

(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2013-163673

(P2013-163673A)

(43) 公開日 平成25年8月22日(2013.8.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 2 4
C07K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 8 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 103 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-24857 (P2013-24857)	(71) 出願人	508043844
(22) 出願日	平成25年2月12日 (2013.2.12)		マトシアン - ロジャーズ、アルビ
(62) 分割の表示	特願2008-525635 (P2008-525635) の分割		イギリス国、ロンドン、フィンチレイ ロード 376
原出願日	平成18年8月9日 (2006.8.9)	(74) 代理人	110000855
(31) 優先権主張番号	0516527.9		特許業務法人浅村特許事務所
(32) 優先日	平成17年8月11日 (2005.8.11)	(72) 発明者	マトシアン - ロジャーズ、アルビ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス国、ロンドン、フィンチレイ ロード 376
(31) 優先権主張番号	0609920.4	F ターム (参考)	4B024 AA01 AA11 BA43 BA53 CA04
(32) 優先日	平成18年5月18日 (2006.5.18)		CA12 DA06 EA04
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA01
(31) 優先権主張番号	0609921.2		DA13
(32) 優先日	平成18年5月18日 (2006.5.18)		4C084 AA07 BA02 NA14 ZB08 ZB09
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫疾患の治療及び診断のためのTCR-Vベータ関連ペプチド

(57) 【要約】

【課題】 GPI 連結エピトープと反応性である自己抗体の体内における不適切な存在により引き起こされる疾患の治療及び診断において使用することができるペプチド、及び、生体を危険にさらして疾患を引き起こすこれらの自己抗体の作用機構並びに疾患の予防及び自己抗体の検出の方法を提供する。

【解決手段】 GPI 連結エピトープに対する反応性を有する抗体に由来するペプチド及び機能的に等価なりガンドを提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

G P I 連結エピトープに対する反応性を有する抗体に由来するペプチド又は機能的に等価なりガンド。

【請求項 2】

前記抗体は、抗 T C R V 抗体、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、又はカルジオリピン（ジアシルグリセロール）等のリン脂質、リン脂質グリカン、一本鎖 D N A、及び二本鎖 D N A から成る群から選択されるエピトープに対する反応性をさらに有する、請求項 1 に記載のペプチド又は機能的に等価なりガンド。

【請求項 3】

前記抗体は、ヒト脾臓細胞、甲状腺の濾胞細胞、副腎髄質、胃及び腸管、唾液腺、卵巣、横紋筋、結合組織の細胞に対する反応性をさらに有する、請求項 2 に記載のペプチド又は機能的に等価なりガンド。

【請求項 4】

F a b、F (a b ') 2、F v、又は s c F v の断片である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のペプチド又は機能的に等価なりガンド。

【請求項 5】

前記抗体の超可変領域に由来する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のペプチド又は機能的に等価なりガンド。

【請求項 6】

次のものから選択されるアミノ酸配列を含む又はから成るペプチド

【化 1】

G-Y-x-F-T-x-x-x-x-x-W (配列番号:162)

x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x (配列番号:163)

x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x (配列番号:164)

x-x-S-x-x-x-S (配列番号:165)

Q-Q-x-x-x-x-P-x-x (配列番号:166)

G-Y-T-F-T-x-x-x-x-x-W (配列番号:167)

G-Y-x-F-x-x-Y-x-M-x-W (配列番号:168)

x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x (配列番号:169)

x-I-x-P-x-x-x-x-T-x-Y-x-x-K-F-x-G (配列番号:170)

x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x (配列番号:171)

x-A-S-x-x-x-x-x-x-L-x (配列番号:172)

x-x-S-x-x-x-S (配列番号:173)

x-T-S-x-L-x-x (配列番号:174)

Q-Q-x-x-S-x-P-x-T (配列番号:175) 及び

Q-Q-x-N-x-x-P-x-x (配列番号:176)

