な「非常に高い抗体結合力」APLとして選ばれたが、これは、それが8.3CD8⁺T細胞において、NRP-A7(アゴニスト)より優れたアゴニスト活性を持っていたからである(図5)。これらのペプチドが事実、8.3CD8⁺T細胞により、異なる抗体結合力でもって認識された(それらは全て、RMA-SK^d安定化アッセイにより求められた場合、同様な抗体結合力でもってK^dに結合した。データ示さず)ことを確かめるべく、我々は、内因性8.3CD8⁺T細胞を染色する対応ペプチド/MHCテトラマーの能力をテストした。図6Aに示されるとおり、該テトラマーの染色強度は、異なるペプチドのまともに機能する抗体結合力と一致していた(図5)。これらのペプチドのまともに機能する抗体結合力も、それらの*in vivo*での寛容原としての活性と良く相関した。中~高抗体結合力でもってNRP-V7を認識するTCRを発現する(我々の未公表データ)8.3NODマウスの、NRP-V7の単回注射(PBS中100 μ g)を用いての処理は、NRP-A7もしくはNRP-I4を用いて処理された8.3NODマウスより少ない8.3CD8⁺脾臓細胞を含有した(図6B)。

【0122】

野生型NODマウス脾臓由来CD8⁺細胞を用いた実験は、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞によるこれらペプチド/K^d複合体の各々の差のある結合が、8.3-TCR発現細胞の特性ではないことを指し示した。NRP-I4テトラマーが、フロー・サイトメトリーによる検出について、その閾値を上回って、20週齢の野生型NODマウスの脾臓由来のT細胞を染色できなかった(データ示さず)一方、NRP-V7テトラマーは一般的に、NRP-A7テトラマー(図6C)より高い蛍光強度で染色した。抗体結合力の定量的測定が、これらの結果を確認した。NRP-V7テトラマーが、NRP-A7(図6D)より有意に低いK_d(より高い抗体結合力)で、9週齢のNODマウスの脾臓由来のCD8⁺細胞に結合した。全体としてこれらのデータは、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞が*in vitro*および*in vivo*両方において、増加した親和性で、NRP-I4、NRP-A7、およびNRP-V7を認識することを実証する。

【0123】

IGRP₂₀₆₋₂₁₄APLは、NODマウスにおいてT1Dの進行を押し留め得るが、狭い範囲内の用量および親和性でしかない。

我々は次に、特異的TCRに対しての個々のペプチド/MHC複合体の親和性によって

10

20

30

40

50

だけでなく、認識に利用可能であるペプチド/MHC複合体の絶対数(つまり、ペプチドの用量)によって定義される場合、上記ALPの抗糖尿病活性が「抗体結合力」の関数であるかどうかを調べた。これは、同齢の雌NODマウスを、広範な用量に亘って、TUM(ネガティブコントロール)、NRP-I4、NRP-A7、およびNRP-V7(PBS中)の繰り返し注射を用いて処理することによって、そして該マウスを糖尿病の進行について追跡することによって、行われた(図7A上図)。3~4週齢においてスタートして、マウスは処理開始後、2週毎(最初の3用量)もしくは3週毎、1回のペプチド注射をi.p.により受けた。マウスは、糖尿病の発症もしくはフォロー・アップ期間(28~32週)の終わりに屠られ、膵島関連IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞下位集団の大きさおよびテトラマー結合抗体結合力についての処理効果を調べた(図7A下図)。

【0124】

NRP-I4は、用量依存的に抗糖尿病性であった。それは、 $< 20 \mu\text{g}$ /単回注射にて与えられた場合、全く保護的ではなかったが、 $100 \mu\text{g}$ /単回注射にて与えられた場合、高度に抗糖尿病性であった(図7A上図)。衝撃的なことに、NRP-I4の保護効果は、 $100 \mu\text{g}$ /単回注射において、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺細胞サブセットの大量の欠損とよりも、むしろ膵島中への低抗体結合力IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺細胞と関連していた。これゆえ、これらのマウスの膵島中に含有されるNRP-V7反応性CD8⁺細胞の%(図7A下図、右y軸)および絶対数(図7B)は、TUM処理されたコントロールにおいて見られたものに類似していた。更に、NRP-I4処理マウスの膵島関連CD8⁺細胞は、TUM処理マウスの膵島由来のもの(左y軸)より有意に低い抗体結合力でもって、NRP-V7テトラマーに結合した(その値は図7Aに示され、これら2群のマウス間の違いを反映する)。これらの結果の最も論理的な解釈は、高用量NRP-I4処理の保護効果は、高抗体結合力IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺細胞の選択的欠損に由来したということである。この見方に一致して、NRP-A7、つまりIGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺細胞のより高親和性のリガンドは、NRP-I4($50 \mu\text{g}$ /単回注射)より低い用量においてマウスを糖尿病から保護し、これもまた、膵島内の低抗体結合力IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺細胞の蓄積と共に起こった(図7A下図)。これらのマウスの膵島中のNRP-V7反応性T細胞の絶対数は抑えられたが、TUM処理マウスに比較して、有意にはなかった(それぞれ、 $0.6 \times 10^5 \pm 0.3$ 対 $1 \times 10^5 \pm 0.3$)。

【0125】

しかしながら、高用量のNRP-I4および中用量のNRP-A7による保護が高抗体結合力クローンタイプの欠損のみによるとのこの解釈は、2つの予期せぬ観察のため、奇妙であった。第1に、高用量のNRP-A7($100 \mu\text{g}$ /単回注射)が無効であった。ここに我々は、稀釈されたストックから乾燥された材料を溶解させることによる(Amraniら、2000年)のとは反対に、ビヒクルを用いてペプチドの濃縮ストックを稀釈することにより接種体を調製したことが、記されるべきである。後者の戦略は結果的にペプチドの損失を与えるので(我々の観察)、以前のとある研究において(Amraniら、2000年)「 $100 \mu\text{g}$ 」用量で与えられた場合、NRP-A7が保護的であったということは、驚くべきことであるはずはない。第2の予期せぬ観察は、NRP-V7(NRP-A7より更に高い親和性の、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞のリガンド)が如何なる用量においても、有意には保護的でないということであった(図7A、最上)。このことが悩ましかったのは、NRP-A7($100 \mu\text{g}$ /用量)およびNRP-V7(ある範囲の用量に亘って)処理マウスの膵島がそれぞれ、有意に抑えられた数のNRP-V7反応性CD8⁺細胞を含有したか、または、殆ど完全にこれらのT細胞を欠いたからである(図7A、最上、および7B)。これゆえ、NRP-I4($100 \mu\text{g}$ において)およびNRP-A7($50 \mu\text{g}$ において)の抗糖尿病活性は、(高抗体結合力)IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺細胞単独の欠損の原因には帰され得なかった。むしろ、このデータは、膵島への低抗体結合力IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺細胞の動員を、(

糖尿病からの)保護が必要とすることを示唆した。恐らく、これらの低抗体結合能力細胞が、慢性ではあるが尚非病原性である炎症状態を促進するであろう。

【0126】

野生型NODマウスは自然に、数多くのIGRPエピトープに対して、CD8⁺T細胞応答を積み重ねる

高用量の(75~100μg/単回注射)IGRP₂₀₆₋₂₁₄を用いたNODマウス処理は、NRP-V7処理マウスにおいて得られたものに非常に似た結果を与えた。このペプチドは、糖尿病発症時の齢を遅らせるが、その発症を有意には抑制しなかった(図8A)。特記すべきことに、IGRP₂₀₆₋₂₁₄処理の無効性は、血流計算(フロー・サイトメトリー、図8BおよびC、左パネル)および脾臓由来T細胞を用いた機能に関するアッセイ(図8BおよびC、右パネル)により求められた両方の場合、脾臓内部IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞下位集団の完全に近い欠損とも関連していた。

