

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 512599

(P2003 - 512599A)

(43)公表日 平成15年4月2日(2003.4.2)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
C 0 7 K 7/06	ZNA	C 0 7 K 7/06	ZNA
7/08		7/08	
16/18		16/18	
G 0 1 N 33/564		G 0 1 N 33/564	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 68数)

(21)出願番号 特願2001 - 517161(P2001 - 517161)

(86) (22)出願日 平成12年8月16日(2000.8.16)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月15日(2002.2.15)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/07973

(87)国際公開番号 W001/013110

(87)国際公開日 平成13年2月22日(2001.2.22)

(31)優先権主張番号 9919452.4

(32)優先日 平成11年8月17日(1999.8.17)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 オステオミーター・ピオテック・イー / エス
OSTEOMETER BIOTECH
A / S

デンマーク国、デーカ - 2730 ヘルレフ、
ヘルレフ・ホーフエダガーデ、207番、オス
テオパルク

(72)発明者 クロオース、ポール・アンドレアス・コン
パーレ

デンマーク国、デーカー - 2100 コペンハ
ーゲン、5テーベイ、ゲーエル・カルクブレ
ンデリベイ、62

(74)代理人 弁理士 竹内 卓 (外1名)

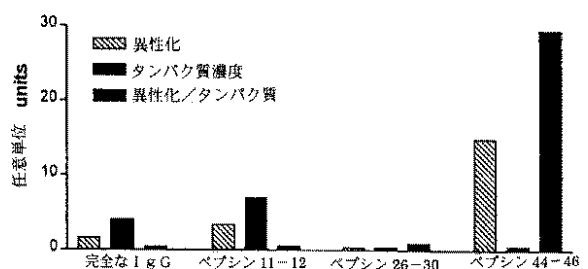
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 異性化 / 光学的反転したエピトープに対する特異的免疫反応：自己免疫病診断への応用

(57)【要約】

アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン又はグルタミン酸残基において異性化したタンパク質と反応性を示す抗体及びTリンパ球が、I g G (リウマチ性関節炎)及びミエリン塩基性タンパク質 (多発性硬化症)に対する自己反応性を含む自己免疫症状に関連性をゆることが見出された。異性化したタンパク質配列に対する自己免疫反応性を診断する測定法が記載される。

I g G切断生成物の選別したプールの異性化パターン



【特許請求の範囲】

【請求項1】(a)異性化したペプチド結合及び/又は光学的に反転したアミノ酸を含むエピトープを特異的に認識する自己反応性免疫系成分及び/又は(b)前記エピトープを含む自己抗原若しくはその断片及び/又は(c)前記エピトープを含む且つ自己免疫応答を誘発する能力を有する非自己抗原若しくはその断片の試料中での存在を定量的又は定性的に測定する操作に試料を供することから成る測定方法。

【請求項2】前記免疫系成分が、細胞性免疫系成分である、請求項1において記載された方法。

【請求項3】前記免疫系成分が、Tリンパ球である、請求項2において記載された方法。

【請求項4】前記免疫系成分が、体液性免疫系成分である、請求項1において記載された方法。

【請求項5】前記エピトープが、異性化したペプチド結合及び/又は光学的に反転したアミノ酸を含むIgGから誘導されたアミノ酸配列を含んで成る、請求項4において記載された方法。

【請求項6】前記免疫系成分が、下記する配列の何れか一つに含まれるアミノ酸^{*}Asxを含んで成るエピトープに配向させた自己抗体である、請求項4において記載された方法：

Trp - Leu - ^{*}Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr ;

Trp - Glu - Ser - ^{*}Asx - Gly ;

His - Phe - Phe - Lys - ^{*}Asx - Ile - Val - Thr - Pro ;

Pro - Ser - ^{*}Asx - Glu - Gly - Lys - Gly - Arg ;

Ala - Leu - Gly - Ile - Gly - Thr - ^{*}Asx - Ser - Val - Ile ;

Trp - Ser - Phe - Gly - Ser - Glu - ^{*}Asx - Gly - Ser - Gly - ^{*}Asx - Ser - Glu - Asn ;

Ala - Gly - Trp - Leu - ^{*}Asx - Gly - Ser - Val - Ar

g ; 及び

Gly - Arg - Val - Arg - Val - *Asx - Ser - Ala - Tyr
r :

なお上式において、*Asxは、D Asp若しくはAsn、又は L Asp若しくは原初の配列における残基Asp若しくはAsnの異性化/光学的反転により生成する D Aspである。

【請求項7】前記免疫系成分が、下記する配列の何れか一つの配列に含まれる*Asxなるアミノ酸を含んで成るエピトープに対して配向させた自己抗体である、請求項4において記載された方法：

Met - Glu - Val - Gly - Trp - Tyr - Arg - Pro - Pro
- Phe - Ser - Arg - Val - Val - His - Leu - Tyr - Arg
- *Asx - Gly - Lys - 又はVal - Val - His - Phe - Phe -
Lys - *Asx - Ile - Val - Thr - Pro :

なお上式において、*Asxは、D Asp若しくはAsn、又は D Asp若しくは原初の配列における残基Asp若しくはAsnの異性化/光学的反転により生成する L Aspである。

【請求項8】前記免疫系成分が、下記する配列の何れか一つに含まれるアミノ酸*Glxを含んで成るエピトープに対して配向させた自己抗体である、請求項4において記載された方法：

Pro - Ser - *Glx - Gly - Lys - Gly - Arg ;
Phe - Ser - Trp - Gly - Ala - *Glx - Gly - Arg ; 又は
Asp - Ala - *Glx - Gly - Thr - Leu - Ser - Lys :

なお上式において、*Glxは、D Glu若しくはGln、又は L Glu若しくは原初の配列における残基Glu若しくはGlnの異性化/光学的反転により生成する D Gluである。

【請求項9】前記免疫系成分又は自己抗原の検出によって自己免疫病が示されるものである、請求項1乃至8の何れか一項において記載された方法。

【請求項10】前記疾病が、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症、ツェリアカ(腹部内臓病)、チャガス病、乾癬又

はクローン病である、請求項9において記載された方法。

【請求項11】自己抗原又はその断片と前記自己抗原内における異性化したペプチド結合又は光学的反転したアミノ酸の存在に対して特異的である免疫学的結合パートナーとの反応性を検出することから成る、自己抗原又はその断片を検出する方法。

【請求項12】前記免疫学的結合パートナーが、請求項6乃至8の何れか一項において定義されエピトープに対して特異的である、請求項11において記載された方法。

【請求項13】前記した免疫系成分、自己抗原、非自己抗原又は抗原断片の検出量に関する情報を提供するものである、前記請求項のうちの何れか一項において記載された方法。

【請求項14】自己抗原中の単一又は複数のエピトープの位置を決定する方法において、L イソアスパルチル(D アスパルチル)メチルトランスフェラーゼ(IAMT)及び標識化メチル基供給源とを用いて前記自己抗原内の異性化したペプチド結合及び/又は光学的に反転したアミノ酸の一つ以上に前記標識化メチル基を導入すること、及び前記標識化メチル基が導入された前記自己抗原内の位置を決定すること、前記位置を包含する領域内における前記自己抗原のアミノ酸配列を決定すること、及び前記位置において前記異性化した又は光学的に反転したアミノ酸を組み込んだ前記アミノ酸配列のペプチドを試験・検査して自己反応性免疫系成分との反応性を測定すること、とから成る前記単一又は複数のエピトープの位置決定方法。

【請求項15】該自己抗体が自己免疫病に関連するものである、請求項14に記載された方法。

【請求項16】該自己免疫病が、リウマチ性関節炎、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症、ツェリアカ(腹部内臓病)、チャガス病、乾癬又はクローン病である、請求項9において記載された方法。

【請求項17】自己反応性免疫系成分によって認識されるエピトープを含むペプチドであって、該エピトープが異性化したペプチド結合又は光学的反転したアミノ酸を含むものである、前記ペプチド。

【請求項18】請求項6乃至8の内の何れか一項において定義されたエピトープを含む、請求項17において記載されたペプチド。

【請求項19】変化したアミノ酸残基である^{*}A s x又は^{*}G l x なお本式において、^{*}G l xは D G l u若しくはG l n、又は L G l u若しくは原初の配列における残基G l u若しくはG l nの異性化/光学的反転により生成する D G l uであり、又^{*}A s xは D A s p若しくはA s n、又は L A s p若しくは原初の配列における残基A s n若しくはA s pの異性化/光学的反転により生成する D A s pである 及び少なくとも三種の側鎖アミノ酸残基とをN 末端及び/又はC 末端方向に含んで成る、請求項18において記載されたペプチド。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明が属する技術分野】**

本発明は、例えば自己抗体や自己反応性T細胞などの免疫系成分を測定する方法及び当初診断を行い且つ自己免疫病をモニターするための診断的免疫測定方法を開発する操作手順に係わる。

【0002】**【従来の技術】**

自己免疫病は、生物の自己構成成分が免疫系によって認識される結果、異常な免疫応答が開始されることになるという、共通の指標を有した複雑な一群の症状を含んで成る。自己免疫反応が生起するためには、通常は良好に維持され、健全な個人にとっては終生維持される免疫学的寛容が、“破断・破壊”される必要がある(Cooke 1988)(下記する“参考文献”を参照のこと)。かかる現象の原因は、一般的には評価し難いものである。その理由は、自己免疫反応の開始は、当該疾病の臨床診断が行われる数年前に生起しており、しかもかかる開始事象は、疾病が異なれば大幅に変動する可能性があるからである。ヒトの身体における潜在的な自己抗原の数は膨大であるとはいえ、自己免疫病は、僅かに幾つかの組織と抗原に限定されることに注目すべきである。生物体内において標的抗原及び自己免疫反応が局在化していると仮定すれば、自己免疫病は、器官特異的又は非器官特異的(全身的)疾患のいずれかに分類することが出来る。何れの場合にも、当該免疫反応は、当該免疫系の内の体液性(即ち、抗体合成性)部分と細胞性部分とを包含するものである(Cooke 1988)。

【0003】

本発明は、例えば自己抗体や自己反応性T細胞又はB-細胞などの免疫系成分及び例えば自己抗原などこれらと相互反応性を有する分子を特性化して、かかる免疫系成分及び自己抗原を検出するための操作手順に係わる。かかる操作手順の適用及び本発明の使用に関する実施例において、全身性自己免疫病であるリウマチ性関節炎(RA)又は多発性硬化症(MS)に関連した自己免疫現象を記載してある。しかしながら、このことは、本発明の具体的な説明の一つとして了

解されるに過ぎず、本発明の範囲をR A又はM Sにのみ限定するものとは決して意図されることはない。

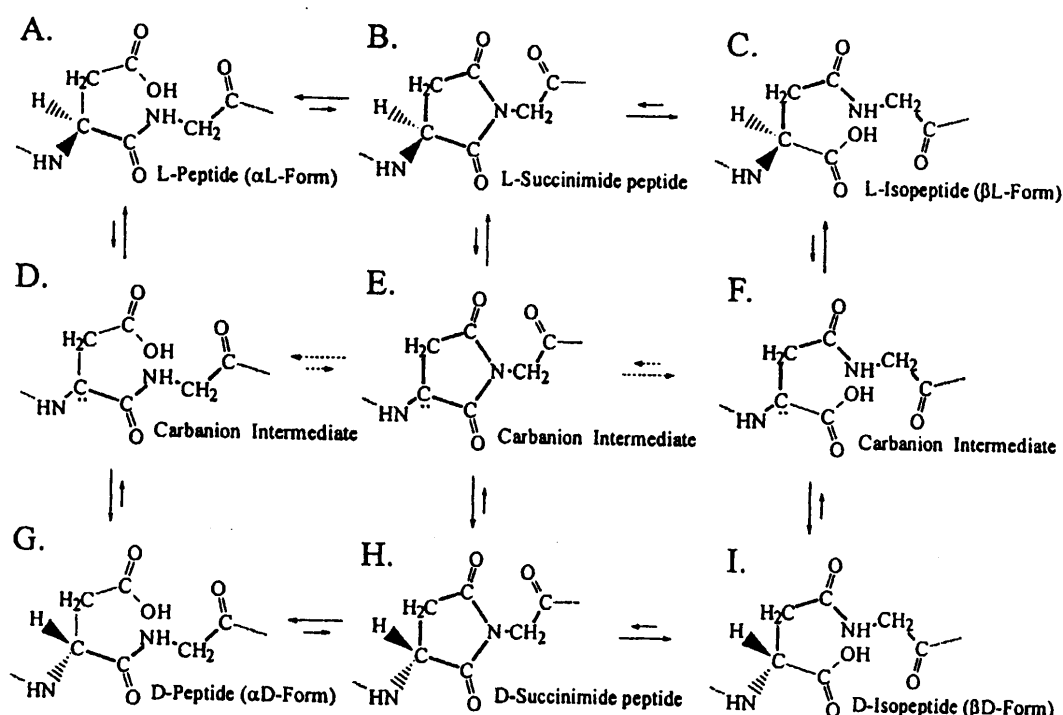
【0004】

本発明の根底となる仮説

本発明は、種々のタンパク質において感受性の高い残基の異性化及び光学的反転が、自己免疫病における自己免疫応答の生成にとって重要である、という仮説に基くものである。アスパラギン酸とアスパラギン (Asx) 及びグルタミン酸とグルタミン (Glx) 残基が、幾つかの感受性の高いタンパク質において自発的転移を受けて、かくしてAsx又はGlx残基と隣接残基との間における正常なペプチド結合が、直鎖のカルボキシル基から側鎖のカルボキシル基 (Glx残基についてはカルボキシル基) に転移されるのである (Clarke 1987)。この異性化反応は、スクシンイミドを経由して進行するが、自発的加水分解が生起すると直ちに下記する四つの式のうちの一つに変わる：即ち、以下の化学反応スキームでアスパラギン酸について概略示すように通常存在するL、イソ型であるL、又は二つの光学的反転型であるD及びDである。

【0005】

【図】



【0006】

ペプチド主鎖窒素原子が隣接アスパラギン残基の側鎖カルボニル基を攻撃した結果、スクシンイミド環が形成される可能性がある（A B）。このスクシンイミド環は、加水分解及び光学的反転を受けて、D及びL双方の立体配座であるペプチドとイソペプチドを生成しやすい。光学的反転は、直接的プロトン引き抜き（A D G又はC F I）かスクシンイミド経路（B E H）のいずれかを介したカルバニオン中間体を經由して（D, E及びF）進行する。上記図においては、当該ペプチド主鎖は、太字の直線で表す。この図は、Asp-Gly配列において生起する異性化/光学的反転反応を示すものであるが、当該反応は、感受性のあるAsx又はGlx含有エピトープの何れにおいても生起する可能性がある。

【0007】

しかしながら、環状イミド生成（及び異性化/光学的反転）が起きるためには、このAsxとGlx残基を取り巻く三次元構造は、最適構造と十分な柔軟性を有していなければならない(Clarke 1987)。

【0008】

種々の研究の結果、ペプチド及びタンパク質内におけるAsxの光学的反転は、主としてスクシンイミド経路(BEH)を経由して進行することが判っている(Geiger and Clarke 1987, Radkiewics et al 1996)。しかしながら、例えば直接的プロトン引き抜き又はイミノラクトン形成などその他の経路も、光学的反転に寄与する可能性がある(Radkiewics et al 1996)。しかしながら、これらの経路は、重要性としては低いものと推定される(Geiger and Clarke 1987, Radkiewics et al 1996)。

【0009】

タンパク質又はペプチド内にこのような構造的変化を導入することは、その機能、安定性及び物理的・化学的特性に甚大な影響を及ぼす。本発明は、かかる構造的変化が当該分子の免疫原性について有する役割を記載・報告するものである。

【0010】

あるタンパク質又はペプチド内にかかる異性化した及び/又は光学的反転した残基を導入した結果、当該タンパク質が免疫応答を發揮する能力において重要な役割を有する新規なL、D及びD型が生じるのである。特に自己免疫病においては、患者自らの組織又は器官の自己成分が突然抗原として免疫系の対象になるため、異性化及び/又は光学的反転が重要な役割を果たすのである。

【0011】

異性化及び/又は光学的反転は、自発的に極めて低い速度で生起するため、免疫学的寛容の対象とはなりにくい分子に新規なエピトープを導入する可能性がある。このような新規のエピトープは、免疫系の抗原提示細胞によって認識され、その結果免疫応答を發揮することになる。