(ただし、「x」は任意のアミノ酸残基を示し、「-」はペプチド結合を示し、ペプチドは、N末端からC末端の向きで示される)。

【請求項 7】

次のものから選択されるアミノ酸配列を含む又はから成るペプチド

10

20

30

40

【化 2】

G-Y-[TA]-F-T-[RNS]-[YN]-[WGN]-[IM]-[NF]-W
 [NWX]-I-[YND]-[PT]-[SY]-[DNT]-[SG]-[YDE]-[TP]-[NRT]-Y-[NSA]-
 [QD]-[KD]-F-K-[DG]
 [LKE]-[RG]-[GML]-[LTY]-[LTG]-[PGN]-[DY]-[YAF]
 [KR]-A-S-[QS]-[NDS]-[VI]-[DSG]-[TNS]-[NY]-[VLY]-[ANL]
 [SYR]-[AT]-S-[YRI]-[RL]-[YHA]-S
 Q-Q-[YG]-[NS]-[TS]-[YFS]-P-[LTP]-[TF]
 G-Y-T-F-T-[RNYSTDEG]-[NYF]-[WGAY]-[IMV]-[NGQH]-W
 G-Y-[ATS]-F-[T/S]-[SDG]-Y-[NWV]-M-[FQHN]-W
 [NWEAY]-I-[YND]-[PT]-[SYG]-[DTGY]-[SGD]-[YEGS]-[TP]-[NTYGS]-
 Y-[NAI]-[QDE]-[KD]-F-K-[DGN]
 [YWKNLRL]-I-[DN]-P-[YAEFS]-[NYS]-[GD]-[DSG]-T-[RESKN]-Y-[SAN]-
 [QSEP]-K-F-[KQT]-G
 [KR]-A-S-[QS]-[NSDT]-[VI]-[DGSR]-[TSYNK]-[NADY]-[VYGL]-[ALD]
 [RK]-A-S-[QR]-[DSG]-[IV]-[SN]-[NSG]-[YW]-L-[NHA]
 [SRW]-[AT]-S-[YIT]-[RL]-[YAE]-S
 [YLDTK]-T-S-[RNKV]-L-[HAG]-[SP]
 Q-Q-[YGWR]-[NSAG]-S-[YSDW]-P-[LPYI]-T 及び
 Q-Q-[GNSTY]-N-[TES]-[FDWY]-P-[TYRF]-[FT]

10

20

(ただし、括弧中に示されるアミノ酸のうちの1つは各位置で関連する場合に選択され、ペプチドは、N末端からC末端の向きで示される)。

【請求項 8】

次のものから選択されるアミノ酸配列を含む又はから成るペプチド

【化 3】

G-Y-T-F-T-R-[YN]-W-[IM]-N-W
 N-I-Y-P-[SY]-D-[SG]-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-[DG]
 L-[RG]-G-L-L-P-[DY]-Y
 K-A-S-Q-N-V-[DSG]-T-N-V-A
 S-A-S-Y-R-Y-S
 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T
 G-Y-T-F-T-[RNS]-Y-W-[IM]-N-W
 G-Y-T-F-T-S-Y-W-M-H-W
 N-I-Y-P-S-D-S-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-G
 [YW]-I-N-P-Y-N-G-D-T-[ES]-Y-N-Q-K-F-K-G
 K-A-S-Q-N-V-S-T-N-V-A
 R-A-S-Q-S-I-S-N-Y-L-[NA]
 S-A-S-Y-R-Y-S
 Y-T-S-N-L-A-S
 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T 及び
 Q-Q-N-N-E-D-P-[YR]-T

30

40

(ただし、括弧中に示されるアミノ酸のうちの1つは各位置で関連する場合に選択され、

50

ペプチドは、N末端からC末端の向きで示される)。

【請求項 9】

配列番号 6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、又は96の任意の1つに記載されるアミノ酸配列を含み、好ましくは配列番号 8、10、又は16の任意の1つに記載されるアミノ酸配列を含むペプチド。

【請求項 10】

配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、若しくは96の任意の1つに記載されるアミノ酸配列又はその機能的等価物若しくは断片を含む又はから成る請求項 9に記載のペプチド。

10

【請求項 11】

連結された、請求項 1～10のいずれか一項に記載の2つ以上のペプチドを含むペプチド。

【請求項 12】

連結された、配列番号 8、配列番号 10、又は配列番号 16に記載されるアミノ酸配列を含む2つ以上のペプチドを含む、請求項 11に記載のペプチド。

20

【請求項 13】

単量体ペプチドのホモ二量体であり、単量体ペプチドは、配列番号 159、配列番号 160、又は配列番号 161に記載されるアミノ酸配列から成る、請求項 12に記載のペプチド。

【請求項 14】

化学的に修飾された、生物学的物質若しくは合成物質に結合した、又は酵素、指標化合物、薬物、毒素、若しくは放射性標識に抱合された、請求項 1～13のいずれか一項に記載のペプチド又は機能的に等価なりガンド。

【請求項 15】

請求項 1～14のいずれか一項に記載のペプチド又は機能的に等価なりガンドを含む抗体又は抗体断片。

30

【請求項 16】

配列番号 6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び96に記載される1、2、3、4、5、又は6つの配列を含む、請求項 15に記載の抗体又は抗体断片。

【請求項 17】

請求項 1～14のいずれか一項に記載のペプチドに対する反応性を示す抗体又は機能的に等価なりガンド。

【請求項 18】

請求項 1～14のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 15若しくは16に記載の抗体若しくは抗体断片、又は請求項 17に記載の抗体若しくは機能的に等価なりガンド、をコードする核酸分子。