【0127】

これらの結果は我々を、(NRP-V7もしくはIGRP₂₀₆₋₂₁₄処理による)IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺サブセットの完全に近い欠損が、脾臓における次に優性な自己反応性T細胞特性体ための「ニッチ」の創出をやや補助したのかも知れないとの可能性を考えるようにさせた。思い至るに、これらのクローンタイプの動員および/または蓄積は、優性なIGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性のプールの欠損により与えられた如何なる保護にも逆に作用し得たのかも知れない。高抗体結合能力インシュリン15~23/K^d(InsL)テトラマーを用いた、TUM対NRP-V7もしくはIGRP₂₀₆₋₂₁₄処理マウスの脾臓由来T細胞(細胞自己反応性CD8⁺細胞の他の唯一の既知の標的(Wongら、1999年))染色が有意な違いを明らかにしなかったので(データ示さず)、我々は、糖尿病における抗IGRP-CD8⁺細胞応答が多数のエピトープを巻き込んでいるのかどうか訝った。このことを調査するために、我々は、76種のMHCクラスI結合ノナー(9量体、33K^dおよび43D^bの結合、表I、IGRP中でのそれらの位置に基づき、アミノ末端からカルボキシ末端へと並べられている)から構成される、IGRP主体のペプチドライブラリーを計画した。これらのペプチドのただ1種(IGRP₂₀₇₋₂₁₅;ペプチド「6」)が、8.3CD8⁺T細胞応答を惹起するその能力により求められる場合、IGRP₂₀₆₋₂₁₄(ペプチド「IG」)と交差反応性であった(データ示さず)。我々は次いで、糖尿病発症前(21±1週)もしくは急性糖尿病(18+1週)NODマウスの脾臓からプロパガンダされたCD8⁺細胞によるIFN-分泌を惹起する、これらIGRPペプチド各々の能力を、NRP-V7およびTUM(10μM)同様、テストした(表IIおよび図9A)。大部分のマウスは、糖尿病であるにも関わらず、脾臓中にIGRP₂₀₆₋₂₁₄(およびIGRP₂₀₇₋₂₁₅)反応性CD8⁺T細胞を含有したが(それぞれペプチド「IG」および「6」、表IIおよび図9A、左パネル)、該糖尿病マウス由来の細胞は、糖尿病でない動物(マウス)由来の細胞よりも、これら2種のエピトープに対するより激しい応答を積み重ねた(図9A、右パネル、応答しなかったマウスを除く(<50pg/mL))。IGRP₂₀₆₋₂₁₄テトラマーを用いた実験は、脾臓関連CD8⁺T細胞によるIFN-分泌の規模と、テトラマー陽性(+)細胞のパーセンテージ(%)との間の相関の存在を確認し(p<0.001)、IFN-分泌の上記の違いが細胞数の違いを反映することを示唆した(データ示さず)。興味あることに、顕著な数のマウスもまた、他のIGRPエピトープ、特にペプチド72、7、8、および39に対する応答を積み重ねた。テトラマーを用いた限られた研究が、少なくとも何匹かの動物において、ペプチド72およびペプチド39に対して反応性のCD8⁺T細胞の存在を確認した(図9B)。抗IGRP全応答の規模の比較が更に、IGRP₂₀₆₋₂₁₄に対する応答が糖尿病の動物(マウス)において有意に、糖尿病でないもの(マウス)より高い一方、他のIGRPエピトープ(IGRP₂₀₆₋₂₁₄を除く)に対する組み合わせられた応答はそうではないことを指し示した(図9C)。このことは、糖尿病を顕在化させる進展が、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性クローンタイプの動員を含んでいるとの仮説に一致しており、我々が以前に提案してあった

10

20

30

40

50

通りである (Amraniら、2000年; Liebermanら、2003年)。

【0128】

【表1】

表I. IGRP特異的ペプチドライブラリー

配列番号	残基	配列番号	残基	
34 DFLHRSGVL	2-10	61 LFALGFYLL	216-224	
18 FLHRSGVLI	3-11	68 FALGFYLLL	217-225	
65 SGVLIHHL	7-15	55 LGFYLLRL	219-227	
73 DYRTYYGFL	18-26	7 LRLFGIDLL	225-231	10
72 TYYGFLNFM	21-29	50 FGIDLLWSV	228-236	
75 GFLNFMSNV	24-32	47 WSVFWLIQI	234-242	
32 SNVGDPRNI	30-38	8 KWCANPDWI	241-249	
4 GDPRNIFSI	33-41	30 CANPDWIHI	243-251	
35 IYFPLWFQL	41-49	74 PFAGLVRNL	255-263	
37 LWFQLNQNV	45-53	1 GLVRNLGVL	258-266	
14 QLNQNVGTK	48-56	58 RNLGVLFGL	261-269	
42 LNQNVGTKM	49-57	69 VLFGLGFAI	265-273	
17 NQNVGTKMI	50-58	56 LGFAINSEM	269-277	
59 WFNLIKWI	66-74	5 GFAINSEMF	270-278	
52 FGHRPYWWI	76-84	3 FAINSEMFL	271-279	
71 IYPNHSSPC	89-97	23 CQGENGTKP	282-290	20
9 YPNHSSPCL	90-98	12 GTKPSFRLL	287-295	
31 GHAMGSSCV	114-122	44 SFRLLCALT	291-299	
45 VWYVMVTAA	122-130	41 RLLCALTSL	293-301	
76 WYVMVTAAL	123-131	2 CALTSLTTM	296-304	
11 ALSYTISRM	130-138	26 LTSLTMMQL	298-306	
28 YTISRMEEES	133-141	16 TSLTTMQLY	299-307	
25 ISRMEESSV	135-143	19 MQLYRFIKI	304-312	
29 SRMEESSVT	136-144	36 RFIKIPHTA	308-316	
15 RMEESSVTL	137-145	13 KIPHTAEPL	311-319	
20 ESSVTLHRL	140-148	46 THAEPLFYLL	314-322	
57 SFLWSVFWL	151-159	70 HAEPLFYLL	315-323	
66 FLWSVFWLI	152-160	22 LSFCKSASI	323-331	30
67 VFVLIQISV	156-164	39 SFCKSASIP	324-332	
48 SRVFIATHF	167-175	10 CKSASIPLM	326-332	
24 ATHFPHQVI	172-180	43 SIPLMVVAL	330-338	
27 THFPHQVIL	173-181	63 IPLMVVALI	331-339	
54 FEHTPGVHM	193-201	51 ALIPYCVHM	337-345	
21 TPGVHMASL	196-204			
38 HMASLSVYL	200-208			
60 LSVYLKTNV	204-212			
6 YLKTNVFLF	207-215			

【0129】

表IIが以下の2ページに示されるが、IGRPのアミノ末端からカルボキシ末端への順に、ペプチドを例示する。少なくとも1匹のマウスにおいて応答を起こしたペプチドのみ、示される。

記号：

M# = マウス数；

IU = ペプチド無処理の糖尿病マウス；

N = ペプチド無処理の糖尿病でないマウス；

IT = TUMペプチド処理された糖尿病マウス；

T = TUMペプチド処理された糖尿病でないマウス；

IIG = IGRP₂₀₆₋₂₁₄ ペプチド処理された糖尿病マウス；

IG = IGRP₂₀₆₋₂₁₄ ペプチド処理された糖尿病でないマウス；

nd = 求められておらず
有意な応答には、影を付けている。

【 0 1 3 0 】

【 表 2 】

表 I I . 脾島由来CD8+T細胞により分泌されたIFN-γ量 (pg/mL)

M#	Age wk	34 (Kd)	35 (Kd)	59 (Kd)	71 (Kd)	57 (Kd)	67 (Kd)	54 (D6)	54 (D6)	54 (D6)	54 (D6)	38 (Kd)	60 (Kd)
IE1	12												
IE2	13												
IE3	14												
IE4	17												
IE5	20												
IE6	23												
IE7	21												
IE8	19												
IE9	17												
IE10	17												
IE11	21												
IE12	25												
IE13	25												
IE14	21												
IE15	21												
IE16	20												
IE17	20												
IE18	19												
IE19	20												
IE20	20												
IE21	19												
IE22	16												
IE23	24												
IE24	18												
IE25	23												
IE26	16												
IE27	15												
IE28	20												
IE29	21												
IE30	21												
IE31	20												
IE32	26												
IE33	27												
IE34	>27												
IE35	>27												
IE36	>27												
IE37	>27												
IE38	>27												
IE39	>27												

Age (wk) : 週齢

10
20
30
40

【 0 1 3 1 】

【表 3】

IG (wk)	IG (Kd)	5 (D6)	5 (D5)	5 (D4)	5 (D3)	5 (D2)	5 (D1)	58 (Kd)	58 (D6)	58 (D5)	58 (D4)	58 (D3)	58 (D2)	58 (D1)	70 (Kd)	70 (D6)	70 (D5)	70 (D4)	70 (D3)	70 (D2)	70 (D1)	39 (Kd)	39 (D6)	39 (D5)	39 (D4)	39 (D3)	39 (D2)	39 (D1)
IG1	12	481	513					504																				
IG2	20	52	nd					nd																				
IG3	17	56																										
IG4	23	59						67																				
IG5	21	67																										
IG6	19	60	71																									
IG7	17	60	71																									
IG8	17	63																										
IG9	21	58																										
IG10	25	58																										
IG11	25	86																										
IG12	25	67																										
IG13	21	50																										
IG14	21	77																										
IG15	21	62																										
IG16	20	63																										
IG17	20	63																										
IG18	19	68																										
IG19	20	68																										
IG20	20	68																										
IG21	19	65																										
IG22	16	nd																										
IG23	24	nd																										
IG24	18	nd																										
IG25	23	nd																										
IG26	16	1660	1302																									
IG27	16	1667	1345																									
IG28	15	226																										
IG29	20	162																										
IG30	21	91																										
IG31	20	500	268																									
IG32	26	395	211	108																								
IG33	27	57																										
IG34	>27	1	97																									
IG35	>27	1																										
IG36	>27	26	60																									
IG37	>27	1																										
IG38	>27	1																										
IG39	>27	1																										

