

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-26797

(P2004-26797A)

(43) 公開日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/00</b>	C07K 14/00 ZNA	4B063
<b>A61K 35/14</b>	A61K 35/14 Z	4C084
<b>A61K 38/00</b>	A61K 39/00 H	4C085
<b>A61K 39/00</b>	A61P 3/10	4C087
<b>A61P 3/10</b>	C12Q 1/02	4H045
審査請求 有 請求項の数 35 O L (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-22033 (P2003-22033)	(71) 出願人	503041890
(22) 出願日	平成15年1月30日 (2003.1.30)		イエダ リサーチ アンド ディヴェロ プメント カンパニー、 リミテッド
(62) 分割の表示	特願平8-519965の分割		イスラエル、レホヴォト 76100、ピ ー オー ボックス 95、ウィズマン
原出願日	平成7年12月20日 (1995.12.20)		インスティテュート オブ サイエンス
(31) 優先権主張番号	112094	(74) 代理人	100066692
(32) 優先日	平成6年12月21日 (1994.12.21)		弁理士 浅村 皓
(33) 優先権主張国	イスラエル(IL)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	114460		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成7年7月5日 (1995.7.5)	(74) 代理人	100088926
(33) 優先権主張国	イスラエル(IL)		弁理士 長沼 暉夫
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100102897
フロッピー			弁理士 池田 幸弘
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド p 2 7 7 類似体及びこれを含む糖尿病の治療又は診断のための薬剤組成物

## (57) 【要約】

【課題】新規 p 2 7 7 類似体を提供する。

【解決手段】 h s p 6 0 の p 2 7 7 配列の構造を有するペプチドであって、システイン残基がバリン残基で置換されてもの及び / 又は T h r <sup>1 9</sup> 残基が L y s で置換されたものは p 2 7 7 と実質的に同一の生物活性を有するが、安定性が向上する。新規 p 2 7 7 類似体は p 2 7 7 が用いられる全ての目的に用いることができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列 I のペプチド。

6

11

Val-Leu-Gly-Gly-Gly-X<sub>1</sub>-Ala-Leu-Leu-Arg-X<sub>2</sub>-Ile-Pro-

19

Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-X<sub>3</sub>-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp (I)

(配列番号 (SEQ ID NO) : 2)

10

(式中、X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> は各々 C y s 又は V a l 残基であり、X<sub>3</sub> は T h r 又は L y s 残基であるが、X<sub>3</sub> が T h r、その塩及びその機能性誘導体である場合、X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> の両方が C y s であることはできない。)

【請求項 2】

X<sub>1</sub> は V a l であり、X<sub>2</sub> は C y s であり、X<sub>3</sub> は T h r である p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> ) と称される請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

X<sub>1</sub> は C y s であり、X<sub>2</sub> は V a l であり、X<sub>3</sub> は T h r である p 2 7 7 ( V a l<sup>1 1</sup> ) と称される請求項 1 記載のペプチド。

20

【請求項 4】

X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> の両方が V a l であり、X<sub>3</sub> は T h r である p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> - V a l<sup>1 1</sup> ) と称される請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 5】

X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> の両方が C y s であり、X<sub>3</sub> は L y s である p 2 7 7 ( L y s<sup>1 9</sup> ) と称される請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 6】

X<sub>1</sub> は V a l であり、X<sub>2</sub> は C y s であり、X<sub>3</sub> は L y s である p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> - L y s<sup>1 9</sup> ) と称される請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 7】

X<sub>1</sub> は C y s であり、X<sub>2</sub> は V a l であり、X<sub>3</sub> は L y s である p 2 7 7 ( V a l<sup>1 1</sup> - L y s<sup>1 9</sup> ) と称される請求項 1 記載のペプチド。

30

【請求項 8】

X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> の両方が V a l であり、X<sub>3</sub> は L y s である p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> · 1 1 - L y s<sup>1 9</sup> ) と称される請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 9】

インシュリン依存性糖尿病(以下、I D D M という。)の診断のための請求項 1 - 8 のいずれか 1 項記載のペプチドの使用。

【請求項 10】

患者における I D D M の存在又は開始を診断する方法であって、前記患者の血液又は尿についてヒト h s p 6 0 と免疫学的に反応する抗体又は T 細胞の存在を抗原としての請求項 1 - 8 のいずれか 1 項記載のペプチドでテストする方法。

40

【請求項 11】

前記患者について h s p 6 0 と免疫反応する抗 - h s p 6 0 抗体又は T 細胞の存在をテストして、これによって h s p 6 0 と免疫的に反応する抗 - h s p 6 0 抗体又は T 細胞の存在が陽性を示す結果が I D D M の存在又は開始の可能性が高いことを示す請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

前記患者は抗 - h s p 6 0 抗体の存在がテストされる請求項 10 又は 11 のいずれか 1 項記載の方法。

50

## 【請求項 13】

テスト方法はラジオイムノアッセイを含む請求項 12 記載の方法。

## 【請求項 14】

テスト方法は E L I S A テストを含む請求項 13 記載の方法。

## 【請求項 15】

請求項 10 - 14 のいずれか 1 項記載の方法に従って抗 - h s p 6 0 抗体の存在をテストすることにより I D D M の存在を診断するためのキットであって、

( i ) 請求項 1 の配列 ( I ) のペプチドである抗原と、

( i i ) 検出される前記抗 - h s p 6 0 抗体の不変領域を認識することができる標識された抗体とを含むキット。

10

## 【請求項 16】

前記抗原は請求項 2 - 8 のいずれか 1 項記載のペプチドである請求項 15 記載のキット。

## 【請求項 17】

前記抗原は固相に固定されている請求項 15 又は 16 のいずれか 1 項記載のキット。

## 【請求項 18】

I D D M の診断においてキットの使用のためのインストラクションを含む請求項 15 - 17 のいずれか 1 項記載のキット。

## 【請求項 19】

標識はラジオアイソトープ、酵素、発色団及び蛍光団からなる群から選択される請求項 15 - 18 のいずれか 1 項記載のキット。

20

## 【請求項 20】

前記患者は h s p 6 0 と免疫反応する T 細胞の存在がテストされる請求項 10 又は 11 のいずれか 1 項記載の方法。

## 【請求項 21】

テスト方法は T 細胞増殖テストを含む請求項 20 記載の方法であって、この T 細胞増殖テストは

( i ) 患者から得られた血液サンプルから T 細胞を含む非核細胞フラクションを調製し、

( i i ) 前記非核細胞フラクションに請求項 1 記載のペプチドから選択された抗原を加え

、

( i i i ) 前記抗原の存在下で適切な時間、適切な培養条件で前記細胞フラクションを培養し、

30

( i v ) 前記培養時間の終了前の適切な時点で ( i i i ) の培養された細胞のカルチャーに対し標識されたヌクレオチドを加え、前記標識されたヌクレオチドを増殖している T 細胞の D N A に取り込ませ、

( v ) 前記 T 細胞に取り込まれた標識されたヌクレオチドの量を分析することにより増殖している T 細胞の量を決定する

工程を含む方法。

## 【請求項 22】

テスト方法は T 細胞サイトカイン応答テストを含む請求項 20 記載の方法であって、このサイトカイン応答テストは、

40

( i ) 患者から得られた血液サンプルから T 細胞を含む非核細胞フラクションを調製し、

( i i ) 前記非核細胞フラクションに請求項 1 記載のペプチドから選択された抗原を加え

、

( i i i ) 前記抗原の存在下で適切な時間、適切な培養条件で前記抗原の存在の下で前記細胞フラクションを培養し、

( i v ) 応答しているリンパ細胞により倍地中に分泌されたサイトカインの存在を測定する

工程を含む方法。

## 【請求項 23】

サイトカインは I F N - 、 I L - 2 、 I L - 4 、 I L - 6 、 I L - 1 0 、 T N F - 又

50

は T G F である請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

請求項 1 0、1 1 及び 2 1 項のいずれか 1 項記載の方法により h s p 6 0 と免疫反応する T 細胞の存在をテストすることにより I D D M の存在を診断するためのキットであって、

- ( i ) 請求項 1 のペプチドの抗原と、
- ( i i ) 標識されたヌクレオチドと、
- ( i i i ) リンパ球の培養のために適した培地とを含むキット。

【請求項 2 5】

請求項 1 0、1 1、2 2 及び 2 3 項のいずれか 1 項記載の方法により h s p 6 0 と免疫反応する T 細胞の存在をテストすることにより I D D M の存在を診断するためのキットであって、

- ( i ) 請求項 1 のペプチドの抗原と、
- ( i i ) リンパ細胞の培養に適した培地と、
- ( i i i ) 応答しているリンパ細胞により培地中に分泌されたサイトカインの存在を測定するためのキットとを含むキット。

【請求項 2 6】

I D D M の診断においてキットの使用のためのインストラクションを含む請求項 2 2 - 2 5 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 2 7】

請求項 1 記載のペプチドから選択された抗原が患者に皮下注射され、検出可能な皮膚反応の発現が観察される請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 8】

I D D M を予防又は治療するための調製物であって、

- ( a ) ヒト h s p 6 0 の p 2 7 7 配列の特異性を明らかにし、請求項 1 の配列 I のペプチドの存在下で培養されることにより活性化されるヒト T 細胞、( b ) 放射されさもなければ希釈された前記ヒト T 細胞、( c ) 水圧による圧力処理、化学架橋剤による処理及び/又は細胞骨格架橋剤による処理を受けた前記ヒト T 細胞、( d ) 上記 ( a ) ( b ) 又は ( c ) の T 細胞のフラグメント又は ( a ) ( b ) 又は ( c ) の T 細胞から得られた表面タンパク質又は ( e ) 前記タンパク質、その塩、機能的誘導体、前駆体又は活性フラクションに特異的な ( a ) のリセプターの可変領域からなるペプチドから成る群から選択される T 細胞生産物を含む調製物。

【請求項 2 9】

前記 ( a ) のヒト T 細胞は処置される I D D M 患者から得られた同原 T 細胞であり、前記 T 細胞の前記特異性は配列 I の前記ペプチドとインヴィトロ系で接触させることにより発現される請求項 2 8 の調製物。

