

(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2007-308502

(P2007-308502A)

(43) 公開日 平成19年11月29日(2007.11.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/725 (2006.01)</b>	C07K 14/725 ZNA	4B024
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A61K 37/02	4C084
<b>A61P 37/02 (2006.01)</b>	A61P 37/02	4H045
<b>A61P 25/00 (2006.01)</b>	A61P 25/00	
<b>A61P 43/00 (2006.01)</b>	A61P 43/00 111	
審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-152066 (P2007-152066)	(71) 出願人	593209736
(22) 出願日	平成19年6月7日(2007.6.7)		ベイラー カレッジ オブ メディシン
(62) 分割の表示	特願2000-601204 (P2000-601204) の分割		Baylor College of Medicine
原出願日	平成12年2月22日(2000.2.22)		アメリカ合衆国 テキサス州 77030
(31) 優先権主張番号	60/121, 311		ヒューストン ワン ベイラー プラザ
(32) 優先日	平成11年2月23日(1999.2.23)		(番地なし)
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075812
			弁理士 吉武 賢次
		(74) 代理人	100091487
			弁理士 中村 行孝
		(74) 代理人	100094640
			弁理士 紺野 昭男
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 T細胞レセプターVβ-Dβ-Jβ配列

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 一般的には多発性硬化症のような自己免疫疾患の治療に有用なペプチドを提供する。

【解決手段】 V<sub>13.1</sub> T細胞のサブセットのT細胞レセプターに見いだされるよう共通モチーフである「LGRAGLTYモチーフ」(アミノ酸配列LeuGlyArgAlaGlyLeuThrTyr)を含んでなるペプチド。このモチーフと同一のペプチドを用いて患者にワクチン接種し、V<sub>13.1</sub>-LGRAGLTYが関連する自己免疫疾患を治療または予防することができる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 3 のアミノ酸配列を含んでなる、8 ~ 32 アミノ酸長のペプチド。

## 【請求項 2】

配列番号 3 のアミノ酸配列からなるペプチド。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のペプチドを含んでなる、自己免疫疾患の治療剤。

## 【請求項 4】

自己免疫疾患が多発性硬化症である、請求項 3 に記載の治療剤。

## 【請求項 5】

LGRAGLT Yモチーフを発現する MBP83-99V 13.1 T細胞を有するヒトに投与される、請求項 3 または 4 に記載の治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の背景】

## 【0001】

## 1. 発明の分野

本発明は、一般的には多発性硬化症 (MS) のような自己免疫疾患の治療の分野に関する。

## 【0002】

更に詳細には、本発明は、幾人かの MS 患者で見られる T細胞レセプター配列、およびその検出法に関する。

## 【0003】

## 2. 関連技術の説明

ヒトおよび他の哺乳類において、T細胞レセプターはT細胞上に見いだされる。T細胞レセプターは および鎖を含んでなり、鎖は下記のN末端からC末端までの領域 V - D - J - C を含んでなる。T細胞レセプターは、本来 V - D - J 領域で変動する。

## 【0004】

抗原が抗原提示細胞 (APC) によってT細胞に提示されると、偶々抗原を認識した可変領域 (V - D - J など) を含むT細胞レセプターは APC 上で抗原に結合する。従って、T細胞レセプターを有するT細胞が活性化する (クローン拡張)。

## 【0005】

多くの自己免疫疾患の病因は、通常は生体によって提示される抗原に対する自己免疫T細胞応答にあると考えられている。このような疾患の一例は多発性硬化症 (MS) であり、これはミエリン抗原、特にミエリン塩基性タンパク質 (MBP) に対するT細胞応答で発生すると一般に考えられている。MBP 反応性T細胞はイン・ビボで活性化することが見いだされており、対照被験者とは異なり、MS患者の血液や脳脊髄液に一層高い前駆体頻度で存在する。これらのMBP 反応性T細胞は、Th1 サイトカイン、例えば IL - 2、TNF および - インターフェロンを産生する。これらのTh1 サイトカインは、炎症細胞の中樞神経系への移行を促進し、MSでのミエリン破壊性炎症反応を悪化させる。

## 【0006】

多くの調節機構を、MSの治療に用いることができる。一つの方法は、細胞外ドメインを有する限定された数のT細胞の1個以上を用いるワクチン接種である。Vandenbarkの米国特許第5,614,192号明細書には、T細胞レセプターの第二の相補性決定領域 (CDR2) の少なくとも一部を含んでなる15~30個のアミノ酸の免疫原性T細胞レセプターペプチドを用いる自己免疫疾患の治療が開示されている。Zhangの同時係属米国特許出願明細書 (60/099,102) には、免疫原性T細胞レセプターペプチドを免疫原性T細胞活性化マーカーペプチドと組み合わせて用いることによる自己免疫疾患の治療が開示されている。

## 【0007】

10

20

30

40

50

T細胞レセプターペプチドを用いるワクチン接種を改良することができる一つの領域は、MSのような自己免疫疾患患者のT細胞レセプターにどの共通モチーフが見いだされるかを決定することによるものである。このようなモチーフが見いだされれば、患者にモチーフと同一のペプチドをワクチン接種して治療を容易にすることができる。

【0008】

従って、自己免疫疾患の患者のT細胞レセプターに見いだされる共通モチーフのアミノ酸配列を有することが望ましい。また、PCRのような通常の方法によって患者試料中のこれらのモチーフを容易に検出することも望ましい。更に、検出されたモチーフと同一のペプチドを用いて、自己免疫疾患患者を治療することが望ましい。

【0009】

本発明は、V 13 . 1 T細胞のサブセットのT細胞レセプターに見いだされるような共通モチーフである「LGRAGLTYモチーフ」であって、アミノ酸配列Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号：3)を有するもの、並びにPCRによるその容易な検出法を開示する。このモチーフは、MBPのアミノ酸83~99(以後、「MBP83-99」)を認識する幾つかのT細胞の幾つかのT細胞レセプターに見いだされる。V 13 . 1 T細胞のこのサブセットに関するモチーフは、以後「V 13 . 1 - LGRAGLTY」と表されることがある。このモチーフと同一のペプチドを用いて患者にワクチン接種し、V 13 . 1 - LGRAGLTYが関連する自己免疫疾患を治療または予防することができる。このような自己免疫疾患には、MSがある。

【発明の概要】

【0010】

一態様では、本発明は、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的なまたはそれから誘導される配列に関する。更に好ましいものは、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

最も好ましいものは、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなる、長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

【0011】

一連の他の態様では、オリゴヌクレオチドを、V 13 . 1 - LGRAGLTY T細胞に見いだされる核酸配列の増幅または検出に用いることができる。これらの態様のサブシリーズでは、オリゴヌクレオチドをプライマーペアであって、(a)長さが約15~30ヌクレオチドであり、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる第一のプライマー、またはそれに相補的な配列、および

(b)配列(a)を含まない長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドである第二のプライマーであって、この第二のプライマー配列はT細胞レセプターT細胞におけるV 13 . 1 遺伝子(配列番号：2)のV ~ J の領域に見いだすことができるものを含んでなりまたはから誘導され、

(a)および(b)の配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られないことを特徴とする、プライマーペアに用いられる。

【0012】

好ましくは、上記第一のプライマーは、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなる、長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

【0013】

これらの態様のもう一つのサブシリーズでは、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブであって、

10

20

30

40

50

(a) 長さが約 15 ~ 30ヌクレオチドであり、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列、および

(b) 標識残基

を含んでなる、オリゴヌクレオチドプローブとして用いられる。

【0014】

好ましくは、オリゴヌクレオチドは、長さが約 15 ~ 30ヌクレオチドであり、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチド、またはそれに相補的な配列を含んでなる。最も好ましいものは、長さが約 15 ~ 30ヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列またはそれに相補的な配列を含んでなる。標識残基は、好ましくは<sup>32</sup>Pまたはジゴキシゲニンから選択される

10

【0015】

もう一つの態様では、本発明は、LGRAGLTYモチーフを発現するMBP83-99V 13.1T細胞の検出法であって、

(i) MBP83-99V 13.1T細胞から核酸試料を得て、

(ii) 核酸試料を、

(a) 長さが約 15 ~ 30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含んでなり、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる第一のプライマー、またはそれに相補的なまたはそこから誘導される配列、および

20

(b) (a)の配列を含まずかつV 13.1T細胞(配列番号：2)におけるV 13.1遺伝子のV ~ Jの領域に見いだされる長さが約 15 ~ 30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含んでなる第二のプライマー

から選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させ、

(a)および(b)の配列がV 13.1遺伝子の同一鎖上には見られず、

(iii) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出することを特徴とする、方法に関する。

【0016】

好ましくは、第一のプライマーは、長さが約 15 ~ 30ヌクレオチドであって、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、長さが約 15 ~ 30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列またはそれに相補的な配列を含んでなる。

30

【0017】

更にもう一つの態様では、本発明は、自己免疫疾患の治療法であって、

(a) ヒトからMBP83-99V 13.1T細胞を得て、

(b) 上記の方法によってLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(c) Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr(配列番号：3)ペプチドをヒトに投与することを特徴とする、方法に関する。

40

【0018】

更にもう一つの態様では、本発明は、自己免疫疾患の監視法であって、

(a) ヒトからMBP83-99V 13.1T細胞を得て、

(b) 上記の方法によってLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(c) 核酸を定量する

ことを特徴とする、方法に関する。

【0019】

図面は本明細書の一部を形成しており、本発明の幾つかの態様を更に説明する目的で包

50

含まれる。本発明は、本明細書に提示された特定の態様の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1以上を参照することによって更に良好に理解されるであろう。