10
20
30
40

Age (wk) : 週齢

表 I I の続き

【 0 1 3 2 】

I G R P _{2 0 6 - 2 1 4} 反応性 C D 8 + T 細胞を減少されたマウスでの、次に優性な I 50

G R P エピトープに対する、T 細胞の促進された応答

我々は次に、I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 処理による I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8⁺ サブセットの完全に近い欠損が、糖尿病からマウスを保護するのに失敗したかどうかを調査したが、これはそれが、膵島中の次に優性な I G R P エピトープを認識する T 細胞クローンのための「ニッチ」の創出を補助したからである。その終わりに、我々は、無処理、T U M 処理、および I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 処理 N O D マウスにおいて、抗 I G R P - C D 8⁺ T 細胞の存在を評価した (表 I I、図 10 A)。T U M 処理は、抗 I G R P 応答の頻度もしくは規模を、有意には増加させなかった。対照的に、I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 処理が該 I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 応答の該頻度および該規模の両方を抑制した一方、他の I G R P エピトープに対する T 細胞応答の頻度および規模を増加させた (表 I I、図 10 A)。結果として、I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 処理 N O D マウスにおける内部膵島抗 I G R P 全応答の規模は、無処理もしくは T U M 処理動物 (マウス) について計算されたものに似ていた (図 10 B)。重要なことに、I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 処理 N O D マウス膵島における次に優性な抗 I G R P 反応性 C D 8⁺ T 細胞応答の存在は、糖尿病へと進行してしまっ 10
たマウスにおいて、最も明白であった (図 6 C および D)。併せると、これらの観察は、T 1 D 予防のための I G R P₂₀₆₋₂₁₄ (および N R P - V 7) ペプチド処理の逆説的な無効性についての説明を与える。

【0133】

議論

近年 (L i b l a u ら、2002年)、臓器特異的自己免疫における組織損傷の主要なエフェクターとして、C D 8⁺ 細胞の緊急性が証言されてきた。我々は以前に、膵島特異的タンパク I G R P (I G R P₂₀₆₋₂₁₄) からのペプチドを、N O D マウスにおける有意な分画の膵島関連 C D 8⁺ 細胞が認識することを示している (L i e b e r m a n ら、2003年)。我々はまた、この T 細胞サブセットが、抗体結合力の成熟プロセスを受け 20
ることも示しており、これは、非糖尿病原性で低抗体結合力のもののより大きなプール (ストック) の消費において、高抗体結合力のクローンタイプの小さなプール (ストック) の競合的な外殖 (outgrowth) に由来する (A m r a n i ら、2000年)。本作業は、A P L を伴って、I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8⁺ T 細胞のプールの操作が治療における有意性を持つ条件を調査するために開始された。我々のデータは、中用量の中親和性の A P L (N R P - A 7) もしくは高用量の低親和性の A P L (N R P - I 4) を 30
用いたマウスの長期の処理が、糖尿病からの完全に近い保護を与えたことを示す。疾患からの保護は、非糖尿病原性で低抗体結合力の I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8⁺ T 細胞の、それらの高抗体結合力対応体 (counterpart) の消費下での、局在した蓄積と関連しており、これらが欠損された。予期せず、低もしくは高用量の非常に高親和性の A P L (N R P - V 7) または高用量の天然ペプチドリガンド (I G R P₂₀₆₋₂₁₄) を用いたマウスの繰り返し処理が、疾患からの限界の (最低限の) 保護のみを与えた。衝撃的なことに、これらのマウスの膵島関連 C D 8⁺ T 細胞についての我々の詳細な系統的な解析が、これらのマウスの膵島が、非常に僅かな I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8⁺ T 細胞しか含有しなかったことを明らかにしたが、増加した数の C D 8⁺ T 細胞が、数多くの他の I G R P エピトープを認識した。これらの結果は強力に、罹患性下位集団の自己反 40
応性 T リンパ球の排除を介した臓器特異的自己免疫の予防について、高抗体結合力 A P L による治療の有用性に反論するものである。

【0134】

この作業から発生している重要な新たな観察は、N O D 膵島関連 C D 8⁺ T 細胞が、I G R P₂₀₆₋₂₁₄ に加えて、I G R P の数多くのエピトープに対する応答を積み重ねるとい 50
うことである。我々が、異なる I G R P エピトープに対して応答する膵島由来 T 細胞により分泌される I F N - の規模が反応性クローンタイプ数に相関すると仮定すると (I G R P₂₀₆₋₂₁₄ 反応性細胞について正しい状況)、全 N O D 膵島関連 C D 8⁺ T 細胞の約 40% に相当することになる。これらの T 細胞の約半分しか I G R P₂₀₆₋₂₁₄ を認識しないので、これらの観察は、糖尿病における抗 I G R P 特異的 C D 8⁺ T

細胞応答の高い罹患性が単に、糖尿病発症前の動物における末梢での高頻度のV 17-J 42+、IGRP₂₀₆₋₂₁₄特異的CD8⁺T細胞によるのではない(Trud ea uら、2003年)ことを示唆する。むしろ、これらの新たなデータは、IGRPについて何か独特なものの存在を指摘し、これはそれを、糖尿病発症における自己反応性CD8⁺T細胞応答の好ましい標的とする。IGRPは、自己免疫攻撃の標的でない他の細胞タンパクのものと比較し得るレベルにおいて、細胞において発現されるので(Ma r t i nら、2001年; A r d e nら、1999年)、その免疫原性が、その分子の性質および/または予見された細胞内部のトポロジー(形状。つまり、小胞体膜)に関連していると推測することが試みられている。最近、細胞における大きな分画のMHCクラスI/ペプチド複合体が、リボゾーム欠陥産物(DRiPs)から生じていることが示され、これは合成後、当該プロテアーゼにより急速に分解される(Pr i n c i o t t aら、2003年)。IGRPの疎水性および通常ではない膜貫通構造が、細胞および/または樹状細胞において、高速度のDRiP形成を促進することがある。あるいは、前記小胞体膜におけるIGRPの位置は、細胞のアポトーシス小体、核の材料を包んで含有する膜結合粒子において、その蓄積を補助することがある(Co c c aら、2002年)。該核の膜はER径の一部なので、IGRPは核の断片と共にアポトーシス小体中へと隔離することがあると思われ、これは容易に、未成熟なDCにより、食作用を受ける(Sa u t e rら、2000年)。この仮説は思惑的なものではあるが、2つの線からの証拠が間接的に、それを裏付ける。第1に、in v i t r oでの樹状細胞によるアポトーシスNIT-1(IGRP+)およびIGRPによりトランスフェクションされたP815細胞の捕捉は結果的に、8.3T細胞の活性化となる(我々の未発表の観察)。第2に、in v i v oでの細胞のアポトーシス誘導は、PLNにおける8.3T細胞への、IGRP₂₀₆₋₂₁₄の交差提示を促進する(Zh a n gら、2002年)。

【0135】

可溶性ペプチドは通常、2日以内にクリアランスされるので(Me t z l e rら、2000年)、それらは、同時刺激シグナル(アジュバントにより樹状細胞において誘導されるもののような)の非存在下に、抗原反応不顕性および欠損に至る弱くて短命の活性化状態を誘導する(A i c h e l eら、1994年; T o e sら、1996年)。この寛容原刺激はTCR占有に関する未画定閾値に達しなければならないので、寛容の誘導についての可溶性ペプチドの有効性は、TCRおよびMHCに対しての親和性同様、用量の関数であるはずである、従って、MRP-I4およびNRP-A7による治療の有効性が用量と共に上昇したという観察は予期されたものではなく、NRP-A7がNRP-I4よりも低用量において最大保護活性に到達したという事実も予期されたものではない(NRP-I4より遙かに高抗体結合力を有するNRP-A7が、認められる)。特記すべきは、保護用量のNRP-A7およびNRP-I4を用いて処理されたマウスの脾臓は、通常もしくは僅かに抑制された数のIGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞を含有し、これらの細胞は、TUM処理のコントロールから単離されたものより低抗体結合力を有するNRP-V7テトラマーに結合した。これらの観察は、保護用量のNRP-A7およびNRP-I4が選択的に、病原性高抗体結合カクローンタイプを欠損させ、それらの低抗体結合力対応体(counterpart)を割愛することを示唆する。