【請求項 3 0】

前記 T 細胞は請求項 1 の配列 I のペプチドに対するインヴィトロ系の特異性を発現する請求項 2 8 又は 2 9 のいずれか 1 項記載の調製物。

【請求項 3 1】

請求項 1 の配列 I のペプチドと薬剤学的に許容される担体とを含む薬剤組成物。

【請求項 3 2】

I D D M の予防又は治療のための請求項 3 1 記載の薬剤組成物。

【請求項 3 3】

前記ペプチドは請求項 2 - 8 のいずれか 1 項記載のペプチドである請求項 3 1 又は 3 2 のいずれか 1 項記載の薬剤組成物。

【請求項 3 4】

I D D M を治療するための薬剤組成物を調製するための請求項 1 - 8 のいずれか 1 項記載のペプチドの使用。

10

20

30

40

50

## 【請求項35】

ヒトを対象として有効量の請求項1の配列Iのペプチドを適切な担体中で投与することを  
含むIDDMの予防又は治療方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明はヒト60kDa熱ショックタンパク質(hsp60)のエピトープの変形である  
新規ペプチド、これを含む薬剤組成物及びこのようなペプチドを用いたインシュリン依存  
性糖尿病(IDDM)の診断及び治療方法に関する。

## 【0002】

## 【従来技術】

I型糖尿病、即ちIDDMは膵臓の小島に存在するインシュリン生産性β細胞を攻撃し  
、破壊するT細胞に起因する自己免疫疾患である(カスタノ及びアイゼンバース、199  
0年)。IDDMにおいて完結する自己免疫過程は症状を発現することなく始まり、進行  
する。この疾患はβ細胞の累積的損失量がインシュリンを供給する残余β細胞の容量  
を越えた場合にのみ臨床的に表面化する。実際、グルコース恒常性の破壊及び臨床的なI  
DDMは80-90%のβ細胞が免疫系により不活性化された後にのみ生じると考えら  
れている。従って、IDDMに罹患したと特定することができる患者はβ細胞の自己免  
疫による破壊の進行した段階に至る。さらに、自己免疫マーカーによる初期の前臨床的な  
糖尿病の診断は自己免疫過程が開始した後にのみ行うことができる。従って、治療法を探  
索するという事は、既に進行している自己免疫過程を停止する安全、明確且つ有効な方  
法を見出すことである。

## 【0003】

以前、本発明者は、ヒトIDDMの忠実なモデルと考えられるNOD種のマウスに進行し  
ている自然発症性糖尿病の研究によりこの問題を検討した(カスタノ及びアイゼンバース  
、1990年)。NODマウスは生後約4週でインシュリン炎を発症し、これは小島周辺  
部の穏やかな浸潤として開始し、重篤な小島内の炎症という過程をたどる。インシュリン  
不足を証明する高血糖症は本発明者のコロニーのメスでは生後約14-17週で始まる。  
生後約35-40週までに殆ど全てのメスNODマウスは重篤な糖尿病を発症し、インシ  
ュリン療法を行わなかった場合殆ど死亡する。オスNODマウスは低い罹患率を示すがそ  
の理由は明らかでない。NODマウスの糖尿病は自己免疫T細胞に起因することが示され  
ている(ベンデラックら、1987)年。

種々の抗原に対するT細胞の反応性及び自己抗体は、NODマウスの場合と同様に、ヒト  
IDDM患者においても検出されており、可能な標的抗原に対する免疫がこの疾病の主た  
る原因であるかは明らかではない。治療の問題は因果関係の問題の背後にある。

NODマウスにおける自己免疫過程の開始は、糖尿病の始まる前に、マウスを食事制限、  
ウイルス感染又は免疫系の不特定な刺激のような種々の操作の対象とすることにより防止  
することができることが示されている(ボウマンら、1994年)。NOD糖尿病は、グ  
ルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)抗原に対する免疫寛容を前糖尿病マウスに誘発  
することにより防止される(カウフマンら、1993年;ティッシュら、1993年)。

## 【0004】

以前、本発明者はNODマウスの糖尿病は、ヒトhsp60分子のp277ペプチド配列  
に特異的なT細胞を用いたT細胞のワクチン接種により防止されることを見出している(  
エリアスら、1991年)。このタンパク質は以前はhsp65と称されていたが、現在  
は分子量に関するより正確な情報を参照してhsp60と称されており、いずれの名称を  
用いてもタンパク質は同一である。

IDDMに関与するヒトhsp60のエピトープであり、ヒトhsp60の配列の位置4  
37-460に対応するp277ペプチドは本出願人のイスラエル特許出願第94241  
号及びエリアス及びコーエン、1994年において最初に開示され、以下のような配列を  
有する。

10

20

30

40

50

**Val-Leu-Gly-Gly-Gly-Cys-Ala-Leu-Leu-Arg-Cys-Ile-**  
**Pro-Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-Thr-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp**

(配列番号 (SEQ ID NO) : 1)

インシュリン炎の開始時に p 2 7 7 ペプチドを投与すると、おそらく N O D 糖尿病に必須の抗 - p 2 7 7 免疫の抑制するように規制することにより、糖尿病の進行を防止することが示されている (エリアスら、1991年; イスラエ尔特許出願第 9 4 2 4 1 号)。最近の研究により、p 2 7 7 ペプチドは - 細胞自己免疫の段階の進行を逆転するために用いることもできることが示されている (エリアス及びコーエン、1994年)。

10

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

最近、本発明者の研究室は、かなり少量の - 細胞毒素であるストレプトゾトシン (S T Z) の投与により、自己免疫糖尿病の形態をマウスの C 5 7 B L / K s J 種に誘発することができることを報告した (エリアスら、1994年)。標準少量の S T Z の 4 0 m g / k g を 5 日間投与すると通常 3 週間以内に臨床的な糖尿病を誘発するが、3 0 m g / k g を 5 日間投与すると約 3 ヶ月の遅滞期間後にのみ臨床的な糖尿病が誘発される。この誘発された糖尿病のモデルは、インシュリンに対する自己抗体、インシュリン自己抗体に対する抗 - イディオタイプ抗体及び h s p 6 0 に対する自己抗体の前兆期間内の外観により標識される。また、マウスも h s p 6 0 及びその p 2 7 7 ペプチドに対する自然的な T - 細胞活性を明らかに示す (エリアスら、1994年)。従って、S T Z の標準少量より少ない量の投与により、N O D マウスにおいて進行する自然発症的な糖尿病において観察されるものとは異なるものでなく、自己免疫過程の引き金を引くということは明らかである (エリアスら、1990年)。

20

本発明の目的は、ペプチド p 2 7 7 の変異体を提供するものであり、この変異体は I D D M の診断及び治療に有用である。

【0006】

【課題を解決するための手段】

ペプチド p 2 7 7 のフラグメント及び変異体の研究において、単一のスレオニン残基がリジン残基に置換され及び / 又は 1 又は両方のシステイン残基がバリン残基により置換されたペプチドは糖尿病の治療において p 2 7 7 としての活性を有するということが思いがけなく見出された。セリン残基によるシステイン残基の置換は不活性なペプチドをもたらすので、これらの結果は驚くべきことであった。

30

即ち、本発明は配列 I を有するペプチドに関するものである。

6

11

**Val-Leu-Gly-Gly-Gly-X<sub>1</sub>-Ala-Leu-Leu-Arg-X<sub>2</sub>-Ile-Pro-**

19

**Ala-Leu-Asp-Ser-Leu-X<sub>3</sub>-Pro-Ala-Asn-Glu-Asp**

(配列番号 (SEQ ID NO) : 2)

40

(式中、X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> は各々 C y s 又は V a l 残基であり、X<sub>3</sub> は T h r 又は L y s 残基であるが、X<sub>3</sub> が T h r 残基である場合、X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> の両方が C y s であることはできない。)

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の具体的実施例は、配列 I を有し、X<sub>1</sub> 及び X<sub>2</sub> の両方が C y s であり、X<sub>3</sub> は L y s である p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) (配列番号 (SEQ ID NO) : 3)、X<sub>1</sub> が V a l であり、X<sub>2</sub> が C y s であり、X<sub>3</sub> が T h r 又は L y s である p 2 7 7 ( V a <sup>1 6</sup> )

50

(配列番号 (SEQ ID NO) : 4) 及び p 2 7 7 (Val<sup>6</sup> - Lys<sup>19</sup>) (配列番号 (SEQ ID NO) : 5)、X<sub>1</sub> が Cys であり、X<sub>2</sub> が Val であり、X<sub>3</sub> が Thr 又は Lys である p 2 7 7 (Val<sup>11</sup>) (配列番号 (SEQ ID NO) : 6) 及び p 2 7 7 (Val<sup>11</sup> - Lys<sup>19</sup>) (配列番号 (SEQ ID NO) : 7)、X<sub>1</sub> と X<sub>2</sub> の両方が Val であり、X<sub>3</sub> が Thr 又は Lys である p 2 7 7 (Val<sup>6</sup> - Val<sup>11</sup>) (配列番号 (SEQ ID NO) : 8) 及び p 2 7 7 (Val<sup>6</sup>, <sup>11</sup> - Lys<sup>19</sup>) (配列番号 (SEQ ID NO) : 9) のペプチドからなる。p 2 7 7 (Val<sup>6</sup> - Val<sup>11</sup>) は p 2 7 7 (V) と称する。

#### 【0008】

本発明の他の目的は本発明の配列 I のペプチドを用いた IDDM の早期の診断方法及びキットを提供することである。IDDM が進行する過程において、動物は h s p 6 0 分子又はこれと交差反応する分子を発現し、これは動物の血液又は尿にたどり着く。また、これらはこのような分子を特異的に対象とする抗体及び T 細胞を発現する。従って、血液又は尿中の h s p 6 0 (又はこれと交差反応する分子) 又は抗体又はこれと特異的な T 細胞は、  
- 細胞の破壊が完結し、個体が生涯糖尿病を運命づけられる前に IDDM の過程を検出するためのアッセイの目的にかなう。

患者中の IDDM の存在又は開始は、前記患者の血液又は尿についてヒト h s p 6 0 と免疫学的に反応する抗 - h s p 6 0 抗体又は T 細胞の存在を抗原としての本発明の配列 I のペプチドでテストすることにより診断することができる。実際、ペプチド p 2 7 7 が使用可能であると従来より記述されているいかなる方法、例えば、W O 9 0 / 1 0 4 4 9 で国際公開されている P C T 国際出願に記載されている方法であって、引用により本明細書に一体化される方法は、本発明の配列 I のペプチドを p 2 7 7 の代用とする場合に使用することができる。