【好ましい態様の説明】

【0020】

本発明の理解を助けるために、幾つかの用語を下記に定義する。

【0021】

「PCR」は、米国特許第4,683,202号明細書(1987年7月28日、Mullinsに発行)に総括的に記載されているように、ポリメラーゼ連鎖反応を意味し、上記特許請求の範囲の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される。PCRは、選択されたオリゴヌクレオチドまたはプライマーを重合剤(例えば、ポリメラーゼ)および4種類 10のヌクレオチドトリホスフェートの存在下にて核酸鋳型にハイブリダイゼーションし、伸張生成物をプライマーから形成させる増幅技術を意味する。次に、これらの生成物を変性させ、循環反応の鋳型として用い、存在する核酸の数および量を増幅し、続いて行うこれらの検出を容易にする。様々なPCR技術を利用することができ、本発明による方法と共に用いることができる。

【0022】

「プライマー」とは、鋳型分子上の特異的DNA配列に相補的なDNA合成の開始点として作用することができる天然または合成のいずれのオリゴヌクレオチドをも意味する。

【0023】

「から誘導される(複数の)プライマーまたは(複数の)プローブ」という用語に関する「から誘導される」とは、プライマーまたはプローブが上記の(複数の)ヌクレオチド配列に限定されず、上記の(複数の)配列に対する変化がV 13.1-LGRAGLTY 20Y配列、すなわちLue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr(配列番号:3)をコードするT細胞レセプターDNAの検出においてプライマーとして作用する能力を保持している程度までヌクレオチド付加、欠失、または置換などの上記の(複数の)ヌクレオチド配列における変動をも包含することを意味する。

【0024】

「免疫原性」とは、ペプチドの記載に用いるときには、ペプチドがT細胞依存性、抗体または両方の免疫応答を誘発することができることを意味する。「抗原性」とは、ペプチドを、遊離の形態で抗体によってまたは抗原特異的T細胞の場合にはMHC分子に関して 30認識することができることを意味する。

【0025】

「免疫関連疾患」とは、免疫系が疾患の病因に関与している疾患を意味する。免疫関連疾患のサブセットは、自己免疫疾患である。本発明によって考えられる自己免疫疾患としては、慢性関節リウマチ、重症筋無力症、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)、グレーヴズ病、炎症性腸疾患、自己免疫ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、およびある種の糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の開示により、当業者であれば、本発明の組成物および方法によって治療可能な自己免疫疾患を容易に理解することができる。「T細胞依存性疾患」とは、T細胞が生体に通常に見られるペプチドを認識する結果として、生体で起こされる疾患を意味する。 40

【0026】

「治療」または「治療する」とは、動物を疾患から保護することを表すときには、疾患の予防、抑制または抑圧を意味する。疾患の予防は、疾患の誘発前に動物に本発明の組成物を投与することを伴う。疾患の抑制は、疾患の誘発後であるが臨床的出現の前に動物に本発明の組成物を投与することを伴う。疾患の抑圧は、疾患の臨床的出現の後に動物に本発明の組成物を投与することを伴う。ヒト医薬では、疾患誘発の経過において本発明の組成物を投与するときを常に知ることはできないことを理解されるであろう。

【0027】

一態様では、本発明は、

(a) 配列番号:1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約 50

15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸である第一のプライマー、および

(b) (a)の配列を含まずかつV<sub>13.1</sub>T細胞におけるT細胞レセプター遺伝子のV-J領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドである第二のプライマー

の配列またはから誘導される配列を含んでなるプライマーペアであって、

(a)および(b)の配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られないことを特徴とする、プライマーペアに関する。

#### 【0028】

好ましくは、上記第一のプライマーは、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

#### 【0029】

本発明によるプライマーは、ヒトV<sub>13.1</sub>T細胞のT細胞レセプターをコードする遺伝子の断片であって、アミノ酸モチーフLue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr(配列番号：3)を含んでなる断片を増幅するようにデザインされている。LGRAGLTYモチーフを含んでなるT細胞レセプターをコードするV<sub>13.1</sub>T細胞由来の遺伝子は、登録番号AF117132でGenBankに寄託されている。LGRAGLTYモチーフを含んでなるT細胞レセプターをコードするV<sub>13.1</sub>T細胞由来の遺伝子の配列は、本明細書では配列番号：2として示す。本発明による方法では、V<sub>13.1</sub>T細胞からのT細胞レセプター遺伝子の約400bpの断片は、第一のプライマーがCDR3領域にあり、第二のプライマーがC領域にある二種類のプライマーを用いて増幅される。T細胞レセプター遺伝子のV-D-Jは、CDR3とC領域の間にある。好ましい態様では、プライマーは上記のプライマーペアである。

#### 【0030】

本発明によるプライマーは、プライマー(a)および(b)から誘導されるオリゴヌクレオチドも包含する。配列がこれらのプライマーの一方と実質的に同一の配列を有するかまたは含み、上記とほぼ同一のV<sub>13.1</sub>T細胞由来のT細胞レセプター遺伝子のV-D-J領域のCDR3またはC領域に選択的にアニールする能力を保持している場合には、この配列はプライマー(a)または(b)から誘導される。更に詳細には、このプライマーは、V<sub>13.1</sub>T細胞由来のT細胞レセプター遺伝子のV-D-J領域の同定された領域に対する選択性を保持している限り、プライマー(a)または(b)とは長さまたは配列に沿った1以上の位置における核酸の種類が異なってもよい。例えば、このプライマーは、少なくとも15ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドであってもよく、15ヌクレオチドはプライマー(a)-(b)の配列から選択されまたは誘導された一連の15個の連続した核酸と同一である。このプライマーは、プライマー(a)-(b)の配列から選択されまたは誘導された配列を有する部分を含んでなる約30ヌクレオチド以下の任意のオリゴヌクレオチドであってもよい。プライマー中のヌクレオチドの数は、プライマー合成およびPCR手続きにおける選択性を保持するのに十分な高さでありかつ効率性および操作性を保持するのに十分な低さであるべきである。プライマーは、プライマー(a)-(b)の配列の変化がV<sub>13.1</sub>-LGRAGLTYの検出においてプライマーとして作用する能力を保持している程度までヌクレオチド欠失、付加または置換などの変動を有することができる。

#### 【0031】

本発明によるV<sub>13.1</sub>-LGRAGLTY検出法は、試料中の任意のV<sub>13.1</sub>-LGRAGLTYの存在を検出する手続きにおいて、上記プライマーの対を用いる。V<sub>13.1</sub>-LGRAGLTYの存在について試験を行う試料は、核酸であり、好ましく

10

20

30

40

50

はDNAである。このDNAは、ゲノムDNA、cDNA、PCRによって予め増幅されたDNA、または任意の他の形態のDNAであることができる。試料は、T細胞レセプター鎖遺伝子を発現する任意の動物またはヒトの体組織から直接または間接的に単離することができる。好ましい体組織は、末梢血単核細胞(PBMC)である。試料がゲノムDNAである場合には、これは体組織から直接単離することができる。試料がcDNAであるときには、これは体組織から直接単離したmRNAの逆転写によって間接的に単離される。試料がPCRによって予め増幅されたDNAであるときには、これはゲノムDNA、cDNAまたは任意の他の形態のDNAの増幅によって間接的に単離される。

#### 【0032】

好ましい態様では、V<sub>13.1</sub>T細胞由来のT細胞レセプター遺伝子の一部であって、LGRAGLTYモチーフをコードする配列を含んでなる部分を増幅して、V<sub>13.1</sub>-LGRAGLTY(5'-CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC-3'(配列番号:1))の存在を検出する能力を高める。増幅は、試料中の部分を高感度で選択的および迅速に増幅するいずれか特定のPCR技術または装置を用いてPCR反応によって行うことができる。

#### 【0033】

例えば、PCR増幅は、下記の成分: 5 $\mu$ l 10 $\times$ PCR緩衝液II(100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl)、3 $\mu$ l 25mM MgCl<sub>2</sub>、1 $\mu$ l 10mM dNTP混合物、0.3 $\mu$ l Taqポリメラーゼ(5U/ $\mu$ l)(AmpliAq Gold, Perkin Elmer, ノーウォーク, コネティカット)、プライマーA 30ピコモル、およびプライマーB 30ピコモルを含む反応混合物を調製する手続きの後に行うことができる。本発明の開示を考慮すれば、当業者であれば、適当なプライマーAおよびBを選択し、V<sub>13.1</sub>T細胞由来のT細胞レセプター遺伝子の部分をPCR増幅することができるであろう。上記混合物は、試料DNA 1 $\mu$ lを増幅するのに適している。以後、増幅を行うDNAを、「鑄型」と呼ぶことができる。

#### 【0034】

試料DNAを上記反応混合物に加えたならば、PCR反応を、95 $^{\circ}$ Cで1分間(変性)、56 $^{\circ}$ Cで20秒間(アニーリング)、および72 $^{\circ}$ Cで40秒間(伸張)の全部で35サイクルの増幅プロフィールで行うことができる。

#### 【0035】

PCR反応において、鑄型を熱変性し、アニーリングして、二種類のオリゴヌクレオチドプライマーとすることができる。オリゴヌクレオチドは、増幅を行う核酸配列の領域を一括している。熱に安定なDNAポリメラーゼは、反応混合物に含まれる。ポリメラーゼは、適当な相補的ヌクレオチドを加えることによって相補的DNAにアニーリングしたプライマーを伸張する。好ましいポリメラーゼは、少なくとも95 $^{\circ}$ Cの温度で安定であるという特徴を有し、50~60の加工性(processivity)を有し、毎分50ヌクレオチドを上回る伸張速度を有する。