【0136】

抗腫瘍免疫の誘導のためのワクチン化プロトコールの効率は高抗体結合カCTLの動員を必要とするので(A l e x a n d e r - M i l l e rら、1996年; P e r e x - D i a zら、2002年; Z e hら、1999年)、NRP-I4およびNRP-A7による罹患性高抗体結合カクローンタイプの欠損が、T1Dからマウスを保護すると仮定するのは安全である。しかしながら、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性T細胞の全プール(ストック)の有意な欠損にもかかわらず、増加した用量のペプチドを用いたNRP-A7の抗糖尿病原性ポテンシャルの損失は、保護が高抗体結合カクローンタイプの欠損だけによるものではないことを示唆した。この驚くべき結果は明らかに、NRP-A7の特性ではなかったが、これは、天然リガンド(IGRP₂₀₆₋₂₁₄)もしくはNRP-V7(N

R P - A 7 よりも高親和性な A P L) を用いて処理されたマウスが、それらの膵島が殆ど I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8 ⁺ T 細胞を含有したという事実にも関わらず、疾患から僅かしか保護されなかったからである。これゆえ、N R P - I 4 および N R P - A 7 の保護効果は、低結合力クローンタイプの動員をも必要としたに違いない。この概念は、無処理および A P L 処理マウスにおいて (A . F . M . M a r e e , P . S a n t a m a r r i a , および L . E d e l s t e i n - K e s h e t , 投稿中) , T 細胞の抗体結合力の成熟の数学的モデル化により、裏付けられる。この作業は、A P L により誘導される、糖尿病からの保護が、非病原性低抗体結合力クローンタイプによる、膵島中での T リンパ球のニッチの占有を必要とすると予測する。これらの細胞が糖尿病からの保護を、該当部位への他の自己反応性特異的因子のアクセスを拒否することによるのか、もしくは、免疫制御因子を分泌することにより与えるのかが、探求され続けている。免疫制御特性を有する自己反応性 T 細胞が、通常の個々の文献 (A r i f ら、2004 年) において見出されており、A P L は、特異的免疫制御 T 細胞を誘導することができる (K a p p o s ら、2000 年 ; N i c h o l s o n ら、1995 年) 。

10

【0137】

本研究の基本的な考察は、特に糖尿病となってしまうマウスでは、I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8 ⁺ T 細胞サブセットの完全に近い欠損が、次に優性な I G R P エピトープに対する膵島由来 C D 8 ⁺ T 細胞の上昇した応答に関連していたということである。このことは、I G R P ₂₀₆₋₂₁₄ 反応性 C D 8 ⁺ T 細胞の消去が、次に優性な糖尿病病原性エピトープ特異的クローンタイプの拡大をやや促進するニッチ「真空」を創出したことを示唆する。次に優性なこれらのエピトープ特異的 (および潜在的に高抗体結合力の) C T L は、それらの細胞標的を破壊することにおいて高度に効果的であることがあがるが、これは、それらが容易に、最近提案されたように (G r o s s ら、2004 年) , 寛容メカニズムをかわすからである。思い至ることに、これら 2 つの反対の現象 (優性エピトープ特異的 T 細胞および次に優性なエピトープ特異的 T 細胞の動員) は、全長タンパク自己抗体を使用した、ヒトでの治験の無効性を斟酌したものかも知れない (W e i n e r , 1993 年 ; T r e n t h a m ら、1993 年 ; M c K o w n ら、1999 年 ; P o z z a l l i ら、2000 年 ; G r o u p D . P . T . - T . D . S . , 2002 年 ; K a p p o s ら、2000 年 ; B i e l e k o v a ら、2000 年) 。

20

【0138】

併せれば、我々の知見は、高用量の高親和性 A P L を使用することによる優性 T 細胞の下位集団の完全な排除が、細胞複合体の進展、つまりポリクローナル自己免疫応答を止めるには非効率な方法であることを示唆する。むしろ、我々は、A P L を用いたこのような疾患の効果的な予防が、高抗体結合力タイプクローンの選択的排除およびそれらの低抗体結合力非病原性タイプ (counterpart) の逆らわない動員を必要とすることを議論するものである。この現象が狭い範囲内のみの用量およびまともに機能する抗体結合力において起きるという事実は、自己免疫における「寛容原」として、A P L もしくは自己抗体主体のワクチンのデザイン (設計) における支援になることがあるという重要な教訓を有する。M H C および T C R に対するペプチドの親和性ならびに用量の慎重な検討がこれゆえ、臨床試験計画において割愛される。

30

40

【0139】

実施例 4 . 更なる T 細胞反応性 I G R P ペプチド

実施例 1 に記載された手順を用いて、我々は、12 週齢の雌 N O D マウスの膵島からの T 細胞を培養している。T 細胞は、インターフェロン E L I S p o t により、幾つかの異なる I G R P ペプチドの認識に関してアッセイされた。反応性は、マウス I G R P (配列 F L W S V F W L I を持つ) の 152 ~ 160 番ペプチドに対して見出された。

【0140】

上記に鑑みれば、本発明の幾つかの利点が達成され、他の利点が得られたことが分かる。

【0141】

50

本発明の範囲から逸脱することなく、上記方法および組成物において種々の変更がなされ得るので、上記記載に含有され、添付の図面に示される全事項は例示として解釈され、限定的な意味で解釈されないようにされるものと意図される。

【0142】

本明細書において引用される全リファレンスが、本明細書において援用される。本明細書におけるこれらリファレンスについての議論は、本著者らによりなされる主張を要約するものとのみ意図され、如何なるリファレンスも、先行技術を構成するものとは認められない。出願人は、引用された該リファレンスの精確さおよび適切さに挑む権利を留保する。

【0143】

付録：マウスおよびヒトのIGRPアミノ酸配列

配列番号1：NP067306からのマウスIGRP。8.3似のT細胞に反応性のペプチドが太字とされかつ下線を施され、本明細書において同定される他のペプチドが下線(のみ)を施される。

1 mdfllhrsgvl iihhlqedyr **tyygflnfms** nvgdprnifs iyfplwfqln qnvgtkmiwv
 61 avigdwnli fkwilfghrp ywwiqeteiy pnhsppcleq fpttcetpgg spsghamgss
 121 cvwyvmvtaa lsytisrmee ssvtlhrltw sflwsvfwli qisvcisrvf iathfphqvi
 181 lgviggmlva eafehtpgvh **maslsvyklt** nvflflfalg fyllrlfghi dllwsvpiak
 241 kwcanpdwih idstpfaglv rnlgvlfglg fainsemflr scqgengtkp sfrllcalts
 301 lttmqlyrfi kipthaepfl yllsfcksas iplmvvalip ycvhmlmpg dkktk

10

20

配列番号2：NP06999からのヒトIGRP。8.3似のT細胞に反応性のペプチドが太字とされ、下線を施される。

1 mdfllhrngvl iiqhlqkdyr ayytflnfms nvgdprniff iyfplcfqfn qtvgtkmiwv
 61 avigdwnli fkwilfghrp ywwvqetqiy pnhsppcleq fpttcetpgg spsghamgas
 121 cvwyvmvtaa lshtvcgmdk fsitlhrltw sflwsvfwli qisvcisrvf iathfphqvi
 181 lgviggmlva eafehtpgiq **taslgtylkt** nflflfavg fyllrvlni dllwsvpiak
 241 kwcanpdwih idttpfaglv rnlgvlfglg fainsemfl scrggnytl sfrllcalts
 301 ltilqlyhfl qiptheehlf yvlsfcksas ipltvvafip ysvhmlmkqs gkksq

【図面の簡単な説明】

【0144】

【図1】図1は、病原性T細胞クローン8.3により認識される天然細胞ペプチドとして、IGRP₂₀₆₋₂₁₄の同定を確立させる実験データのグラフである。パネルA~C：H-2K^d溶出NIT-1ペプチドの、1次元(A)、2次元(B)、および3次元(C)HPLC分画のエピトープ再構築活性である。RMA-S/K^d細胞は、ペプチド分画のパルスを与えられ、エフェクターとして8.3CTLを用いた⁵¹Cr放出アッセイにおいて、標的として使用された(15)。パネルD：3次元HPLC分画のエピトープ再構築活性(右および上の軸上にプロットされた)との、イオン量曲線(左および下の軸上にプロットされた)の相関による、候補ペプチドの決定。ペプチドのm/z値は、注釈中に指し示される。パネルE：1同位体の548.845m/zを有する候補ペプチドイオン(M+2H)⁺のCAD質量スペクトル。XはIもしくはLを表す。該スペクトルにおいて観測されたイオンには、下線が施されている。bイオンは該ペプチドN末から発し、yイオンはC末から発する。パネルF：8.3CTLによるVYLKTNVFL(IGRP₂₀₆₋₂₁₄)の認識。RMA-S/K^d細胞が、指し示されたペプチドのパルスを与えられ、エフェクターとして8.3CTLを用いた⁵¹Cr放出アッセイにおいて、標的として使用された。パネルG：8.3CTLにより認識される天然抗原ペプチド源としての、IGRPの証明。COS-7細胞が、種々の濃度のIGRP₂₀₆₋₂₁₄発現構築物もしくはベクターのみを用いて、10ng/mLのH-2K^d発現構築物と一緒にトランスフェクションされた(実線)。別個の培養が、H-2K^d構築物のみを用いてトランスフェクションされ、種々の濃度のIGRP₂₀₆₋₂₁₄ペプチドのパルスを与えられた(破線)。8.3CTLを用いた共培養後、T細胞応答が