【0012】

Asxに関連した“タンパク質疲労”が免疫原性を含むタンパク質特性に及ぼす影響は、研究検討に価する可能性がある(Galletti et al 1995)。

【0013】

短鎖のペプチドの持つ免疫学的特性は、アスパルチル残基の光学的反転によって左右される可能性があることが既に報告されている(Benkirane et al 1993)。

【0014】

更には、インビトロで脱アミド化した血清アルブミンが、抗原特性を変化させ、かくして生体内で免疫原性を有するものになり又インビボでの同様のプロセスが、加齢した生体内での種々の自己免疫プロセスの生成において役割を果たしていることが報告されている (Lukash et al, 1987)。

【0015】

アスパラギンの脱アミド化は、当該ペプチド結合の異性化の結果である可能性があるが、脱アミド化については多くのプロセスが存在する (Mor et al, 1992)。脱アミド化それ自体では、上記反応スキームにおいて示した態様においてスクシンイミドを経由した異性化 / 光学的反転により生起した種類のタンパク質主鎖の構造的変化は惹起されることはない。脱アミド化は例えば、当該アミドのうちのアミン-NH₂基を脱離するのに特異的であって且つ当該ペプチド結合を変化させないか又は光学活性の変化を伴わない酵素の作用の結果である可能性もある。

【0016】

D - アミノ酸を含むペプチドに対する免疫応答は、L - アミノ酸からのみ構成される相当するペプチドに対する応答とは異なることが報告されている (Sela & Zisman 1997, Maillere et al 1995, Todome et al 1992, Sela & Fuchs 1965)。Todomeら (1992)は、D アラニン残基を含有するバクテリア性タンパク質断片は、ヒトにおいて免疫応答を惹起することを証明している。Maillereら (1995)は、蛇毒に由来する、T - 細胞エピトープ中の通常型のL - アミノ酸は、T - 細胞レセプターとの結合及びその反応性を変化させることを示している。Sela及びFuchs (1964年プラハで開催された会合での会議講演要旨)は、D - アミノ酸をエピトープ / 抗原に含有させると、D チロシンを含む合成オリゴペプチドを用いた実験結果から判定しているようにその抗原性を増加させる可能性があることを記述している。これらや類似の観察結果は、Morら (1992)やSela及びZisman (1997)による総説においてさらに検討されている。

【0017】

これらの報告書の何れにおいても、自己抗原又は自己抗原性エピトープがD - アミノ酸を含有しているとか又はかかるD - アミノ酸が自己免疫応答を誘発する可能性があることを議論してはいない。更には、上記において引用した研究報告の何れも、本特許明細書において記載するスクシンイミド経路を介した自発的光学的反転について言及していない。寧ろこれら報告書には、`G l x`及び`A s x`以外のD - アミノ酸を用いて作成した合成ペプチドを使用して行った研究を記載しているのである。

【0018】

リウマチ性関節炎

リウマチ性関節炎 (R A) は、重篤な慢性で且つ進行性の疾患であり、工業国及び発展途上国の何れにおいても人口のほぼ1%が罹患している。環境、遺伝子及び発育の諸因子がR Aの病因に関与しているものの、現在ではR Aは、自己免疫病のひとつであることが確立されている (Williams 1996)。

【0019】

R Aの主要な臨床像としては、軟骨及び滑膜組織の異常と退化であり、その結果関節の潤滑機能が重度に低下するため、R A患者の運動能力に係わる問題が幾つか生じる。罹患した関節は、多形核好中球、マクロファージ、T - 細胞やその他の免疫系細胞を含んだ浸潤 (滑膜炎) を示す。これらの細胞は、ある能動的免疫学的プロセスに関与していて、この場合これら細胞及びその分泌生成物の作用が関節破壊のメディエータとなる (Munthe & Natvig 1972; Harris 1993)。その代わりに、活性滑膜炎が、新たな毛細血管 (血管新生) と滑膜内膜細胞の関節内部への過大成長を促す結果、関節の正常な機能を更に障害することになる。

【0020】

R Aの最も特徴的な血清学的特長は、自己I g Gに対して配向した抗体が循環することである (Bernstein 1990)。これらの抗I g G自己抗体は、リウマチ性因子 (R F s) と称される。R F sは、I g M , I g G , I g A及びI g Eであってもよいが、I g M及びI g GのR F sが、R A患者の間では臨床上的重要性と蔓延性は大きいように思われる (Jonsson & Valdimarsson)。多くの免疫グロブリンクラスがR F 応答に関与しているとの知見が得られた結果、R F 形

成は、抗原に駆動され且つT細胞依存性であって、単なるモノクローナル増殖又は免疫系の全般的な刺激の結果ではないことが強く示唆されることになった(Harris 1993; Bernstein 1990)。

【0021】

RFsは、RAに特異的なものではなく、割合は異なるが、急性炎症患者、自己免疫病などの患者また一見健常と見える若干の人の血清中にも見出される(Chen et al 1987, Carson et al 1993, Bernstein 1990)。滑膜組織中で局所的に自己関連RF複合体が形成されることは、RAやその他の全身性自己免疫病、例えばシェーグレン症候群、全身性紅斑性狼瘡や強皮症などにおいてしか認められない(Natvig & Munthe 1975, Winchester 1975)ことから、何らかの異常因子又は免疫学的応答がこれらの疾患においてIgG-RF複合体の凝集を加速していることが示唆されている。

【0022】

RAに関するこのような誘発原因因子は、未だ特定されておらず、大半の自己免疫病について言えるように、自己免疫攻撃が疾患の臨床的発症に数年も先だって誘発開始される可能性があるため、このような研究は実行が困難である。RAに対する高い感受性は、幾つかのMHC遺伝子の対立遺伝子、即ちDR-1位置のDw4とDw14遺伝子に関連していることが、既に充分確立されている(Nepom 1990)。

【0023】

本疾患の誘発開始と病因におけるRFの役割は、未だ知られていないが、RFがかかる疾患における中心的事象であるか、それともRAにおける二次的現象として単に発生しているのかの疑問には、依然として回答がなされていない。RAにおけるRF形成の誘発開始は、IgGのFc領域における立体構造変化の結果である可能性がある(Johnson et al 1975)。

【0024】

RA患者から単離されたIgGにはFcフラグメントにおけるオリゴサッカロイドのガラクトシル化に欠陥があるとの観察が、Parekhら(1985)によってなされ、大きな興奮を巻き起こしたが、IgGのガラクトシル化状態の持つ臨床

上の意義について更なる研究がなされたが、矛盾する結果が得られている (Parekh et al. 1988, Tomana et al. 1988)。寧ろ、I g Gのガラクトシル化の欠陥は、自己免疫病を発症するための一般的なリスクファクターである可能性がある (Harris 1993; Pilkington et al 1995)。

【0025】

RA患者から採取した関節について行った免疫組織化学的研究の結果、リウマチ性滑膜中にはRF活性を示すプラズマ細胞を含んだ相当数のI g Gが存在することが明らかとなり (Munthe & Natvig 1972)、その結果、RFsが自己I g Gと反応して、巨大な自己凝集性複合体を形成し、これが次に貪食されるため、引き続いてリソソーム酵素の放出・遊離が生起することになることが提案されている。幾つかの観察結果が、RAにおいて免疫学的に誘発された組織損傷の機構を支持している (Williams 1996; Carson 1993)。

【0026】

幾つかの免疫グロブリン型を有し、従って関与するI g G分子上に多重エピトープを有するRFsの異種性もまた、本疾患において果たす役割を正確に判断・評価するのを妨げている (Kalsi & Isenberg 1993)。RAに関連したRFsは、別の状況下にあるRFsとは異なっている可能性があり、I g GのFc領域のC_H2及びC_H3範囲におけるエピトープに対して配向されているように思われる (Bonagura et al 1993)。

【0027】

I g Gは、多数のアスパラギン及びアスパラギン酸残基を含み、これらは理論的に環状イミド (異性化/光学的反転) を形成するのに用いられる可能性がある。I g Gの三次元構造は公知であり、ヒトタンパク質内におけるAsx異性化の潜在的部位に関する理論的研究にも含まれていた (Clarke, 1987)。標準結合の長さや幾何学とを想定して、Clarkeは、バックボーン窒素原子からAsx又はGlxの側鎖ガンマカルボニル炭素までの距離をヒトI g Gを含む種々のタンパク質の場合について二面角ファイ ()、プサイ ()、カイ () 及びカイ2 (2) に基いて計算・算出している。これらの理論的な考察の結果、ヒトI g G Fc_H3領域におけるAsn-384は、イミド形成のためには最小の

立体構造変化しか必要としないことが判明し、従って、この部位は異性化し易い傾向を有するものと予想される(Clarke (1987))。更には、Svasti及びMilstein(1972)による研究の結果、マウスIgGは、Fcフラグメント内のAsn-Gly配列において異性化することが明らかとなっている(Svasti及びMilstein 1972)。Asn-384の周辺領域は、表面が暴露され、特にイミド形成を促進する環境影響に対して感受性が高く、敏感である可能性がある。

【0028】

自己免疫反応と多発性硬化症

多発性硬化症(MS)は、中枢神経(CNS)白質の炎症性疾患であり、その結果神経機能の混乱・破壊を伴う脱髄領域の発生に到る。MSの病因・病理発生は未だ解明されていないが、自己免疫機構に起因し、ミエリン破壊に到るものと信じられている。

【0029】

MSの誘発・開始原因因子は、未だ特定されておらず、大半の自己免疫病の場合と同様に、自己免疫攻撃が、当該疾患の臨床的発症に先立つ数年前に開始している可能性があるため、かかる研究は実行が困難である。MSの疾患プロセスが一定の病理学的レベルに到達する前に幾つかの事象が生起するはずである。これら事象の一つとして、血液脳関門が通常は十分に維持されて、CNSの諸成分と免疫系との間における接触が防止されるのであるが、ミエリタンパク質とかかる脳血液関門における欠陥に対する健全な免疫学的寛容の破断・破壊が挙げられる(de Vries et al 1997)。

【0030】

本疾患の発病と病因・病理発生における自己抗原の役割は未知であり、自己抗原の生成が本疾患の中心的事象であるか又はMSにおける副次的現象として生起するに過ぎないのかに係わる疑問は、依然として回答はなされていない。MSにおける自己抗原生成の開始は、ミエリタンパク質の立体配座の変化の結果であるのかもしれない。

【0031】

幾つかのミエリタンパク質が、自己抗体及び自己反応性T細胞の標的として

関与しており、例えばミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリン希突起神経膠細胞(MOG)及び クリスタリンなどがある(Martin 1997、Bettadapura et al. 1998、Van Noort et al, 1998)。

【0032】

MBPは、MSにおいては自己抗体及び自己反応性T-細胞の標的である。MBPの三次元構造は公知であり(Beniach 1997)、この分子は、多くのアスパラギンとアスパラギン酸とを含み、これらは理論的には環状イミド形成(異性化/光学的反転)に用いられる可能性がある。異性化/光学的反転が、このタンパク質の抗原性に影響を与えることはありそうである。

【0033】

MOGは、ミエリン鞘の外表面に局在化した膜貫通型グリコプロテインである(Linington et al. 1984)。ミエリン鞘の外表面上に限定して局在化しているため、MOGは、特にCNS内の抗MOG抗体がインビボ及びインビトロの双方において広範な脱髄を起こすため、MSにおいて自己免疫攻撃に対する理想的な一次標的抗原となる(Adelman et al 1995)。

【0034】

MOGは、EAEモデルにおいて脱髄性抗体を開始出来且つまた脳炎発生性T-細胞エピトープを含む、これまでに報告された唯一のミエリン自己抗原である(Linington et al. 1993)。更に抗MOG抗体の存在が、MS患者の血液中及びCSF中において証明されている(Sun et al. 1991)。そのうえ、Kerlero de Rosboと共同研究者は、MSkjのある母集団において圧倒的なMOGに対するT-細胞の応答を証明している(Kerlero de Rosbo et al. 1993)。MOGは、光学的反転/異性化の潜在的部位をただ一つしか含んでいないが、この部位は、MOGの残基54-55から成り、分子の表面暴露部分に位置する。更には、この部位は、極めて脳炎発生性が高く且つB-細胞とT-細胞応答の強力な(最も強力な)誘発因子であることが証明されている配列MOG₃₅₋₅₅の一部である(Ichikawa et al 1006)。

【0035】

従って我々は、MBP、 クリスタリン又はMOGの感受性のある部位にお

ける異性化が、MS病因・病理発生にある役割を果たしていることを提案する：異性化/光学的反転は、体液性及び細胞性免疫系の標的となるであろう新規な免疫原性エピトープを提供することによってMSの初期相に直接的に関与する可能性がある。

【0036】

その他の免疫病

本発明の基礎となる理論(即ち、自己タンパク質の異性化/光学的反転によって、自己免疫応答を生起させる新規の非寛容化エピトープが生成する)も同様に、他の自己免疫病にも適用可能であろう。これらのうち幾つかを下記する。

【0037】

インスリン依存性糖尿病(1DDM)

ランゲルハンス島にある膵臓の細胞は、自己免疫反応の結果破壊され、その結果インスリン依存性糖尿病(1DDM)を惹起する可能性がある。この破壊は、長期間にわたって進行し、その後初めて臨床症状が発現・発症する(Gorsuch et al. 1981)。多数の自己タンパク質が、1DDMにおける自己抗原として同定されている。

【0038】

神経内分泌酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)は、1DDMにおける主要な自己抗原である(Baekkeskov et al. 1990)。GADには二種のイソ型、即ちGAD65及びGAD67が存在し、これらは、大半はN末端の最初の100個のアミノ酸が異なる。1DDM血清は、GAD65に対して圧倒的に反応性を示すが、自己エピトープは主として、GAD67と相同性が高いGAD65の幾つかの領域に局在している。

【0039】

二種の緊密に関連したタンパク質であるIA2及びIA2betaは、膜貫通型チロシンホスファターゼファミリーに属し(Banifcio et al. 1995, Lu et al. 1996)、同様に1DDMにおける自己抗原であることが判っている。1DDM患者は、しばしばこれらのタンパク質に対する自己抗体を示す(Li et al. 1997)。

【0040】

G l i m a 3 8 は、3 8 k D a のランゲルハンス島細胞の膜グリコプロテインであって、やはり I D D M における自己抗原であることが示されている (Baekkeskov et al. 1982、Aanstoot et al. 1996)。

【0041】

さらには、インスリン自己抗体 (I A A) は、新たに診断された I D D M 患者の内の少なくとも半数において検出されているが (Palmer et al. 1883)、I A A の有する予見能は劣っている (Dean 1986)。

【0042】

重症筋無力症

重症筋無力症 (M G) は、骨格筋アセチルコリンリセプター (A C h R) を標的とする器官特異的自己免疫病である (Berrin-Aknin 1995)。即ち、大半の M G 患者は、神経筋伝達を妨害する、A C h R 配向自己抗体を有する。A c h R は胸腺に存在するものの、このタンパク質に対する寛容は、M G 患者には欠落している。かかる観察結果に対する一つの説明は、M G 患者は、A C h R が “ 変化した ” (異性化又は光学的反転した) 結果新規なエピトープとなり、従って寛容されなくなった A C h R に対する免疫学的応答を起こす、ということである。A C h R 上の幾つかの T 細胞エピトープが既に報告されている (Zisman et al. 1996、Yoshikawa et al. 1997、Atassi & Oshima 1997) が、中でも幾つかの A s x と G l x 残基を含む A C h R¹²⁹⁻¹⁴⁵ は、潜在的に異性化 / 光学的反転を受けやすい可能性がある。最近、この疾患におけるもう一つの可能性のある自己抗原が同定されている : 即ち、グラビン (G r a v i n) であって、2 5 0 k D a のキナーゼスカホールドプロテイン (kinase scaffold protein) (Nauert et al. 1997) である。従ってこのタンパク質における A s x 及び G l x 残基は、異性化 / 光学的反転を受けて、自己免疫応答を誘発し易い可能性がある。

【0043】

ツェリアカ (腹部内臓病)

ツェリアカ病 (C I D) は、食事中的グルテンに対する筋内膜及び T - 細胞媒介過敏反応に対する I g A 自己抗体によって特徴づけられる。グリアディン (G

liadin)が、グルテンの免疫原性部分であって、CID患者由来のT-細胞クローンに反応することが明らかにされている。CIDにおける腸内炎症は、食事中小麦グリアジンに対する暴露によって促進され、組織トランスグルタミナーゼ(TGase)なる酵素の粘膜活性が増大することに関連している。この酵素(TGase)が、かかる症状の自己抗原であると同定されている(Dietrich et al. 1997)。即ち、患者の98%が、TGaseに対するIgA力価が上昇しており、一方健常な対照者の95%は陰性である(Dietrich et al. 1998)。