#### 【0036】

約40PCRサイクルが、典型的なPCR増幅反応で用いられる。しかしながら、ある種のPCR反応では、15~20サイクル程度または50サイクル程度を処理することができる。それぞれのサイクルは、鑄型を約95 $^{\circ}$ Cを上回る温度にまで加熱する溶融段階からなっている。

#### 【0037】

次に、PCR反応の温度を下げ、プライマーを鑄型にアニーリングする。このアニーリング段階では、反応温度を約55 $^{\circ}$ C~72 $^{\circ}$ Cに約20秒間調節する。特定の反応によっては、これより長または短時間処理することもできる。

#### 【0038】

次に、PCR反応の温度を上げて、ポリメラーゼによってプライマーの伸張を最大にする。この伸張段階では、反応温度を、約70 $^{\circ}$ C~75 $^{\circ}$ Cに約40秒間調節する。特定の反応によっては、これより高温または低温、および/またはこれより長または短時間処理することもできる。

## 【0039】

更に、一回目のサイクルを開始する前に、反応混合物に初期変性を約5分～15分間行うことができる。同様に、最後のサイクルを終了した後に、反応混合物に最終伸張を約5分～10分間行うこともできる。

## 【0040】

増幅は、二段階PCRを用いて行うことができる。この手法では、第一のPCR増幅反応を行って、目的とする領域より大きくかつを含んでなる第一の領域を増幅する。次に、第二のPCR増幅反応を、第一の領域を鋳型として用いて行い、目的とする領域を増幅する。第一のPCR反応からのいずれのプライマーも第二のPCR反応で用いることができるときには、第二のPCR反応は「セミ-ネステド(semi-nested)」である。第一のPCR反応からのプライマーのいずれも第二のPCR反応で用いることができないときには、第二のPCR反応は「ネステド(nested)」である。

10

## 【0041】

本発明の方法を行う好ましい方法では、V<sub>13.1</sub>-LGRAGLTYモチーフを二段階PCRによって増幅する。第一のPCR反応では、試料をT細胞レセプター遺伝子のV領域にアニーリングする第一のプライマーおよびT細胞レセプター遺伝子のC領域にアニーリングする第二のプライマーを用いて、反応混合物および上記のプロフィールを用いて増幅する。第一のPCR反応は、約600bpである第一の領域を増幅し、VからV-D-J接合を介してCへ伸張する。第二のPCR反応はネステドまたはセミ-ネステドであり、第一の領域の一部は、プライマー(a)-(b)を用いて部分増幅される。第二のPCR反応では、目的とする領域を増幅する。

20

## 【0042】

試料中のV<sub>13.1</sub>-LGRAGLTYをコードする任意のDNAを増幅した後、増幅生成物を検出する。この検出は、多数の方法によって行うことができる。例えば、増幅生成物の一部を電気泳動ゲルに装填し、これに電場をかけて、大きさによってDNA分子を分離することができる。もう一つの方法では、増幅生成物の一部を、SYBRグリーン、臭化エチジウム、またはDNAに結合して検出可能なシグナルを発する別の分子で染色したゲルに装填する。例えば、私有化エチジウムはDNAに結合し、紫外光線で照明すると可視光線を放射する。乾燥ゲルは、増幅した鋳型の配列の一部に相補的な放射能-または化学-標識オリゴヌクレオチド(以後、「オリゴヌクレオチドプローブ」と呼ぶことができる)を含み、これからゲルをフィルムに暴露することによってオートラジオグラフを行うこともできた。

30

## 【0043】

もう一つの態様では、本発明は、

- (a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約10～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および
  - (b) 標識残基
- を含んでなる、オリゴヌクレオチドプローブに関する。

## 【0044】

好ましくは、「(a)」は、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1の1、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましくは、長さが約15～30ヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。好ましくは、標識残基は、<sup>32</sup>Pまたはジゴキシゲニンから選択される。

40

## 【0045】

本発明のプライマーを用いて生成された増幅生成物の検出に有用な典型的な放射能標識したオリゴヌクレオチドを、V-D-J領域から取り出す。V<sub>13.1</sub>-LGRAGLTY領域を、上記の二段階のセミネステドPCRによって増幅し、LGRAGLTYモチーフをコードする配列に相当するプライマーを用いるときには、約10以上のヌク

50

レオチド、好ましくは約18以上のヌクレオチドを有し、増幅したV<sub>13.1-LGRAGLTY</sub>領域のいずれかの鎖の一部に相補的な任意のオリゴヌクレオチドを用いることができる。更に好ましくは、オリゴヌクレオチド5'-CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC-3' (配列番号: 1) またはそれに相補的な核酸配列が、プローブとして用いられる。

【0046】

本発明は、第一のプライマー(a)で長さが約15~30ヌクレオチドであり、配列番号: 1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドまたはそれに相補的な核酸配列を含んでなる、試験キットでもある。

【0047】

好ましい態様では、この試験キットは、第二のプライマー(b)をも含んでなり、第二のプライマーは、(a)のオリゴヌクレオチドの配列を含まず、T細胞におけるV<sub>13.1</sub>T細胞レセプター遺伝子のV~Jの領域に見いだされる長さが約15~30ヌクレオチドの核酸配列であり、

(a)および(b)の配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られない。

【0048】

更に好ましくは、上記第一のプライマーは、長さが約15~30ヌクレオチドであり、配列番号: 1の11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15~30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。最も好ましいものは、長さが約15~30ヌクレオチドであり、配列番号: 1のヌクレオチド配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な配列である。

【0049】

この態様では、試験キットは、上記のPCR技術によるV<sub>13.1-LGRAGLTY</sub>DNAの増幅に有用な少なくとも一種類の試薬をも含んでなる。このキットに配合することができる代表的試薬としては、緩衝液、デオキシヌクレオシドトリホスフェート、熱に安定なDNAポリメラーゼ、例えばTaqポリメラーゼ、正の対照に対するV<sub>13.1-LGRAGLTY</sub>DNA、および負の対照に対する非-V<sub>13.1-LGRAGLTY</sub>DNAが挙げられるが、これらに限定されない。試験キットに配合することができる他の試薬は、当業者には知られている。

【0050】

もう一つの好ましい態様では、試験キットは標識残基をも含んでなる。好ましくは、標識残基は<sup>32</sup>Pまたはジゴキシゲニンである。

【0051】

本発明は、自己免疫疾患の治療法をも含んでなる。この疾患は、少なくとも幾人かの患者については、LGRAGLTYを含んでなるT細胞レセプターがV<sub>13.1</sub>T細胞上に見いだされるものである。他の種類のT細胞、および/またはLGRAGLTYモチーフを含んでなるT細胞レセプターを欠くV<sub>13.1</sub>T細胞を患者が有することもある。

【0052】

自己免疫疾患の治療法は、

(a) ヒトからMBP83-99V<sub>13.1</sub>T細胞を得て、

(b) T細胞中にLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出されるときには、

(c) Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号: 3) ペプチドをヒトに投与することを特徴とする。

【0053】

自己免疫疾患は、LGRAGLTYモチーフを含んでなるT細胞レセプターがV<sub>13.1</sub>T細胞上に見いだされる任意の自己免疫疾患であることができる。

本発明により考えられる自己免疫疾患としては、慢性関節リウマチ、重症筋無力症、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)、グレーブズ病、炎症性腸疾患、自己免疫ブドウ膜網膜炎、多発性筋炎、およびある種の糖尿病が挙げ

10

20

30

40

50

られるが、これらに限定されない。好ましい自己免疫疾患は多発性硬化症（MS）である。

【0054】

LGRAGLTYモチーフをコードする核酸が上記の方法によって検出されるときには、自己免疫疾患はLue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr（配列番号：3）を含んでなるペプチドを投与することによって治療することができる。このペプチドは、単独で、またはT細胞活性化マーカーペプチドと組み合わせて投与することができる。好ましくは、ペプチドは、Zhangの米国特許出願明細書60/099,102の開示に準じてT細胞活性化マーカーペプチドと組み合わせて投与されるのであり、上記特許出願明細書の内容は、その開示の一部として本明細書に引用される。ペプチドを投与することにより、免疫原性応答を生じ、患者はV<sub>13.1</sub>T細胞上に見いだされるT細胞レセプターのLGRAGLTYモチーフを認識してこれに結合する抗体およびT細胞レセプターを発現することができる。

10

【0055】

V<sub>13.1</sub>-LGRAGLTYはMSに罹っている患者およびこの疾患にかかっていない正常な被験者のいずれにも存在することができるので、Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr（配列番号：3）ペプチドをMS患者および正常な被験者のいずれにも投与できると考えられる。

【0056】

もう一つの態様では、LGRAGLTYモチーフをコードする核酸が上記方法によって検出されるときには、自己免疫疾患は核酸を定量することによって監視することができる。PBMCのような試料に含まれる核酸の量が多くなれば、V<sub>13.1</sub>T細胞の数は増加し、自己免疫疾患の症状の予想される重さも大きくなる。また、増加したV<sub>13.1</sub>T細胞水準の提示および症状の出現の間の時間によっては、臨床医は症状の重さを最小限にし、および/または症状が現れる前に疾患を治療する目的で治療を行う機会を得ることができる。