従って、本発明は患者における IDDM の存在及び開始を診断する方法であって、前記患者について h s p 6 0 と免疫反応する抗 - h s p 6 0 抗体又は T 細胞の存在をテストして、これによって h s p 6 0 と免疫的に反応する抗 - h s p 6 0 抗体又は T 細胞の存在が陽性を示す結果が IDDM の存在又は開始の可能性が高いことを示す方法を提供する。

#### 【0009】

IDDM の診断をするための方法においては、患者は抗 - h s p 6 0 抗体の存在がテストされ、このテスト法はラジオイムノアッセイ又は E L I S A テストを含むことができる。患者は h s p 6 0 と免疫反応する T 細胞の存在をテストされることもできる。この形態の実施例においては、テスト方法は T 細胞増殖テストを含み、この T 細胞増殖テストは

( i ) 患者から得られた血液サンプルから T 細胞を含む非核細胞フラクションを調製し、  
( i i ) 前記非核細胞フラクションに請求項 1 記載のペプチドから選択された抗原を加え、

( i i i ) 前記抗原の存在下で適切な時間、適切な培養条件で前記細胞フラクションを培養し、

( i v ) 前記培養時間の終了前の適切な時点で ( i i i ) の培養された細胞のカルチャーに対し標識されたヌクレオチドを加え、前記標識されたヌクレオチドを増殖している T 細胞の DNA に取り込ませ、

( v ) 前記 T 細胞に取り込まれた標識されたヌクレオチドの量を分析することにより増殖している T 細胞の量を決定する工程を含む。

上記の工程 ( i v ) においては、前記標識されたヌクレオチドは好ましくは <sup>3</sup> H - チミンである。増殖している T 細胞の量の決定は標準的な方法で T 細胞の刺激指数を計算することにより行われる。

#### 【0010】

本発明のこの形態の他の実施例においては、テスト方法は T - 細胞サイトカイン応答テストを含み、これにおいてはステップ ( i ) から ( i i i ) は上記 T 細胞増殖テストと同一であるが、ステップ ( i v ) において応答しているリンパ細胞により培地中に分泌された I F N - 、 I L - 2 、 I L - 4 、 I L - 6 、 I L - 1 0 、 T N F 又は T G F のよう

10

20

30

40

50

なサイトカインが商業的に入手可能なキットで標準的な方法で検出される。

他の形態においては、本発明は配列 I のペプチドから選択される抗原が患者に皮下注射され、検出可能な皮膚反応 ( D T H ) の発生が観察されるインヴィヴオ系の方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

また、本発明はこのようなアッセイを実行するためのキットとともに、このようなアッセイを実行する手段を提供する。キットは本発明を達成するために用いられる種々のアッセイのいずれかを実行するために調製することができる。このようなキットの各々は単一のアッセイ又は所定数のアッセイを実行するのに必要な全ての物質を含む。例えば、抗 - h s p 6 0 抗体の存在を決定するキットは固相に固定された配列 I のペプチドと、標識された抗 - ヒト F a b のような検出される抗 - h s p 6 0 抗体の不変領域を認識することができる標識された抗体とを含む。また、キットはキットを使用するための説明書とキットの物質を保持するための容器を含んでもよい。ラジオアイソトープ、酵素、発色団又は発蛍光団のような従来からある標識を用いることができる。典型的なラジオアイソトープはヨウ素 - 1 2 5 又はイオウ - 3 5 である。本目的のための典型的な酵素はホースラディッシュペルオキシダーゼ、  
- ガラクトシダーゼ及びアルカリホスファターゼを含む。

10

【 0 0 1 2 】

抗 - h s p 6 0 抗体の存在をテストすることにより I D D M の存在を診断するキットは、  
( i ) 配列 I のペプチドから選択される抗原と、

( i i ) 検出される抗 - h s p 6 0 抗体の不変領域を認識することができる標識された抗体とを含む。

20

h s p 6 0 と免疫反応する T 細胞の存在をテストすることにより I D D M の存在を診断するキットは、

( i ) 配列 I のペプチドから選択される抗原と、

( i i ) リンパ細胞 ( T 細胞 ) の培養に適した培地と、

( i i i ) T 細胞増殖テストのための標識されたヌクレオチド又はサイトカインテストのための I F N -  $\gamma$ 、 I L - 2、 I L - 4、 I L - 6、 I L - 1 0、 T N F  $\alpha$  又は T G F  $\beta$  のようなサイトカインとアッセイキットのいずれかを含む。インヴィヴオ系のテストのためにはキットは注射に適した形態の配列 I のペプチドのみを含むことができる。

【 0 0 1 3 】

更に、本発明は I D D M の予防又は治療のための手段に関する。本発明の配列 I の抗原ペプチドのワクチン接種は抗原に対する自己免疫を下降調節し、 I D D M の自己免疫過程に対する抵抗性を有効に作り出す。このような抗原に特異的な T 細胞によるワクチン接種が、希釈化又は弱毒化された形式による場合、抗原性を向上させるために処理された後である場合、又はそのフラグメント又は活性フラクシオンである場合でも同一である。患者が既に I D D M の前臨床的な開始段階にあると示されている場合、このような抗原又は T 細胞 ( 又はフラクシオン ) はこの抗原に対する自己免疫を下降調節し、明確で恒久的な損失が生じる前に自己免疫過程を抑止することができる。また、ペプチド p 2 7 7 による N O D マウスの治療に関し本発明の発明者が最近示したように ( エリアス及びコーエン、 1 9 9 4 年 )、ペプチドは自己免疫過程がはるかに進行した後であってもこれを停止するための治療剤として用いることができる。

30

40

【 0 0 1 4 】

従って、本発明はインシュリン依存性糖尿病 ( I D D M ) の予防又は治療のための調製物を提供するものであり、この調製物は ( a ) ヒト h s p 6 0 の p 2 7 7 配列の特異性を明らかにし、配列 I のペプチドの存在下で培養されることにより活性化されるヒト T 細胞、 ( b ) 放射されさもなければ希釈された前記ヒト T 細胞、 ( c ) 水圧による圧力処理、化学架橋剤による処理及び / 又は細胞骨格架橋剤による処理を受けた前記ヒト T 細胞、 ( d ) 上記 ( a ) ( b ) 又は ( c ) の T 細胞のフラグメント又は ( a ) ( b ) 又は ( c ) の T 細胞から得られた表面タンパク質又は ( e ) 前記タンパク質、その塩、機能的誘導体、前駆体又は活性フラクシオンに特異的な ( a ) のリセプターの可変領域からなるペプチドか

50

ら成る群から選択されるT細胞生産物を含む。

この発明の好ましい実施例においては、調製物は処置されるIDD M患者から得られた同原T細胞であり、このT細胞は配列Iの前記ペプチドとインヴィトロ系で接触させることにより活性化される。このような特異的で活性化されたT細胞は、細胞を得た同一の患者に投与される。

#### 【0015】

また、本発明は薬剤学的に許容可能な担体と、有効量の主剤としての配列Iのペプチド、その塩又はその作用的誘導体とを含むIDD Mを予防又は治療するための薬剤組成物を提供する。薬剤学的に許容可能な担体とは、好ましくは、不完全フロインドアジュバント（IFA）として知られるミネラルオイルのエマルジョンのようなオイル担体である。しかしながら、IFAは、完全フロインドアジュバント（CFA；マイコバクテリアの死滅した組織を含むミネラルオイルの調製物）と同様、ヒトに対する使用は認められない。その理由はミネラルオイルは代謝可能でなく、身体により分解されることができないからである。

本発明者は、ヒトの患者に対し静脈内栄養として永年使用されてきた特定の脂肪エマルジョンが本発明のペプチドを用いたペプチド療法の担体として機能することができることを見出した。このようなエマルジョンの例は、イントラリピッド及びリポフンディンとして知られている商業的に入手可能な脂肪エマルジョンである。“イントラリピッド”は静脈内栄養のための脂肪エマルジョンに対するスウェーデンのカピ・ファーマシアの登録商標であり、米国特許第3,169,094号に記載されている。リポフンディンはドイツのビー・ブラウン・メルシュンゲンの登録商標である。両方とも脂肪としてダイズ油（蒸留水1000ml中各々100又は200g、各々10%又は20%）を含む。卵黄リン脂質はイントラリピッド中で乳化剤として用いられており（12g/l蒸留水）、卵黄レシチンはリポフンディン中で用いられている（12g/l蒸留水）。イントラリピッド及びリポフンディンの両方において、等張性はグリセロール（25g/l）の添加による。

更に、本発明はIDD Mの予防又は治療方法に関し、この方法は配列Iのペプチドを含む薬剤組成物又は本発明の配列Iのペプチドに対し特異性を発現するT細胞を含む調製物をこれを必要とする患者に投与することを含む。

#### 【0016】

本発明において“配列Iのペプチド”という場合、ペプチドの糖尿病に対する生物活性が維持される限り、その塩及び作用的誘導体も意味する。

本発明で意味するペプチドIの“塩”は生理学的に許容され得る有機及び無機塩である。本明細書中で用いられるペプチドIの“作用的誘導体”は、残基又はN-又はC-末端の側鎖として現れる官能基から公知の手段により調製されることができ誘導体を含み、これは薬剤的に許容可能である、即ち、p277の公知の活性の類似性に関する限りペプチドの活性を破壊せず、これを含む組成物に毒性を与えず、その抗原性に不利な影響を与えない限り、本発明に含まれる。このような“作用的誘導体”は1個のアミノ酸を他に有効に変換する変化を含むものと意図されない。

上記の資質を前提として、これらの誘導体は、例えば、カルボキシル基の脂肪酸エステル、アンモニア又は第1級又は第2級アミンとの反応により生産されるカルボキシル基のアミド、アシル部分（例えば、アルカノイル又はカルボサイクリックアロイル基）との反応により形成されるアミノ酸残基の遊離アミノ基のN-アシル誘導体又はアシル部分との反応により形成される遊離ヒドロキシル基（例えば、セリル又はスレオニル残基のそれ）のO-アシル誘導体を含む。

本発明の配列Iのペプチドは、IDD Mの診断のための診断用組成物における抗原と同様に、薬剤組成物における免疫原、特にIDD Mの軽減又は治療のためのワクチンとして用いることができる。これらの薬剤及び診断用組成物は、本技術分野における公知の方法により調製することができるものであるが、本発明の一部をなす。