【0044】

チャガス病(DC)

寄生原生動物であるTrypanosoma cruziに感染した結果、チャガス病(CD)と称される慢性の心臓及び内臓に関連した自己免疫病に罹患する。この慢性疾患は、心筋及び神経組織における濃厚な炎症性浸潤によって特徴づけられる。多数の自己タンパク質が、CDにおける自己抗原として同定されているが、中でも、心臓ミオシン(Abel et al. 1997)、ムスカリン様アセチルコリンレセプター(mAChR)(Goin et al. 1997)、及び核内低分子RNA(UsnRNP)(Bach-Elias et al. 1998)などが挙げられる。

【0045】

乾癬(Ps)

乾癬(Ps)は、表皮の増殖性慢性疾患であって、自己免疫の性格を有するようと思われる。この疾患の典型的な臨床的発症は、銀白色の鱗屑で被覆され、炎症を起こし腫脹した皮膚病変である。しかしながら、この疾患は、多くの異なる変型や重篤度で発症する。Ps患者の5乃至10%は、関節の炎症と糜爛・侵食を起こす乾癬性関節炎を発症する。本疾患の病因・発症病理は、なお議論の多いところであるが、その自己免疫性格は、免疫抑制治療及びIL-2(活性化T-細胞の増殖を選択的に防止する薬剤)による良く知られた成功によって裏づけられている(Gottlieb et al. 1995)。幾つかの研究も同様に、本疾患へのT細胞病因の関与を示唆している(Schon et al. 1997)。推定された、200KDaの透明板P(lamina lucida Ps)自己抗原が最近同定されている(Chen et al. 1996)

)。

【0046】

クローン病 (C r D)

クローン病 (C r D) は腸の慢性炎症性疾患であり、頻繁に小腸及び大腸に局在化して、潰瘍を生起せしめるが、C r Dは、消化系全般に影響を与える可能性がある。C r Dの原因は、目下のところ不明であるが、本質は自己免疫系であるように思われる。尤も、現在のところ自己抗原又はT - 細胞エピトープは一切同定されていない。

【0047】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明は、(a) 異性化したペプチド結合及び/又は光学的に反転したアミノ酸を含むエピトープを特異的に認識する自己反応性免疫系成分及び/又は (b) 前記エピトープを含む自己抗原若しくはその断片及び/又は (c) 前記エピトープを含む且つ自己免疫応答を誘発する能力を有する非自己抗原若しくはその断片の試料中での存在を定量的又は定性的に測定する操作に試料を供することから成る測定方法を提供するものである。

【0048】

該異性化は、アスパラギン酸若しくはアスパラギンなるアミノ酸残基又はグルタミン酸若しくはグルタミンなるアミノ酸残基におければよい。

【0049】

前記免疫系成分は、細胞性免疫系成分、例えばT リンパ球であればよい。又はその代わりに、前記免疫系成分は、例えば抗体などの体液性免疫系成分であればよい。かかる抗体は、公知の抗体型のものであれば何れでもよく、特にI g Gであればよい。

【0050】

前記エピトープは、本質的に如何なるタンパク質のアミノ酸配列を一つ含んで成っていてもよいが、幾つかの自己免疫症状に関連して、異性化したペプチド結合及び/又は光学的に反転した、I g G、M O G、M B P又は クリスタリンであってもよい。他の自己免疫症状に関連して、該エピトープは、当該疾患の進

行の過程において攻撃されたタンパク質の一部を形成していてもよい。

【0051】

前記自己抗体の検出が好ましくは、例えばリウマチ性関節炎、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症、ツェリアカ（腹部内臓病）、チャガス病、乾癬又はクローン病などの自己免疫病を示すものである。

【0052】

前記免疫系成分が、下記する配列の何れか一つに含まれる特定の又は一つのアミノ酸である^{*}Asxを含んで成るエピトープに配向させた自己抗体であってもよい：

Trp - Leu - ^{*}Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr ;

Trp - Glu - Ser - ^{*}Asx - Gly ;

His - Phe - Phe - Lys - ^{*}Asx - Ile - Val - Thr - Pro ;

Pro - Ser - ^{*}Asx - Glu - Gly - Lys - Gly - Arg ;

Ala - Leu - Gly - Ile - Gly - Thr - ^{*}Asx - Ser - Val - Ile ;

Trp - Ser - Phe - Gly - Ser - Glu - ^{*}Asx - Gly - Ser - Gly - ^{*}Asx - Ser - Glu - Asn ;

Met - Glu - Val - Gly - Trp - Tyr - Arg - Pro - Pro - Phe - Ser - Arg - Val - Val - His - Leu - Tyr - Arg - ^{*}Asp - Asn - Gly - Lys

Val - Val - His - Phe - Phe Lys - ^{*}Asx - Ile - Val - Thr - Pro

Ala - Gly - Trp - Leu - ^{*}Asx - Gly - Ser - Val - Arg ;又は

Gly - Arg - Val - Arg - Val - ^{*}Asx - Ser - Ala - Tyr ;

なお上式において、^{*}Asxは、D Asp若しくはAsn、又は L Asp若しくは原初の配列における残基Asp若しくはAsnの異性化/光学的反転によ

り生成する D Aspである。

【0053】

前記免疫系成分は、下記する配列の何れか一つに含まれるアミノ酸^{*}Glxを含んで成るエピトープに配向させた自己抗体であってもよい：

Pro - Ser - ^{*}Glx - Gly - Lys - Gly - Arg；

Phe - Ser - Trp - Gly - Ala - ^{*}Glx - Gly - Arg；又は

Asp - Ala - ^{*}Glx - Gly - Thr - Leu - Ser - Lys：

なお上式において、^{*}Glxは、D Glu若しくはGln、又は L Glu若しくは原初の配列における残基Glu若しくはGlnの異性化/光学的反転により生成する D Gluである。

【0054】

問題となるエピトープは、T - 細胞又はB - 細胞エピトープであればよい。

【0055】

本発明は、前記自己抗原又はその断片と前記自己抗原内における異性化したペプチド結合又は光学的に反転したアミノ酸の存在に対して特異的である免疫学的結合パートナーとの反応性を検出することから成る自己抗原又はその断片を検出する方法を含む。

【0056】

好ましくは、前記自己抗原は、自己免疫病に関連するものである。

【0057】

本発明は、異性化した又は光学的に反転したアミノ酸を含む自己エピトープと交差反応性を有する免疫学的応答を産出する非自己抗原を検出する方法を含む。即ち、自己タンパク質配列を擬態する非自己起源に暴露することによって、免疫応答を産出せしめてもよく、この応答が次に疾患発症態様で該自己タンパク質に対して配向するに到るのである。又はその代わりに、非自己抗原が、免疫系関与に対する応答、例えば炎症性応答などを産出してもよく、その結果自己寛容の破壊又従って誘発原因となった非自己抗原上に存在しない他のエピトープ類に対する自己免疫応答を産出するに到るのである(エピトープ拡大)。本発明のかかる局面に従えば、自己免疫症状を生じさせる非自己抗原又はその断片を検出する方

法において、前記抗原又はその断片と異性化したペプチド結合又は光学的に反転したアミノ酸の該抗原中での存在に対して特異的である免疫学的結合パートナーとの間における反応性を検出することから成る前記方法が、提供されるのである。

【0058】

かかる複数の方法は、前記自己反応性免疫系成分又は検出される自己抗原若しくはその断片の量に関する情報を提供するものであってもよいか又は純粹に定性的なものであってもよい。

【0059】

異性化に応じた、これらの想像上の免疫応答は、疾患にとって一次的重要性を有し得る。即ちこれらは、誘発・発症又は原因因子となり得るのである。又はその代わりに、これらの免疫応答は、疾患の結果他の免疫プロセスや体液性プロセス発生したために生じる二次的な重要性を有するものであり得る。何れの場合でも、当該免疫系の体液性及び細胞性成分の双方が関与してもよい。即ち、本発明の目的は、特異的抗原の異性化した（及び/又は光学的反転した）標的エピトープに対して配向せしめた免疫系の特異的成分（例えば抗体など）の存在を検出するか又は定量化することが可能である診断薬剤を開発することである。問題となる免疫応答が、当該疾患に関して原因的であるより寧ろ二次的である場合でも、変化した免疫応答はなお診断上の意義を持つであろう。

【0060】

本発明の具体的な実施態様についての更なる説明として、以下にRAの病因・発生病理に特異的IgG配列の異性化が関与していることを記述する。しかしながら、このことは、本発明の範囲を制限して、他の自己免疫病であって、重要な高原の異性化又は光学的反転が生起し、その結果以下に記載する反応に類似した反応を惹起する自己免疫病に対する適用を排除するものとは解されない。

【0061】

上記にて考察したように、IgGのAsn-384は、異性化を受ける潜在的な部位の一つである（Clarke 1987）。しかしながら、この残基は、IgGのFc領域における唯一の表面に暴露された、異性化を受ける可能性のあるアスパラ

ギン残基ではない。下記する実施例1において、Asn-315は異性化を受けやすいことの直接的な証明を示すが、この残基も又表面暴露されて、FC_H2領域に局在化している(Bonagura et al 1993)。

【0062】

ベータアミロイドの凝集特性がその位置に依存するもののAsx残基の光学的反転によって左右される、というTomiyamaら(1994)の知見については、IgGの異性化/光学的反転が、IgGの溶解性と親水性を変化させ、その結果IgGの自己凝集を誘発するという事は、考えられないことではない。さらには、我々の知見によれば、異性化/光学的反転は、当該タンパク質の抗原性に影響を与えないことはほぼ間違いないのである。血流からのIgGのクリアランスが低下し及び/又はIgG濃度が増大した人は、このような現象を受け易い。更なる付加的要因、例えば溶解性を低下させるか又は園凝集能力を低下させるその他の血清タンパク質又はIgG遺伝子の対立遺伝子変異などが、このような状況を悪化させる可能性がある。環境的因子もまた、免疫系の機能を変調させることによってかかる状況に影響を及ぼす可能性がある。

【0063】

従って、感受性のある部位におけるIgGの潜在的な異性化/光学的反転が、下記する二つの態様で自己免疫病の病理発生に役割を果たしている可能性がある：即ち、

A) 先ず、異性化/光学的反転が、新規の免疫原性エピトープを産出し、これが後刻体液性免疫系の標的になることによってRAの初期相に直接的に関与する可能性がある。異性化した又は光学的に反転した自己IgGを認識する特異的抗体がかくして生成し、巨大な不溶性の免疫複合体を産生し、これが関節の滑膜組織において凝集する結果炎症性応答を開始することによって本疾患において一時的な役割を果たし得るのである(Inam & Day 1981)。更には、免疫系の細胞成分もまた、かかる新規のエピトープに向けて追尾せしめられ、RAを特徴づける滑膜組織内での破壊をある程度媒介することになり得る。

【0064】

B) 又はその代わりに、RAにおけるIgGの凝集は、IgGクリアランスを

低下させ、従って凝集 I g G が、保持時間を函数として異性化 / 光学的反転する可能性がある。特にクリアランス速度の低い滑液は、このプロセスが生起する可能性の高い個所であろう。即ち、このような筋書きによれば、異性化 / 光学的反転は、R A プロセスに関連した I g G 凝集の一つの徴候として生起するのであるが、最終的には上記したイソ- I g G 特異的自己抗体を形成するに到るのである。再度、免疫系の細胞成分が個の段階で関与している可能性がある。

【0065】

上記にて該述した二つの仮説は、相互に排他的なものではなく、何れ場合においても、異性化した又は光学的に反転した A s x 又は G l x 残基を認識する自己抗体が、本疾患の特異的マーカーとなるであろう。感受性の高いアスパラギン又はアスパラギン酸残基の異性化が、リユーマチ性因子生成によって特徴づけられる自己免疫反応に関与しているという、見解を支持する幾つかの観察結果とは例えば下記の如きである：R F s は、全ての潜在的異性化部位が所在する C_H2 又は C_H3 上のエピトープを認識する (Johnson and Page Faulk 1976; Nardella et al. 1981)。幾つかの種類の種類から、異常 (通常ではない) I g G が R A において存在することが明らかとなっている (Rawson et al. 1969; Watkins et al. 1972; Johnson et al. 1974)。最後に、I g G 1, 2 & 4 の C_H2 領域における A s n₃₁₅ 及び C_H3 領域における A s n₃₈₄ の周囲における立体配座及びアミノ酸配列とが、イミド結合形成には殆ど最適であり (Clarke 1987) また潜在的エピトープは、表面に暴露されている。

【0066】

G l a n t らは、軟骨アグリカン (aggrecan) は、マウスにおいて生じる自己免疫応答の対象となるエピトープを含有することを報告している。アグリカンは、軟骨のプロテオグリカン構成成分であるが、この成分中において、本発明者等は、アグリカンの G - 1 領域におけるアミノ酸配列 G l y - A r g - V a l - A r g - V a l - A s n - S e r - A l a - T y r に含まれた潜在的異性化 / 光学的反転部位を同定したのである。異性化した及び / 又は光学的に反転したエピトープがこの配列において定義されているが、本発明においては、これに対する自己免疫応答を標的として追求するものである。

【0067】

軟骨結合タンパク質(CLP)は、軟骨中においてアグリカンとヒアルロン酸とに関連するものであるが、このタンパク質に対する自己免疫性が本疾患の動物モデルにおいてRAを誘発するという意味において関連性を有することが証明されている(Zhang et al 1998)。本発明者らは、自己免疫性に関与する可能性のある異性化及び/又は光学的反転部位としてAla - Gly - Trp - Leu - Ala - Asp - Gly - Ser - Val - Argなるアミノ酸配列を同定したのである。

【0068】

類推によって、例えばMBP又はMOGなどその他の重要な自己抗原又はより一般的に異性化した又は光学的に反転した抗原に対する、自己免疫病における自己免疫応答は、当該疾患の病理発生において一つの役割を果たしている可能性がある。

【0069】

本発明の又別の局面において、その他の自己免疫疾患は、異性化するか又は光学的反転型で存在するかのいずれかに対して重要抗原が持つ感受性によって特徴づけられるので、かくして当該疾患に対して一次的又は二次的に重要な免疫応答を生成する可能性がある。即ち、本発明は、RA又はMSの診断薬剤に限定されるものではなく、その他の自己免疫病に対しても広く適用するものである。

【0070】

本発明を実施する目的のために、自己免疫病の標的自己抗原における重要抗原の異性化及び/又は光学的反転は、標的抗原が既知である場合は以下において列挙する操作手順のうちの一つ以上によって同定することが出来るのである。

【0071】

標的抗原の三次元構造が既知である場合は、潜在的な異性化/光学的反転部位(例えば、Asx - Gly配列)を同定することが出来る。これらの異性化/光学的反転に対する傾向は、二面角ファイ()、サイ()、カイ()及びカイ₂(₂)の計算結果及びカルボキシル基を含むアミノ酸側鎖の柔軟度に基いて評価することが出来る(Clarke 1987)。更には、潜在的変更残基が表面暴露さ

れ、かくして自己抗体に接触可能であるか否かを評価することも出来る。一つの重要なパラメーターは、当該タンパク質の半減期であるが、その理由は、相対的に長い半減期（例えば10日以上）のタンパク質は、相当程度に異性化/光学的反転を受けることが期待できるからである。

【0072】

仮に当該変更タンパク質が問題となる疾患の原因ではなくまた自己反応性免疫系成分の産生が原因ではなく寧ろ症候的なものであったとしても、`Asx`又は`Glx`含有エピトープに対する特異性を有する免疫系成分を検出するために本発明を有益に実施することが理解されるであろう。このような場合、自己反応性成分の認識は、当初の診断及び治療のモニターに関して価値ある診断意義を有する可能性が高い。

【0073】

本発明に包含されるのはまた、自己抗原中の単一又は複数のエピトープの位置を決定する方法において、L イソアスパルチル(D アスパルチル)メチルトランスフェラーゼ(IAMT)及び標識化メチル基供給源とを用いて前記自己抗原内の異性化したペプチド結合及び/又は光学的に反転したアミノ酸の一つ以上に前記標識化メチル基を導入すること、及び前記標識化メチル基が導入された前記自己抗原内の位置を決定すること、前記位置を包含する領域内における前記自己抗原のアミノ酸配列を決定すること、及び前記位置において前記異性化した又は光学的に反転したアミノ酸を組み込んだ前記アミノ酸配列のペプチドを検査して自己反応性免疫系成分、例えば自己抗体との反応性を測定することとから成る、前記位置決定方法である。

【0074】

即ち、対象とする標的抗原（例えばI型糖尿病におけるグルタミン酸デカルボキシラーゼ、多発性硬化症におけるミエリン塩基性タンパク質、即ちMOG又はリウマチ性関節炎におけるIgG）を酵素IAMTによって分析することが出来るのである。この酵素は、D及びLAsx、即ち幾つかの異性化した又は光学的に反転したアスパラギン酸及びアスパラギン残基を認識する（但し、DAsp及び変化していないGlxは認識しない）のであり、カルボキシル

基をメチル化する。放射能で標識化したメチル供与体を使用することによって、異性化したタンパク質又はペプチドをこの酵素と共に培養して、これらを放射能で標識化し、また当該タンパク質の標識化を導入した放射能を測定することによって検出することが出来る。

【0075】

対象となる抗原を化学的又はタンパク分解酵素による加水分解によって断片化し、次いで生成した断片を公知のクロマトグラフィーによる方法で精製し、その後IAMT分析法で当該断片を分析することによって、異性化した部位の位置を決定することが出来る。IAMT分析法で異性化した配列を含むものと同定された断片は、アミノ酸配列分析及びアミノ酸解析に供して、標的抗原内における正確な位置決めを正確に指摘することが出来る。

【0076】

IAMT又は他の方法を用いて同定することが出来る該当関連異性化配列としては、例えば下記が挙げられる：

IgG由来：

(RA)

Asn-135: Trp - Leu - ^{*}Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr、His - Gln - Asp - Trp - Leu - ^{*}Asx - Gly、His - Gln - Asp - Trp - Leu - ^{*}Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr .

Asn-384: Trp - Glu - Ser - ^{*}Asx - Gly - Gln - Pro - Glu、Val - Glu - Trp - Glu - Ser - ^{*}Asx - Gly、Val - Glu - Trp - Glu - Ser - ^{*}Asx - Gly Gln - Pro - Glu .

MBP由来：

(MS)

Asn-92: His - Phe - Phe - lys - ^{*}Asx - Ile - Val - Thr - Pro

Gln-103: Pro - Ser - ^{*}Glx - Gly - Lys - Gly - Arg

Gln - 119 : Phe - Ser - Trp - Gly - Ala - ^{*}Glx - Gly - Arg

Gln - 143 : Asp - Ala - ^{*}Glx - Gly - Thr - Leu - Ser - Lys

MOG由来 :

(MS)

Asn - 53 : Met - Glu - Val - Gly - Trp - Tyr - Arg - Pro - Pro - Phe - Ser - Arg - Val - Val - His - Leu - Tyr - Arg - ^{*}Asx - Gly - Lys

GAD₆₅由来 :

(I型糖尿病)

Asp - 297 : Ala - Leu - Gly - Ile - Gly - Thr - ^{*}Asx - Ser - Val - Ile

Asp - 15 & 19 : Trp - Ser - Phe - Gly - Ser - Glu - ^{*}Asx - Gly - Ser - Gly - ^{*}Asx - Ser - Glu - Asn

なお上式において、^{*}Asxは、D Asp若しくはAsn、又は D Asp若しくは原初の配列における残基Asp若しくはAsnの異性化/光学的反転により生成する L Aspであり、また^{*}Glxは、D Glu若しくはGln、又は D Glu若しくは原初の配列における残基Glu若しくはGlnの異性化/光学的反転により生成する L Gluである。

【0077】

本発明の範囲に包含されるものは、これらアミノ酸配列の内の何れか一つに存在するエピトープを一種含むペプチドである。又同様に包含されるのは、L-イソアスパルチル(D-アスパルチル)メチルトランスフェラーゼ(IAMT)を用いて位置決めされたエピトープを複数含む異性化した又は光学的に反転したアミノ酸を含むその他のペプチド類である。

【0078】

自己抗原が対象とする自己免疫病において同定されなかった場合は、当該免疫破壊の標的組織又は器官を分析してもよい。上記したように当該組織の可溶化及

びタンパク質分解酵素による分解を行った後、クロマトグラフィー又はその他の技法によって生成したペプチドを精製し、次いでI A M T分析法を使用して異性化/光学的反転した断片を同定すればよい。次いで、これら断片をアミノ酸配列決定法、質量分光測定法やその他の該当する方法によって同定すればよい。

【0079】

異性化した又は光学的に反転したエピトープに対する自己抗体の検出

ヒト患者又は動物から得られた、重要自己抗原の主要エピトープにおける異性化/光学的反転した配列を認識する自己抗体は、下記する分析法によって検出することが出来る。

【0080】

一般的に、広範な種類の公知免疫測定法の構成及び操作手順、例えばE L I S A、R I A、不均一及び均一測定操作法などを用いることが出来る。例として、合成した異性化/光学的反転したペプチド、即ち対象とするエピトープを含む真性抗原からタンパク質分解酵素で生成させた断片を、キャリアタンパク質(例えばチログロビン又は血清アルブミンなど)に複合化させるか又はビオチニル化させて、かくしてストレプトアビジンコート処理したマイクロタイタープレート(M T P)表面に結合する能力を持たせることによってマイクロタイタープレート(M T P)の固体層にコートすればよい。かくして、血清試料を測定緩衝液に適当に希釈したものを当該M T Pのウェルに加えて固定化したエピトープを含む資材に結合させることによって、反応性自己抗体を同定することが出来る。結合した抗体の量は、二次的酵素結合抗ヒト抗体、次に発色性酵素基質を使用することによって定量することが出来る。この測定系においては、I g G又は他の血清成分がM T P表面に吸着するために起因する非特異的反応を最小限にするように注意しなければならない。

【0081】

又はその代わりに、問題となっているエピトープに対していくつかの抗体を産生させ、これらをM T P表面に固定化してもよい。問題となっている異性化エピトープを含む合成ペプチド、即ち標的エピトープを含む真性抗原からタンパク質分解酵素で生成させた断片を、次に例えばペルオキシダーゼやアルカリ性ホスフ

アタゼなどの酵素に結合させるか、又はビオチン又はジゴキシゲニンなどのリガンドで標識化すればよい。この反応試薬を適当に希釈して次に、血清試料と共にウエルに添加するのである。MTP表面にコートした標的エピトープと反応性を示す、この血清試料中の自己抗体は、当該エピトープがMTP表面にコートした抗体に結合するのを防止するはずであり、その結果その後に発色性酵素基質、即ちストレプタビジン結合検出剤を添加することによって生成させることが出来るシグナルが減少することになる。このシグナルは定量することが可能であり、検討試料中の自己抗原の量を評価・査定するために使用することが出来る。

【0082】

上記した問題となるエピトープに対して産生させた非ヒト抗体を使用するもう一つ別の競争的測定法は、問題となっているエピトープを含む合成若しくは真性ペプチド又はその断片でコートしたMTPプレートを使用して実施することが出来る。該ペプチドは、直接そのままMTP表面コートするか又はキャリアタンパク質（例えばチログロブリン又は血清アルブミン）に結合させればよく、又はビオチニル化して、ストレプタビジンをコートした表面に結合させる能力を持たせるようにしてもよい。ヒト血清試料は、測定用緩衝液に適当に希釈して、MTPで培養させるが、その後又は同時に問題となっているエピトープに対して産生させた抗体を加える。問題となっているエピトープに反応性を示す自己抗体を含む血清試料をMTP表面に設けたエピトープと反応し、かくして他の抗体の結合を置換するはずである。問題となっているエピトープに対して産生させた非ヒト交代に特異的な、酵素標識化した二次的抗体を用いることによって、結合したヒト抗体の量を、発色性酵素基質と共に培養した後定量することができる。染料の量は、結合したヒト自己抗体の量には反比例するであろう。

【0083】

同質測定法の一つの構成は、適当に希釈したヒト血清試料を問題となっているエピトープを含むビオチニル化ペプチド及び適当な酵素又は例えば¹²⁵Iなどの放射性分子で共有結合により標識化したストレプタビジンと共に培養することによって実行することが出来る。ヒト血清試料中に含まれる自己抗体は、ストレプタビジン分子上の標的エピトープに結合し、次にプロテインAセファロース又は

ヒト IgG に特異的な他の沈降剤若しくは固体層によって沈降させることが出来る。結合抗体の量は、次に、酵素標識化ストレプトビジンの場合は発色性酵素基質を用いて、又はラジオアイソトープで標識化したストレプトビジンの場合はシンチレーションカウンティングによって定量することが出来る。

【0084】

異性化 / 光学的反転した自己抗原に対する細胞性免疫反応性の検出

新たに診断されたばかりの自己免疫病罹患患者からの自己応答に関するインビトロ研究は、当該疾患を診断し、治療法選択を促進・補助し且つこの患者についての予後をモニターしまた算定するのを援助するために極めて望ましい。自己免疫応答に関連した免疫系の分子成分の相互作用を決定することは、当該疾患を特性化し且つ当該疾患を発症するための抗原と分子応答の持つ重要性を評価するために必要である。前記した文節においては、Asx 残基について L D 又は D (及び Glx についての L 又は D 型) の何れかの型に含まれる標的エピトープに対する体液性反応性についての解析・分析を記述したのであるが、変化した自己タンパク質に対する細胞性免疫応答は、当該疾患のモニターを行う上で同等又はそれ以上の重要性を持つ可能性がある。免疫系の細胞性分画部分が、RA や MS など T 細胞が組織破壊の一次メディエータとして挙げられている自己免疫病の大半に関与している。免疫系の細胞分画部分の標的を決定することが、当該免疫応答が重要性として一次的であるか又は二次的であるかを決定する上で必須であり得る。

【0085】

T - 細胞媒介自己免疫の検出は、例えば T - 細胞増殖測定法、ELISPOT 測定法、限定希釈測定法又は 51Cr 放出測定法などのいくつかの方法によって行うことが出来る (当該方法の全般的概観については、C.A. Janeway & P. Travers (1997) を参照)。異性化 / 光学的反転した抗体に対する細胞性免疫反応性を検討するために使用することが出来るこのような方法のいくつかの概要を下記に記載する。

【0086】

T - 細胞増殖測定法

自己免疫病において抹消血液又は罹患標的器官（例えばRA患者又はCNS若しくはMS患者の滑液/滑膜組織）又は当該疾患の動物モデルから単離したT-細胞の抗原特異的反応性は、リンパ球増殖測定法によって測定することが出来る。即ち、リンパ球をL、D又はDの何れかの存在下に、又は関連性のない比較対照抗原と共に又は抗原を全く用いることなく適当な細胞培地での培養に供するのである。³H-1チミジンを培地に添加し、抗原の共存により刺激された活発に分裂するリンパ球は、標識化したチミジンをDNAに取り込ませるであろう。DNAに取り込まれた³H-チミジンを定量することによって、当該自己抗原又は抗原から誘導されたエピトープの種々に異なる型・種類に対する増殖性応答を評価することが出来る(Weir 1996)。抗原特異的な増殖は、特異的CD4+T-細胞反応性を持つ顕著な特徴である。

【0087】

限定希釈測定法

L、D又はD（又はL又はD）型における一定の抗原又はそのエピトープに対して配向させた細胞性免疫反応性の“力価”に関する情報を取得するために、限定希釈測定法を行うことが出来る。この測定法は、異なる数のリンパ球（即ち抹消血液から得た）をそれぞれの培養ウエルに添加し、次いで抗原及び抗原提示細胞又は特異的成長増殖因子を刺激することによって行うことが出来る。数日後に、これらのウエルを抗原に対する特異的応答、例えば標的細胞の細胞毒性による殺戮又は特異的な増殖などについて試験する。特異的T細胞を含むウエルはそれぞれ、その標的に対する応答を行うはずであり、ポワソン分布から、一定のT細胞希釈率のウエルの37%が陰性である場合は、各ウエルは、培養の開始時において平均して一つの特異的T細胞を含んでいたものと決定することが出来る。異性化し及び/又はラセミ化した抗原（即ち、RA又はMS患者）に対し自己免疫反応性を示す個人と比較対照個人とにおける応答を比較することによって、二つの母集団間におけるT-細胞力価の差異を評価することが出来るのであって、自己免疫病に罹患した個人において生起した自己反応性細胞の抗原特異的増殖の目安として使用することが出来る。

【0088】

E L I S P O T測定法

E L I S P O T測定法は、特異的抗体（B - 細胞）又はサイトカイン特徴的刺
激抗原特異的 T - 細胞を産生させるために抹消血液から得た単一リンパ球細胞を
定量するための感度の高い方法として使用することが出来る。E L I S P O T測
定法は、自己免疫病（即ち、R A患者又はC N S若しくはM S患者の滑液 / 滑膜
組織）における抹消血液又は罹患標的器官又自己免疫病の動物モデルから単離し
たリンパ球を培養することによって行うことが出来る。このE L I S P O T測定
法は、リンパ球が分泌したタンパク質又はペプチドを保持することが出来るニト
ロセルロース又は他の固体表面上において適当な培地にて当該リンパ球を培養す
ることによって行うことが出来る(Ronnellid & Klareskog, 1997)。ある特定の抗
原が当該培地に添加されると、この抗原又はそのエピトープに特異的なリンパ球
が刺激され、特徴的なリンホカインを分泌する（即ち、 インターフェロン、
インターロイキン-2 又はインターロイキン-4 ）(Weir 1996、Okamoto et al
1998)。一定期間培養した後、細胞を当該膜から洗い落とし特異的作用物質（即
ち抗体）を使用して当該細胞が産生したリンホカイン類を検出することが出来る
。特定のリンホカインを産生する細胞の数を定量すること及びリンホカイン産生
のパターンを数量化することによって、刺激のために使用した抗原に対する応答
を評価し且つ特性化することが出来る。

【0089】

【実施例】

本発明を下記する実施例に言及し、添付した図面を参照することによって更に
記述し且つ詳細に説明する。

【0090】

実施例1：I g GのF c領域におけるA s n - 3 1 5を異性化感受性部位として
同定すること

ヒトI g G (Sigma cat No. I-4506) を下記するプロトコールに従ってペプシ
ンで消化した：即ち、消化は、固定化ペプシン (Pierce Cat. No. 20343) を用
いて実質的にメーカー (Pierce) により記載された操作手順に従って実施する。
要するに、0 . 1 2 5 m l の固定化ペプシンを試験管に加え、0 . 1 5 m l の消

化緩衝液(20mMの酢酸ナトリウム緩衝液、pH4.5)で平衡化した。10mgの純粋の凍結乾燥IgGを1.0mlの消化緩衝液に加え、この混合物を37℃にて4時間培養する。消化は、1.5mlの10mM Tris HCl, pH7.5を培養混合物に添加することによって停止する。次いで、IgG断片を遠心分離(1000gにて5分間)し、次に当該断片を含む上清液を除去することによって固定化ペプシングルから分離する。

【0091】

得られたIgG断片をSuperdex 75 HR 10/30カラム(Pharmacia, Sweden)によるゲル濾過によって未消化IgGから分離する。このカラム(2.6 x 72 cm (全容量は360 mL))を28ml/hにおいて0.2M NH₄HCO₃, pH8.0中で平衡化する。2.75mlの試料をロードして、0.25mLのフラクションを集める。このカラムは、下記するMwマーカの混合物で補正済みであり、その結果溶出断片のサイズ決定を行うことが出来る:即ち、アルブミン(67kDa)、オボアルブミン(43kDa)、キモトリプシノーゲンA(25kDa)、リボヌクレアーゼA(13.7kDa)及びアプロチニン(6.5kDa)である。IgGのFc部位から誘導されたIgGの低分子量(分子量が10kDa以下)断片は、溶出容量22-28ml(フラクション44-56、図1参照)に現れる。

【0092】

このフラクションのアリコートは、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)に再度溶解し、L-イソアスパルチル(D-アスパルチル)メチルトランスフェラーゼ(IAMT)を用いた酵素測定法によって分析し、異性化又は光学的反転したAsx残基の有無を調べる。簡潔に述べれば、この測定法は、IAMT酵素により放射性(トリチル化)メチオニンで標識化することによって異性化残基を検出することに基くものである。

【0093】

600µlのエッペンドルフ試験管に、下記する試薬を加える:即ち、IAMT活性を含む15µlのウシ赤血球溶菌液(Murray and Clarke 1984に従って調製)、10µlの測定緩衝液(0.25M NaH₂PO₄/NaOH pH 7.02)、15µlの