40

【請求項 19】

請求項 17に記載の核酸分子を取り込んだベクター。

【請求項 20】

請求項 17に記載の核酸分子又は請求項 19に記載のベクターを取り込んだ宿主細胞。

【請求項 21】

請求項 1～14のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 15又は16に記載の抗体又は抗体断片、請求項 17に記載の抗体又は等価なりガンドを発現させる方法であって、請

50

求項 18 に記載の核酸分子又は宿主細胞における請求項 19 に記載のベクターを発現させることを含む方法。

【請求項 22】

患者における疾患を治療する方法であって、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 15 若しくは 16 に記載の抗体若しくは抗体断片、又は請求項 17 に記載の抗体若しくは等価なリガンド、請求項 18 に記載の核酸分子、請求項 19 に記載のベクター、或いは請求項 20 に記載の宿主細胞を患者に投与することを含む方法。

【請求項 23】

疾患の療法又は診断における使用のための、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 15 若しくは 16 に記載の抗体若しくは抗体断片、請求項 17 に記載の抗体若しくは等価なリガンド、請求項 18 に記載の核酸分子、請求項 19 に記載のベクター、又は請求項 20 に記載の宿主細胞。

10

【請求項 24】

前記疾患は、GPI 連結エpiteopに対する反応性を有する自己抗体の存在により特徴づけられ、抗 TCR V 抗体、シグナリング能力を有する分子、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、及びカルジオリピン（ジアシルグリセロール）を含むリン脂質、リン脂質グリカン、インスリン作用のセカンドメッセンジャー、一本鎖 DNA 及び二本鎖 DNA、並びに GPI 連結の要素、におけるエpiteop に対して反応性でもある、請求項 22 又は 23 に記載の方法又は使用。

【請求項 25】

前記疾患は、IDDM、NIDDM、器官特異的若しくは非器官特異的自己免疫疾患、心血管疾患、癌性悪液質及び癌、又は抗リン脂質抗体及び/若しくは高インスリン血症及び/若しくは高グルカゴン血症及び/若しくはインスリン抵抗性及び/若しくはグルコース不耐性が存在する他の疾患から成る群から選択される、請求項 22 又は 23 に記載の方法又は使用。

20

【請求項 26】

抗リン脂質抗体及び/又は高インスリン血症、インスリン抵抗性、並びにグルコース不耐性が存在する前記他の疾患は、乾癬、湿疹、白斑、黒色表皮腫、皮膚老化、円形脱毛症、アルツハイマー病、統合失調症、うつ病、パーキンソン病、片頭痛、多発性硬化症、重症筋無力症、筋萎縮性側索硬化症及び関連疾患、運動性ニューロン及び関連疾患、甲状腺疾患、クッシング症候群及びアジソン病、多嚢胞性卵巣症候群、性腺機能低下症及び男性における早発性禿頭症、肥満、X 症候群、抗リン脂質抗体及びループス抗凝固因子抗体に関連する疾患、セリアック病、胃炎、炎症性腸疾患、関節炎及び関連疾患、喘息、嚢胞性線維症、骨粗鬆症及び骨減少症、扁平苔癬及び白板症、貧血、発作性夜間血色素尿症、睡眠時無呼吸、不眠、癌、HIV、感染、並びに免疫調節における機能不全から成る群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

30

【請求項 27】

前記疾患は、グルコース不耐性に関連する疾患又は自己血糖調節の低下若しくは悪化に関連する疾患である、請求項 22 又は 23 に記載の方法又は使用。

【請求項 28】

薬学的に許容し得る担体と共に、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のペプチド、請求項 15 若しくは 16 に記載の抗体若しくは抗体断片、請求項 17 に記載の抗体若しくは等価なリガンド、請求項 18 に記載の核酸分子、請求項 19 に記載のベクター、又は請求項 20 に記載の宿主細胞を含む医薬組成物。

40

【請求項 29】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のペプチドを含むワクチン組成物。

【請求項 30】

アジュバントを含む請求項 29 に記載のワクチン組成物。

【請求項 31】

疾患又は障害に対して個体にワクチン接種する方法であって、個体に請求項 1 ~ 14 の

50

いずれか一項に記載のペプチド又は請求項 29 若しくは 30 のいずれか一項に記載のワクチン組成物を個体に投与することを含む方法。

【請求項 32】

ペプチドに対する抗体は個体中で形成される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

自己免疫抗体の存在又はレベルについて個体を診断する方法であって、血液試料、血漿試料、若しくは血清試料、又は他の体液を、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のペプチドと、前記自己免疫抗体に対する標的の存在下で接触させること、及び特異的に標的に結合する前記自然発生の自己抗体の量を評価することを含む方法。