30

40

50

、ELISAによりIFN-放出として測定され、405nmでの吸光度として表示される(A405)。

【図2】図2は、多数の早期インシュリン炎T細胞クローンが、IGRP₂₀₆₋₂₁₄を認識することを確立させる実験結果のグラフである。指し示されたTCRを発現した58⁸トランスフェクション体が、指し示されたペプチドのパルスを与えられたRMA-S/K^d細胞と共に培養され、IL-2の放出(平均±SD)が、ELISAにより測定された。8.3ならびに早期インシュリン炎T細胞クローンAI12.B1.3およびAI15.F5についてのTCRの鎖および鎖の一部の配列が、以前に報告された(DiLorenzoら、1998年; Santamariaら、1995年; Nagataら、1994年)。AI4、AI12.B1.1、AI12.B1.2、AI15.A10株は全て、非V17TCR鎖を発現するが、血小板結合抗CD3に対する応答におけるIL-2の放出により証明されたとおり、トランスフェクションされた該TCRを介してシグナル伝達できたにもかかわらず、テストされたペプチドのいずれにも応答しなかった(S. M. Liebermanら、データ示さず)。IGRPはIGRP₂₀₆₋₂₁₄; INSはINS_{B15-23}; FWはフレームワーク残基; CDRは相補性決定領域。

【図3】図3は、IGRP₂₀₆₋₂₁₄が、H-2K^dに上手く結合しないペプチドを実証しないことを確立させる実験結果のグラフである。RMA-S/K^d細胞が、指し示されたペプチドのパルスを与えられ、抗H-2K^d抗体を用いて染色され、フロー・サイトメトリーにより分析された。IGRPはIGRP₂₀₆₋₂₁₄; INSはINS_{B15-23}; MFIは平均蛍光強度。

【図4】図4は、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性T細胞が容易に、ex vivoにおいて直接、NODマウスの脾臓および末梢血中検出されることを確立させる実験結果のグラフである。9および20週齢の非糖尿病NODマウスの脾臓もしくは末梢血からの細胞が、抗CD8および指し示されたペプチド/H-2K^dテトラマーを用いて染色された。左のパネルは、CD8⁺集団上ゲート化された(gated)20週齢マウスからのサンプルの、代表的なテトラマー染色パターンを示す。数字は、該CD8⁺集団内の、テトラマー⁺(陽性)細胞のパーセンテージを指し示す。右のパネルは、1老齢群につき5匹ずつのマウスについての、該CD8⁺集団内の、テトラマー⁺(陽性)細胞のパーセンテージ(平均±SD)を指し示す。TUM/H-2K^dテトラマーは各群において、0%の細胞を染色した。IGRPはIGRP₂₀₆₋₂₁₄。

【図5】図5は、8.3CD8⁺T細胞のAPLのアゴニスト活性を示す実験結果のグラフである。内因性脾臓8.3CD8⁺細胞(2×10^4)が2通り、2もしくは3日間(それぞれ、サイトカイン分泌および増殖アッセイ)ペプチドのパルス(0.01~1μM)および照射NOD脾臓細胞(10^5)と共にインキュベートされ、1μCiの(³H)-チミジンのパルスを与えられ、回収され、数えられた(増殖アッセイに関して)。この2日間培養したものの上清(100μL)がELISAにより、IL-2、IL-4、および/またはIFN-について、アッセイされた。これらライブラリーのいずれも、IL-4分泌を誘導しなかった(データ示さず)。データは平均±SEであり、2回もしくは3回の異なる実験の代表である。

【図6A】図6は、APLの機能する抗体結合力の違いが、ペプチド/MHC結合抗体結合力および寛容原活性の違いと相関することを示す実験結果のグラフである。図6Aは、テトラマー染色の蛍光強度を示す。内因性脾臓8.3CD8⁺T細胞が、異なるAPL/K^d-PEテトラマーおよびCD8-FITCmAbを用いて染色された。

【図6B】図6Bは、in vivoにおける8.3CD8⁺T細胞に対するAPLの寛容原活性を示す。本グラフは、無処理(10±1週齢; n=9)もしくはAPL処理8.3NODマウス中の全CD8⁺脾臓細胞の合計数を比較する。マウスは、分析前の7日間、PBS中100μgのペプチドのi.p.注射を1回受けた。実験されたマウスの齢および数は、以下のとおりである。TUM処理(11±1週齢; n=5) NRP-I4処理(9±1週齢; n=3) NRP-A7処理(11±1週齢; n=7) NRP-V7処理(14±2週齢; n=3)

10

20

30

40

50

【図6C】図6Cは、20週齢非遺伝子導入NODマウスからの膵島関連CD8⁺T細胞のテトラマー結合能を示す。縦に並んだパネルは、3匹の個々のマウスに対応する。各パネルの右上～中の数字は、テトラマー陽性CD8⁺細胞のパーセンテージに対応する。NRP-V7が、NRP-A7より高い蛍光強度で、これらの細胞を染色することに注目。

【図6D】図6Dは、9週齢の雌NODマウスの膵島から増殖されたCD8⁺T細胞が、NRP-A7/K^d (n=6マウス)より高い抗体結合力(より低いK_d)で、NRP-V7/K^dテトラマー(n=6マウス)に結合することを示す。

【図7A】図7は、野生型NODマウスにおけるAPLの抗糖尿病原活性を示す実験結果のグラフである。図7A(上のグラフ)は、TUM対APL処理雌NODマウスにおける糖尿病発症を示す。N値は、次のとおりであった。 TUM: 25 μg (n=29) 10

、50 μg (n=10)、100 μg (n=69) NRP-I4: 25 μg (n=30)、35 μg (n=10)、50 μg (n=10)、100 μg (n=10) NRP-A7: 25 μg (n=29)、35 μg (n=10)、50 μg (n=10)、75 μg (n=10)、100 μg (n=50) NRP-V7: 25 μg (n=30)、35 μg (n=10)、50 μg (n=10)、100 μg (n=59) 図7A

(下のグラフ)は、膵島由来CD8⁺細胞内での、APL対TUM処理のそのパーセンテージでの効果、ならびに、NRP-V7/K^dテトラマー結合細胞の抗体結合力を示す。

マウスは、糖尿病発症時もしくは本研究の終わり(32週目)に屠られ、膵島関連CD8⁺T細胞を単離した。データは、APL対TUM処理マウスにおいて得られた値(x±SE)の差として、表示される。0を上回るかもしくは下回る値は、APL処理がそれぞれ 20

結果的に、低もしくは高抗体結合力T細胞の動員、および/または、より低いかもしくは高いパーセンテージのテトラマー反応性CD8⁺T細胞の動員をもたらしたことを指し示す。N値は、次のとおりであった。 NRP-I4: 25 μg (n=15、7 T1D)

、35 μg (n=4、3 T1D)、50 μg (n=3、1 T1D)、100 μg (n=7、0 T1D) NRP-A7: 25 μg (n=9、5 T1D)、35 μg (n=4、4 T1D)、50 μg (n=5、1 T1D)、75 μg (n=3、0 T1D)、100 μg (n=10) NRP-V7: 25 μg (n=10、7 T1D)、35 μg (n=6、3 T1D)、50 μg (n=10、5 T1D)、100 μg (n=47、31 T1D) 抗体結合力の測定は、膵島中にテトラマー陽性細胞を含有するマウスにおいてのみ

可能であった。そのn値は、次のとおりであった。 NRP-I4: 25 μg (n=15)、35 μg (n=4)、50 μg (n=2)、100 μg (n=7) NRP-A7: 25 μg (n=6)、35 μg (n=4)、50 μg (n=5)、75 μg (n=2)、100 μg (n=10) NRP-V7: 25 μg (n=7)、50 μg (n=2) 30

【図7B】図7Bは、100 μg/単回注射での異なるペプチドを用いて処理されたマウスにおける、NRP-V7/K^dテトラマー結合CD8⁺T細胞の絶対数を示す。

【図8A】図8は、NRP-V7およびIGRP₂₀₆₋₂₁₄が、IGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性CD8⁺T細胞のプールを欠損させたにもかかわらず、糖尿病の進行を鈍化させ得ないことを実証する実験結果のグラフである。図8Aは、TUM(n=69)、NRP-V7(n=59)、およびIGRP₂₀₆₋₂₁₄(n=19)処理NODマウスに 40