試料（又は既知濃度の合成異性化ペプチドからなる検量物）及び10 µlのSAMトレーサー（以下のように調製：3 mlの冷SAMを26.1 mlの調製したばかりの10 mM HClに加え、次いでこの溶液の20 mlに100 µlの“ホットSAM”（Amersham TRA 236, 1000 µmol/L）を加えて、得られた溶液を1 mlのアリコートとして-18 °Cにて貯蔵する）。バイアルを回しながら混合した後、37 °Cにおいて60 ± 1分間培養する（水浴上にて）。個の反応は、50 µlのクエンチング溶液（0.2M NaOH, 1%ドデシル硫酸ナトリウム）を加えて、次いで混合することによって停止する。75 µlの溶液をろ紙（予めアコーディオンプリーツに折った0.75 x 5.5 cmのもの）上にスポットする。このろ紙を2.5 mlのエコシントHシンチレーション液を含む6 mlのシンチレーション管に入れる（当該管中にほぼ1.5 cm沈める）。管は、ほぼ18時間（一夜）室温に放置し、放射性メタノールをシンチレーション液に拡散させる。フィルター片を取り外し、バイアルを下記する停止条件でシンチレーターでカウントする：即ち、900秒、又は最大6400 CPM。未知の試料中の濃度を、濃度が既知である合成イソペプチドから成る検量物質の測定値から作成した標準曲線に基づいて算出する。

【0094】

これらの測定値から、IgGのペプシン分解で得られた低分子量フラクションは、IAMT活性が高く、分解しないIgG分子の異性化部位の大半を明らかに含有することが明らかとなった（フラクション44 - 56、図1を参照）。これらのフラクションは、さらに逆相高性能液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）で精製する。

【0095】

IAMT反応性ペプチドを含むサイズ排除クロマトグラフィーから得られたフラクション（フラクション44乃至56）をプールし、その容量を9.5 mlに調節して、20 µlのTFAを添加する。Sep-Pak C18カートリッジ（3 cc, 500 mg, Waters）を10 mlの80%メタノールで調整し、10 mlの0.2% TFAで平衡化する。試料はこのコラムに適用し、次いで個のコラムを10 mlの1% TFAで溶出した。最後に、結合したペプチドを10 mlの

40%アセトニトリル、0.1% TFA、で溶出した。溶出液を集め、凍結し次いで凍結乾燥した。溶出液を2mlの20mM Tris - 緩衝液 pH 7.88に再度溶解し、得られた溶液の100 μ lをIAMT活性測定のため保存し、残りは(1900 μ l)、イオン交換クロマトグラフィーに使用した。

【0096】

アニオン交換クロマトグラフィーを1mlのmono-QHR5/5カラム(Pharmacia 62-1622-00)を用いて行った。カラムは、20mM Tris, pH 7.88により流速を1ml/minとして平衡化した。試料を手動式注入装置ループを用いてロードし、カラムは、線状NaClグラジエント(0.0 - 0.3M、30分間で適用)を用いて溶出する。次いで0.3乃至1M NaClの線状グラジエントを1分間適用する。溶出を1M NaClで1分間継続し、最後に1M乃至0M NaClの線状グラジエントを1分間適用した。溶出をこの緩衝液で2分間継続し、溶出ペプチドは、280nmにおけるUV吸収で検出して、0.5 μ lのフラクション(30秒)を集めた。このフラクションのアリコートでIAMT測定法で分析し、得られた結果を図2にプロットした。フラクション4 - 6を(a)としてプールし、フラクション25 - 27を(b)としてプールしまたフラクション29 - 31を(c)としてプールし、更なる分画を行うために保管した。

【0097】

これらのプールしたフラクションは、上記したSep-Pak C-18カートリッジを用いてバッファー変化させ、200 μ lの0.1% w/w三フッ化酢酸(TFA)に再度溶解し、RP-HPLCでさらに精製する。第一回目のRP-HPLCは、C-18カラム(Nova-PaK C 18 4 μ m 3.9 X 150mm)のHPLCカラム、Waters)にて0.1%(w/w)三フッ化酢酸(TFA)中0乃至40%アセトニトリルの線状グラジエントで流速を1ml/minとして行う。溶出したペプチドは、214nmにおけるUV吸収及び蛍光(励起のための297nmの光線を使用して380nm(放出)における)により検出し、0.5mlフラクション(30秒)を集めて、凍結乾燥し、IAMT測定法における分析に供する。

【0098】

アニオン交換クロマトグラフィーから得たプール‘a’については、大半のIAMT反応性物質は、22と23.5分との間において溶出する(図3を参照)。これらのフラクションをプールし、フラクション中のペプチドは、上記したSep-Pak C-18カラムを使用して濃縮する。試料は、200 μ lの0.05%ヘプタフルオロ酪酸(HFBA)中に再度溶解し、試料を同一のカラムによる二回目のRP-HPLCによってさらに精製するが、今回は0.05%ヘプタフルオロ酪酸(HFBA)中5-30%のアセトニトリルから成るグラジエントを80分間実行して0.5mlフラクションを集める。これらのフラクションは、214nmにおけるUV吸収及び蛍光(励起のための297nmの光線を使用して380nm(放出)における)により検出し、凍結乾燥したフラクションをIAMT測定法による分析のため再度溶解する。

【0099】

図4から明らかなように、アニオン交換クロマトグラフィーから得たプール‘b’の第二回目HPLCによる精製の結果得られた一つの主要ピークは(図2を参照)、異性化したAsx残基の大半を含んでいる(図4を参照)。このピークを含むフラクションは、Applied Biosystemsの477A型Sequencerを使用して、メーカーの指示に従ってアミノ酸配列決定に供する。下記する配列が演繹される：

‘プールb’：His-Gln-Asp-Trp-Leu

‘プールc’：Thr-Vla(Leu/Val)His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asp-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys(Ala/Gly)Leu-Pro

C_H2：Thr-Vla(Leu/Val)His-Gln-Asp-Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asp-Lys(Ala/Gly)Leu-Pro(Ala/Ser)(Pro/Ser)Ile-Glu-Lys-Thr-Ile Ser Lys(Ala/Thr)Lys

即ち、単離されたこれらの異性化ペプチドは、C_H2領域から由来するものであるが、ペプシン分解によって異なる鎖長に処理されている。このC_H2領域に

対して発表されている配列を上記に掲げているが、これから明らかなように、これら三つのペプチドは、この配列と合致している。太字で表したアスパラギン残基はAsp315であり、残基308は、IgG₂におけるバリン又その他のIgGサブクラスのロイシンである。イタリックで示した‘プールc’のペプチド配列は、アミノ酸解析から推定したものである(下記を参照)。この配列で残基315は、アスパラギンではなくアスパラギン酸として表示されているが、これは、この残基に続くグリシンとのペプチド結合が からカルボキシル基へと転移した結果に従ったものである。

【0100】

単離されて全てのペプチドは、イソアスパラギン酸特異的IAMT酵素によって認識され、Asn-315残基のN末端のロイシン残基以降は配列決定することが出来ない。この結果強く示唆されるのは、Asn-315残基が異性化反応して、ペプチド結合が、直鎖カルボキシル基から側鎖のカルボキシル基に転移すると同時に、またアミノ酸が加水分解により除去されることである。残基315以降のペプチドの配列決定が出来ないことは、このような異性化反応が生じた結果、通常のエドマン分解によっては感受性の高い部位以降のペプチドの配列決定は出来ない、という以前に得られた結果に従うものである(Fledelius et al 1977)。

【0101】

実施例2：Asn-315に反応性を示す自己抗体の検出

自己抗体がAsn-315由来セプタペプチドを認識するのか否か、またかかる自己抗体がリウマチ性関節炎の特徴であるのか否かを検討した。かかる検討を実施するために、IgG Fc Asn-315由来(L)セプタペプチドであるTrp-Leu-Asp-Gly-Lys-Glu-Tyrを合成により調製した。使用したペプチドは、下記する操作によって線状(L型)Trp-Leu-Asn-Gly-Lys-Glu-Tyrペプチドを加熱して異性化を促進させた結果得られたものである。このペプチドを緩衝液中に溶解し、4時間90にて加熱し、異性化及び/又は光学的反転を促進した。得られた異性化(L)、光学的反転(D及びD)及び線状ペプチドの混合物を0.1%

TFA中15 - 35%のアセトニトリルグラジエントを用い、流速を1 ml / minとしてRP - HPLCによって分析し、得られたピークの異性化状態を上記したアミノ酸分析によって検討した。このペプチドを5 mg / mlの割合で0.2 Mリン酸ナトリウムpH 9.2に溶解したが、このペプチドを下記するプロトコールを使用してグルタルアルデヒド(GA)によって(Fluka 49626 lot 43381/1)チログロブリンに結合した。

【0102】

0.1 Mのリン酸ナトリウム緩衝液pH 8.0に溶かした0.5 mlのチログロブリン(30 mg / ml)を下記する溶液の0.5 mlに絶えず混合しながら、滴下して加えた(2分間で): 10% GA、40% H₂O、50% 0.2 Mリン酸ナトリウム pH 8.0。バイアルを室温で混合しながら一夜培養した。過剰のGAをゲル濾過(NAP-10 カラム、Pharmacia)によって除去し、緩衝液をPBSに変更した。最終容量を1.5 ml(10 mg/mL 各調製物当たりのキャリアタンパク質)に調節した。500 µlのキャリアタンパク質を500 µlの5 mg / mlペプチド溶液と共に培養し、またバイアルは、絶えず混合しながら室温で24時間培養した。過剰のペプチドをゲル濾過(NAP-10 カラム、Pharmacia)により緩衝液中に除去した。最終容量を1500 µLに調節し、タンパク質濃度をBioRadタンパク質測定法をメーカーの指示に従って実施することによって測定した。

【0103】

Thy - GA - Trp - Leu - Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr複合物をPBSに溶解して最終濃度を10 µg / mlとし、得られた溶液の100 µlをピペットでマイクロタイタープレートのウェル(MTP、flat-well polyorb、Nune)に移した。このプレートを報告された通りにブロックし(Bonde et al 1994)、次いで血清試料を10 mMリン酸ナトリウム、140 mM NaCl、0.1% トウエン(Tween) - 20、1% BSA pH 7.4(測定緩衝液)に100倍に希釈して添加した。MTPを回転振とう器に20にて1時間±5分の間放置した。プレートを洗浄緩衝液(25mM tris, 140 nM NaCl, 0.1% トウエン - 20 pH 7.4)で手動式プレート洗浄装置によって5回洗浄した。ペ

ルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヒト鎖 (Dako 063) 及び鎖 (Dako 013) を含む測定用緩衝液 100 μ L を各ウエル内に添加し、このMTPを再度回転振とう器で20にて1時間 \pm 5分の間培養した。5回洗浄した後、100 μ Lのペルオキシダーゼ基質を加え(3, 3', 5, 5'テトラメチルベンジジン二塩酸塩 (TMB)、Kirkegaard & Perry Laboratories, USA)、暗所にて室温で15 \pm 2分間培養した。0.18 M H₂SO₄を添加してから、吸光度を450 nmにおいて測定した。

【0104】

リウマチ因子に陽性であるRA血清、リウマチ因子に陰性であるRA血清及びコントロール血清を比較した場合、RA RF+母集団においては、他の二つの母集団と比較して有意に増大した反応性が検出された(図5を参照)。同一の測定操作に従って一旦し、他の無関係のThy-GA-複合物(Thy-GA-Glu-Lys-Ala-His-Asx-Gly-Gly-Arg)を用いて一平行して実験を行った結果、これらの群の間には相異は全くなかった。この結果から、RFに陽性のRA患者においては、IgGFcAsn-315由来配列であるTrp-Leu-Asx-Gly-Lys-Glu-Tyrに対する自己抗体反応性が増大したことが明らかとなった。

【0105】

実施例3：異性化Asn-315を認識する特異的自己抗体と合成ペプチドとの結合の競合

上記したThy-GA-Trp-Leu-Asx-Gly-Lys-Glu-TyrをコートしたプレートとRA自己抗体との結合は、溶液中においてTrp-Leu-Asx-Gly-Lys-Glu-Tyrなるペプチドと共に当該血清を予備培養することによって競合させることが出来た。実験は以下のように行った。即ち、血清試料を10 mMリン酸ナトリウム、140 mM NaCl、0.1% トウエン (Tween) - 20、1% BSA pH 7.4 (測定緩衝液) に100倍に希釈し、200 μ l w o 1.5 mlのポリプロピレンチューブに添加し、次いで下記する試薬を測定用緩衝液に50 μ g/mlなる濃度に溶解して50 μ lを添加した：

1. Trp - Leu - Asp - Gly - Lys - Glu - Tyr (当該エピトープの L型)

2. Trp - Leu - Asn - Gly - Lys - Glu - Tyr (当該エピトープの L型)

3. Thy - GA - Trp - Leu - Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr 複合物 (実施例2において調製)

4. 測定用緩衝液のみ

これらのチューブを4に17時間供し、100 μ lの混合物をThy - GA - Trp - Leu - Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr 複合物でコートしたMTPに添加した。この測定法は、上記実施例2において記載したように実施した。

【0106】

これらの結果を図6に示す。これから明らかなように、この異性化したペプチド(1)及びThy - GA - Trp - Leu - Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr 複合物(3)は、6種の分液したRA血清と結合に競合して勝ることが出来る。このことは、残基315を囲む7つのアミノ酸エピトープを認識するRA患者の自己抗体は、当該エピトープの異性化型(L)に対して圧倒的に特異的であることを示唆している。

【0107】

実施例4: IgG Fc Asn - 315に由来した異性化ペプチドに反応性を示す自己抗体の検出を評価するための均一ラジオイムノアッセイ

IgG C_H2領域に由来したエピトープであるTrp - Leu - Asn - Gly - Lys - Glu - Tyrの異性化型に対する反応性を有する自己抗体を測定するための均一RIA測定法を開発した。この測定法は、毛せい試料を125IThy - GA - Trp - Leu - *Asx - Gly - Lys - Glu - Tyrと共に一夜培養し、次いでプロテインAセファローズとの免疫複合物を沈降させることによって実施した。

【0108】

血清試料をIMP緩衝液 (IMP緩衝液: 10mMリン酸ナトリウム、pH

7.4、140mM NaCl、5mM EDTA、0.5% Triton X-100、0.1% BSA、10 μ g/ml大豆トリプシン阻害剤)で1:200にて希釈し、Thy-GA-Trp-Leu-Asx-Gly-Lys-Glu-Tyr複合物を実施例2に記載したように調製し、次いでクロラミンTプロトコールを用いて¹²⁵Iで沃素化する:即ち、100 μ gの複合物を0.25M Na₂HPO₄で希釈して、全量を140 μ lとする。1.5mCiのNa¹²⁵Iを添加し、次いで10 μ LのクロラミンT(1mg/ml,調製したてのもの)を加える。この溶液を30秒間攪拌し、150 μ Lのメチオニン(1mg/ml)を添加し、直ちに120秒間攪拌する。このトレーサーは、1%BSAを含むPBSで流速1.0ml/minで平衡化したサイズ排除カラム(type: BIOSEP SEC S-2000, size:300 x 7.80mm)で精製する。500 μ lのフラクションを集め、シンチレーションカウンター(カウンター)で分析する。このトレーサーを含むフラクションをプールし、均一RIA測定法に使用する。

【0109】

この¹²⁵I Thy-GA-Trp-Leu-Asx-Gly-Lys-Glu-TyrトレーサーをIMP緩衝液で希釈し、75 μ lの200倍希釈血清試料を融封したポリプロピレン製バイアル中にて25 μ lのペプチド/ストレプトビジンと混合する。バイアルを4において一夜(16-18時間)培養する。プロテインAセファロース(PAS)(20 μ l/試料バイアル)を秤取し、10mlのIMP洗浄緩衝液で三回洗浄し、リピータピペットを用いて1.5mlエッペンドルフチューブに移す。PASを1000RPMにて2分間遠心分離することによって沈降させ、上澄み液を吸引フラスコ又はピペットを用いて吸引する。3時間培養した後、抗体/抗原溶液をPASペレットに移し、振とう台にて室温でさらに30分間培養する。PASを100RPMで2分間遠心分離することによって沈降させ、得られたPASペレットを750 μ lのIMP洗浄緩衝液で5回洗浄する。各洗浄工程の後、PASは1000RPMで2分間遠心分離することによって沈降させ、上澄み液は、吸引フラスコ又はピペットを用いて吸い取る。最後に、PASペレットをmilli-Q水中のスラリー100 μ Lに再度懸濁させ、4mlのポリプロピレンチューブに移して、カウンターで計数す

る。上記にて非均一E L I S A測定法について述べたように、コントロール実験をナンセンスタンパク質について行うこととする。

【0110】

このプロトコールに従って操作を行って、高度に特異的なシグナルを血清について得た。群毎にみて、RF + RA患者は、コントロール被験者から得た血清よりも高い応答を示した(図7を参照)。