【請求項 34】

前記標的は、T 細胞受容体 V 鎖上の少なくとも 1 つのエピトープを同定する抗 TCR V ポリクローナル免疫グロブリン分子若しくは抗 TCR V モノクローナル免疫グロブリン分子又はその任意の一部である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記ペプチド、抗体、及び / 又は標的は標識される、請求項 33 又は 34 に記載の方法。

【請求項 36】

少なくとも 1 つは請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のペプチドであるペプチドのアレイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、GPI 連結エピトープに対する反応性を有する抗体に由来するペプチド及び機能的に等価なリガンドを提供する。これらのペプチドは、様々な疾患の療法及び診断において使用することができ、これら疾患はすべて、GPI 連結エピトープと反応性である自己抗体の体内における不適切な存在により引き起こされると考えられる。本発明は、さらに、生体を危険にさらして疾患を引き起こすこれらの自己抗体の作用機構を記載し、且つ疾患の予防及び上記自己抗体の検出の方法を記載する。

【0002】

本明細書中に援用される刊行物、特許、及び特許出願はすべて、参照により全体が援用される。

【背景技術】

【0003】

本発明は、自己免疫疾患及び自己免疫であると現在考えられていない他の疾患の原因に関する新しい概念に関する。この概念は、国際特許出願 WO 99 / 05175 に初めに記載され、特異的な反応性を有する自然発生の自己抗体の発生が糖尿病等の様々な自己免疫疾患に関連づけられた。その概念は、感染性若しくは非感染性の起源の、遺伝的素因を有する若しくは有していないほとんどの疾患又は老化過程と関連する状態が多特異性自己抗体の発生により顕性になる又は悪化するというものである。母集団のうちの多くがこの自己抗体を産生し、この自己抗体は、インスリン及び / 若しくは GPI 連結型分子、自己抗体により認識された他の調節分子、並びにリン脂質により制御される又はこれらに影響を与える血中グルコースレベル、インスリンレベル、他のホルモンレベルにより影響を与えるすべての組織並びに器官を危険にさらす。これらの自己抗体は、老化関連疾患及び年齢関連疾患を速め、癌を促進し、遺伝的素因に基づくにせよ基づかないにせよ疾患の顕性を媒介し、且つ感染作用物質に対する第一線の防御を妨害する可能性を有している。すなわち、個々の感受性に依存して、1 つ又は複数の問題の状態又は疾患につながる自己抗体の生産となる根底にある病原性の問題がある。類似するものとしては、任意の所定の医薬品に対するものであろう。1 つ又は複数の副作用がある可能性があり、その医薬品の非存在下では副作用は存在しないであろう。したがって、これらの抗体は、同一の機構を

10

20

30

40

50

介して顕性化された多数の異なる障害の原因となると考えられる。

【0004】

病原性自己抗体は、抗TCR V 抗体、シグナリング能力を有する分子、ホスファチジルイノシトールを含むリン脂質、インスリン作用についてのセカンドメッセンジャー、一本鎖DNA及び二本鎖DNA、並びにGPI連結の要素を認識するモノクローナル抗体により代表される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

ある種の療法が、本明細書中に述べられる疾患及び状態のために存在しているが、これらの疾患のほとんどが問題で残っており、罹患及び死亡の重要な原因となっている。したがって、これらの状態の予防、治療、及び診断に有効である導き出されるべき新規な療法に対する多大な必要性が残っている。もちろん、本明細書中に述べられる種類の種々様々な疾患を考慮し、これらのすべての疾患に有効となるであろう単一の療法を導き出すことが可能になれば多大な利益となるであろう。

【0006】

出願人は、ペプチド中和抗体と称するある種のペプチド又は抗体が、種々様々な疾患及び状態の予防、療法、及び診断において使用されてもよいことをここで確立した。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明によれば、GPI連結エピトープに対する反応性を有する抗体に由来するペプチド又は機能的に等価なリガンドが提供される。

【0008】

出願人の調査から明らかになった概念は、多くの疾患が、ある種の自己抗体の発生により顕性になる又は悪化するというものである。この抗体は、GPI連結エピトープに対する反応性を有するが、この抗体が抗TCR V 抗体、シグナリング能力を有する分子、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、及びカルジオリピン（ジアシルグリセロール）を含むリン脂質、リン脂質グリカン、インスリン作用のセカンドメッセンジャー、一本鎖DNA及び二本鎖DNA、並びにGPI連結の要素、におけるエピトープに対する反応性を示すという意味で多特異性である。この発見の要素は、国際特許出願WO 99/05175 (A. Matossian - Rogers) 中に最初に報告され、その全体の内容が参照により本明細書中に援用される。