#### 【0017】

治療のための処置のため又は予防ワクチンとして用いられる場合、本発明のペプチドは自

10

20

30

40

50

己免疫T細胞のTH1 TH2のシフトを促進する生物活性を有する担体とともに投与されることが好ましい。CD4ヘルパー型のT細胞は活性化された場合に分泌するサイトカインにより2つのグループに分類される(モスマン及びコフマン、1989年)。TH1細胞はIL-2及びIFN- $\gamma$ を分泌し、TH2細胞はIL-4及びIL-10を分泌する。このような担体は10-20%の植物及び/又は動物起源のトリグリセライド、1.2-2.4%の植物及び/又は動物起源のリン脂質、2.25-4.5%の浸透圧調整剤、0-0.5%の抗酸化剤及び100%までの蒸留水を含む脂肪エマルジョンであることが好ましい。このような担体はイントラリピッド又はリポフンディンであることが最も好ましい。このような担体の使用は、本発明についてのイスラエル特許出願(出願人の参照番号9451Aにより特定される)と同日に本出願と同一の出願人により出願人されたイスラエル特許出願(出願人の参照番号9523により特定される)に記載されており、この内容は全体として本明細書中に一体化される。

10

本発明による治療用の組成物は経口的に又は皮下、筋肉内、静脈内、鼻腔内などのように非経口的に投与することができる。

本明細書中の実施例はヒトIDDMの科学的に受け入れられる動物モデルにおいて本発明の化合物及び組成物による治療上の処置の有効性を確立するものである。

【0018】

【実施例】

物質及び方法

(i) マウス NOD/Lt種インブレットメスマウスは、イスラエル、レホヴォトのウィズマンインスティテュートオブサイエンスのアニマルブリーディングセンターより提供された。これらのマウスは生後14から17週でヒトのIDDMに類似する自己免疫性糖尿病を自然発症する。

20

(ii) ペプチド ペプチドはABIMED合成器(FRG)を用いた標準フェモック化学により合成され、逆相クロマトグラフィーによりHPLCで精製された。配列はアミノ酸分析により確認された。以下のようなペプチドが合成された。p277ペプチド;配列:Asn-Glu-Asp-Gln-Lys-Ile-Gly-Ile-Glu-Ile-Ile-Lys-Arg-Thr-Leu-Lys-Ile(配列番号(SEQ ID NO):10)のコントロールペプチドp278、ヒトhsp60分子の458-474の位置に対応; p277のフラグメント: p277のアミノハーフ(p277.N)、 p277のカルボキシハーフ(p277.C)、及びp278と結合しているp277C(p277.C-p278);ペプチドp277(Lys<sup>19</sup>);配列中の2つのシステイン残基が種々のアミノ酸で置換されたペプチドp277は以下の通りである: -SH基で架橋されたp277(p277(Cys-Cys架橋));両方のシステイン残基がバリンで置換されたp277(p277(Val<sup>6</sup>-Val<sup>11</sup>))又はセリンで置換されたp277(p277(Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>11</sup>))。

30

【0019】

(iii) 処置及び追跡 マウスは、p277、他のペプチド又はウシ血清アルブミン(BSA, USA, MO, セントルイスのシグマから購入)のエマルジョン0.1mlを背中に皮下注射するにより処置された。抗原はPBS中で希釈され、同量のミネラルオイル(不完全フロインドアジュバント(IFA);シグマ)又は10%のイントラリピッド中で乳化された。マウスの血中グルコースレベルはエリアスら、1991年に記載されているように、10A.M.の非絶食状態、治療時(生後7、12、15又は17週)及び生き残ったマウスについては生後40週でテストされた。グルコース濃度が11.1mM/L以上の場合に明確な高血糖症であるとされた。その理由は、この濃度の血中グルコースは100匹の健康なマウスで測定された平均血中グルコース濃度より高い3つの標準偏差だからである(示さず)。膵臓の小島の組織学的検査はヘマトキシリン及びエオシンで着色された部分について行われた。この部分は群の特性を知らない2人の観察者により別個に評価された。種々の処置の統計的な差異を明らかにするため<sup>2</sup>テストが用いられた。

40

(iv) T-細胞増殖アッセイ メスNODマウスから得られたクローンC9細胞及び脾

50

臓細胞のサスペンションが前述のように（エリアスら、1991年）T-細胞増殖が試験された。簡単に言うと、 $1 \times 10^5$  個クローン細胞/ml又は $1 \times 10^6$  個脾臓細胞/mlが、 $5 \mu\text{g/ml}$ の種々の抗原の存在下又は不存在下で、マイクロタイターウェル中の0.2mlの培養培地中で72時間4組にわたって培養された。増殖は、培養の最後の12時間の $[^3\text{H}]$ -チミジンのDNAへの取り込みにより測定された。結果は刺激指数、即ち抗原存在下における平均テストcpmの抗原不存在下における平均バックグラウンドcpmに対する比として計算された。4組のサンプル間における標準偏差は常に平均cpmの $< 10\%$ であった。脾臓細胞の実験におけるバックグラウンドは $< 1000 \text{ cpm}$ であり、C9細胞については $< 200 \text{ cpm}$ であった。各々のマウスの脾臓は別々にテストされた。各々のグループのマウスの結果は平均 $\pm$ SDとして示されている。

10

【0020】

実施例 1p277又はこのフラグメントによるNODマウスの治療

p277ペプチドの2つの12-アミノ酸ハーフのいずれかが、単独であるいは結合して、p277のようにNODマウスにおいて有効であるかどうかをテストするため、メスNODマウスは生後7週の時点で、オイル中の種々のペプチド $50 \mu\text{g}$ を皮下接種することにより治療された。生後40週までのマウスの状態が決定された。

結果を表1に示す。コントロールhs p60ペプチドp278は糖尿病の進行に効果を有しなかったことが分かる。即ち、治療された40匹のマウス中、全てが糖尿病であり、90%が生後40週までに死亡した。これに対して、p277ペプチドは死亡を完全に防止し、20匹の処置したマウスの60%を治療した。p277のフラグメントはそれほど有効ではなかった。即ち、p277のアミノハーフ（p277.N）、p277のカルボキシハーフ（p277.C）及びこれらの混合物（p277.N, p277.C）は、完全なp277の約半分の作用を果たした。ペプチドp277.Cはペプチドp278に結合して合成され、長いペプチドを生産する。しかしながら、p277.C-p278はp277.C単独よりも良い結果を示さなかった。従って、完全な治療上の効果を得るためには完全な、p277ペプチドが必要であると結論することができる。

20

【0021】

【表1】

表1 p277又はそのフラグメントによるNODマウスの処置

30

## 40週の糖尿病の状態

ペプチド処置 ( $50 \mu\text{g}$ )	マウスの数	健康 %	高血糖症 %	死亡 %
p278	40	0	100	90
p277	20	60*	40	0*
p277.N	20	20	80	50*
p277.C	20	30	70	40*
p277.N, p277.C	20	35*	65	40*
p277.C-p278	20	25	75	50*

40

\* コントロールペプチドp278で処置した群と比較して $p < 0.01$ 

【0022】

実施例 2p277置換ペプチドによるNODマウスの治療

以下のペプチドがNODマウスでテストされた。p277、p277(Cys-Cys架橋)、p277(Val<sup>6</sup>-Val<sup>11</sup>)及びp277(Ser<sup>6</sup>-Ser<sup>11</sup>)。

50

NODメスマウスはミネラルオイルのエマルジョン ( I F A ) 0 . 2 c c 中の 1 0 0 μ g のペプチドを皮下投与することにより治療された。マウスは生後 1 2 週で処置され、糖尿病の罹病率が生後 3 0 週の時点で決定された。

表 2 に示すように、p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) は糖尿病の治療において p 2 7 7 と同じように有効であり、未処置のマウスの糖尿病の罹病率は 8 0 % であるが、p 2 7 7 及び p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) で処置されたマウスは各々 2 2 % 及び 2 3 % の罹病率を示した。一方、p 2 7 7 ( C y s - C y s 架橋 ) または p 2 7 7 ( S e r <sup>6</sup> - S e r <sup>11</sup> ) のいずれも治療上の効果を奏しなかった。位置 6 及び 1 1 におけるシステイン残基がアラニン又は - アミノブチル酸残基で置換された 2 つの追加の p 2 7 7 の変異体もまたクローン C 9 細胞及び N O D 脾臓 T - 細胞の双方でインヴィトロでテストした場合有効でなかった。これらの 2 つのペプチドは抗 - p 2 7 7 特異的 T 細胞 ( 示さず ) により認識されなかったため、これらは治療効果のためのインヴィヴォテストには供されなかった。

10

【 0 0 2 3 】

【 表 2 】

表 2 p 2 7 7 置換体による N O D マウスの処置

ペプチド処置	糖尿病の罹病率 (%)	処置を受けた数
無	80	100
p277	22*	200
p277(Cys-Cys架橋)	70 †	10
p277(Val <sup>6</sup> -Val <sup>11</sup> )	23*	52
p277(Ser <sup>6</sup> -Ser <sup>11</sup> )	85 †	20

20

\* アジュバント単独で処置したマウスの糖尿病罹病率と比較して  $p < 0.01$

† アジュバント単独で処置したマウスの糖尿病罹病率と比較して明らかな差異はない。

30

【 0 0 2 4 】

実施例 3

p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) の安定性

システインを置換する理由は、p 2 7 7 ペプチドの安定性の問題であったため、p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) の安定性が合成後のいくつかの時点でテストされた。p 2 7 7 ペプチドは不安定であり、厳格な条件 ( 真空中の凍結乾燥パウダー、 - 2 0 ) においても悪化する。

p 2 7 7 の安定性をその p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) 類似体と比較するため、両方のペプチドが同時に合成され、乾燥粉末として - 2 0 で貯蔵された。合成日の 1、9 及び 2 0 週後、アликウォットが計量され、溶解され、テストされた。ペプチドの安定性は T 細胞クローン C 9 を刺激する能力により評価された。図 1 は実験の結果を示す。元の p 2 7 7 は合成後 9 週間以内にほとんどの効果を失い、2 0 週までに全ての効果を失うが、p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) は 2 0 週間の貯蔵の後でも変化しないことが分かる。p 2 7 7 の不安定性はシステイン残基に起因すると考えられるため、p 2 7 7 の生物活性を保持する本発明の全ての類似体は、p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) の例で示されたのと同様の方法で、p 2 7 7 よりも優れた安定性を有することが期待される。

40

【 0 0 2 5 】

実施例 4

p 2 7 7 又は p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) による N O D メスマウスの治療はインシュリン炎を逆転する