【0111】

競合実験を下記するペプチドを100, 1, 000又は10, 000 ng / ml含む 溶液をそれぞれ25 µl添加することによって行った: Trp - Leu - Asp - Gly - Lys - Glu - Tyr、Trp - Leu - Asn - Gly - Lys - Glu - Tyr、Glu - Lys - Ala - His - Asp - Gly - Gly - Arg及びGlu - Lys - Ala - His - Asp Gly - Gly - Argペプチド並びに‘ナンセンス’コントロールペプチドであるHis - Thr - Ala - Arg - Gln - Met - Ala - Trp - Ala - Lys及びThy - GA - Trp - Leu - Asx - Gly - Lys - Glu - TyrとThy - GA - Glu - Lys - Ala - His - Asx - Gly - Gly - Argの複合物である。全ての実験において認められた反応性を集めて、その反応性を群毎に算出すると、最高濃度でのTrp - Leu - Asp - Gly - Lys - Glu - Tyrペプチド(及びThy - GA - Trp - Leu - Asx - Gly - Lys - Glu - Tyr複合物)に対する有意の反応性(Student t - 検定で、P=0.01)が認められるが、その他のペプチド類の何れについても認められない(図8を参照)。このことは、前記実施例において記載したE L I S A構成において行った観察結果に類似している。

【0112】

実施例5: RA患者から単離した免疫親和性精製自己抗体に反応性を示す、ヒトIgG のAsn - 315を含む免疫反応性エピトープの遺伝子地図作成

IgMの解析は、自己抗体の分析を行う前に血清試料から内因性IgGを除去出来る可能性を開くものである。事実、循環する異性化/光学的反転したIgGが相当な量において健常個人及びRA罹患個人の双方において存在することは

、既に確固として認められており、想定された抗イソ- I g G 自己抗体の何れもが、これらの分子の存在によって殆ど完璧に阻害され、その結果当該測定法において固体層に結合することが妨害されるに到ることは、想到可能なことである。下記する実施例は、ヒト I g G から誘導された異性化標的エピトープと反応性を示すヒト自己抗体を精製する方法、及び不活性なセルロース支持体上において合成された合成ペプチドと一緒に培養することによって発現した、かかるエピトープに対する反応性を検出する方法を記載するものである。

【0113】

I g G カラムにおける免疫親和性クロマトグラフィーによるヒト血清試料から R F ' s を精製すること

適用した実験プロトコールは以下の通りである：

- 1 . I g G を C N B r で活性化したセファロースにメーカーの指示 (Pharmacia, Upsala, Sweden) に従って結合させる。
- 2 . この I g G セファロースを適当なカラム (即ち、使い捨て型の D G 1 0 カラム、BioRad Laboratories, Richmond, CA) に充填する。このカラムは、少なくともカラムの 1 0 倍容量の P B S 及びカラムの 1 0 倍容量の 0 . 1 M 酢酸ナトリウム、0 . 1 5 M 塩化ナトリウム p H 3 . 5 で洗浄し、最後に P B S で平衡化処理する。
- 3 . R A 患者から採取した血清を P B S に 1 0 倍に希釈し、このカラムにロードする。吸光度 (O D 2 8 0 n m) がベースラインに達するまでカラムを P B S で洗浄する。
- 4 . 結合した R F ' s を 0 . 1 M 酢酸ナトリウム、0 . 1 5 M 塩化ナトリウム p H 3 . 5 で洗浄する。
- 5 . 0 . 1 M 酢酸ナトリウム、0 . 1 5 M 塩化ナトリウム p H 3 . 5 を用いたセファデックス G - 2 0 0 カラムによるゲル濾過により I g M を I g G 及び I g A から分離する。
- 6 . 溶出した I g M を P B S - B T で 1 μ g / m L にまで希釈し、下記するように測定する。

【0114】

セルロース結合ペプチドの合成

Asn - 315 残基上を伸展する7つのアミノ酸ペプチドをWhatman 540 paper (Maidstone, U.K.) を使用した前述した操作法 (Frank, 1992, Kramer et al 1994) を用いてスポット合成法により合成した。これらのペプチドは、スポット合成法 (Abimed, Langenfeld, FRG) を用いれば自動的に合成される。以下のペプチドをカルボキシ末端を介して共有結合させた状態で合成した：

- I . Thr - Val - Leu - His - Gln - Asp - Trp ...
 II . Val - Leu - His - Gln - Asp - Trp - Leu ...
 III . Leu - His - Gln - Asp - Trp - Leu - Asp - ...
 IV . His - Gln - Asp - Trp - Leu - Asp - - Gly ...
 V . Gln - Asp - Trp - Leu - Asp - - Gly - Lys ...
 VI . Asp - Trp - Leu - Asp - - Gly - Lys - Glu ...
 VII . Trp - Leu - Asp - - Gly - Lys - Glu - Tyr ...
 VIII . Leu - Asp - - Gly - Lys - Glu - Tyr - Lys ...

- IX . Asp - - Gly - Lys - Glu - Tyr - Lys - Cys ...
 X . Gly - Lys - Glu - Tyr - Lys - Cys - Lys ...

Asp - : 異性化Asp残基を支配するが、この場合ペプチド結合は、直鎖のカルボキシル基 (L型) ではなくカルボキシル基を貫通する。

... : セルロース支持体との結合を支配する。

【0115】

これらのペプチドを含むセルロース膜は、上記したように免疫親和性精製したRA自己抗体と共に培養した。結合抗体の培養及び可視化は、報告されている従来法によるイムノプロットティング法を用いて行った (Kramer et al 1994) 。

【0116】

この実験の結果、ペプチドIV及びVIIに対して強い反応性が明らかとなった。このことから、RA患者の血清から精製した自己抗体は、当該エピトープ

の異性化 (L) 型における A s n - 3 1 5 残基を取り囲む七つのアミノ酸エピトープを認識していることが強く示唆される。

【 0 1 1 7 】

実施例 6 : Pro - Ser - Glu - Gly - Lys - Gly - Arg - Gly に反応性を示す自己抗体の検出

多発性硬化症に罹患した患者における自己抗体が、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) から誘導されたオクタペプチドである Pro - Ser - Glu - Gly - Lys - Gly - Arg - Gly を認識するか否かを検討した。

【 0 1 1 8 】

この目的のために、M B P 誘導オクタペプチド Pro - Ser - Glu - Gly - Lys - Gly - Arg - Gly (L) を標準的 F M O C 化学を使用して合成により製造した。このペプチドをビスー [スルホスクシンイミジル] スベレート (B S ³) によってメーカー (Pierce) の指示に従ってウシ血清アルブミン (B S A) に結合させ、実施例 4 において記載したようにクロラミン T プロトコールを用いて ¹²⁵ I で沃素化させた。

【 0 1 1 9 】

9 人の M S 患者及び 8 人の健常者から採取した血清を ¹²⁵ I - B S A - B S ³ Pro - Ser - Glu - Gly - Lys - Gly - Arg - Gly と一夜反応させ、次いでプロテイン A セファロースで免疫複合体を沈殿させた。血清試料を I M P 緩衝液で 1 : 2 0 0 に希釈し、また ¹²⁵ I - B S A - B S ³ - Pro - Ser - Glu - Gly - Lys - Gly - Arg - Gly トレーサーを I M P 緩衝液で希釈した (活性が 1 0 0 0 0 0 C P M / 2 5 μ l になるまで) 。希釈した血清試料の 7 5 μ l を 2 5 μ l のトレーサーと混合し、2 5 μ l の I M P 緩衝液か又はフリーの (未結合 / 未標識化) ペプチド Pro - Ser - Glu - Gly - Lys - Gly - Arg - Gly ペプチド (I M P 緩衝液中 1 0 μ g / m l の濃度で) をこの混合物に加えた。この混合物を 4 にて一夜培養した。試料バイアル当たり 2 0 μ l のプロテイン A セファロースを秤取し、1 0 m l の I M P 洗浄緩衝液で 3 回洗浄し、リピーターピペットを用いてエッペンドルフ 1 . 5 m l チューブに移した。P A S 2 0 0 0 R P M で 2 分間遠心分離するこ

とによって沈降させ、上澄み液を吸引装置（又はピペット）を用いて吸引した。一夜培養した後、抗体/抗原溶液をPASペレットに移し、振とう台にて室温で3時間培養した。PASを2000RPMにて2分間遠心分離することによって沈降させ、PASペレットを750 μ lのIMP洗浄緩衝液で5回洗浄した。各洗浄工程終了後、上澄み液を吸引し、最後にPAS-ペレットをmilli-Q水に再度懸濁させて、100 μ lのスラリーにし、4mlのプロピレンチューブに移して、カウンターで計数した。このプロトコールに従って操作することによって、特異的シグナルが血清について得られた。群毎に、MS血清は、コントロール被験者から採取した血清試料よりも有意に高い応答を示した（ $P = 0.0078$ 、両側、ノンパラメトリックt検定）。図9Aを参照。更には、 ^{125}I -BSA-BS³-Pro-Ser-Glu-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly複合物とヒト免疫グロブリンとの結合は、フリーのPro-Ser-Glu-Gly-Lys-Gly-Arg-Glyペプチドを添加することによって特異的に阻害することが出来た。即ち、免疫グロブリンの阻害率%は、MS血清においてはコントロール血清と比較して有意に高かった（ $p = 0.008$ 、両側、ノンパラメトリックt検定）。図9cを参照。従って、MS患者は、異性化（L）グルタミン酸を含むMBP誘導エピトープに配向させた抗体を複数有している。

【0120】

これらの結果を図9に示すが、この図において三つのグラフは、下記の通りである：

グラフA； 多発性硬化症（MS）の患者及び健常対照者（CO）から採取した血清 中におけるヒト免疫グロブリンと ^{125}I -BSA-BS³-Pro-Ser-Glu-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly（競合化合物としてフリーのペプチドは一切添加しない）との結合。

【0121】

グラフB； 多発性硬化症（MS）の患者及び健常対照者（CO）から採取した血清 中におけるヒト免疫グロブリンと ^{125}I -BSA-BS³-Pro-Ser-Glu-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly（競合化合物とし

てフリーのPro-Ser-Glu-Gly-Lys-Gly-Arg-Glyペプチドを添加)との結合。

【0122】

グラフC；多発性硬化症(MS)の患者及び健常コントロール(CO)から採取した血清中におけるヒト免疫グロブリンと¹²⁵I-BSA-BS³-Pro-Ser-Glu-Gly-Lys-Gly-Arg-Glyとの結合のパークセント阻害率。

【0123】

参考文献

1. Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J, Lindsay LA, Roll U, Knip M, Atkinson M, Mose-Larsen P, Fey S, Ludvigsson J, Madsen O, & Baekkeskov S. J. Clin. Invest. (1996) June 15; 97(12);2772-83 Identification and characterisation of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in Type I Diabetes.
2. Abel LC, Kalil J, Cunha Neto E (1997) Braz. J. Med. Biol. Res. (1997)
)
Molecular mimicry between cardiac myosin and Trypanosoma cruzi antigen B13: identification of a B13-drive human T cell clone that recognises cardiac myosin. 30(11):1305-1308.
3. Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassman H, Matthieu J-M, Gardiner MV, Dornmair K, Linnington C (1995) The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. J Neuroimmunol. 63:17-27
4. Atassi MZ, Oshima M (1997) Autoimmune responses against acetylcholine receptor: T and B cell collaboration and manipulation by synthetic peptides. Crit. Rev. Immunol. 17(5-6):481-495
5. Bach-Elias M, Bahia D, Teixeira DC, Cicarelli RM (1998) Presence of

autoantibodies against small nuclear ribonucleoprotein epitopes in Chagas' patients' sera. *Parasitol Res.* 84(10):796-799

6. Beniac DR, Luckevich MD, Czarnota GJ, Tompkins TA, Ridsdale RA, Ottenmeyer FP, Moscarello MA, Harauz G (1997) Three-dimensional structure of myelin basic protein. I. Reconstruction via angular reconstitution of randomly oriented single particles. *J. Biol. Chem.* 272(7):4261-4268

7. Benkirane N, Friede M, Guichard G, Briand J-P, Van Regenmorte MHV, Muller S, (1993) Antigenicity and immunogenicity of modified synthetic peptides containing D-amino acid residues. Antibodies to a D-enantiomer do recognise the parent L-hexapeptide and reciprocally *J. Biol Chem* 268: 26279-26285

8. Bernstein RM (1990) Humoral autoimmunity in systemic rheumatic disease, A review. *J Royal Col. Phys. London.* 24, 18-25

9. Bettadapura J, Menon KK, Moritz S, Liu J, Bernard CCA (1998) Expression, purification and encephalitogenicity of recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein *J Neurochem* 70: 1593-1599

10. Bakkeskov S, Bielson JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A (1982) Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins *Nature* 298:167-169

11. Bakkeskov S, Aanstoot H-J, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascaho M, Folli F, Richter-Olesen H, and De-Camilli P (1990) Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesising enzyme glutamic acid decarboxylase *Nature* 347(6289):151-156

12. Berrih-Aknin S, (1995) Myasthenia gravis, a model of organ-specific autoimmune disease. *J. Autoimmun* 8(2):139-143

13. Bonagura VR, Artandi SE, Davidson A, Randen I, Agostino N, Thompson K, Natvig J, Morrison SL (1993) Mapping studies reveal unique epitopes on IgG recognised by rheumatoid arthritis-derived monoclonal rheumatoid factors. *J Immunol.* 151:3840-3852

14. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, C. Christiansen C. 1994 Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin. Chem.* 40, 2022-2025
15. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E, (1995) Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J. Immunol.* 155(11):5419-5426
16. Carson DA (1993). In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S and Sledge CB (Eds.). *Textbook of Rheumatology*; 1: 155 - 163, WB Saunders, London.
17. Chen KR, Shimizu S, Miyakawa S, Ishiko A, Shimizu H, Hashimoto T (1996) Coexistence of psoriasis and an unusual IgG-mediated subepidermal bullous dermatosis: identification of a novel 200-kDa lower lamina lucida target antigen. *Br J Dermatol* 134(2): 340-346
18. Chen P, Fong S, Carson DA (1987) Rheumatoid factor *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 13: 575
19. Clarke S (1987). Propensity for Spontaneous Succinimide Formation from Aspartyl and Asparaginyl Residues in Cellular Proteins. *Int. J. Peptide Protein Res.* 30: 808 - 821.
20. Cooke A (1988) Mechanisms of autoimmunity. *Diabetic Med.* 5: 782- 788
21. Dean BM, Becker F, McNally JM, Tarn AC, Schwartz G, Gale EA, Bottazzo GF (1986) Insulin autoantibodies in the pre-diabetic period: correlation with islet cell antibodies and development of diabetes. *Diabetologica* 29:339-342
22. De Vries HE, Kuiper J, De Boer AG, Van Berkel TJC and Breimer DD, *Pharmacological Reviews* (1997) Vol. 49, No.2, 143
23. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Med.* 3(7):797-801

24. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillet H, Riecken EO, Schuppan D (1998) Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease *Gastroenterology* 115(6):1317-1321
25. Fledelius C, Johnsen A, Cloos P, Bonde M, Qvist P. 1997 Characterisation of urinary C-terminal telopeptide degradation products. Identification of a s-isomerised Aspartyl residue in the C-terminal chain type I collagen. *J. Biol. Chem.* 272: 9755-9763
26. Frank, R (1992) Spot synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48: 9217-9232
27. Galletti P, Ingrosso D, Manna C, Clemente G, Zappia V. (1995) Protein Damage and Methylation mediated repair in the erythrocyte *Biochem J.* 305: 313-325
28. Geiger T, Clarke S, (1987) Deamidation, Isomerisation, and Racemisation at Asparaginyll and Aspartyl Residues in Peptides. *J. Biol. Chem.* 262: 785-794
29. Glant TT, et al Mapping of Arthritogenic/Autoimmune Epitopes of Cartilage Aggrecans in Proteoglycan-Induced Arthritis. *Scand J Rheumatol* 1995: 24 (Suppl. 101) 43-99
30. Goin JC, Leiros CP, Borda E, Serin-Boirda L (1997) Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications *FASEB J.* 11(1):77-83
31. Gorsuch AN, Spencer KM, Lister J, McNally JM, Dean BM, Bottazo GF, Cudworth AH (1981) Evidence for a long prediabetic period in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Lancet* 2(8260-61): 1363-1365
32. Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB, Krueger JG (1995) Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pa

thogenic basis. *Nat.Med.* 1(5):442-447

33. Harris ED (1993) Aetiology and pathogenesis of Rheumatoid Arthritis
In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S and Sledge CB (Eds.). *Textbook of Rheumatology*; 1: 833 - 873, WB Saunders, London.
34. Ichikawa M, Johns TG, Jiu J, Bernard CC (1996) Analysis of the fine B cell specificity during the chronic/relapsing course of a multiple sclerosis-like disease in Lewis rats injected with the encephalitogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35-55 *J. Immunol.* 157:919-926
35. Inman RD and Day NK (1981). *Immunologic and Clinical Aspects of Immune Complex Disease.* *Am. J. Med.* 70: 1097.
36. Janeway CA Jr. Travers P, Hunt S, "Immuno Biology" (1997) 3rd ed. *Current Biology Ltd.* (London) pp 226-235.
37. Johnson PM, Page Faulk W (1976). *Rheumatoid Factor: Its Nature, Specificity, and Production in Rheumatoid Arthritis.* *Clin. Immun. Immunopath.* 6: 414-430.
38. Johnson PM, Watkins J, Scopes PM and Tracey BM (1974). *Differences in Serum IgG Structures in Health and Rheumatoid Diseases.* *Ann. Rheum Dis.* 33: 366.
39. Johnson PM, Watkins J, Holbrow EJ (1975) *Antiglobulin production to altered IgG in Rheumatoid Arthritis* *The Lancet*, 1(7907): 611-613
40. Johnson T, Valdimarsson H (1993). *Is Measurement of Rheumatoid Factor or Isotypes Clinically Useful?* *Ann. Rheum. Diseases* 52: 161 - 164.
41. Kalsi J and Isenberg D (1993) *Rheumatoid factor: Primary or Secondary event in the pathogenesis of RA?* *Int. Arch. Allergy Immunol.* 102:209-215.
42. Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CCA, Ben-Nun A (1993) *Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein.* *J. Clin. Invest.* 92:2602-2608

43. Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A (1998) T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis: Relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte J. Autoimmun. 11: 287-299
44. Kramer A, Schuster A, Reineke U, Malin R, Volkmer-Engert R, Landgraf C and Schneider-Mergener J (1994) Combinatorial cellulose bound peptide libraries: Screening tools for the identification of peptides that bind ligands with pre-defined specificity. Comp. Meth. Enzymol. 6: 388-395
45. Li Q, Borovitskaya AE, DeSilva MG, Wasserfall C, MacLaren NK, Notkins AL, Lan MS (1997) Autoantigens in insulin-dependent diabetes mellitus : molecular cloning and characterisation of human IA-2 beta. Proc. Assoc. Am Physicians 109(4):420-439
46. Linington C, Webb M, Woodhams P (1984) A permanent rat T cell line that mediates experimental allergic neuritis in the Lewis rat in vivo. J. Neuroimmunol. 6:387-396
47. Linington C, Bergr T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, Lu H-C, Lassmann H, Werkele H. (1993) T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. Eur J. Immunol. 23:1364-1372
48. Lu J, Li Q, Xie H, Chen ZJ, Borovitskaya AE, MacLaren NK, Notkins A L, Lan MS (1996) Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: precursor of the 37-kDa tryptic fragment. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(6):2307-2311
49. Lukash AI, Pushkina NV, Tibulsky IE "Autoantigenic properties of deamidated serum albumin" Immunologiya 68: 1987
50. Martin R (1997) Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis and their application for new therapeutic strategies, J. Neural Transm. 49:53067
51. Mor A, Amiche M, Nicolas P, (1992) Enter a New Post-translational M

odification: D-amino Acids in Gene-encoded Peptides. Elsevier Science Publications (UK) Dec. 1992 481-485

52. Munthe E and Natvig JB (1972). Complement Fixing Intracellular Complexes of IgG Rheumatoid Factor in Rheumatoid Plasma Cells. Scand. J. Immunol. 1: 217.

53. Murrey DE Jr. & Clarke S, Jnl of Biological Chemistry (1984) Vol. 259, No.17, Sept. 10 pp 10722-10732 "Detection of a new site of methylation at isomerised L-aspartyl residues"

54. Nardella FA, Teller DC and Mannik M (1981). Studies on the Antigen Determinants in the Self-association of IgG Rheumatoid Factor. J. Exp. Med. 154: 112 - 125.

55. Natvig JB and Munthe E (1975). Self-associating IgG Rheumatoid Factor Represents a Major Response of Plasma Cells in Rheumatoid Inflammatory Tissue. Ann. NY Acad. Sci. 256: 88 - 95.

56. Nauert JB, Klauck TM, Langenberg LK, Scott JD (1997) Gravin, an autoantigen recognised by serum from myasthenia gravis patients, is a kinase scaffold protein Curr. Biol. 7(1):52-62

57. Nepom GT (1990). MHC Genes in HLA-associated Disease. Curr. Opinion in Immunology 2: 588 - 592.

58. Noritake DT, Colburn KK, Chan G and Weisbart RH (1990). Rheumatoid factors Specific for Active Rheumatoid Arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 49 : 910 - 915.

59. Okamoto Y, Abe T, Niwa T, Mizuhashi S, Nishida M (1998) Development of a dual colour enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T-helper type 1 and T-helper type 2 cells. Immunopharmacology 39:107-116

60. Palmer JP, Asplin CM, Clemens P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL (1983) Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment Science 222:1337-1339

61. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, Rademacher TW, Mizuochi T, Taniguchi T, Matsuta K (1985). Association of Rheumatoid Arthritis and Primary Osteoarthritis with Changes in the Glycosylation Pattern of Total Serum IgG. *Nature* 316: 452 - 457.
62. Parekh RB, Isenberg DA, Ansell BM, Roitt IM, Dwek RA and Rademacher TW (1988). Galactosylation of IgG-associated Oligosaccharides is Reduced in Patients with Adult and Juvenile Onset Rheumatoid Arthritis and is Related to Disease Activity. *Lancet* 1: 966 - 999.
63. Pilkington C, Yeung E, Isenberg D, Lefvert AK and Rook GAW (1995) A galactosyl IgG and antibody specificity in rheumatoid arthritis, tuberculosis, systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis. *Autoimmunity*. 22 : 107-111.
64. Rawson AJ, Hollander JL, Quismorio FP and Abelson NM (1969). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 168: 188
65. Ronnelid J, Klareskog L. (1997) A comparison between ELISPOT methods for the detection of cytokine producing cells: Greater sensitivity and specificity using ELISA plates as compared to nitrocellulose membranes. *J Immunol. Meth.* 200: 17-26
66. Schon MP, Detmar M, Parker CM (1997) Murine psoriasis-like disorder induced by naive CD4+ T cells. *Nat. Med.* 3(2):183-188
67. Sela MS, Fuchs (1964) On the role of charge and Optical Configuration in Antigencity. *Sec. Chem. Immunol.* pp 43-56
68. Sela M, Zisman E, (1997) Different Roles of D-amino Acids in Immune Phenomena. *Dept. of Immunol. Rehovot* pp 449-456
69. Sun J, Link H, Olsson T, Xiao BG, Andersson G, Ekre HP, Linington C, Diener P. (1991) *J. Immunol.* 146:1490-1495
70. Svasti J and Milstein C (1972). The Complete Amino Acid Sequence of a Mouse (Light Chain. *Biochem. J.* 128: 427-444.
71. Todome Y, Ohkuni H, Mizuse M, Furuya M, Fujikawa S, Tanaka S, Watan

- abe N, Fujii K, Zabriskie J, (1992) Detection of Antibodies against Streptococcal Peptidoglycan and the Peptide Subunit (Synthetic Tetra-D-Alanyl-Bovine Serum Albumin Complex) in Rheumatic-Diseases. *Int. Arch Allergy Immunol* 1992: 301-307
72. Tomana M, Schrohenloher RE, Koopman WJ, Alarcon GS and Paul WA (1988). Abnormal Glycosylation of Serum IgG from Patients with Chronic Inflammatory Diseases. *Arthritis and Rheumatism*. 31: 333 - 338.
73. Tomiyama T, Asano S, Furiya Y, Shirasawa T, Endo N, and Morrill, J. *J. Biol. Chem.* (1994) Vol. 269, No. 14 April 9, pp 10205-10208 "Racemisation of Asp²³ Residue affects the aggregation properties of Alzheimer Amyloid Protein Analogues"
74. Vann Noort JM, van Sechel AC, van Stipdonk MJB, Bajaramovic JJ (1998) "The small heat shock protein α -crystallin as key autoantigen in multiple sclerosis" In "Progress in brain research" vol 117(eds: Van Leuwen FW, Salehi A, Giger RJ, Holtmaat AJGD, Verhaagen J) Elsevier Science, Amsterdam
75. Watkins J, Turner MW, Roberts A. (1972). In: Peeters H (ed.) *Proteins of the Biological Fluids*, 19th Colloquim, Oxford : 468
76. Weir, D (ed.) (1996) *The handbook of experimental immunology*, vol.1, 5th edn. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
77. Williams RC (1996) Autoimmune mechanisms involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Adv. Dent. Res.* 10:47-51
78. Winchester RJ (1975). Characterisation of IgG Complexes in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.* 256: 73 - 81.
79. Yoshikawa H, Lambert EH, Walser-Kuntz DR, Yasukawa Y, McCormick DJ, Lennon VA (1997) A 17-Mer self-peptide of acetylcholine receptor binds to B cell MHC class II, activates helper T cells, and stimulates antibody production and electrophysiologic signs of myasthenia gravis. *J. Immunol.* 159(3):1570-1577

80. Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, de Miguel E, Rosenberg G, Poole AR 1998 Induction of arthritis in Balb C mice by cartilage link protein: involvement of distinct regions recognised by T and B lymphocytes. Am. J. Pathol. 153:1283-1291

Zisman E, Katz-Levy Y, Dayan M, Kirshner SL, Paas-Rozner M, Karni A, Abramsky O, Brutbar C, Fridkin M, Sela M, Mozes E. (1996) Peptide analogs to pathogenic epitopes of the human acetylcholine receptor alpha subunit as potential modulators of myasthenia gravis Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(9):4492-4497

【図面の簡単な説明】

【図1】(A)は、ペプシンで分解したヒトIgGについて行った第一回目の排除クロマトグラフィーにより実施例1において得られた結果を、溶出物質のOD280nmまた収集したフラクションについて測定したIAMT活性を示すグラフとして示す。図1(B)は、サイズ排除クロマトグラフィーによって単離したペプシン分解IgGのいくつかの分画について異性化の特異的度合いを示す；

【図2】サイズ排除クロマトグラフィーによって単離したIgGの低分子量断片をアニオン交換樹脂カラムによる分離に供することによって実施例1において得られた結果を示す。更に精製に供したフラクションについて収集したプールを、a, b, c及びdとして表す。

【図3】図2において示した陰イオン精製IgGペプチドの“プールb”からHPLCでペプチド類を分離した結果を示す。下記するトレーサーを示す：UV214nm、蛍光(380/297nm)、アセトニトリルグラジエント及びIAMT反応性である。

【図4】図3において概要を示したプールb精製物のRP-HPLCによる第二回目の精製結果を示す。UV214nm検出器シグナル及び溶出物質のIAMT反応性を示す。

【図5】実施例2で得られた結果を、3つの患者群の血清試料について行ったELISA測定法で得られたシグナルグラフの形式として示したものである。

【図6】実施例3で得られた結果を、競合ペプチドの存在下に試験した6つの血清試料のE L I S A信号の棒グラフの形式として示したものである。

【図7】実施例4で得られた結果を、R A患者と健常コントロールの試料を用いて均質R I A測定法で得たシグナル(C P Mにおける)グラフの形式として示したものである。

【図8】実施例4で得られた結果を、競合ペプチドの存在下で得られたR I A信号を阻害率として表した棒グラフの形式として示したものである。

【図9】実施例6で得られた結果を、散布グラフA , B及びCの形式として示したものである。

【図1】

図1A: I g G断片のサイズ排除クロマトグラフィー

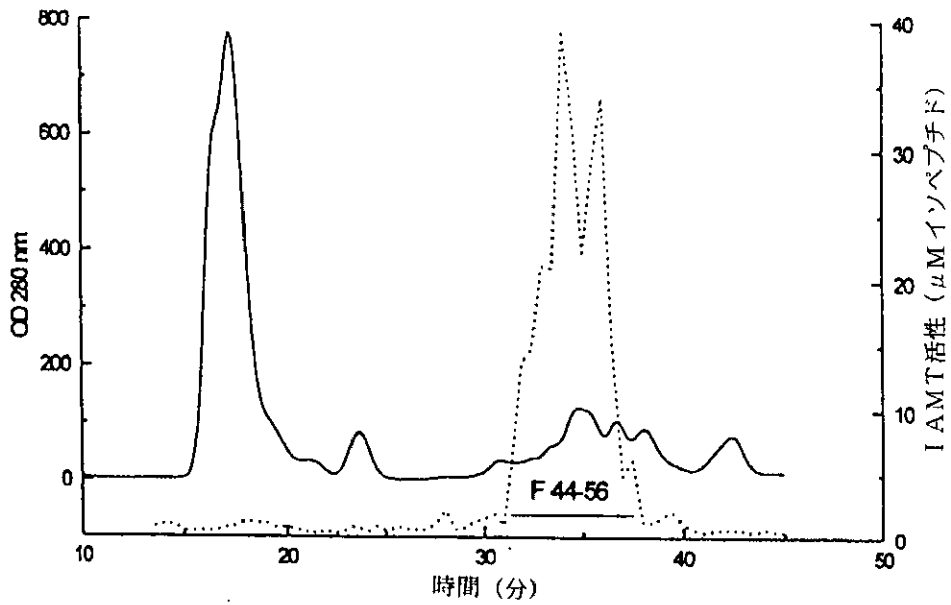
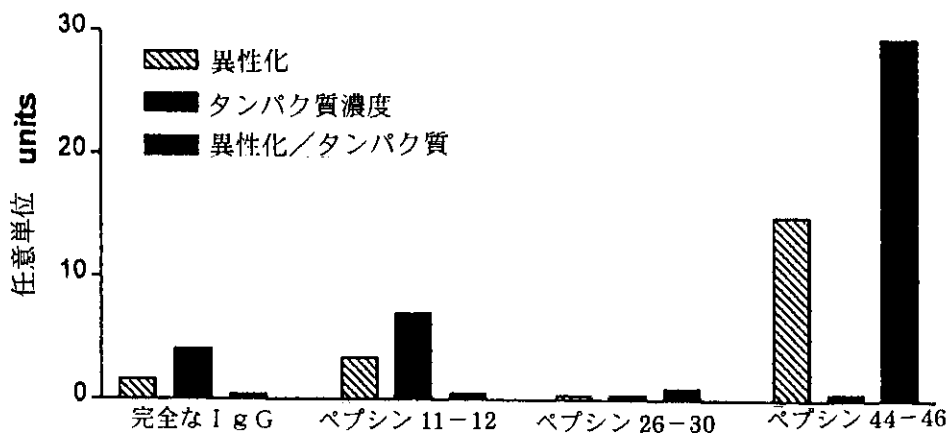
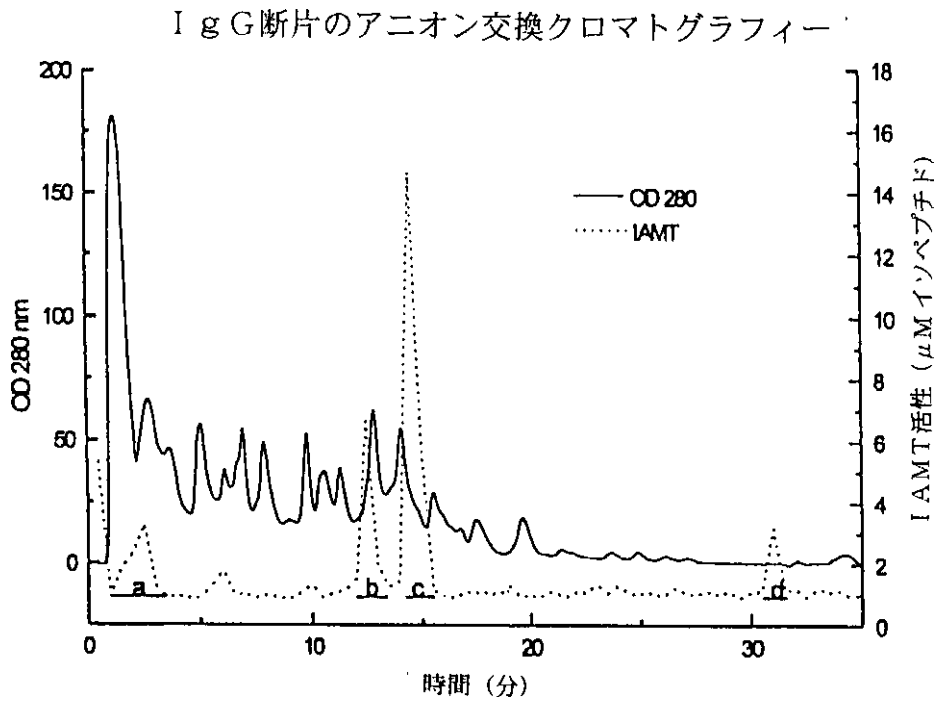