【0009】

これらの自己抗体の存在に関連づけられた障害の1つは糖尿病である。糖尿病の因果関係に関する現在の考えは、感染及び自己免疫T細胞による細胞の破壊の理論（後に、多くの知られている自己抗体の発生につながる）の間のいかなる構造的リンクをも成していない。糖尿病患者における初期のインスリン産出量における増加及びグルカゴン分泌の調節不全についての重要な観察もまた現在の理論により説明されていない。

【0010】

本発明が基づく概念を糖尿病の特異的な症例に適用させると、感染は、モノクローナルT細胞又はポリクローナルT細胞の増殖及びその後恒常的に調節されるT細胞数の増加をもたらす。これは、異なるT細胞を同定する抗体（抗TCR V）を産生させるT細胞受容体（TCR）断片を放出するT細胞の死に関わる⁽¹⁾。上記抗体は、順番に、抗抗TCR V 抗体の発達を刺激し得る。これらのモノクローナル抗抗TCR V 抗体は、*in vitro* 研究において、抗TCR V 抗体だけではなくヒト脾臓細胞にも結合する（WO99/05175を参照されたい）。これらの抗抗TCR V 抗体は、カルジオリピン、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルイノシトール等のリン脂質に対しても反応性である。

【0011】

抗抗TCR V 抗体は、GPI連結の要素の1つであるホスファチジルイノシトール

を抗抗 T C R V 抗体の交差反応性で認識することにより 細胞上の G P I 連結型分子を認識すると考えられる。ホスファチジルイノシトールは、G P I 連結型標的分子に対する抗 G P I 抗体の結合を著しく阻害することが実証された⁽²⁾。G P I 連結は、インスリンに活性化されたホスホリパーゼを介したインスリン作用に感受性である^(3, 4)。G P I 連結型分子は、ホスホリパーゼにより速やかに加水分解されるが、培養下垂体プロラクチン分泌細胞においてセカンドメッセンジャーを産生させることが示された⁽⁵⁾。したがって、細胞上の G P I 連結型分子に結合する抗体が、どのようにして、これらの細胞によるグルカゴン分泌の際のインスリンによる正常な負のフィードバックを破壊し、その結果として、グルカゴン産出量を増加させるかを想定することは可能である。

【0012】

グルカゴンは、島の細胞における c A M P 生産を刺激することにより栄養素誘発性のインスリン分泌に関与する；精製細胞からのインスリン生産は、グルカゴン又は細胞の追加後に著しく増加する⁽⁶⁾。グルカゴンはまた、グルコースに応じたパルス状インスリン放出の振幅を増強することも示された⁽⁷⁾。したがって、膵島細胞に対する上記抗体の影響によりインスリンの過剰生産となるはずである。

【0013】

これが、実際に、W O 9 9 / 0 5 1 7 5 に提示された症例及びデータであることが示されたことは、この主張を支持する。死体ドナーから単離されたヒト膵島細胞をモノクローナル抗抗 T C R V 抗体に暴露させると、インスリン分泌は、対照細胞と比較して調節不全となることがわかった。したがって、膵臓細胞に対する抗抗 T C R V 抗体の i n v i t r o での結合は、インスリン分泌の調節不全につながる。さらに、新たに診断された糖尿病患者の子供において、自己抗体が、モノクローナル抗 T C R V 抗体に結合することがわかった(表2を参照されたい)。これらの自己抗体は、抗抗 T C R V 抗体に類似している。これらの自己抗体は、高血糖及び逆調節欠陥を生じさせる、糖尿病患者における正常な生理的な刺激に対する細胞の応答性の欠如の原因である可能性がある。モノクローナル抗抗 T C R V 抗体は、おそらく標的分子がその自己抗体によりダウンレギュレートされている又はすでに飽和されているといった理由で慢性 I 型糖尿病患者の島に結合しない、という事実により、確かにこれらの分子についての役割が示唆される。

【発明を実施するための形態】

【0014】

ペプチド

上記に記載される多重特異性自己抗体を代表するモノクローナル抗体の構造に基づくペプチドが今すでに考案されている。上記ペプチドは、ウサギにおいて免疫原性であり且つヒト血清の広域スペクトルと反応した抗体の産生をもたらすことが示された。上記ペプチドは、ヒト患者における有用な治療効果を提供することがさらに示された。したがって、これらのペプチド又は等価なりガンドに対して産生されたポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体並びにペプチド及び等価なりガンドそれら自体は、治療上及び分析技術においての両方で、自己抗体又は自己抗体に対して作製された中和抗体の存在を定性的に又は定量的に検出するために使用されてもよいことが提唱される。

【0015】

本明細書中に使用されるように、用語「ペプチド」は、ペプチド結合又は修飾されたペプチド結合(つまりペプチドアイソスター)によりお互いに結合したアミノ酸を含む任意の部分を含む。この用語は、短鎖(5~20個のアミノ酸)及びより長鎖のオリゴペプチド(20~500個のアミノ酸)の両方を言う。好ましくは、ペプチドは、ペプチド結合又は修飾されたペプチド結合によりお互いに結合した、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも25個、少なくとも30個、少なくとも35個、又は少なくとも45個のアミノ酸を含む。