50

NODメスマウスは、生後12週で、ミネラルオイルのエマルジョン（不完全フロイントアジュバント）0.1cc中の改変されていないp277又はp277（Val<sup>6</sup>-Val<sup>11</sup>）を100μg/マウスだけ皮下投与することにより治療された。コントロールマウスはPBS及びミネラルオイルのエマルジョンを投与された。生後6ヶ月で各々の群の5匹のマウスが犠牲にされ、膵臓が摘出され、ブワン固定液中で固定され、その部分がヘマトキシリン、エオシンで着色された。インシュリン炎はブラインド法で評価された。コントロールマウスでは重篤な糖尿病が進行したので、これらのマウスは生後5ヶ月で犠牲にされた。その時まで、コントロールマウスの血中グルコースレベルは29-48mmol/Lの範囲であった。結果を表3に示す。

【0026】

【表3】

表3 p277又はp277（Val<sup>6</sup>-Val<sup>11</sup>）によるNODメスマウスの処置はインシュリン炎を逆進する

組織検査（22週）

ペプチド処置 (12週)	島の数	インシュリン炎		
		正常(%)	島周辺部(%)	島内(%)
無	83	10	23	67
p277	49	25	69	6
p277(Val <sup>6</sup> -Val <sup>11</sup> )	62	52	31	17

10

20

30

40

【0027】

生後12週、即ち処置の時点において、未処置のマウスの小島の約60%が小島内のインシュリン炎を示し、約20%の小島が小島周辺部のインシュリン炎を有し、約20%の小島はインシュリン炎を示さなかった。小島内の浸潤は細胞の作用の欠如に関連したインシュリン炎の重篤の形態であると考えられる。表3に示すように、小島部の外観の顕著な分岐は、オイル単独で処置されたコントロールマウスと比較して処置された2つの群において発達した。オイルで処置を受けたマウス（コントロール）では影響を受けなかった小島部の比率が斬新的に下降し、生後22週、即ち全てのマウスが明らかな糖尿病となる時点までには、わずか10%の正常な小島部を観察することができるだけであった。小島部の約67%は22週の時点で小島内のインシュリン炎を示し、残りの23%の小島部は小島周辺部のインシュリン炎を示した。対照的に、p277又はp277（Val<sup>6</sup>-Val<sup>11</sup>）で処置されたマウスは正常な小島の数の上昇（25%から52%の間）及び小島内にインシュリン炎を有する小島の数の下降（6%から17%の間）を示した。小島周辺部のインシュリン炎を起こしている小島は約31%-69%にまで上昇した。従って、p277及びp277（Val<sup>6</sup>-Val<sup>11</sup>）による治療は、治療後3ヶ月以上持続するインシュリン炎の程度の逆転と関連する組織学上の描写の改善に関連する。

【0028】

メスNODマウスにおけるp277（V）の使用の他の結果

15の他の実験が行われ、これにおいては10匹のNODメスマウスの群の各々が生後12-15週でオイル中のp277（V）又はオイル単独で処置された。オイル単独で処置された150匹のマウスの総数の内、90%で糖尿病が進行し、85%が生後32週までに死亡した。対照的に、p277（V）で処置されたマウスはわずか50%（p<0.01）の罹病率を示しただけであり、わずか20%が重篤な糖尿病で死亡しただけであった（p<0.01）。従って、p277（V）による後期の治療は致命的な糖尿病の進行を停止させるのに有効であった。

【0029】

50

## 実施例 5

油性エマルジョン中の p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>1 1</sup> ) を用いた I 型糖尿病のペプチド療法

膵臓のインシュリン生産性 - 細胞の自己免疫による破壊は T - リンパ球により行われる。炎症性浸潤は生後 5 - 8 週で膵臓の小島周辺部で発達し、インシュリン欠乏症及び完全な糖尿病をもたらす。細胞の破壊は生後 1 4 - 2 0 週で認められるようになり、生後 3 5 - 4 0 週までにはほとんど 1 0 0 % のメス N O D マウスは影響を与える。

N O D メスマウスは、P B S、又は 1 0 % の大豆オイル、1 . 2 % の卵リン脂質及び 2 . 2 5 % のグリセロールからなる 1 0 % の油性エマルジョン ( イントラリピッド、カピファーマシア A B、スウェーデン ) 0 . 1 m l 中の 1 0 0 μ g のペプチド p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>1 1</sup> ) をマウスごとに皮下投与することにより処置された。

生後 6 ヶ月での糖尿病の罹病率及び抗 - p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>1 1</sup> ) 抗体の生産は以下の通りであった。糖尿病は持続的な高血糖症、即ちベックマングルコースアナライザー I I で 1 週間の間隔をおいて少なくとも 2 回 1 1 . 1 m m o l / L 以上の血中グルコースレベルが測定された場合に診断された。ペプチド療法は、正常な血中グルコース濃度 ( 1 1 . 1 m m o l / L 以下 ) が維持された場合、膵臓の小島内の炎症 ( インシュリン炎 ) が軽減された場合及び T H 2 型の免疫応答のインディケータールとして治療に用いるペプチドに対する抗体が誘発された場合に成功したと判断された。結果を表 4 に示す。

【 0 0 3 0 】

【 表 4 】

表 4 6 ヶ月時点での糖尿病の罹病率

処置	糖尿病の罹病率 (%)	死亡 (%)
p277 (Val <sup>6</sup> -Val <sup>11</sup> ) /PBS	90	80
p277 (Val <sup>6</sup> -Val <sup>11</sup> )/イントラリピッド	45*	20*
無	100	90

\* 未処置の N O D マウスと比較して p < 0 . 0 1

【 0 0 3 1 】

表 4 から明らかなように、イントラリピッド中で投与された本発明のペプチドによる処置は糖尿病の罹病率及び死亡率を低下するのに有効であった。一方、P B S 中で投与された処置は無効であった。

【 0 0 3 2 】

## 実施例 6

ペプチド p 2 7 7 及び p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>1 1</sup> ) は免疫学的に交差反応性である前糖尿病の N O D マウスから単離された T - 細胞クローン C 9 の細胞はペプチド p 2 7 7 ( 黒塗りの円 )、p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>1 1</sup> ) ( 白抜きの円 )、p 2 7 7 ( S e r <sup>6</sup> - S e r <sup>1 1</sup> ) ( 黒塗りの四角形 ) 及び p 2 7 7 ( C y s - C y s 架橋 ) ( 白抜きの菱形 ) と共に培養された。結果を図 2 に示す。クローン C 9 はペプチド p 2 7 7 及び p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>1 1</sup> ) に対してのみ陽性の増殖応答を示すことが見出された。これは p 2 7 7 及び p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>1 1</sup> ) が交差反応性であり、ペプチド p 2 7 7 ( S e r <sup>6</sup> - S e r <sup>1 1</sup> ) 及び p 2 7 7 ( C y s - C y s 架橋 ) は治療上は有効でなく、免疫学的に交差反応性でないことを示す。

【 0 0 3 3 】

## 実施例 7

新しく I D D M と診断された患者は p 2 7 7 及び p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>1 1</sup> ) の両方に対して T - 細胞増殖応答を示す

新しく I D D M と診断された患者 ( 2 - 4 週 ) が増殖アッセイでテストされた。末梢血のリンパ球がヘパリンを加えた全血からフィコール - ハイパーク法で単離され、インヴィト

10

20

30

40

50

口系で増殖がスクリーニングされ、これは<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みとして測定され、h s p 6 0 ペプチド p 2 7 7、p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> - V a l<sup>11</sup> ) 及びコントロールペプチド p 2 7 8 により誘発された。T細胞増殖応答は刺激指数 ( S I )、即ち、ペプチドで刺激されたチミジン取り込みの量とT細胞によるチミジンのバックグラウンド ( 抗原が加えられていない ) の取り込み量との割合として表される。

【 0 0 3 4 】

【 表 5 】

表 5 新規に I D D M と診断された患者は p 2 7 7 及び p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> - V a l<sup>11</sup> ) の双方に対して T 細胞の増殖を示す

患者	T細胞増殖 ( S I )		
	p277	p277 (Val <sup>6</sup> -Val <sup>11</sup> )	p278
IDD#68	3.5	3.2	0.8
IDD#69	2.5	5.0	0.5

10

【 0 0 3 5 】

表 5 に示されるように、新しく I D D M と診断された患者は、p 2 7 7 ペプチドと同様に、p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> - V a l<sup>11</sup> ) に対して応答する。従って、p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> - V a l<sup>11</sup> ) は免疫学的に p 2 7 7 と均等である。p 2 7 7 の治療上の効果は、免疫学上の認識により達成されるので、p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> - V a l<sup>11</sup> ) が p 2 7 7 と免疫学的に交差反応性であるという事実は、p 2 7 7 ( V a l<sup>6</sup> - V a l<sup>11</sup> ) は糖尿病の治療において p 2 7 7 の代りに用いることができるということを示している。

20

【 0 0 3 6 】

実施例 8

h s p 6 0 及び I D D M 及び健康な個体中のペプチドに対する T 細胞の応答

21 人の I D D M 患者及び 14 人の健康な血液ドナーが実施例 7 の増殖アッセイにより抗 - h s p 6 0 及び p 2 7 7 ( V ) のスクリーニングを受けた。表 6 及び表 7 はコントロール抗原 ( コントロール A g )、即ち破傷風毒素及びテキサス株のインフルエンザウイルス及び全体の遺伝子組み替え型 h s p 6 0 及び p 2 7 7 ( V ) に対する各々の個体の T 細胞の増殖応答 ( 刺激指数 ; S I ) を示す。3 又はそれ以上の S I 値は陽性と考えられた。

30

【 0 0 3 7 】

【 表 6 】

表6 I D D M患者のT細胞の増殖応答

患者	年齢 (年)	診断からの時間 (週/月)	T細胞の応答 (刺激指数)			
			コントロールAg	hsp60	p277(V)	
1.	LM	32	3.5月	+	+	-
2.	G	25	24月	+	+	-
3.	H	23	6月	+	+	-
4.	DV	20	3週	+	+	-
			5週	+	+	+
5.	SD	15	6週	+	+	+
6.	P	15	4週	+	-	-
7.	G	60*	5週	+	+	+
			7週	+	+	+
8.	F	45*	6週	+	+	+
9.	IS	53	2週	+	+	-
10.	T	20	4週	+	+	+
11.	KK	21	4週	+	+	-
12.	RI	40	6週	+	-	-
13.	MS	5	1週	+	-	-
14.	KB	5	2月	+	+	+
15.	BI	11.3	3週	+	-	-
16.	YY	60	2月	+	+	-
17.	KA	12	4週	-	-	-
18.	ZA	12	4週	+	+	+
19.	A	17.5	11.5年	+	+	+
20.	N	17.5	7.5年	+	+	+
21.	A	19.7	5.7年	+	+	+