おけるT1Dの累積した発症を示す。全てのマウスが、ペプチド100 μg(TUM、NRP-V7、およびIGRP₂₀₆₋₂₁₄)もしくは75 μg(IGRP₂₀₆₋₂₁₄; n=9)/単回注射を受けた。75 μgもしくは100 μgのIGRP₂₀₆₋₂₁₄を受けたマウスにおいて特記される差はなく、このため、これらのデータはプールされた。

【図8B】図8Bは、NRP-V7/K^dテトラマー反応性細胞のパーセンテージ(左)、ならびに、無処理、TUM、およびIGRP₂₀₆₋₂₁₄処理NODマウスからの膵島関連CD8⁺T細胞によるIFN-分泌(右)を示す。個々の処理群内において、糖尿病マウスと非糖尿病マウスとの間において特記される有意差はなかった。テトラマー染色についてのn値は: 無処理群: n=11(糖尿病2匹) TUM処理群: n=2 50

0 (糖尿病9匹) NRP-V7処理群: n = 52 (糖尿病32匹) IGRP₂₀₆₋₂₁₄処理群: n = 17 (糖尿病8匹)であった。INF-分泌についてのn値は:
 無処理群: n = 28 (糖尿病19匹) TUM処理群: n = 11 (糖尿病7匹)
 IGRP₂₀₆₋₂₁₄処理群: n = 12 (糖尿病6匹)であった。

【図8C】図8Cは、図8Bと同じだが、IGRP₂₀₆₋₂₁₄/K^dテトラマーもしくはIGRP₂₀₆₋₂₁₄ペプチドを用いた。テトラマー染色についてのn値は:
 無処理群: n = 28 (糖尿病19匹) TUM処理群: n = 3 (糖尿病0匹) IGRP₂₀₆₋₂₁₄処理群: n = 14 (糖尿病6匹)であった。INF-分泌についてのn値は:
 無処理群: n = 29 (糖尿病9匹) TUM処理群: n = 7 (糖尿病4匹) IGRP₂₀₆₋₂₁₄処理群: n = 11 (糖尿病5匹)であった。

10

【図9A】図9は、多数のIGRPエピトープに対する膵島内CD8⁺T細胞応答を、NODマウスが自然に蓄積することを示す実験結果のグラフである。図9A(左)は、IGRPエピトープを認識する膵島内CD8⁺T細胞を含有する糖尿病および非糖尿病(NOD)マウスのパーセンテージ(%)を示す。図9A(右)は、対応するペプチドに対して応答するマウスからの膵島由来CD8⁺T細胞(応答しなかったマウスを除く)により分泌されたINF-の平均量を示す。データは表IIからのものである。

【図9B】図9Bは、テトラマーを用いて求められた場合の、IGRP₃₂₄₋₃₃₂もしくはIGRP₂₁₋₂₉反応性CD8⁺T細胞を膵島内に含有するマウスの例を示す。

【図9C】図9Cは、IGRPペプチドに対する応答における、膵島由来CD8⁺T細胞により分泌されたINF-の累積量を示す。

20

【図10A】図10は、IGRP₂₀₆₋₂₁₄処理がIGRP₂₀₆₋₂₁₄反応性を抑制するものの、特に顕在化した糖尿病へと進行しているマウスにおいて、他のIGRPエピトープに対する応答を増加させることを示す実験結果のグラフである。図10A(上のグラフ)は、IGRPエピトープを認識する膵島内CD8⁺T細胞を含有する無処理およびTUMもしくはIGRP₂₀₆₋₂₁₄処理NODマウスのパーセンテージを示す。

図10A(下のグラフ)は、対応するペプチドに対して応答するマウスからの膵島由来CD8⁺T細胞により分泌されたINF-の平均量を示す。データは表IIからのものである。

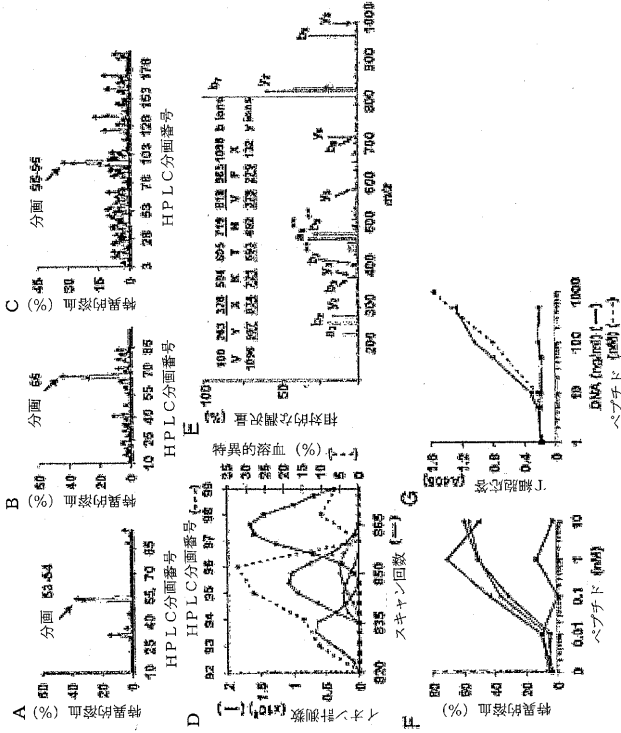
【図10B】図10Bは、IGRPペプチドに対する応答における膵島由来CD8⁺T細胞により分泌されたINF-の累積量を示す。

30

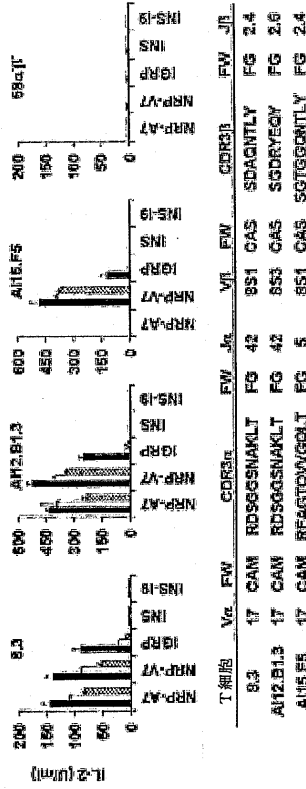
【図10C】図10Cは、糖尿病を進行させたIGRP₂₀₆₋₂₁₄処理NODマウス対糖尿病を進行させなかったマウスの比較を行うこと以外、図10Bにおけるものと同じである。

【図10D】図10Dは、IGRPペプチドに対する応答における、糖尿病および非糖尿病IGRP₂₀₆₋₂₁₄処理NODマウスの膵島由来CD8⁺T細胞により分泌されたINF-の累積量を示す。