【0016】

好ましくは、本発明によるペプチドは、G P I 連結エピトープ及び1つ又は複数の以下

10

20

30

40

50

の部分に対する反応性を有する抗体のアミノ酸配列を含む：抗TCR V 抗体、シグナリング能力を有する分子、リン脂質（ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、カルジオリピン（ジアシルグリセロール）、又はリン脂質グリカンを含む）、インスリン作用のセカンドメッセンジャー、及び一本鎖DNA又は二本鎖DNA。抗体は、非網羅的な記載から例として与えられたヒト脾臓細胞、甲状腺の濾胞細胞、副腎髄質、胃及び腸管、唾液腺、卵巣、横紋筋、並びに結合組織の細胞を含む1つ又は複数の細胞型に対する反応性をさらに示してもよい。用語「反応性」は、抗体が、特異的結合が示されない他の抗原に対する抗体の親和性よりも実質的に高い親和性を、記載された抗原に対して有することを意味する。好ましくは、この実質的に高い親和性は、少なくとも1.5倍、より好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは5倍、10倍、100倍、1000倍、10,000倍、100,000倍、 10^6 倍、又はそれ以上である。抗体は高度に特異的であるけれども、特定の抗体は、1つを超える抗原に対して高度に特異的である可能性があることは当業者により理解されるだろう。用語「交差反応性」を含む様々な用語はこの現象を説明するために当技術分野で使用されている。抗体が交差反応する抗原は、構造的に類似していてもよく、又は構造的に類似していなくてもよい。上記に記載されたGPI連結エピトープ及び1つ若しくは複数の部分又は細胞型に対する反応性を有するこれらの抗体は、上記「交差反応性」の例である。

10

【0017】

したがって、本発明によるペプチドは、上記に記載された特性を有する抗体の断片であってもよい。たとえば、上記断片は適切な抗体の可変領域に由来してもよい - Fab、F(ab')₂、Fv、及びScFv部分は、有利な特性を有する抗体断片の例である。上記抗体断片を構築する方法は、当技術分野で十分に文書化されている (Molecular Immunology, Hames, B. D. 及び Glover D. M. 編, IRL Press, New York, 1996、Practical Immunology, Hay, F. 及び Westwood, O. Blackwell Science Ltd., 2002)。上記断片が由来する好ましい抗体は、国際特許出願WO99/05175に記載される。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、WO99/05175に開示された抗体、等価なりガンド、及びそれらの使用は、本発明の範囲から明確に除外される。

30

【0019】

本発明によるペプチドが由来してもよい特に好ましい可変領域は、配列が、配列番号2（重鎖）及び4（軽鎖）として本明細書中に提示される可変領域である。これらの可変領域をコードする遺伝子は、抗TCR V 抗体を認識する抗体を分泌するネズミモノクローナル細胞から単離された。対応するDNA配列は配列番号1及び3において提示される。

【0020】

本発明によるペプチドが由来してもよい他の好ましい可変領域は、配列が、配列番号18、20、34、36、50、52、66、68、82、及び84として本明細書中に提示される可変領域である。これらの可変領域をコードする遺伝子もまた、抗TCR V 抗体を認識する抗体を分泌するネズミモノクローナル細胞から単離された。対応するDNA配列は、配列番号17、19、33、35、49、51、65、67、81、及び83において提示される。

40

【0021】

本発明によるペプチドは、好ましくは、上記に記載された特性を有する抗体の超可変領域の断片であってもよい。抗体の超可変領域は、抗原の表面の部分と直接接触する領域である。この理由で、超可変領域はまた、相補性決定領域又はCDRと時に呼ばれる。重鎖及び軽鎖のそれぞれは、本明細書中でCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3と名付けられた3つのCDRを有している。

【0022】

50

本発明によるペプチドが由来してもよい特に好ましい超可変領域は、配列が、配列番号 6、8、10、12、14、及び16として本明細書中に提示される超可変領域である。

【0023】

これらの超可変領域の配列に一致するある種のペプチドを構築し、且つ抗TCRV抗体に結合することができる抗原としての効力について試験した。これらのペプチドは、配列番号8、10、及び16において記載されるアミノ酸配列を有しており、且つ本発明による特に好ましいペプチドである。

【0024】

本発明によるペプチドが由来してもよい他の好ましい超可変領域は、配列が、配列番号 22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び96として本明細書中に提示される超可変領域である。