\* 抗-GAD抗体に陽性の患者は、開始からの時間にかかわらず、I型糖尿病であり、II型糖尿病ではない

【0038】

【表7】

10

20

30

40

表7 健康な血液ドナーのT細胞の増殖応答

ドナー	T細胞の応答 (刺激指数)		
	コントロールAg	hsp60	p277(V)
1	+	-	-
2	+	-	-
3	+	nd	+
4	+	-	-
5	+	+	+
6	+	-	-
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	+	-	-
11	+	+	-
12	+	-	-
13	+	+	-
14	+	-	-

10

20

nd : 未処置

## 【0039】

表8は、86%及び52%の患者がhsp60及びp277(V)に対し応答したのに対し、21%及び14%がコントロールに反応したこと( $p < 0.05$ )を示す表である。従って、IDDM群はhsp60及びp277(V)に対する反応が明らかに陽性であった。これによって、IDDM患者ではhsp60及びp277(V)に反応する個体の割合は健康人よりも高いという結論が導かれる。

30

## 【0040】

## 【表8】

表8 IDDM及び健康な個体のT細胞の応答性の陽性の割合

応答	T細胞の応答の割合 (%)	
	hsp60	p277(V)
IDDM	18/21 (86)	11/21 (52) *
健康	3/14 (21)	2/14 (14)

40

\* 健康な血液ドナーにおける抗-p277(V) 応答の割合と比較して  $\chi^2$ 分析で  $p < 0.05$

## 【0041】

## 実施例9

p277(Lys<sup>19</sup>)に対するNODのT-細胞増殖

50

p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) ペプチドは 1 個のアミノ酸が p 2 7 7 と異なる。 p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) が N O D の I D D M における自己抗原であることを確認するため、ペプチド p 2 7 7 及びペプチド p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) に対する T - 細胞の増殖を比較した。図 3 はメス N O D 脾臓の T 細胞が p 2 7 7 と同一の程度 p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) に対して増殖したことを示す。コントロールペプチド p 2 7 8 に対する応答は存在しなかった。

上記の結果は、クローン C 9、即ちヒトペプチド p 2 7 7 に対して応答することが知られている糖尿病誘発性の N O D の T - 細胞クローンを使用することで確認された(エリアスら、1991年)。C 9 細胞は p 2 7 7 ペプチドと同程度 p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) ペプチドに対して増殖することが見出された(図 4)。

【 0 0 4 2 】

実施例 1 0

p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) による N O D メスマウスの治療

以前、本発明者は、生後 3 ヶ月のメス N O D マウスに現れる進行したインシュリン炎はヒト p 2 7 7 の単一注射で処置することで停止することができ、処置されたマウスでは臨床的に完全な糖尿病の罹病率及び重篤な高血糖症による死亡率が低下することを報告した。ペプチド p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> )、即ちマウスの自己 p 2 7 7 ペプチドが有効であるかどうかテストするため、本発明者は生後 3 ヶ月のメス N O D マウスを I F A 中のヒト p 2 7 7 又は p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) 1 0 0 μ g で処置した。

リン酸緩衝食塩水 ( P B S ) 中の 2 m g / m l の濃度のペプチド p 2 7 7 又は p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) は同量の不完全フロイドアジュバント ( I F A ) で乳化された。10 匹の生後 3 ヶ月のメス N O D マウスの群はいずれかのペプチドを含むエマルジョン 0 . 1 m l ( ペプチド 1 0 0 μ g ) が皮下注射された。コントロールマウスは P B S 及び I F A のエマルジョンが注射された。マウスは 4 週毎に採血され、血中グルコースレベルがベックマングルコースアナライザー I I で求められた。高血糖症の罹病率及び糖尿病による死亡率は、生後 6 ヶ月で評価された。マウスは血中グルコースが 1 1 m m o l / L より大きい場合に糖尿病と診断された。

結果を表 9 に示す。生後 6 ヶ月で、9 0 % のコントロールマウスが完全な高血糖症となり、6 0 % が糖尿病により死亡した。これに対して、p 2 7 7 又は p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) による処置により糖尿病 ( 各々 4 0 % 及び 5 0 % の罹病率 ) 及び死亡 ( 各々 1 0 及び 2 0 % の死亡率 ) が防止された。従って、マウスの自己ペプチド p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) は進行したインシュリン炎の治療に異種 p 2 7 7 として有効であると思われる。

【 0 0 4 3 】

【表 9】

表 9 p 2 7 7 又は p 2 7 7 ( L y s <sup>19</sup> ) による糖尿病の処置

3ヶ月時点での処置	6ヶ月時点での糖尿病	
	高血糖症 (%)	死亡 (%)
p277 (Lys <sup>19</sup> )	50*	20*
p277	40*	10*
PBS	90*	60

\* p < 0 . 0 5

【 0 0 4 4 】

これらの結果は、ヒト h s p 6 0 分子及びその p 2 7 7 ペプチドを用いて検出された N O D の T 細胞の増殖応答は、マウス h s p 6 0 及びマウス p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) 配列に対する自己免疫応答と均等であることを示す。これは前糖尿病マウスの脾臓において進行している自然応答と同様、糖尿病誘発性 C 9 T 細胞クローンについても示された。さらに、p 2 7 7 ( L y s <sup>1 9</sup> ) は N O D マウスの糖尿病の治療に p 2 7 7 と同程度有効であった

10

20

30

40

50

。月齢及び性別が一致する他の種類のマウスの脾臓 T 細胞は p 2 7 7 に対する自然的な T - 細胞の増殖応答を示さなかった（示さず）。

糖尿病誘発性 T 細胞により標的されるマウス h s p 6 0 配列に対する自己免疫性の発見は、I D D M が自己免疫過程に起因するという一般的な考え方を支持するものである。

【 0 0 4 5 】

#### 実施例 1 1

##### p 2 7 7 ( V ) による S T Z 誘発性糖尿病の治療

ストレプトゾトシン ( S T Z ) は、2 0 0 m g / k g の容量が注射されると、2 4 - 4 8 時間以内に - 細胞を破壊することにより中毒性糖尿病を引き起こすことができる - 細胞特異性毒素である。これを少量投与すると糖尿病に結びつく遺伝的なマウスのインシュリン炎を誘発する。炎症過程は S T Z の容量により、2 0 - 3 0 日かかる。S T Z 誘発性糖尿病のための通常のプロトコールは体重 1 k g に対し 2 0 0 m g の S T Z を連日 4 0 m g / k g の容量を 5 回投与することであり ( ライク及びロジニ、1 9 7 6 年 ) 、このモデルは低量 S T Z と呼ばれている。全量が 1 5 0 m g / k g ( 3 0 m g / k g × 5 ) に減量されると、糖尿病は 8 0 - 1 0 0 日以内に発現するということが見出されている。この S T Z 誘発性糖尿病の穏やかな進行形態はおそらくヒトにおける自己免疫性糖尿病と類似し、N O D マウスの自然発症的な糖尿病の前臨床的段階と同一の期間持続する ( カスタノ及びアイゼンバース、1 9 9 0 年 ) 。さらに、急性の毒素効果は容量が減少すると減少する

10

。6 0 k D a 熱ショック蛋白質 ( h s p 6 0 ) は N O D ( エリアスら、1 9 9 0 年 ) 及び S T Z 誘発性 ( エリアスら、1 9 9 4 年 ) 糖尿病の両方において役割を果たしている。完全な糖尿病が始まる前に、h s p 6 0 に対する抗体及び T 細胞増殖応答が生じていることが示されている。h s p 6 0 に特異的な T 細胞クローンは前糖尿病 N O D マウスに由来し、若い N O D ( エリアスら、1 9 9 1 年 ) 又は N O D マウスにインシュリン炎及び高血糖症を養子免疫伝達することができる。N O D 糖尿病誘発性 T 細胞クローンは p 2 7 7 と呼ばれる h s p 6 0 配列 4 3 7 - 4 6 0 の 2 4 個のアミノ酸からなる長いペプチドを認識する。誘発性糖尿病は前臨床段階で抗 - p 2 7 7 T 細胞応答を伴う。

20

上記実施例は p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) ペプチドは N O D マウスを保護することを示した。本実験は低量 S T Z モデルにおける p 2 7 7 ( V ) 療法の有効性をテストするものである。

30

【 0 0 4 6 】

1 0 匹のオスマウスからなる群は 1 日あたり 3 0 m g / k g の S T Z で 5 日間治療された。1 週間後、マウスはオイル中の 1 0 0 μ g の p 2 7 7 ( V ) 、カウフマンらが 1 9 9 3 年に N O D マウスの糖尿病に関連すると記載したグルタミン酸デカルボキシラーゼ ( G A D p 3 4 ) のペプチド又はオイル単独で処置された。この処置は、8 5 日間繰り返された。1 0 0 日目にマウスは採血され、その血液が高血糖症かどうかテストされた ( 1 5 m m o l / L 以上のグルコース濃度 ) 。結果を図 5 に示す。G A D p 3 4 で処置されたマウス又は処置されなかったマウスの平均血中グルコースは高血糖症の範囲にあることが分かる。反対に、p 2 7 7 ( V ) で処置されたマウスの平均血中グルコースは正常の範囲内であった。従って、p 2 7 7 ( V ) は遺伝的に異なるメス N O D マウスで自然的に進行した糖尿病と同様 S T Z にオス C 5 7 B L / k s j マウスに誘発された糖尿病の治療においても有効である。p 2 7 7 ( V ) 療法の適用性は、1 の原因又は 1 の遺伝子型又は性別の糖尿病に限定されない。

40

本明細書中に引用された参考文献は雑誌、記事若しくは要約、又は公開された若しくは対応する米国若しくは外国出願、発行された米国又は外国出願、更には他の参考文献を含むものであるが、全体として本明細書に一体化され、これは、引用された文献中の全てのデータ、表、数値及びテキストを含む。更に、ここに引用した参考文献中で引用されている参考文献の全体の内容もまた本明細書に一体化される。