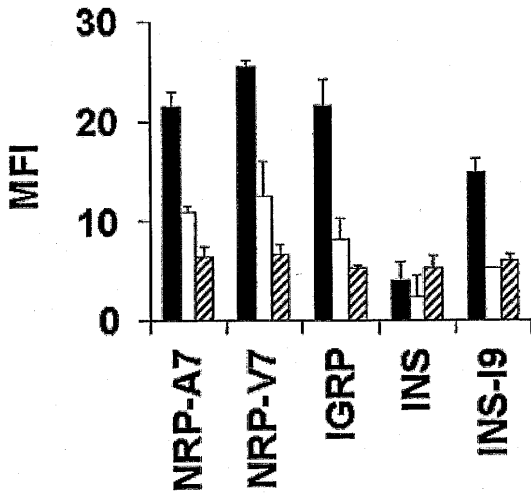
【 図 1 】



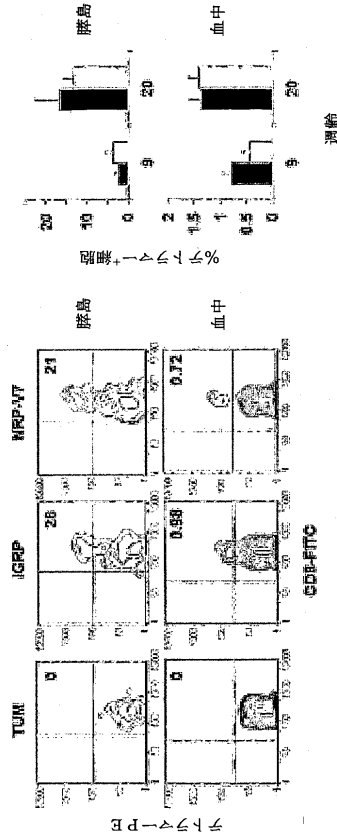
【 図 2 】



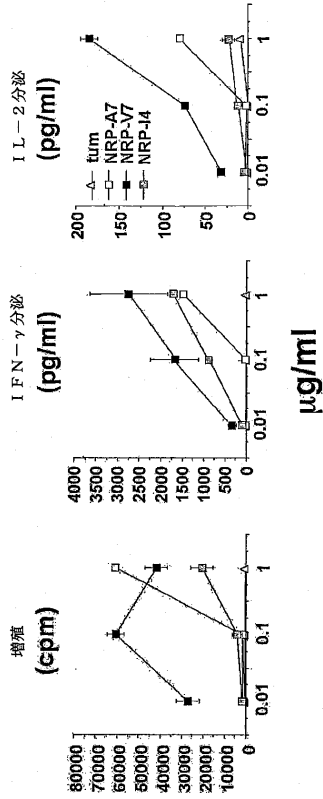
【 図 3 】



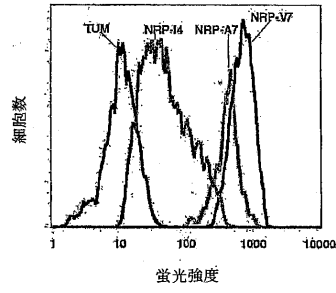
【 図 4 】



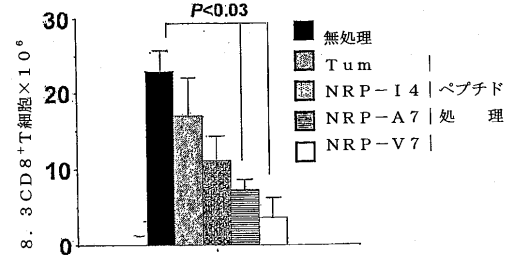
【 図 5 】



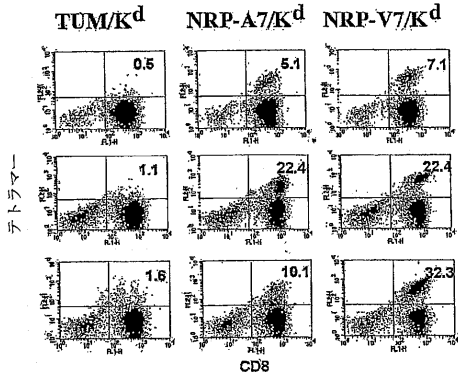
【 図 6 A 】



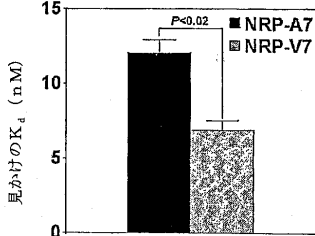
【 図 6 B 】



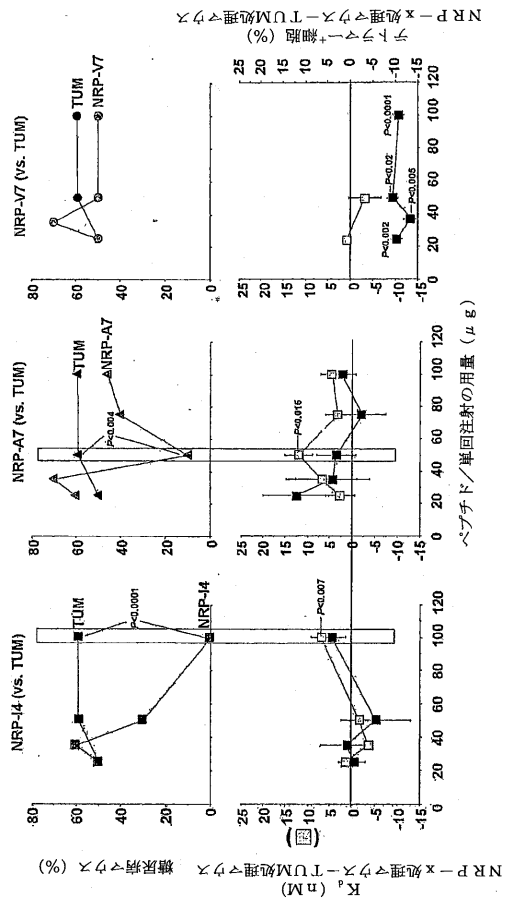
【 図 6 C 】



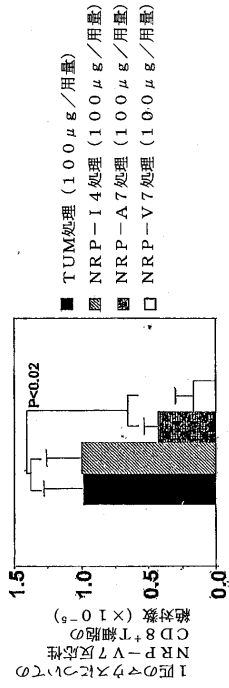
【 図 6 D 】



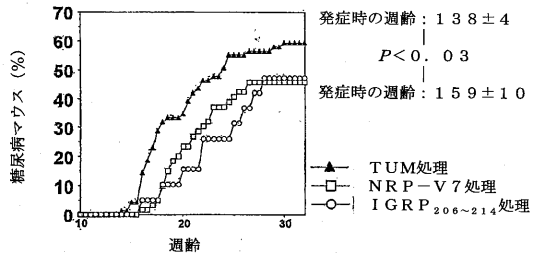
【 図 7 A 】



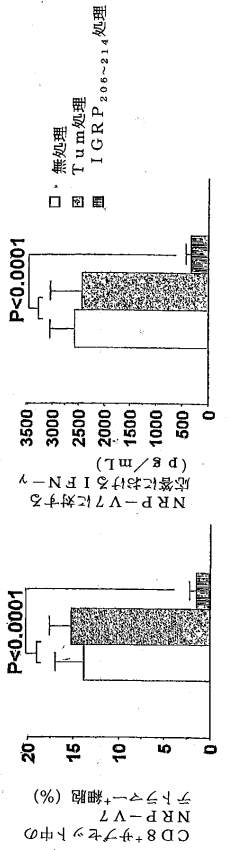
【図7B】



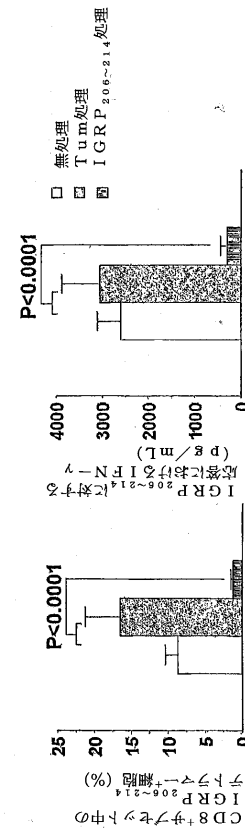
【図8A】



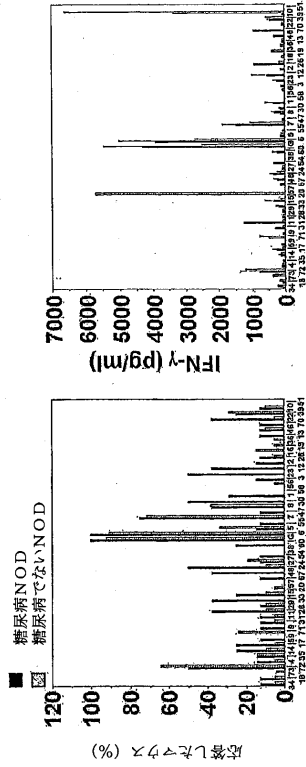
【図8B】



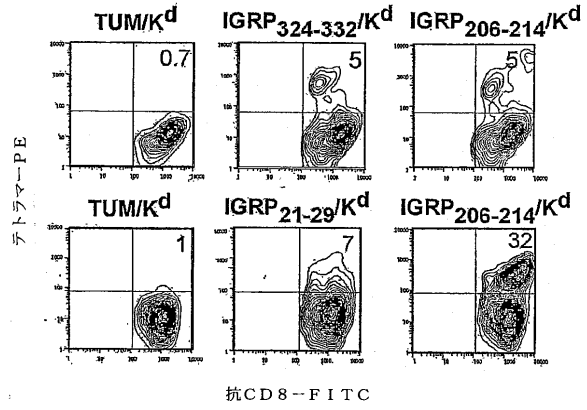
【図8C】



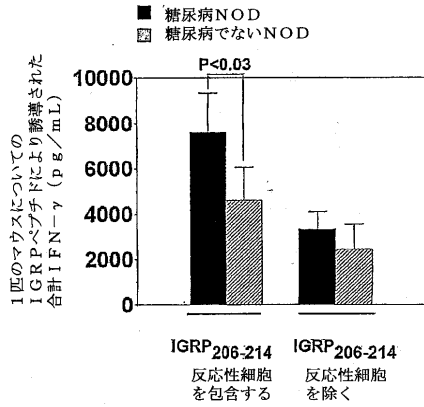
【図 9 A】



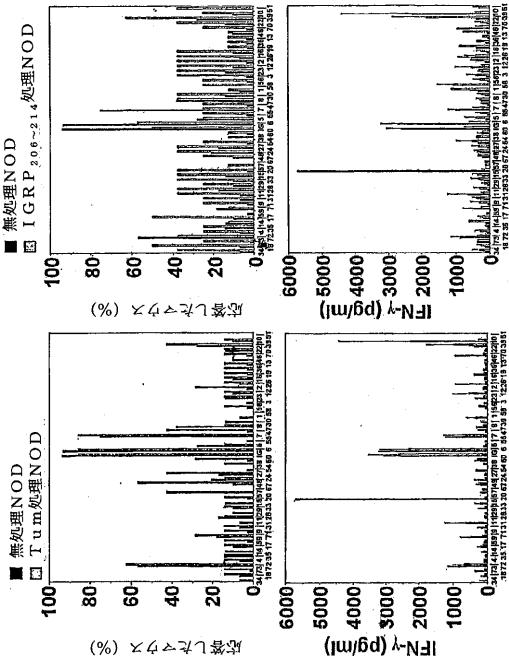
【図 9 B】



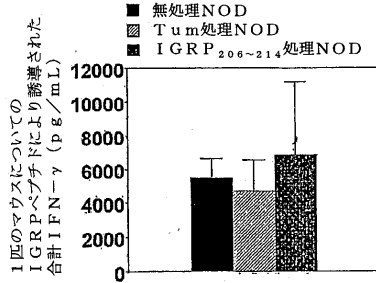
【図 9 C】



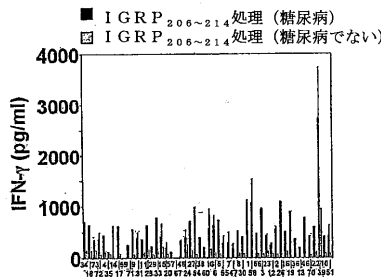
【図 10 A】



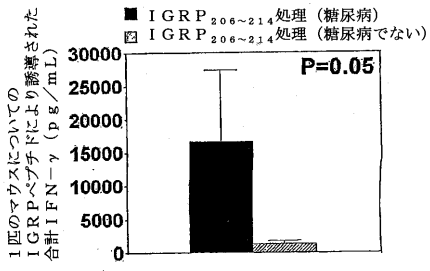
【図 10 B】



【図 10 C】



【 図 1 0 D 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte. PCT/US04/15752
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/04, 39/00, 39/38; G01N 33/53; C07K 5/00, 16/00, 17/00 US CL : 424/184.1; 435/7.1; 530/328 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/184.1; 435/7.1; 530/328 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, Medline, Caplus, Biosis, Scisearch, Embase		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARTIN, C.C., et al. Cloning and Characterization of the Human and Rat Islet-specific Glucose-6-phosphate Catalytic Subunit-related Protein (IGRP) Genes. J. Biol. Chem. 6 July 2001. Vol. 276. No. 27. pages 25197-25207, see entire document.	1-78
A	DILORENZO, T.P., et al. During the Early Prediabetic Period in NOD Mice, the Pathogenic CD8+ T Cell Population Comprises Multiple Antigenic Specificities. Clin. Immunol. December 2002. Vol. 105. No. 3. pages 332-341, see entire document.	1-78
P	LIEBERMAN, S.M., et al. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 8 July 2003. Vol. 100. No. 4. pages 8384-8388, see entire document.	2-6, 9-14, 25-78
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input 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 application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation 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 September 2005 (26.09.2005)		Date of mailing of the international search report 24 OCT 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer G. R. Ewoldt, Ph.D. <i>Valerie Bell-Harris</i> Telephone No. 571-272-1600

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 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/39 (2006.01)	A 6 1 K 35/39	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/53	P

(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, IT, LU, 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 505432728

ユーティアイ・リミテッド・パートナーシップ

U T I L I M I T E D P A R T N E R S H I P

カナダ国、アルバータ・ティ2エル・2ケイ7、カルガリー、ノース・ウェスト、サーティファースト・ストリート 3353