20

【0057】

下記の例は、本発明の好ましい態様を例示する目的で挙げられている。当業者であれば、下記の例に開示されている技術は、発明の実施において良好に機能するように本発明者によって見いだされた技術を表し、従って、その実施の好ましい様式を構成すると考えることができることが理解されるであろう。しかしながら、当業者は、本発明の開示に関して、開示されている特定の態様に多くの変更を行うことができ、本発明の精神および範囲から離反することなく類似または同様な結果を得ることができることを理解すべきである。

30

【実施例】

【0058】

例1

T細胞レセプターV<sub>13.1</sub>-D<sub>13.1</sub>-J<sub>13.1</sub> DNA配列、および様々なMS患者から誘導されるMBP<sub>83-99</sub>特異的T細胞クローン間で共有される配列モチーフ 20CD4+独立T細胞クローンのパネルを、7名のMS患者から作成した。

40

総てのT細胞クローンは、抗原提示細胞としてDRB1\*1501をトランスフェクションしたマウス繊維芽腫細胞（L細胞）を用いて測定したHLA-DR2に関してミエリン塩基性タンパク質（MBP<sub>83-99</sub>）の83~99ペプチドを認識した。T細胞クローンを、V<sub>13.1</sub>-およびV<sub>13.1</sub>-特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる逆転写PCR（RT-PCR）におけるTCR<sub>V<sub>13.1</sub></sub>遺伝子転位について特性決定した後、V<sub>13.1</sub>-J<sub>13.1</sub>およびV<sub>13.1</sub>-D<sub>13.1</sub>-J<sub>13.1</sub>結合領域について配列決定した。結合領域の配列を、表1および2に示す。

【0059】

表1は、V<sub>13.1</sub>遺伝子ファミリーに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーのパネルを用いる逆転写PCRによりV<sub>13.1</sub>遺伝子の用法に準じて特性決定した20名の独立MBP<sub>83</sub>

50

- 99 特異的 T 細胞クローンのパネルを用いる分析の結果をまとめている（使用したユニークプライマーの配列は、それぞれのクローンに相当する DNA 配列に下線を施すことによって示す）。それぞれのクローンの「V」、「n」、「J」および「C」部分のアミノ酸配列を、下記のように表 1 に示し、「n」部分は下線を施し、「V」および「J」配列は「n」配列の両側で肉太活字で示し、「C」配列は下線を施さない通常フォントで示す。増幅した PCR 生成物をジゴキシゲニン標識 C<sub>α</sub> DNA プローブとハイブリダイゼーションした後、DNA 配列について分析した。

【0060】

表 2 は、20 名の独立 MBP 83 - 99 特異的 T 細胞クローンのパネルの分析結果をまとめている。クローンを 26 の V 遺伝子ファミリーに特異的な一組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いる逆転写 PCR によって V 遺伝子の用法について分析した（それぞれのクローンの特異的プライマーの配列は、相当する DNA 配列に下線を施すことによって示す）。それぞれのクローンの「V」、「D」、「J」および「C」部分を下記のように表 2 に示し、「D」部分は下線を施し、「V」および「J」配列は、「D」配列の両側で肉太活字で示し、残りの配列である「C」配列は通常フォントで示す（下線を施したりまたは肉太活字にしたりしない）。増幅した PCR 生成物をジゴキシゲニン標識 C<sub>α</sub> DNA プローブでハイブリダイゼーションした後、DNA 配列について分析した。

10

【0061】

【表 1】

表 1 : MBP83-99 ペプチドに特異的なTCRV $\alpha$ 遺伝子

T細胞クローン (GenBank登録 番号)	V遺伝子	DNAまたはアミノ 酸配列	V $\alpha$ - <u>n</u> -J $\alpha$ -C $\alpha$
MS7-E3.1 (AF117142)	V $\alpha$ 22	アミノ酸	YFCALSRGGS <u>NYKL</u> TFGKGTL $\Delta$ TVNPNI QN (配列番号 : 4)
		DNA	TACTTCTGTGCTCTGAGTAGGGGAGGTA <u>GCAACTATAAACTGACATTTGGAAAAGG</u> AACTCTCTTAACCGTGAATCCAAATATC CAGAAC (配列番号 : 5)
MS-7-D2.2 (AF117143)	V $\alpha$ 9	アミノ酸	YYCALKRNF <u>GNEKL</u> TFGTGTRLTIIPNIQ N (配列番号 : 6)
		DNA	TATTACTGTGCTCTAAAAAGAACTTTG GAAATGAGAAATTAACCTTTGGGACTGG AACAAGACTCACCATCATACCCAATATC CAGAAC (配列番号 : 7)
MS7-E2.6 (AF117144)	V $\alpha$ 17	アミノ酸	YFCAASPGGS <u>NYKL</u> TFGKGTL $\Delta$ TVNPNI QN (配列番号 : 8)
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAAGCCCCGGAGGT <u>AGCAACTATAAACTGACATTTGGAAAAG</u> GAACTCTCTTAACCGTGAATCCAAATAT CCAGAAC (配列番号 : 9)
MS7-C3.1 (AF117145)	V $\alpha$ 17	アミノ酸	YFCAAMGDF <u>GNEKL</u> TFGTGTRLTIIPNIQ N (配列番号 : 10)
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAATGGGGGACTTTG <u>GAAATGAGAAATTAACCTTTGGGACTGG</u> AACAAGACTCACCATCATACCCAATATC CAGAAC (配列番号 : 11)

10

20

30

40

MS27-D7.16 (AF117145)	V $\alpha$ 17	アミノ酸	YFCAAMGDFGNEKLTFGTGTRLTIIPNIQ N (配列番号 : 1 2)	10
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAATGGGGGACTTTG GAAATGAGAAATTAACCTTTGGGACTGG ACAAGACTCACCATCATAACCCAATATC CAGAAC (配列番号 : 1 3)	
MS27-F3.4 (AF117145)	V $\alpha$ 17	アミノ酸	YFCAAMGDFGNEKLTFGTGTRLTIIPNIQ N (配列番号 : 1 4)	10
		DNA	TACTTCTGTGCAGCAATGGGGGACTTTG GAAATGAGAAATTAACCTTTGGGACTGG ACAAGACTCACCATCATAACCCAATATC CAGAAC (配列番号 : 1 5)	
MS27-D4.4 (AF117146)	V $\alpha$ 22	アミノ酸	YFCALSVAGGTSYGKLTFGQGTILTVHP NIQN (配列番号 : 1 6)	20
		DNA	TACTTCTGTGCTCTGAGCGTTFGCTGGTG GTACTAGCTATGGAAAGCTGACATTTGG ACAAGGGACCATCTTGACTGTCCATCCA AATATCCAGAAC (配列番号 : 1 7)	
MS32-F5.12 (AF117147)	V $\alpha$ 16	アミノ酸	YYCLVGDVVRPGGNKLTFGTGTQLKV ELNIQN (配列番号 : 1 8)	30
		DNA	TACTACTGCCTCGTGGGTGACGCCGTG AGGCCGGGAGGAGGAAACAAACTCACC TTTGGGACAGGCACTCAGCTAAAAGTG GAACTCAATATCCAGAAC (配列番号 : 1 9)	

MS32-B9.8 (AF117147)	V $\alpha$ 16	アミノ酸	YYCLVGD <u>AVRPGGGNKLTFGTGTQLKV</u> ELNIQN (配列番号 : 20)	10
		DNA	TACTACTGCCTCGTGGGTGACGCCGTG AGGCCGGGAGGAGGAAACAAACTCACC TTTGGGACAGGCACTCAGCTAAAAGTG GAACTCAATATCCAGAAC (配列番号 : 21)	
MS37-D9.3 (AF117148)	V $\alpha$ 3	アミノ酸	YFCATDAGGTYKYIFGTGTRLKVLANIQ N (配列番号 : 22)	20
		DNA	TACTTCTGTGCTACGGACGCAGGAGGA ACCTACAAATACATCTTTGGAACAGGCA CCAGGCTGAAGGTTTTAGCAAATATCCA GAAC (配列番号 : 23)	
MS37-B9.1 (AF117149)	V $\alpha$ 16	アミノ酸	YYCLVGD <u>I</u> DDMRFGAGTRLTVKPNIQN (配列番号 : 24)	30
		DNA	TACTACTGCCTCGTGGGTGACATCGATG ACATGCGCTTTGGAGCAGGGACCAGAC TGACAGTAAAACCAAATATCCAGAAC (配列番号 : 25)	
MS9-C.26 (AF117150)	V $\alpha$ 3	アミノ酸	YFCATSVNTDKLIFGTGTRLQVFPNIQN (配列番号 : 26)	30
		DNA	TACTTCTGTGCTACATCGGTTAACACCG ACAAGCTCATCTTTGGGACTGGGACCA GATTACAAGTCTTTCCAAATATCCAGAA C (配列番号 : 27)	