【 0 0 4 7 】

公知の方法のステップ、従来の方法のステップ、公知の方法又は従来の方法への参照は、

50

本発明の観点、説明及び実施例が関連技術において開示、教示又は示唆されていることを認めるものではない。

上述の実施例の説明は本発明の一般的性質を明らかにしているため、本技術の属する分野の通常の知識を適用することにより（ここに引用した参考文献の内容を含む）、不必要な実験を行うことなく、本発明の一般的概念から離れることなく、容易に実施例の変更及び/又は応用を行うことができる。従って、このような変更及び応用は、本明細書中における教示及び指導に基づき、実施例と均等の意味及び範囲内であると意図される。本明細書中で用いられた用語は発明の説明のためのものであり、発明を限定するものではないので、本明細書の用語は本明細書の開示及び教示を参照して、発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者の知識と組み合わせることにより、通常の知識を有する者により解釈されなければならない。

10

【0048】

#### 参考文献

ベンデラック (Bendelac A)、カルナウド (Carnaud C)、バツハ (Bach JF)、(1987)、糖尿病 NOD マウスから健康な新生児への自己免疫糖尿病の親縁移転: L3T4+ 及び LY+ - 2+ T 細胞の要件 (Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Ly+ - 2+ T cells)、J. Exp. Med., 166: 823 - 832

20

ボウマン (Bowman MA)、レイター (Leiter EH) 及びアトキンソン (Atkinson MA)、(1994)、NOD マウスにおける糖尿病の予防: ヒト疾病の治療的介入の関係 (Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease)、Immunology Today, 15: 115 - 120

カスタノ (Castano L)、アイセンバース (Eisenbarth GS)、(1990)、I 型糖尿病: ヒト、マウス及びラットの慢性自己免疫疾患 (Type - I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat)、Annu. Rev. Immunol., 8: 647 - 679

30

エリアス、ダナ (Elias, Dana)、(1994)、NOD マウス: 自己免疫インシュリン依存性糖尿病のモデル (The NOD mouse: A model for autoimmune insulin-dependent diabetes.)、Autoimmune Disease Models, A Guidebook, pp 147 - 161

【0049】

エリアス (Elias, D)、マルコヴィッツ (Markovits D)、レシェフ (Reshef T)、ファン・デル・ジー (van - Der Zee R)、コーエン (Cohen IR)、(1990)、65 - kDa 熱ショックタンパク質による非肥満性糖尿病 (NOD/Lt) における自己免疫性糖尿病の誘発と治療 (Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese-diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65 - kDa heat shock protein)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1576 - 1580

40

エリアス (Elias D)、プリゴジン (Prigozin H)、ポラック (Polak N)、ラポポート (Rapoport M)、ローゼン (Lohse AW)、コーエン (Cohen IR)、(1994)、 $\beta$ -細胞毒素であるストレプトゾトシンにより誘発される自己免疫糖尿病 (Autoimmune diabetes induced by the  $\beta$ -cell toxin streptozotocin)、Di

50

abetes, 43:992-998

エリアス (Elias D.)、レシェフ (Reshef T)、ビルク (Birk O S)、ファンデルジー (van der Zee R)、ウォーカー (Walker M D)、コーエン (Cohen IR)、(1991)、ヒト65kDa熱ショックタンパク質のT細胞エピトープによるマウス自己免疫糖尿病のワクチン (Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65kDa heat shock protein)、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 88:3088-3091

エリアス (Elias D.)、コーエン (Cohen IR)、(1994)、NOD マウスにおける糖尿病のペプチド療法 (Peptide therapy for diabetes in NOD mice)、The Lancet, 343:704-706. 10

カウフマン (Kaufman DL)、クラール-サルズラー (Clare-Salzer M)、タイアン (Tian J)、ホルストフーバー (Forsthuber T)、ティング (Ting GSP)、ロビンソン (Robinson P)、アトキンソン (Atkinson MA)、セルカルツ (Sercarz EE)、トビン (Tobin AJ)、レーマン (Lehmann PV)、(1993)、ムリンインシュリン依存性糖尿病におけるグルタミン酸デカルボキシラーゼに対するT-細胞寛容の自然損失 (Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes)、Nature, 366:69-72 20

【0050】

ライク (Like AA)、ロジニ (Rossini AA)、(1976)、ストレプトゾトシン誘発性膵臓インシュリン炎：糖尿病の新規モデル (Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus)、Science, 193:415-417

モスマン (Mosmann T.R.)及びコフマン (Coffman R.I.)、(1989)、Ann Rev Immunol, 7:145-173 30

ティッシュ (Tisch R)、ヤング (Yang XD)、シンガー (Singer SM)、リブラヴ (Liblav RS)、フガー (Fuggar L)、マクデヴィット (McDevitt HO)、(1993)、グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する免疫応答は非肥満性糖尿病マウスにおいてインシュリンと相互関連する (Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice)、Nature, 366:72-75

【0051】

【配列表】

## (1) 一般情報：

## (1) 出願人：

(A) 氏名：イエダ リサーチ アンド ディヴェロップメントカンパニー、リミテッド

(B) 番地：P. O. Box 95

(C) 町名：レホヴォト

(E) 国名：イスラエル

(F) 郵便番号 (ZIP) : 76100

10

(A) 氏名：コーエン、イルン アール

(B) 番地：ハンキン ストリート 11

(C) 都市名：レホヴォト

(E) 国名：イスラエル

(F) 郵便番号 (ZIP) : 76354

20

(A) 氏名：エリアス、ダナ

(B) 番地：デレチ ヤヴネ 57

(C) 都市名：レホヴォト

(E) 国名：イスラエル

(F) 郵便番号 (ZIP) : 76344

30

(A) 氏名：フリドキン、マティチャフ

(B) 番地：ミラー ストリート 23

(C) 都市名：レホヴォト

(E) 国名：イスラエル

(F) 郵便番号 (ZIP) : 76284

(i 1) 発明の名称：ペプチド p 277 類似体及びこれを含む糖尿病の治療又は診断のための薬剤組成物

40

(i 1 1) 配列の数：10

## (iv) コンピュータ判読:

- (A) 媒体の種類: フロッピーディスク
- (B) コンピューター: IBM PC compatible
- (C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: パテントイン リリース #1.0、バージョン

## 1.30 (EPO)

## (v1) 前出願の情報

10

- (A) 出願番号: IL 112094
- (B) 出願日: 1994年12月21日

## (v1) 前出願の情報

- (A) 出願番号: IL 114460
- (B) 出願日: 1995年7月5日

## (2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 1の情報

20

## (1) 配列の特徴

- (A) 長さ: アミノ酸24個
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

## (11) 配列の種類: ペプチド

## (x1) 配列の記載: 配列番号 (SEQ ID NO) : 1:

30

Val Leu Gly Gly Gly Gys Ala Leu Leu Arg Cys Ile Pro Ala Leu Asp

1                    5                    10                    15

Ser Leu Thr Pro Ala Asn Glu Asp

20

## (2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 2の情報

## (1) 配列の特徴

40

- (A) 長さ: アミノ酸24個

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(i i) 配列の種類：ペプチド

(i x) 特徴

(A) 名前／キー：ペプチド

(B) 位置：6、11、19

10

(D) 他の情報：位置6／11のXaaはCys又はValであり、位置19のXaaはThr又はLysであり、位置19のXaaがThrである場合、位置6／11のXaaの両方がCysでない。

(x i) 配列の記載：配列番号 (SEQ ID NO) : 2 :

Val\_Leu Gly Gly Gly Xaa Ala Leu Leu Arg Xaa Ile Pro Ala Leu Asp

1                    5                    10                    15

Ser Leu Xaa Pro Ala Asn Glu Asp

20

20

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 3 の情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：アミノ酸24個

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

30

(D) トポロジー：直鎖状

(i i) 配列の種類：ペプチド

(x i) 配列の記載：配列番号 (SEQ ID NO) : 3 :

Val Leu Gly Gly Gly Gys Ala Leu Leu Arg Cys Ile Pro Ala Leu Asp

1                    5                    10                    15

Ser Leu Lys Pro Ala Asn Glu Asp

40

20

## (2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 4 の情報

## (1) 配列の特徴

(A) 長さ : アミノ酸 24 個

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(11) 配列の種類 : ペプチド

10

## (1x) 特徴

(A) 名前 / キー : ペプチド

(B) 位置 : 19

(D) 他の情報 : 位置 19 の X a a は T h r 又は L y s である。

(x1) 配列の記載 : 配列番号 (SEQ ID NO) : 4 :

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Cys Ile Pro Ala Leu Asp

1

5

10

15

20

Ser Leu Xaa Pro Ala Asn Glu Asp

20

## (2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 5 の情報

## (1) 配列の特徴

(A) 長さ : アミノ酸 24 個

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(11) 配列の種類 : ペプチド

30

(x1) 配列の記載 : 配列番号 (SEQ ID NO) : 5 :

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Cys Ile Pro Ala Leu Asp

1

5

10

15

Ser\_Leu Lys Pro Ala Asn Glu Asp

20

40

## (2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 6 の情報

## (1) 配列の特徴

(A) 長さ : アミノ酸 24 個

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

10

(11) 配列の種類 : ペプチド

## (1x) 特徴

(A) 名前/キー : ペプチド

(B) 位置 : 19

(D) 他の情報 : 位置 19 の Xaa は Thr 又は Lys である。

(x1) 配列の記載 : 配列番号 (SEQ ID NO) : 6 :

Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp

20

1                    5                    10                    15

Ser Leu Xaa Pro Ala Asn Glu Asp

20

## (2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 7 の情報

## (1) 配列の特徴

(A) 長さ : アミノ酸 24 個

30

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(11) 配列の種類 : ペプチド

(x1) 配列の記載 : 配列番号 (SEQ ID NO) : 7 :

Val Leu Gly Gly Gly Cys Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp

40

1                    5                    10                    15

Ser Leu Lys Pro Ala Asn Glu Asp

## (2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 8 の情報

## (1) 配列の特徴

(A) 長さ : アミノ酸 24 個

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

10

(11) 配列の種類 : ペプチド

## (1x) 特徴

(A) 名前 / キー : ペプチド

(B) 位置 : 19

(D) 他の情報 : 位置 19 の X a a は T h r 又は L y s である。

(x1) 配列の記載 : 配列番号 (SEQ ID NO) : 8 :

20

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp

1                    5                    10                    15

Ser\_Leu Xaa Pro Ala Asn Glu Asp

20

## (2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 9 の情報

## (1) 配列の特徴

30

(A) 長さ : アミノ酸 24 個

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(11) 配列の種類 : ペプチド

(x1) 配列の記載 : 配列番号 (SEQ ID NO) : 9 :