3353 - 31st Street, NW, Calgary, Alberta, Canada T2L 2K7

(71) 出願人 505432739

ユニヴァーシティ・オブ・ヴァージニア・パテント・ファウンデーション

U N I V E R S I T Y O F V I R G I N I A P A T E N T F O U N D A T I O N

アメリカ合衆国、ヴァージニア州、シャーロットツヴィル、ウェスト・メイン・ストリート 1224、スイート 1-110

1224 West Main Street, Suite 1-110, Charlottesville, VA 22903, United States of America

(74) 代理人 100057874

弁理士 曾我 道照

(74) 代理人 100110423

弁理士 曾我 道治

(74) 代理人 100084010

弁理士 古川 秀利

(74) 代理人 100094695

弁理士 鈴木 憲七

(74) 代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74) 代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72) 発明者 ディロレンゾ、テレサ・ピー

アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ベイサイド、トゥエンティサード・アベニュー 212-30、アパートメント 6ピー

- (72)発明者 エヴァンズ、アン・エム
アメリカ合衆国、ヴァージニア州、シャーロットヴィル、リンデン・アヴェニュー 1000、ナンバー210
- (72)発明者 ハント、ドナルド・エフ
アメリカ合衆国、ヴァージニア州、シャーロットヴィル、オールド・バラード・ロード 970
- (72)発明者 リーバーマン、スコット・エム
アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ブロンクス、イーストチェスター・ロード 1935、アパートメント 26シー
- (72)発明者 ネイセンソン、スタンリー・ジー
アメリカ合衆国、ニューヨーク州、ペルハム・マナー、ハイブルック・アヴェニュー 450
- (72)発明者 サンタマリア、ペレ
カナダ国、アルバータ・ティ3エイチ・2エス3、カルガリー、サウス・ウェスト、クリスティー・エステイツ・ブルヴァード 6923
- (72)発明者 シャバノウィッツ、ジェフリー
アメリカ合衆国、ヴァージニア州、シャーロットヴィル、ティルマン・ロード 914

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 HA17

4B050 CC01 DD11 LL01

4B063 QA19 QQ09 QR48 QS03 QS28 QS39 QX02 QX07

4C084 AA02 AA13 AA19 BA01 BA02 BA17 BA23 NA14 ZB21 ZC35

4C085 AA13 AA14 EE01

4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZC35

4C087 BB51 NA14 ZB21 ZC35

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA86 EA28 EA50 FA34

专利名称(译)	1型糖尿病中易感致病性T细胞靶向的抗原及其用途		
公开(公告)号	JP2006525813A	公开(公告)日	2006-11-16
申请号	JP2006514899	申请日	2004-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	环球技术学院 盐湖城弗吉尼亚专利基金会 弗吉尼亚大学专利基金会		
申请(专利权)人(译)	Ieshiba大学 实用眼有限合伙 盐湖城弗吉尼亚专利基金会		
[标]发明人	ディロレンゾテレサピー エヴァンズアンエム ハントドナルドエフ リーバーマンスコットエム ネイセンソンスタンリージー サンタマリアペレ シャバノウィッツジェフリー		
发明人	ディロレンゾ、テレサ・ピー エヴァンズ、アン・エム ハント、ドナルド・エフ リーバーマン、スコット・エム ネイセンソン、スタンリー・ジー サンタマリア、ペレ シャバノウィッツ、ジェフリー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12N9/00 C12Q1/02 A61K38/00 A61P3/10 A61K45/00 A61K39/395 A61K35/39 A61P43/00 A61K31/7088 A61K48/00 G01N33/53 A61K38/04 A61K39/00 A61K39/38 C07K5/00 C07K16/00 C07K17/00 C12N		
CPC分类号	C07K14/4711		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12N9/00 C12Q1/02 A61K37/02 A61P3/10 A61K45/00 A61K39/395.D A61K35/39 A61P43/00.105 A61K31/7088 A61K48/00 A61K39/395.N G01N33/53.Y G01N33/53.P		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/HA17 4B050/CC01 4B050/DD11 4B050/LL01 4B063/QA19 4B063/QQ09 4B063/QR48 4B063/QS03 4B063/QS28 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZB21 4C084/ZC35 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZC35 4C087/BB51 4C087/NA14 4C087/ZB21 4C087/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA34		
代理人(译)	英年古河 Kajinami秩序		
优先权	60/471868 2003-05-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明基于对1型糖尿病有反应的CD8 + T细胞的显性配体的鉴定。配体是胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白(IGRP)。已经从IGRP鉴定了几种CD8 + T细胞结合肽，包括含有IGRP序列的206至214氨基酸的肽和自身免疫性糖尿病中的致