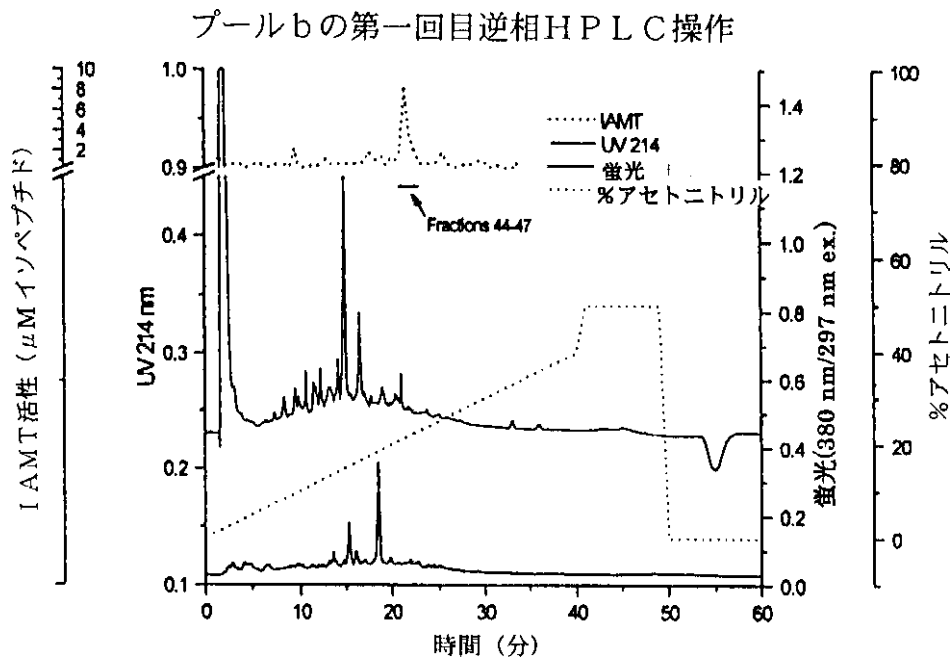
図1B: I g G切断生成物の選別したプールの異性化パターン



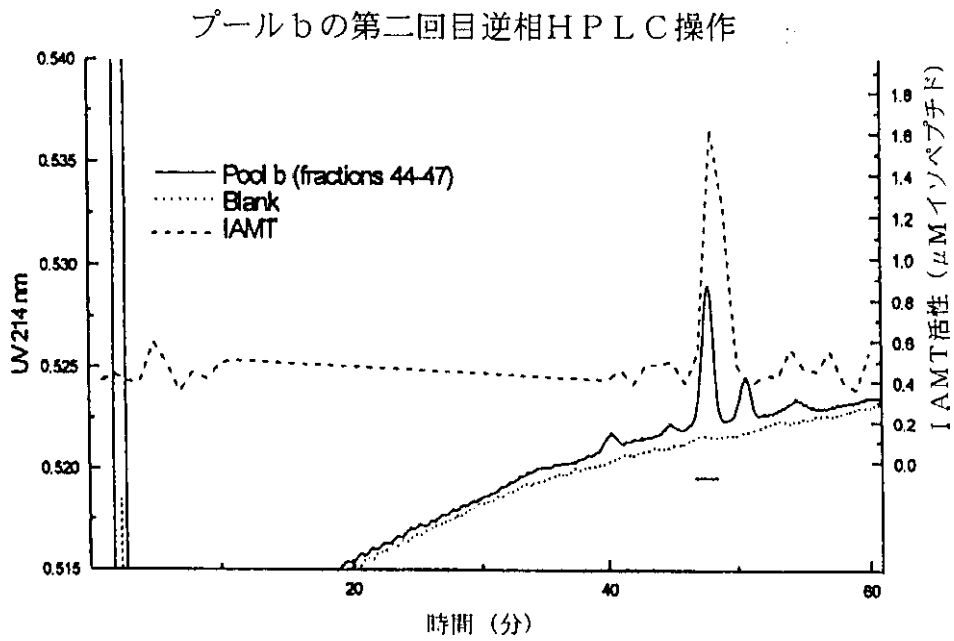
【図2】



【図3】

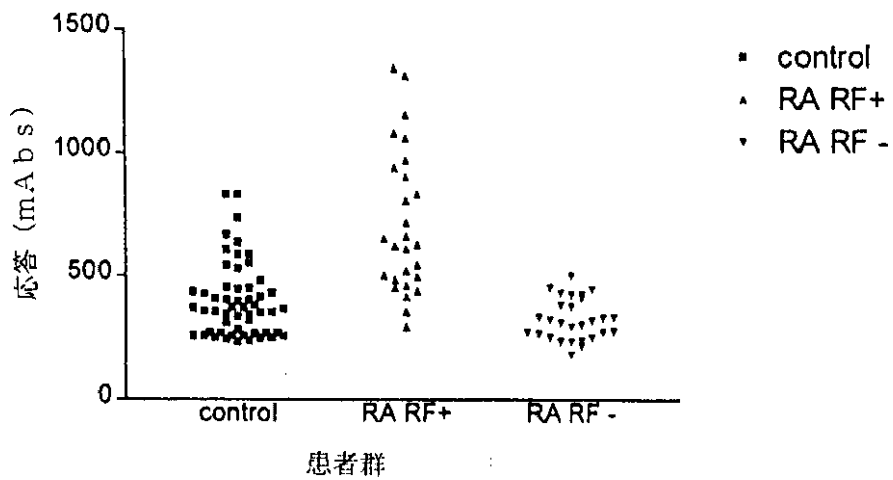


【図4】



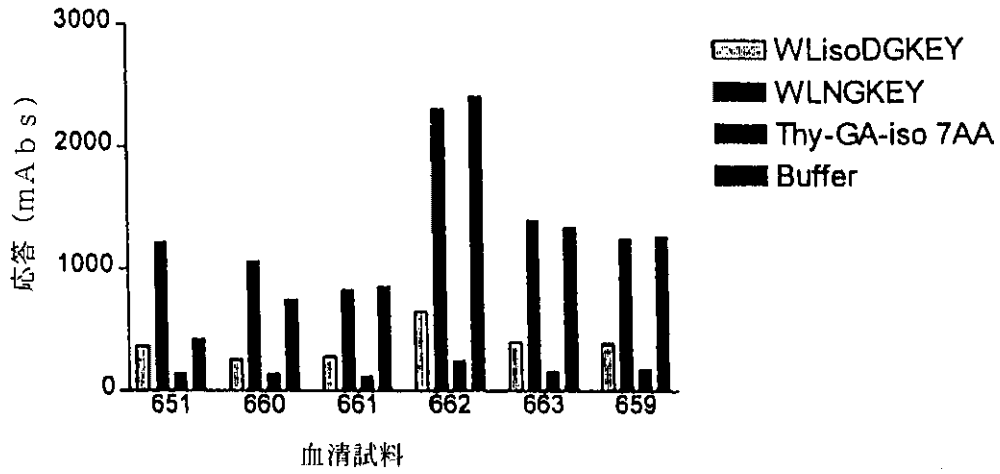
【図5】

IgG誘導エピトープWLD-β-GKEY
に配向した自己抗体に対する直接結合測定法
における応答



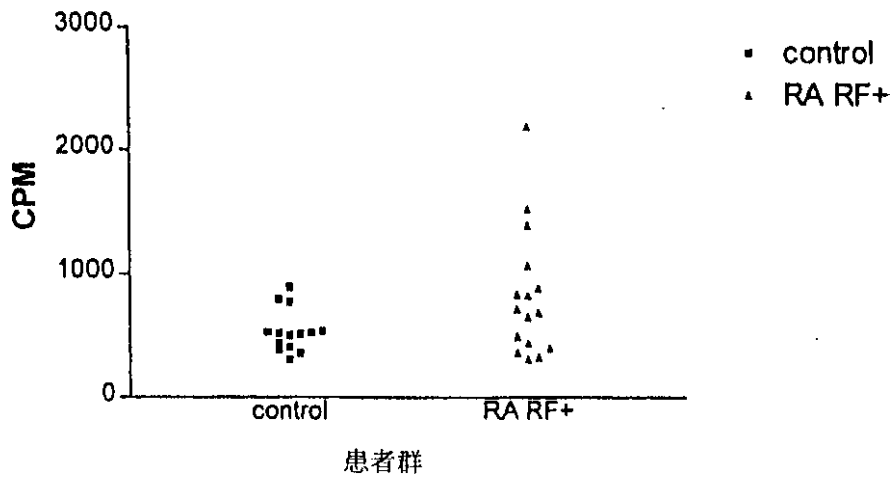
【図6】

Thy-GA-WLD-β-GKEY
コート処理プレートを用いた直接結合



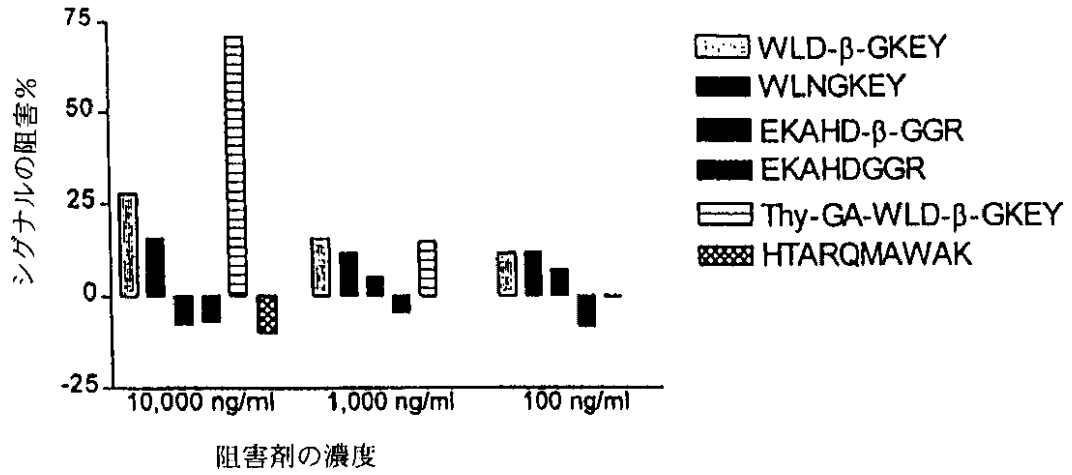
【図7】

IgG誘導エпитープWLD-β-GKEY
に配向した自己抗体に対する均一免疫測定法
における応答



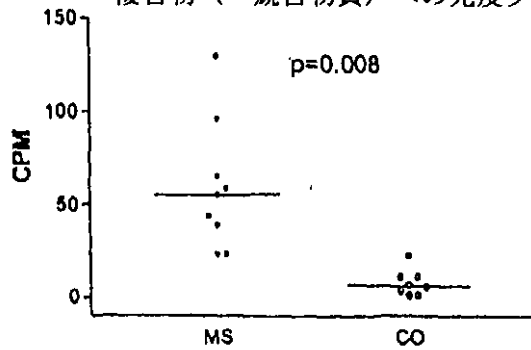
【図8】

IgG誘導エпитープWLD-β-GKEY
の均一測定法における自己抗体の阻害

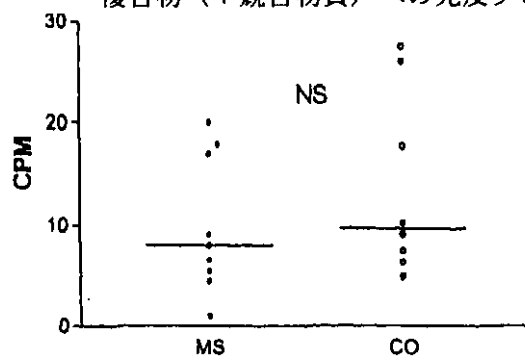


【図9】

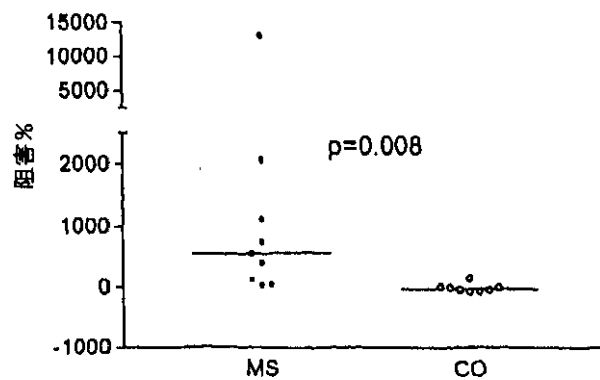
グラフA：¹²⁵I-BSA-BS³-Pro-Ser-Glu-
γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly
複合物（-競合物質）への免疫グロブリンの結合



グラフB：¹²⁵I-BSA-BS³-Pro-Ser-Glu-
γ-Gly-Lys-Gly-Arg-Gly
複合物（+競合物質）への免疫グロブリンの結合



グラフC：“コールド”ペプチド添加による免疫グロブリン結合の阻害



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 00/07973
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/564 C07K14/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARTNES KRISTIAN ET AL: "A retro-inverso analog mimicks the cognate peptide epitopes of a CD4+ T cell clone." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 27, no. 6, 1997, pages 1387-1391, XP000983044 ISSN: 0014-2980	1-3,9, 10,13,17
A	abstract page 1390, column 2, paragraph 4 -page 1391	11
X	WO 97 46251 A (MARQUIS DAVID MATTHEW ; JONES DAVID S (US); YU LIN (US); LAJOLLA PH) 11 December 1997 (1997-12-11) abstract; tables 8,9 page 41 -page 43, line 3 --- -/--	1,2,4,5, 9,10,13, 17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 14 February 2001		Date of mailing of the international search report 26/02/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Patent Application No
PCT/EP 00/07973

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 98 08098 A (FLEDELIUS CHRISTIAN ;OSTEOMETER BIOTECH AS (DK); QVIST PER (DK); C) 26 February 1998 (1998-02-26) claims 1,5 -----	17 1-16,18, 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/07973

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746251 A	11-12-1997	AU 3640497 A	05-01-1998
		EP 0954531 A	10-11-1999
		JP 2000512981 T	03-10-2000
		NO 985636 A	08-02-1999
WO 9808098 A	26-02-1998	AU 3943597 A	06-03-1998
		EP 0922228 A	16-06-1999
		JP 2000516721 T	12-12-2000

フロントページの続き

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

(72)発明者 クリストガウ、ステファン
デンマーク国、デーカー - 2820 ヘントホ
フテ、レーベスコフスベイ、10アー
Fターム(参考) 4H045 AA10 AA30 BA01 BA13 BA14
BA15 BA16 BA18 CA40 DA75
DA86 EA22 FA71

专利名称(译)	对异构化/光学反转表位的特异性免疫应答：应用于诊断自身免疫疾病		
公开(公告)号	JP2003512599A	公开(公告)日	2003-04-02
申请号	JP2001517161	申请日	2000-08-16
申请(专利权)人(译)	Osuteomita-Bioteku-ER / ES		
[标]发明人	クロオースポールアンドレアスコンパーレ クリストガウステファン		
发明人	クロオース、ポール・アンドレアス・コンパーレ クリストガウ、ステファン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 G01N33/564		
CPC分类号	G01N33/564 G01N2800/24 G01N2800/285		
FI分类号	G01N33/53.D C07K7/06.ZNA C07K7/08 C07K16/18 G01N33/564.Z		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA01 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/FA71		
优先权	1999019452 1999-08-17 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

与天冬氨酸，天冬酰胺，谷氨酰胺或谷氨酸残基异构化的蛋白质具有反应性的抗体和T淋巴细胞对IgG（类风湿关节炎）和髓鞘碱性蛋白（多发性硬化）具有自身反应性 已经发现它与自身免疫疾病有关。 描述了用于诊断对异构化蛋白质序列的自身免疫反应性的测定法。