Val Leu Gly Gly Gly Val Ala Leu Leu Arg Val Ile Pro Ala Leu Asp

1                    5                    10                    15

40

Ser Leu Lys Pro Ala Asn Glu Asp

20

(2) 配列番号 (SEQ ID NO) : 10 の情報

(1) 配列の特徴

(A) 長さ : アミノ酸 17 個

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(11) 配列の種類 : ペプチド

(x1) 配列の記載 : 配列番号 (SEQ ID NO) : 10 :

Asn Glu Asp Gln Lys Ile Gly Ile Glu Ile Ile Lys Arg Thr Leu Lys

1

5

10

15

Ile

10

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は p 2 7 7 及び p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) の安定性を示すグラフである。黒塗りの円は p 2 7 7 を用いた結果を示し、白抜きの円は p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) を用いた結果を示す。大きい円は 1 週間の貯蔵後の結果を示し、中間の大きさの円は 9 週後を示し、最も小さい円は 20 週後を示す。

【図 2】図 2 は糖尿病誘発性クローン C 9 の N O D の T 細胞がペプチド p 2 7 7 ( 黒塗りの円 ) 及び p 2 7 7 ( V a l <sup>6</sup> - V a l <sup>11</sup> ) ( 白抜きの円 ) に応答して増殖することを示す。

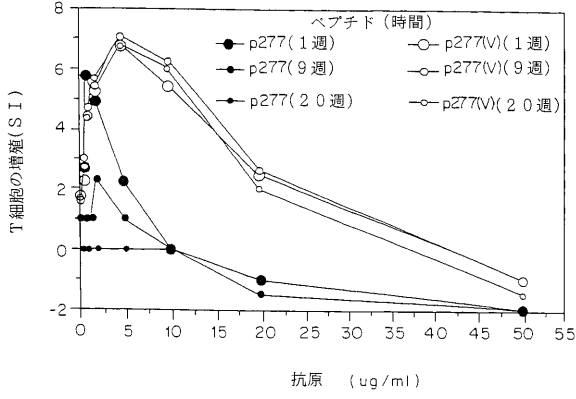
30

【図 3】図 3 は N O D 脾臓細胞がペプチド p 2 7 7 ( L y s <sup>19</sup> ) 存在下で増殖することを示す。5 匹のメスマウスの脾臓が各々の月齢のグループでペプチド p 2 7 7 ( L y s <sup>19</sup> ) ( 黒塗りの円 )、p 2 7 7 ( 白抜きの円 ) 及びコントロールペプチド p 2 7 8 ( 黒塗りの四角形 ) に応答した T 細胞の増殖がテストされた。

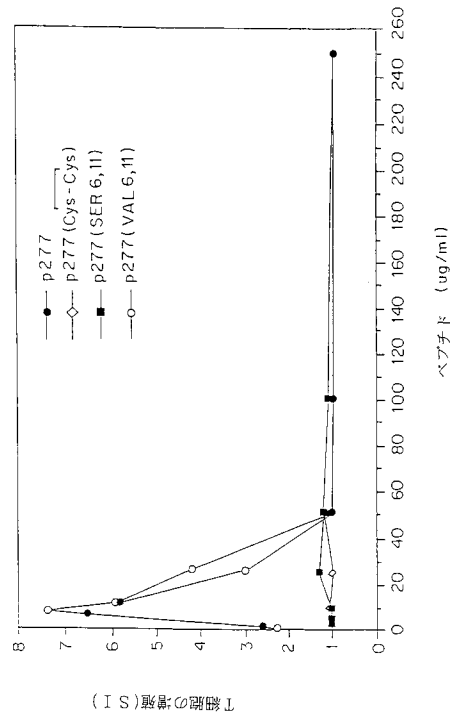
【図 4】図 4 は糖尿病誘発性クローン C 9 の N O D の T 細胞がペプチド p 2 7 7 に応答して増殖することを示す。

【図 5】図 5 は S T Z 誘発性糖尿病の予防においてコントロールの処置又は G A D p 3 4 による処置と比較して I F A 中の p 2 7 7 ( V ) による前処置の有効性を示すグラフである。

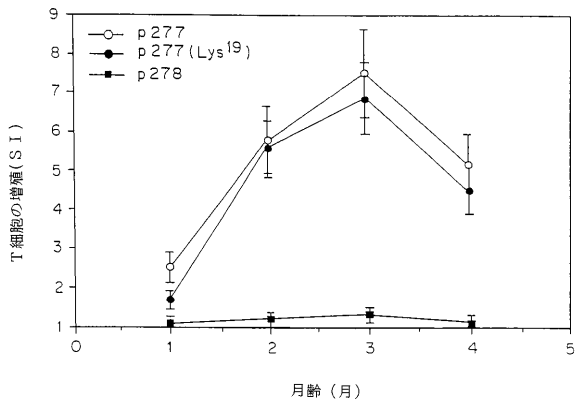
【 図 1 】



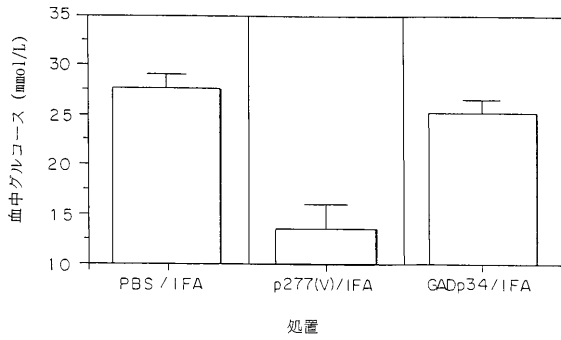
【 図 2 】



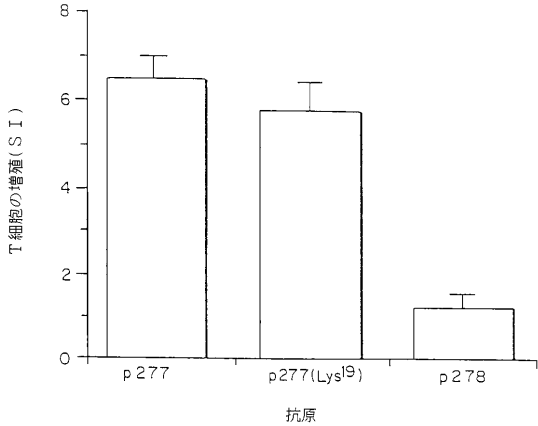
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
 C 1 2 Q 1/02 A 6 1 K 37/02

(72)発明者 コーエン、イルン アール  
 イスラエル、レホヴォト 7 6 3 5 4、ハンキンストリート 1 1

(72)発明者 エリアス、ダナ  
 イスラエル、レホヴォト 7 6 3 4 4、デレチ ヤヴネ 5 7

(72)発明者 フリドキン、マティチャフ  
 イスラエル、レホヴォト 7 6 2 8 4、ミラーストリート 2 3

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ03 QQ79 QR42 QR48 QR58 QR77 QS02 QS03 QS12  
 QS13 QS36  
 4C084 AA02 AA07 BA08 BA19 BA23 CA59 DC50 MA52 MA59 MA66  
 NA03 ZC35  
 4C085 AA03 BB11 CC32 EE01 GG02 GG03 GG04 GG08  
 4C087 AA01 BB37 NA14 ZC35  
 4H045 AA10 AA30 BA18 CA40 EA20 EA50 FA10 GA25

专利名称(译)	用于治疗或诊断糖尿病的肽p277类似物和药物组合物包含其		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004026797A</a>	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2003022033	申请日	2003-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	焯达研究和迪已经跌落仪器有限公司		
申请(专利权)人(译)	耶达研究及迪已经跌落仪器公司，有限公司		
[标]发明人	コーエンイルンアール エリアスダナ フリドキンマティチャフ		
发明人	コーエン、イルン アール エリアス、ダナ フリドキン、マティチャフ		
IPC分类号	C12Q1/02 A61K35/14 A61K35/17 A61K38/00 A61K38/16 A61K38/17 A61K38/18 A61K39/00 A61K45/00 A61K49/00 A61P3/08 A61P3/10 C07K14/00 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543 G01N33/564 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P3/08 A61P3/10 C07K14/4713		
FI分类号	C07K14/00.ZNA A61K35/14.Z A61K39/00.H A61P3/10 C12Q1/02 A61K37/02 A61K35/17.Z A61K38/00 A61K38/16 C07K14/47.ZNA C07K16/18 G01N33/53.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR58 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS03 4B063/QS12 4B063/QS13 4B063/QS36 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/CA59 4C084/DC50 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA03 4C084/ZC35 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4C087/AA01 4C087/BB37 4C087/NA14 4C087/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA10 4H045/GA25		
代理人(译)	池田幸		
优先权	112094 1994-12-21 IL 114460 1995-07-05 IL		
其他公开文献	JP3554319B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

患者	年齢 (年)	診断からの時間 (週/月)	T細胞の応答 (刺激指数)		
			コントロールAg	hsp60	p277 (Y)
1. LM	32	3.5月	+	+	-
2. G	25	24月	+	+	-
3. H	23	6月	+	+	-
4. DV	20	3週	+	+	-
		5週	+	+	+
5. SD	15	6週	+	+	+
6. P	15	4週	+	-	-
7. G	60*	5週	+	+	+
		7週	+	+	+
8. F	45*	6週	+	+	+
9. IS	53	2週	+	+	-
10. T	20	4週	+	+	+
11. KK	21	4週	+	+	-
12. RI	40	6週	+	-	-
13. MS	5	1週	+	-	-
14. KB	5	2月	+	+	+
15. BI	11.3	3週	+	-	-
16. YY	60	2月	+	+	-
17. KA	12	4週	-	-	-
18. ZA	12	4週	+	+	+
19. A	17.5	11.5年	+	+	+
20. N	17.5	7.5年	+	+	+
21. A	19.7	5.7年	+	+	+

\* 抗-GAD抗体に陽性の患者は、開始からの時間にかかわらず、I型糖尿

摘要(译)  
 提供了新颖的p277类似物。具有hsp60的p277序列结构的肽，其具有被缬氨酸残基取代的半胱氨酸残基和/或被Lys取代的Thr19残基，基本上等同于p277。它具有相同的生物活性，但稳定性更高。新颖的p277类似物可以用于使用p277的所有目的。[选择图]无