【表 2】

表 2 : MBP83-99 ペプチドに特異的な TCR V $\beta$  遺伝子

T 細胞クローン (GenBank 登録 番号)	V 遺伝子	DNA またはアミノ酸配列	V $\beta$ -D-J $\beta$ -C $\beta$
MS7-E3.1 (AF117130)	V $\beta$ 9	アミノ酸	YFCASSQDRFWGGTVNTEAFFGQGTRLT VVEDLNK (配列番号 : 28)
		DNA	TATTTCTGTGCCAGCAGCCAAGATCGTT TTTGGGGGGGACGGTGAACACTGAAG CTTTCTTTGGACAAGGCACCAGACTCAC AGTTGTAGAGGACCTGAACAAG (配列 番号 : 29)
MS7-D2.2 (AF117131)	V $\beta$ 1	アミノ酸	YFCASSAMGETQYFGPGTRLLVLEDLKN (配列番号 : 30)
		DNA	TATTTCTGTGCCAGCAGCGCTATGGGAG AGACCAGTACTTCGGGCCAGGCACGC GGCTCCTGGTGCTCGAGGACCTGAAAA AC (配列番号 : 31)
MS7-E2.6 (AF117132)	V $\beta$ 13.1	アミノ酸	YFCASSLGRAGLTQEYFGPGTRLTVTE DLKN (配列番号 : 32)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGCCTAGGGCGG GCGGGACTCACCTACGAGCAGTACTTC GGGCCGGCACCAGGCTCACGGTCACA GAGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 33)
MS27-C3.1 (AF117132)	V $\beta$ 13.1	アミノ酸	YFCASSLGRAGLTQEYFGPGTRLTVTE DLKN (配列番号 : 34)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGCCTAGGGCGG GCGGGACTCACCTACGAGCAGTACTTC GGGCCGGCACCAGGCTCACGGTCACA GAGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 35)

10

20

30

40

MS27-D7.16 (AF117132)	V $\beta$ 13.1Y	アミノ酸	YCASSLGRAGLTYEQYFGPGTRLTVTED LKN (配列番号 : 36)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGCCTAGGGCGG GCGGGACTCACCTACGAGCAGTACTTC GGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA GAGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 37)
MS27-F3.4 (AF117132)	V $\beta$ 13.1	アミノ酸	YFCASSLGRAGLTYEQYFGPGTRLTVTE DLKN (配列番号 : 38)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGCCTAGGGCGG GCGGGACTCACCTACGAGCAGTACTTC GGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACA GAGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 39)
MS27-D4.4 (AF117133)	V $\beta$ 9	アミノ酸	YFCASSPVNYGYTFGSGTRLTVVEDLN K (配列番号 : 40)
		DNA	TATTTCTGTGCCAGCAGCCCGACAGTTA ACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGAC CAGGTTAACCGTTGTAGAGGACCTGAA CAAG (配列番号 : 41)
MS32-F5.12 (AF117134)	V $\beta$ 13.1	アミノ酸	YFCASSYSIRGQGNEQYFGPGTRLTVTE DLKN (配列番号 : 42)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGTTACTCGATTA GGGGACAGGGTAACGAGCAGTACTTCG GGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAG AGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 43)
MS32-B9.8 (AF117134)	V $\beta$ 13.1	アミノ酸	YFCASSIRGOGNEQYFRPGTRLTVTED LKN (配列番号 : 44)
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGTTACTCGATTA GGGGACAGGGTAACGAGCAGTACTTCC GGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAG AGGACCTGAAAAAC (配列番号 : 45)

10

20

30

40

MS37-D9.3 (AF119246)	V $\beta$ 7	アミノ酸	YLCASSQ <u>DRVAPQY</u> FGPGTRLLVLEDLKN (配列番号: 46)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGCAGCCAAGATCGG GTTGCGCCACAGTACTTCGGGCCAGGC ACGCGGCTCCTGGTGCTCGAGGACCTG AAAAAC (配列番号: 47)
MS37-B9.1 (AF117135)	V $\beta$ 17	アミノ酸	YLCASSTRQGPQ <u>ETQY</u> FGPGTRLLVLEDLKN (配列番号: 48)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGTAGTACCCGGCAAG GACCTCAAGAGACCCAGTACTTCGGGC CAGGCACGCGGCTCCTGGTGCTCGAGG ACCTGAAAAAC (配列番号: 49)
MS8-D2.7 (AF117136)	V $\beta$ 8	アミノ酸	YLCASSLGQGAYEQYFGPGTRLTVTEDLKN (配列番号: 50)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGCAGCTTAGGACAGG GGGCTTACGAGCAGTACTTCGGGCCGG GCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACC TGAAAAAC (配列番号: 51)
MS8-A2.7 (AF117136)	V $\beta$ 8	アミノ酸	YLCASSLGQGAYEQYFGPGTRLTVTEDLKN (配列番号: 52)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGCAGCTTAGGACAGG GGGCTTACGAGCAGTACTTCGGGCCGG GCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACC TGAAAAAC (配列番号: 53)
MS8-A1.15 (AF117136)	V $\beta$ 8	アミノ酸	YLCASSLGQGAYEQYFGPGTRLTVTEDLKN (配列番号: 54)
		DNA	TATCTCTGTGCCAGCAGCTTAGGACAGG GGGCTTACGAGCAGTACTTCGGGCCGG GCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGACC TGAAAAAC (配列番号: 55)

10

20

30

40

MS8-D1.3 (AF117137)	V $\beta$ 8	アミノ酸	YFCASSLQVYSPLHFGNGTRLTVTEDLN K (配列番号 : 56)	
		DNA	TACTTCTGTGCCAGCAGTTTACAAGTGT ATTCACCCCTCCACTTTGGGAACGGGAC CAGGCTCACTGTGACAGAGGACCTGAA CAAG (配列番号 : 57)	
MS33-D1.2 (AF117138)	V $\beta$ 12	アミノ酸	YFCAISESIGTGTEAFFGQGRRLTVVEDL NK (配列番号 : 58)	10
		DNA	TACTTCTGTGCCATCAGTGAGTCGATTG GTACGGGA <del>ACT</del> GAAGCTTTCTTTGGACA AGGCACCAGACTCACAGTTGTAGAGGA CCTGAACAAG (配列番号 : 59)	
MS33-D3.3 (AF117138)	V $\beta$ 12	アミノ酸	YFCAISESIGTGTEAFFGQGRRLTVVEDL NK (配列番号 : 60)	20
		DNA	TACTTCTGTGCCATCAGTGAGTCGATTG GTACGGGA <del>ACT</del> GAAGCTTTCTTTGGACA AGGCACCAGACTCACAGTTGTAGAGGA CCTGAACAAG (配列番号 : 61)	
MS33-D8.1 (AF117139)	V $\beta$ 3	アミノ酸	YLCASRDRSYEQYFGPGTRLTVTEDLKN (配列番号 : 62)	
		DNA	TACCTCTGTGCCAGCCGGGACAGGTCC TACGAGCAGTACTTCGGGCCGGGCACC AGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAA AAC (配列番号 : 63)	30
MS9-C.26 (AF117140)	V $\beta$ 12	アミノ酸	YFCAISEGSSSGNTIYFGE <del>GS</del> WLTVVEDL NK (配列番号 : 64)	
		DNA	TACTTCTGTGCCATCAGTGAGGGGTCCA GCTCTG <del>GAAAC</del> ACCATATATTTTGGAGA GGGAAGTTGGCTCACTGTTGTAGAGGA CCTGAACAAG (配列番号 : 65)	40

MS35-C7.2 (AF117141)	V $\beta$ 2	アミノ酸	FYICSAIDGYTFGSGTRLTVVEDLNK (配 列番号：66)
		DNA	TTCTACATCTGCAGTGCTATAGACGGCT ACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAA CCGTTGTAGAGGACCTGAACAAG (配列 番号：67)

10

## 【0063】

V および V 転位は個々の MBP83-99 T細胞クローンの中で変化したが、所定の被験者由来のこれらの独立 T細胞クローンの多くは、同一の V - J および V - D - J 結合領域の配列を有する同一の V および V 鎖を共有した。この知見は、以前に報告された (Vandevyver 1995, Wucherpfenning 1994) 所定の MS 患者での MBP83-99 特異的 T細胞の イン・ビボでのクローン伸張と一致する。

## 【0064】

興味深いことには、表 1 および 2 に示したように、ある患者 (MS-1) 由来の独立 T細胞クローン (クローン E2.6) は、別の患者 (MS-2) から得た 4 個の T細胞の 3 個 (クローン C3.1、D7.16 および F3.4) を有する同じ V 13.1 および V 17 を共有した。これらの T細胞クローンの V 13.1 は、V - D - J 接合領域内に同一の DNA 配列を共有した。

20

## 【0065】

## 例 2

V - D - J 特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、元の MBP83-99 T細胞クローン並びに元の MBP83-99 T細胞クローンを含む P BMC に含まれる相当する DNA 配列の検出に極めて特異的かつ高感度であった

14 個のオリゴヌクレオチドプライマーの組を独立 MBP83-99 T細胞クローンの V - D - J 結合領域内で DNA 配列に準じて合成した後、RT-PCR でのそれらの特異性について検討した。これらのオリゴヌクレオチドプライマーの DNA 配列を、表 3 に示す。

30

## 【0066】

## 【表 3】

表 3 : V $\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$  特異的オリゴヌクレオチドプライマーの DNA 配列

T 細胞クローン	DNA 配列	配列番号
MS1-E3.1	AGCAGCCAAGATCGTTTTTTGG	配列番号 : 6 8
MS1-E2.6	CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC	配列番号 : 6 9
MS2-C3.1	CTAGGGCGGGCGGGACTCACCTAC	配列番号 : 7 0
MS2-D4.4		
MS3-F5.12	TACTCGATTAGGGGACAGGGTAAC	配列番号 : 7 1
MS3-B9.8		
MS4-D9.3	CAAGATCGGGTTGCGCCA	配列番号 : 7 2
MS4-B9.1	ACCCGGCAAGGACCTCAAGAGACC	配列番号 : 7 3
MS5-D2.7	AGCTTAGGACAGGGGGCT	配列番号 : 7 4
MS5-D1.3		
MS6-D8.1	GCCAGCCGGGACAGGTCC	配列番号 : 7 5
MS6-D1.2	GAGTAGATTGGTACGGGA	配列番号 : 7 6
MS7-C.26		
MS8-C7.2	TACATCTGAAGTGCTATAGAC	配列番号 : 7 7