【0025】

本発明はまた、上記ペプチドが共に連結して、二量体又は多量体を形成してもよいことを規定する。二量体又は多量体は、ホモ二量体又はホモ多量体であってもよく、或いはヘテロ二量体又はヘテロ多量体であってもよい。提示されたエピトープの結合部位及び/又は範囲の利用能がより高くなるために結合効力が増加する可能性があるため、上記の連結した分子は、単一のペプチドを別個に使用するよりも効果的である可能性がある。ペプチドは直接連結してもよく、又はアミノ酸（特にグリシン）、ペプチド、若しくは化学連結基等のリンカー分子により共に連結してもよい。好ましい多量体は、配列番号8、配列番号10、又は配列番号16において提示されるアミノ酸配列を含むホモ二量体を含む。配列番号8、配列番号10、又は配列番号16において提示されるアミノ酸配列を含むホモ二量体及び付加的なN末端システイン残基は、ヒト患者における有用な治療効果を提供することが示された（本明細書中の実施例6及び7を参照されたい）。これらのペプチドは、アミノ酸配列が、配列番号6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び96において記載されるペプチドの組合せをさらに含んでもよい。ペプチドの好ましい組合せは、アミノ酸配列が配列番号8、10、及び16において記載されるペプチドを含む組合せを含む（たとえば、配列番号8及び10、配列番号8及び16、配列番号10及び16、並びに配列番号8、10、及び16）。

【0026】

本発明の上記態様によるペプチドは、翻訳後プロセッシング等の自然のプロセスにより又は当技術分野でよく知られている化学的修飾技術により修飾された、20種の遺伝子コード化アミノ酸以外のアミノ酸を含んでもよい。本発明のポリペプチド中に通常存在していてもよい知られている修飾の中には、グリコシル化、脂質付加、硫酸化、たとえばグルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化、ヒドロキシル化、及びADPリボシル化がある。他の可能性のある修飾は、アセチル化、アシル化、アミド化、フラビンの共有結合的付加、ヘム部分の共有結合的付加、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合的付加、脂質誘導体の共有結合的付加、ホスファチジルイノシトールの共有結合的付加、架橋連結（たとえばシステイン残基間）、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合的架橋連結の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、フォルミル化、GPIアンカー形成、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性のプロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、アルギニン化等の、アミノ酸のタンパク質への転移RNA媒介性の追加、及びユビキチン化が挙げられる。修飾は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖、及びアミノ末端又はカルボキシル末端を含む、ペプチド中のいかなる場所においても生じ得る。

【0027】

本発明によるペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、4

10

20

30

40

50

6、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、及び96において上記に明確に同定されたペプチドに相同であってもよい。一方のポリペプチドの配列が、他方のポリペプチドの配列に対して、高度に十分な程度の同一性又は類似性を有している場合、2つのポリペプチドは「相同である」と、その用語が本明細書中に使用されるように表現される。「同一性」は、整列した配列における任意の特定の位置でアミノ酸残基が配列間で同一であることを示す。「類似性」は、整列した配列における任意の特定の位置でアミノ酸残基が配列間で類似する種類であることを示す。同一性及び類似性の程度は容易に算出することができる(Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 編, Oxford University Press, New York, 1988、Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 編, Academic Press, New York, 1993、Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M. 及び Griffin, H. G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994、Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987、並びに Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 及び Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991)。

10

【0028】

20

通常、2つのペプチド(好ましくは、超可変領域等の特定の領域に関して)間の25%を超える同一性が機能的等価の指標であると考えられる。好ましくは、本発明の第1の態様の機能的に等価なポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、及び96のうちの任意の1つに記載されるペプチドと又はそれらの活性断片と、25%を超える配列同一性の程度を有している。より好ましいポリペプチドは、これらのペプチドと又はそれらの活性断片と、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%を超える同一性の程度をそれぞれ有している。

30

【0029】

同一性の割合は、本明細書中で言及されるように、NCBIにより指定されたデフォルトパラメーターを使用したBLASTバージョン2.1.3を使用して決定される(米国バイオテクノロジー情報センター(the National Center for Biotechnology Information); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)[Blosum 62 matrix; gap open penalty = 11及びgap extension penalty = 1]。

【0030】

したがって、相同ペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、及び96において上記に明確に同定されるペプチドの自然の生物学的変異体(たとえば対立遺伝子変異体又はペプチドが由来する種内の地理的変異)及び突然変異体(アミノ酸の置換、挿入、修飾、又は欠失を含む突然変異体等)を含む。上記突然変異体は、1つ又は複数のアミノ酸残基が、保存アミノ酸残基又は非保存アミノ酸残基(好ましくは保存アミノ酸残基)により置換されるペプチドを含んでいてもよく、上記置換されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによりコード化されたアミノ酸残基であってもよく又はなくてもよい。典型的な上記置換は、基Ala、Val、Leu、及びIleの間、Ser及びThrの間、酸性残基Asp及びGluの間、Asn及びGlnの間、塩基性残基Lys及びArgの間、