10

20

## 【0067】

これらの V - D - J 特異的プライマーは元の MBP83-99 T細胞クローンに含まれる DNA 配列のみに結合し、関連のない MBP83-99 T細胞クローン由来の配列には結合せず (図 2)、元の V - D - J DNA 配列に対する特異性が高いことを示唆していた。唯一の例外はクローン MS1-E2.6 およびクローン MS2-C3.1

30

## 【0068】

V - D - J オリゴヌクレオチドプライマーが特異的でありかつ PCR 検出系の感度が高いことを考慮し、5' V プライマーおよび V - D - J 特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いるこの二段階 PCR 検出系を用いて、MBP83-99 T細胞クローンが生じる末梢血単核細胞 (PBMC) 標本に含まれる相当する V - D - J DNA 配列を検出することができるかどうかを検討した。二種類の別々の実験の結果は、元の PBMC 標本における V - D - J 配列の正の検出を示した。従って、これらの知見は、V - D - J 配列が指紋として役に立つ PCR 検出系が、同一 DNA 配列の

40

## 【0069】

## 例 3

様々な MS 患者および健常被験者由来の PBMC 標本での共通の V - D - J DNA 配列の検出

次に、MBP83-99 T細胞クローンの V - D - J 結合領域に相当する DNA 配列を、MS 患者および健常被験者の群から無作為に選択した PBMC 標本で検出することができるかどうかを検討した。(第一の PCR における) 相当する V ファミリーに特異的なプライマーおよび (第二のセミ-ネステド PCR における) V - D - J 配列

50

に特異的なプライマーを用いる同じPCR増幅系を用いた。これを、相当するV-D-Jプローブを有するサザンブロット分析と組み合わせて、ハイブリダイゼーションを行った。二段階PCR検出系の特異的要件およびV-D-Jプライマーおよびプローブの特異性を考慮すれば、同一DNA配列は特異的TCRV鎖に由来し、目的とするV-D-J配列と同一または類似している。

#### 【0070】

これらの結果は、一種類のV-D-Jオリゴヌクレオチドプライマー(MS1-E2.6, V13.1-LGRAGLTY)のみが、様々なMS患者から得た48個のPBMC標本の15個(31%)において相補的TCRV13.1DNA配列を検出することを示唆した。従って、この知見は、これらのMS患者にV13.1-LGRAGLTYを発現するMBP83-99T細胞が含まれることを示唆している。同様の実験条件下で、同じプライマーは健常被験者由来の20個のPBMC標本の5個(25%)でも相当するDNA配列を検出した。残りの13個のV-D-Jプライマーは、同じパネルのPBMC標本での任意の配列シグナルの同定に失敗した。これらの結果は、三つの別々の実験で再現性を有していた。同定したDNA生成物は、V13.1を発現するT細胞由来のE2.6プライマーによって増幅したが、V13.1特異的プライマーを最初のPCRで用いて増幅したからである。

10

#### 【0071】

更に、同定したV13.1-LGRAGLTY配列を、PBMC標本がV13.1-LGRAGLTY配列を含むことが示された5名のMS患者由来の24個の短期MBP83-99T細胞系の13個(54%)でも増幅した。これらの結果から、V13.1-LGRAGLTY DNA配列がMBP83-99を認識するT細胞由来のPBMC標本で検出されることを確かめた。この知見は、V13.1-LGRAGLTY配列を発現するMBP83-99T細胞が幾人かのMS患者で見られるMBP83-99T細胞系の総てまたは大半であることも示している。

20

#### 【0072】

V-D-J配列が指紋として用いられる組合せPCR-DNAハイブリダイゼーション検出系は、同一のV-D-J結合配列を検出することによって抗原特異的T細胞のトレースに強力な手段を提供した。検出系の特異性が高くかつ高感度であることにより、末梢血T細胞中の特異的V-D-J配列が同定された。本研究は、MBPの主要抗原83-99ペプチドを認識し、同一のV-D-J配列を均一に発現するV13.1T細胞の共通のサブセットはMS患者の約30%に存在することを初めて立証した。この結論は、本明細書に記載の段階的実験に基づいてなされる。第一に、同一のDNA配列(V13.1-LGRAGLTY)が、様々なMS患者由来の独立したMBP83-99T細胞クローン中に見いだされた。第二に、様々なMS患者から得たPBMC標本のTCRV13.1から増幅したcDNA生成物で、配列を同定した。第三に、V13.1-LGRAGLTY配列を含むことが示されたPBMC標本由来の短期独立MBP83-99T細胞系で、配列を検出した。V13.1-LGRAGLTY配列を発現するMBP83-99T細胞は、幾人かのMS患者由来のMBP83-99T細胞系の総てまたは大半であると思われる。最後に、PBMC標本におけるV13.1-LGRAGLTY配列の存在は、組換えDNAクローニングおよび直接DNA配列決定によって立証された。

30

40

#### 【0073】

更に、共通のV13.1-LGRAGLTY配列を発現するMBP83-99T細胞は、健常被験者中にも存在することは、意外なことではない。これまでに報告された研究は、主要抗原83-99ペプチドを認識するT細胞などのMBP反応性T細胞は健常被験者にも存在することを示唆している(Zhang 1994, Ota 1990)。しかしながら、これらのT細胞は、健常被験者とは異なり、MS患者ではイン・ピボでの活性化およびクローン伸張を行うという機能上の差異がある(Zhang, 1994)。

#### 【0074】

50

共通の V - D - J 配列を共有するこれらの V 13 . 1 M B P 8 3 - 9 9 T 細胞は、幾人かの M S 患者で見られる M B P 8 3 - 9 9 T 細胞の有意な画分を表すことがある。この可能性は、2 回の刺激サイクルの後に M S 患者由来の短期 M B P 8 3 - 9 9 T 細胞系の 4 0 % に V 13 . 1 - L G R A G L T Y 配列が存在するという観察によって支持される。

【 0 0 7 5 】

同定した共通の V - D - J 配列を定量的 P C R 検出系で特異的マーカーとして用いて、M S 患者の大きな群の血液および脳脊髄液における M B P 8 3 - 9 9 T 細胞の共通のサブセットを検出し、イン・ピボでのクローン伸張およびこの疾患と潜在的に関連したイン・ピボ活性を観察することができる。この方法は、通常の細胞培養に基づいた分析法より優れており、M B P 反応性 T 細胞のイン・ピボでの選択および伸張は、細胞培養に固有の様々な阻害因子によって妨げられることが多いからである。これは、直接エクス・ピボ分析を用いて M B P 反応性 T 細胞を定量するときには、M B P 反応性 T 細胞の頻度が M S 患者で予想外に高いことが見いだされた細菌の研究と一致している (Hafler as last author JEM 1997)。

10

【 0 0 7 6 】

更に、T C R に相当する合成ペプチドは、M S 患者での M B P 反応性 T 細胞に対する抗イディオタイプ T 細胞を誘導することが示された (Chou et al., J.I.). 従って、共通 C D R 3 配列を含む T C R ペプチドは、抗イディオタイプ T 細胞を誘導して、M B P 8 3 - 9 9 T 細胞が共通 C D R 3 配列モチーフを有する患者の群における M B P 8 3 - 9 9 反応性 T 細胞の特異的サブセットを抑制する大きな可能性を有することがある。このような共通 C D R 3 ペプチドで免役することは、M S 患者における可能な治療手続きとしての C D R 3 ペプチドまたは個体依存性の C D R 3 ペプチドと比較して遊離である (Vandenbark 1996)。

20

【 0 0 7 7 】

本明細書に開示し、特許請求した総ての組成物および/または方法は、本発明の開示を考慮すれば、過度の実験なしに作成し、実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して説明してきたが、組成物および/または方法、および本明細書記載の方法の段階または段階の順序において本発明の概念、精神および範囲から離反することなく変更を加えることができることは当業者には明らかであろう。更に具体的には、化学的および生理学的に関連しているある種の薬剤を本明細書記載の薬剤の代わりに用いることができ、同一または類似の結果が得られることは明らかであろう。当業者に明らかなら総ての同様な置換基および改質は、特許請求の範囲によって定義される本発明の精神、範囲および概念の範囲内にあると考えられる。

30

【 0 0 7 8 】

本発明は以下の通りである。

( 1 ) 配列番号 : 1 の少なくとも 1 0 個の連続したヌクレオチドを含んでなる、長さが約 1 5 ~ 3 0 ヌクレオチドであるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸。

( 2 ) 配列番号 : 1 の少なくとも 1 5 個の連続したヌクレオチドを含んでなる、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸。

40

( 3 ) 配列番号 : 1 の配列を含んでなる、請求項 1 に記載のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸。

( 4 ) ( a ) 配列番号 : 1 の少なくとも 1 0 個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約 1 5 ~ 3 0 ヌクレオチドの第一のプライマー、またはそれに相補的な核酸、および

( b ) ( a ) の配列を含まずかつ T 細胞レセプター T 細胞における V 13 . 1 遺伝子の V ~ J の領域に見いだされる長さが約 1 5 ~ 3 0 ヌクレオチドの核酸を含んでなる第二のプライマー

を含んでなるプライマーペアであって、

上記第一および第二のプライマーの配列が T 細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られないことを特徴とする、プライマーペア。

50

(5) V 13 . 1 遺伝子配列が配列番号：2である、(4)に記載のプライマーペア。

(6) (a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約10～30ヌクレオチドのオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 標識残基を含んでなる、オリゴヌクレオチドプローブ。

(7) 標識残基が<sup>32</sup>Pまたはジゴキシゲニンから選択される、(6)に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

(8) T細胞レセプターLGRAGLTYモチーフを発現するMBP83-99V 1 10  
3 . 1 T細胞の検出法であって、

(a) MBP83-99V 13 . 1 T細胞から核酸試料を得て、

(b) 核酸試料を、

(i) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(ii) 第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプターT細胞におけるV 13 . 1 遺伝子のV ~ J の領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチド

から選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させ、

第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られず、

(c) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出することを特徴とする、方法。

(9) V 13 . 1 遺伝子が配列番号：2である、(8)に記載の方法。

(10) 核酸試料の断片をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅する、(8)に記載の方法。

(11) 検出段階が、

(a) 配列番号：1の配列を含んでなるオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 標識残基

を含んでなるオリゴヌクレオチドプローブを用いてプロービングすることを含んでなる、(10)に記載の方法。

(12) 検出段階が、オートラジオグラフィーを含んでなる、(10)に記載の方法。

(13) 長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチドであって、配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる上記第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸を含んでなる試験キット。

(14) 上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まず、T細胞レセプターT細胞のV 13 . 1 遺伝子のV ~ J の領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチドをも含んでなり、第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列がT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見られない、(13)に記載の試験キット。

(15) V 13 . 1 遺伝子配列が配列番号：2である、(14)に記載の試験キット。

(16) 標識残基をも含んでなり、標識残基が<sup>32</sup>Pまたはジゴキシゲニンから選択される、(13)に記載の試験キット。

(17) ヒトの自己免疫疾患の治療法であって、

(a) ヒトからMBP83-99V 13 . 1 T細胞を得て、

(b) MBP83-99V 13 . 1 T細胞から核酸試料を得て、

(c) 核酸試料を、

(i) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる、長

20

30

40

50

さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、および

(iii) 上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプターT細胞のV<sub>13.1</sub>遺伝子のV～Jの領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチド

から選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させ、

(d) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(e) Lue Gly Arg Ala Gly Leu Thr Tyr (配列番号：3) ペプチドをヒトに投与することを特徴とする、方法。

(18) V<sub>13.1</sub>遺伝子配列が配列番号：2である、(17)に記載の方法。 10

(19) 投与段階が、T細胞活性化マーカーペプチドの投与も含んでなる、(17)に記載の方法。

(20) 自己免疫疾患の監視法であって、

(A) ヒトからMBP83-99V<sub>13.1</sub>T細胞を得て、

(B)(i) MBP83-99V<sub>13.1</sub>T細胞から核酸試料を得て、

(ii) 核酸試料を、

(a) 配列番号：1の少なくとも10個の連続したヌクレオチドを含んでなる長さが約15～30ヌクレオチドの第一のオリゴヌクレオチド、またはそれに相補的な核酸、および

(b) 上記第一のオリゴヌクレオチドの配列を含まずかつT細胞レセプターT細胞のV<sub>13.1</sub>遺伝子のV～Jの領域に見いだされる長さが約15～30ヌクレオチドの第二のオリゴヌクレオチドであって、 20

上記第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列はT細胞レセプター遺伝子の同一鎖上には見いだされないもの

から選択されまたは誘導されるプライマーペアと接触させることによってLGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、

(c) LGRAGLTYモチーフをコードする核酸の存在を検出し、核酸が検出される場合には、

(C) 核酸の量を定量する

ことを特徴とする、方法。 30

(21) V<sub>13.1</sub>遺伝子配列が配列番号：2である、(20)に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】PBM由来のPCR生成物のクローニングおよび配列決定の実験手続き。PBM標本由来のcDNAを5'V<sub>13.1</sub>プライマーによって増幅し、LGRAGLTYモチーフの発現について陽性の四種類のPBM標本由来の3'JプライマーをTAKクローニングベクターpCR2.1に連結し、E. coliに形質転換した。プラスミドDNAを、M13プライマーおよびLGRAGLTY特異的プライマーを用いるPCRによってスクリーニングした。PCRによって視認し得る増幅を示した陽性プラスミドを、V<sub>13.1</sub>プライマーを用いてV<sub>D</sub>J配列について配列決定した。 40

【図2】単一のアラニン置換を有する類似ペプチドに対する二種類のMBP83-99T細胞の反応性パターン。同一のV<sub>13.1</sub>転位(MS7-E2.6およびMS27-C3.1について)および類似のV-J結合配列(MS7-E2.6およびMS27-C3.1について)を示した2対のMBP83-99T細胞クローンを、[<sup>3</sup>H]-チミン組込み分析法におけるアラニン置換ペプチドのパネルに対する反応性について検討した。DRB1\*1501を発現するマウス繊維芽腫細胞系を、抗原提示細胞の供給源として用いた。それぞれの類似体ペプチドに対するクローンの増殖応答を72時間後に測定し、結果を組込まれたCPMとして示す。隈取りしたボックスは、類似体ペプチドに応答してT細胞クローンの増殖が>50%減少したことを表している。

【図3】元のおよび関連のないT細胞クローンをを用いるCDR3オリゴヌクレオチドの特 50

異性の交差検討。TCR VDJ領域に特異的なオリゴヌクレオチドの組を、元のMBP 83-99 T細胞クローン並びに同一および異なる被験者由来の関連のないMBP 83-99 T細胞クローンに含まれる既知の標的DNA配列の検出における特異性について検討した。CDR3に特異的なオリゴヌクレオチドを前進プライマーとして3'-Cプライマーを復帰プライマーとして用いてPCR反応を行った。無地ボックスは、元のT細胞クローンまたは同一のCDR3配列を共有する(複数の)T細胞クローンに含まれるDNA配列の陽性検出を表す。総てのプライマーを、関連のないCDR3配列(無地ボックス)を有する無作為に選択されたT細胞クローンのDNA生成物へのそれらの結合についても検討した。

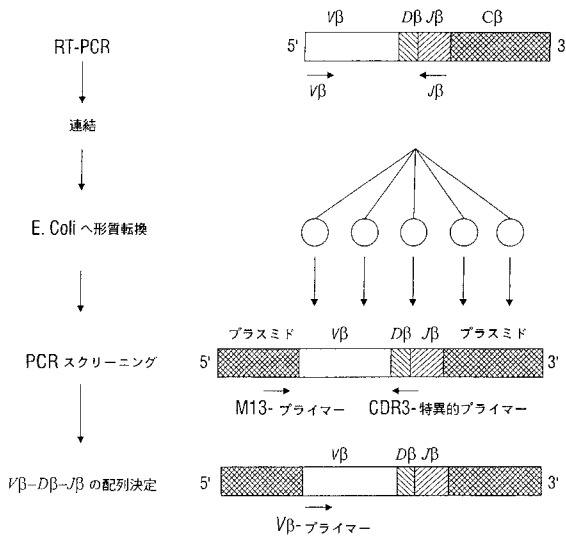
【図4】MS患者由来の無作為に選択したPBMC標本におけるモチーフV 13.1-LGRAGLTYに相補的な標的DNA配列の検出。無作為に選択したMS患者(n=48)からのPBMC標本から調製したcDNAを、5'-V 13.1特異的プライマーおよび3'-Cプライマーを用いてRT-PCRで最初に増幅した。次に、増幅したPCR生成物を、LGRAGLTYモチーフに特異的なジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーションした。元のMBP 83-99クローン(MS7-E2.6)および関連のないT細胞クローン(MS32-B9.8)を、それぞれ正および負の対照として用いた。MS-7およびMS-27は元のPBMC標本であり、これらからクローンMS7-E2.6(表1のMS-7)およびクローンMS27-C3.1(表1のMS-27)を誘導した。星印は、DRB1\*1501の正の発現を示す。

【図5】正常被験者由来の無作為に選択したPBMC標本におけるV 13.1-LGRAGLTYモチーフの検出。20名の正常被験者(NS)から得たPBMC標本を、図4の凡例に記載されているのと同条件で分析した。元のクローン(MS7-E2.6)および関連のないT細胞クローン(MS32-B9.8)を、それぞれ正および負の対照として用いた。星印は、DRB1\*1501の正の発現を示す。

【図6】MS患者および正常被験者由来のPBMC標本におけるLGRAGLTYモチーフの発現の半定量的比較。モチーフV 13.1-LGRAGLTYの発現を、MSおよび正常被験者のPBMC由来のそれぞれのcDNAにおけるC発現に関して半定量的PCRによって分析した。相対発現レベルを、(LGRAGLTYモチーフ/Cの発現)×100%として計算した。

【図7】MS患者由来の短期MBP 83-99 T細胞系におけるV 13.1-LGRAGLTYモチーフの検出。独立した短期MBP 83-99 T細胞系のパネルを、MBPの合成83~99ペプチドを用いて5名のMS患者から生成させた。これら総てのT細胞系を、MBP 83-99ペプチドに対するそれらの特異的反応性を確かめた(MBP 83-99に対するCPM/対照CPM>5)。cDNA生成物を、PCRにおいて5'-V 13.1特異的プライマーおよび3'-Cプライマーを用いて増幅した。次に、増幅したPCR生成物を、サザンプロット分析でV 13.1-LGRAGLTYモチーフに相当するジゴキシゲニン標識オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーションした。元のMBP 83-99クローン(MS7-E2.6)および関連のないT細胞クローン(MS32-B9.8)由来のcDNA生成物を、それぞれ正および負の対照として用いた。

【 図 1 】

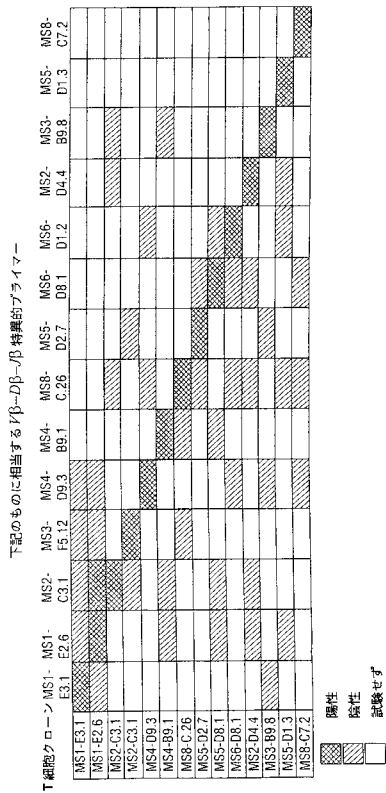


【 図 2 】

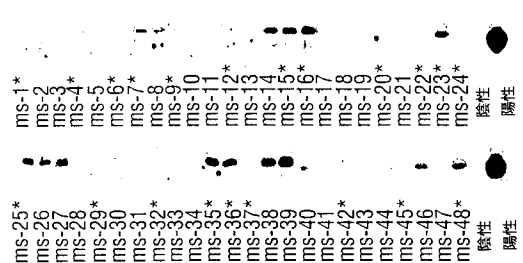
フラニン置換ペプチド	T細胞の反応性 (CPM±SD)			
	MS1-E2.6	MS1-C3.1	MS1-E3.1	
83-ENPVWHFKNIVPRTP-99	74,189 ± 6,224	28,966 ± 1,100	31,236 ± 3,099	
A-----	59,328 ± 2,583	42,446 ± 676	38,880 ± 1,483	
--A-----	68,881 ± 3,155	33,165 ± 1,883	31,243 ± 1,036	
---A-----	64,901 ± 377	27,079 ± 3,085	24,487 ± 731	
----A-----	65,519 ± 588	21,340 ± 1,288	34,289 ± 357	
-----A-	65,205 ± 241	35,032 ± 5,649	34,080 ± 2,274	
-----A-	74,224 ± 526	16,199 ± 412	35,242 ± 300	
-----A-	67,916 ± 1,979	34,437 ± 88	16,853 ± 690	
-----A-	2,504 ± 519	907 ± 10	334 ± 38	
-----A-	51,052 ± 4,329	26,400 ± 3,969	12,577 ± 610	
-----A-	1,787 ± 120	3,364 ± 275	1,658 ± 78	
-----A-	69,699 ± 3,649	7,649 ± 337	16,596 ± 440	
-----A-	1,710 ± 34	35,340 ± 476	42,982 ± 1,605	
-----A-	48,169 ± 1,418	32,109 ± 570	21,977 ± 1,354	
-----A-	70,946 ± 1,326	23,662 ± 529	10,237 ± 22	
-----A-	2,389 ± 473	21,401 ± 432	2,424 ± 126	
-----A-	1,859 ± 110	32,085 ± 257	36,930 ± 623	
-----A-	1,569 ± 32	31,506 ± 351	34,389 ± 457	
-----A-	1,763 ± 132	999 ± 57	715 ± 53	

培地のみ

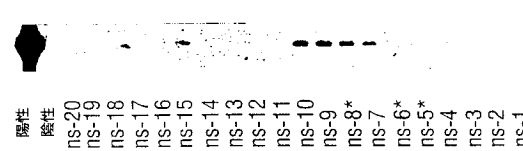
【 図 3 】



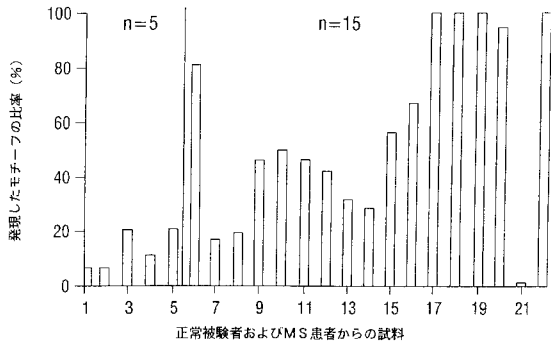
【 図 4 】



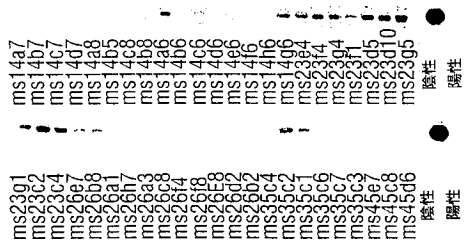
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

[2007308502000001.app](#)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	1 0 1
<b>A 6 1 P 19/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 19/02	
<b>A 6 1 P 21/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 21/04	
<b>A 6 1 P 5/14 (2006.01)</b>	A 6 1 P 5/14	
<b>A 6 1 P 1/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/04	
<b>A 6 1 P 27/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 27/02	
<b>A 6 1 P 21/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 21/00	
<b>A 6 1 P 3/10 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/10	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 ジングウ、ゼッド・ツァン

アメリカ合衆国テキサス州、ミズリーシティー、パークビュー、レイン、2 2 1 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA09 DA06 HA14

4C084 AA02 BA02 BA08 BA17 BA18 BA19 BA23 CA25 DC50 NA14

ZA012 ZA332 ZA682 ZA942 ZA962 ZB072 ZB152 ZC022 ZC062 ZC352

4H045 AA10 AA30 BA10 BA15 CA40 DA50 EA22 EA50 FA20 FA71

专利名称(译)	T细胞受体Vβ-Dβ-Jβ序列		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007308502A</a>	公开(公告)日	2007-11-29
申请号	JP2007152066	申请日	2007-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	贝勒医学院		
申请(专利权)人(译)	Medisuin的贝勒医学院		
[标]发明人	ジングウゼッドツアン		
发明人	ジングウ、ゼッド.ツアン		
IPC分类号	C07K14/725 A61K38/00 A61P37/02 A61P25/00 A61P43/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P5/14 A61P1/04 A61P27/02 A61P21/00 A61P3/10 C12N15/09 G01N33/53 A61K38/08 A61P9/10 A61P37/00 A61P37/06 C07H21/02 C07H21/04 C12N15/00 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P9/10 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C07K14/725.ZNA A61K37/02 A61P37/02 A61P25/00 A61P43/00.111 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P21/04 A61P5/14 A61P1/04 A61P27/02 A61P21/00 A61P3/10 C12N15/00.A A61K38/00 A61K38/02 A61K38/03 A61K38/08 A61K38/10 A61K38/16 C12N15/09.P C12N15/09.Z C12Q1/6883.C C12Q1/6883.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/HA14 4C084/AA02 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/CA25 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA332 4C084/ZA682 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB152 4C084/ZC022 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA71		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	60/121311 1999-02-23 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通常可用于治疗自身免疫性疾病（例如多发性硬化症）的肽。包含“LGRAGLTY基序”（氨基酸序列 LeuGlyArgAlaGlyLeuThrTyr）的肽，该基序是在Vβ13.1T细胞子集的T细胞受体中发现的常见基序。与该基序相同的肽可用于给患者接种疫苗以治疗或预防与Vβ13.1-LGRAGLTY相关的自身免疫性疾病。[选择图]无

T 細胞クローン ( GenBank 登録番号)	V 遺伝子	DNA または アミノ酸配列	V α - n - J α - C α
MS7-E3.1 (AF117142)	V α 22	アミノ酸 DNA	YFCALSRGGSNYKLTFGKGFLLTVNPNIQN (配列番号: 4) TACTTCTGTGCTCTGAGTAGGGGAGGTAQCAACTATAAACTGACATTTGGAAAAGGAACTCTTTAACCGTGAATCCAATATCCAGAAC (配列番号: 5)
MS-7-D2.2 (AF117143)	V α 9	アミノ酸 DNA	YYCALKRNEGNEKLTFTGTGTRLTHTPNIQN (配列番号: 6) TATTACTGTGCTCTAAAAAGAACTTTGGAAATGAGAAAATTAACCTTTGGGACTGGAACAAAGACTCACCATCATACCAATATCCAGAAC (配列番号: 7)
MS7-E2.6 (AF117144)	V α 17	アミノ酸 DNA	YFCAASPGGSNYKLTFGKGFLLTVNPNIQN (配列番号: 8) TACTTCTGTGCGCAGCAAGCCCGGAGGTAGCAACTATAAACTGACATTTGGAAAAGGAACTCTTTAACCGTGAATCCAATATCCAGAAC (配列番号: 9)
MS7-C3.1 (AF117145)	V α 17	アミノ酸 DNA	YFCAAMGDFGNEKLTFTGTGTRLTHTPNIQN (配列番号: 10) TACTTCTGTGCGCAATGGGGGACTTTGGAAATGAGAAAATTAACCTTTGGGACTGGAACAAAGACTCACCATCATACCAATATCCAGAAC (配列番号: 11)