40

50

又は芳香族残基 P h e 及び T y r の間とする。いくつかの、すなわち、1 ~ 5 個、1 ~ 3 個、1 ~ 2 個の間又はただ1つのアミノ酸が、任意の組合せで置換される、欠失する、又は追加される変異体が特に好ましい。タンパク質の特性及び活性を変化させないサイレント置換、追加、及び欠失が特に好ましい。上記突然変異体は、1つ又は複数のアミノ酸残基が上記に記載される置換基を含むペプチドをさらに含む。

【0031】

上記変異体は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、及び96において本明細書中に明確に同定されたペプチドの拡張バージョン又は切断バージョンを含む。拡張変異体については、配列のC末端及び/又はN末端での付加的な残基がペプチド断片に含まれる場合、これらのペプチドの抗原領域が正確に折り重なり、且つ抗原活性を示すだろうということが大いに考えられる。たとえば、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、及び96において本明細書中に明確に同定されたペプチドからの又は相同配列からの付加的な5、10、20、30、40、50、100個、又は200個もの数のアミノ酸残基が、ポリペプチド断片が正確に折り重なる能力を害することなく、ペプチドの境界域のC末端及び/又はN末端のいずれか又は両方において含まれていてもよい。

10

20

【0032】

これらのペプチドの切断変異体については、1つ又は複数のアミノ酸残基が、これらのペプチドが正確に折り重なる能力を損なうことなく、ペプチドのC末端又はN末端のいずれか又は両方において通常欠失していてもよい。

【0033】

修飾した、変異した、又は置換したペプチドを使用する理由は、たとえば、野性型ペプチドの治療的及び/又は薬物動態学的特性に対して類似する又は改善された治療的及び/又は薬物動態学的特性を有するペプチドを産生するためであってもよい。上記ペプチドは、たとえばその生物学的標的に対する結合において、野性型ペプチドの効力を保有しているはずである。たとえば、対象への注射後のペプチダーゼによる開裂に対するペプチドの感受性が問題となる場合、特に感受性のペプチド結合を非開裂のペプチドミメティックと交換することにより、より安定した、したがって、治療に、より有用なペプチドを提供することができる。同様に、L-アミノ酸残基の交換は、タンパク質分解に対してペプチドの感受性をより小さくし、最終的に、ペプチド以外の有機化合物に、より類似させる標準的な方法である。t-ブチルオキシカルボニル、アセチル、テイル (t h e y l)、スクシニル、メトキシスクシニル、スベリル (s u b e r y l)、アジピル、アゼライル (a z e l a y l)、ダンシル、ベンジルオキシカルボニル、フルオレニルメトキシカルボニル、メトキシアゼライル (m e t h o x y a z e l a y l)、メトキシアジピル、メトキシスベリル (m e t h o x y s u b e r y l)、及び2,4,-ジニトロフェニル等のアミノ末端ブロッキング基もまた有用である。ペプチドの荷電したN末端及びC末端のブロッキングは、疎水性細胞性膜を介した及び細胞中へのペプチドの通過を高める付加的な有益性を有するであろう。ペプチドミメティック及び他の非ペプチドミメティックの合成及び開発のための技術は当技術分野でよく知られている(たとえば、Hruby V J 及び Balse PM, Curr Med Chem 2000, 7: 945-70、Golbiowski Aら, Curr Opin Drug Discov Devel 2001, 4: 428-34、Kim HO及びKahn M, Comb Chem High Throughput Screen 2000; 3: 167-8を参照されたい)。たとえば、タンパク質間相互作用を崩壊させ、タンパク質複合体形成を阻害することができるミニタンパク質及び合成ミミックが記載された(Cochran AG, Cu

30

40

50

rr Opin Chem Biol 2001, 5(6):654-659)。in vitro翻訳系及びin vivo翻訳系の両方を使用した、タンパク質の構造及び機能を探索する及び/又は改善するための、人為的なアミノ酸をタンパク質に取り込むための様々な方法論が文献中にさらに開示される(たとえば、Dougherty DA, Curr Opin Chem Biol 2000, 4:645-52を参照されたい)。

【0034】

この文献は、保存的アミノ酸の置換の選択が、自然のタンパク質の配列及び/又は構造についての統計学的及び物理化学的研究に基づいて実行され得る多くのモデルを提供する(たとえば、Bordo及びArgos, J Mot Biol 1991, 217:721-9、Rogov及びNekrasov, Protein Eng 2001, 14:459-463を参照されたい)。タンパク質設計実験は、アミノ酸の特異的なサブセットの使用により、折り重なることができる活性タンパク質を生産することができることを示し、より容易にタンパク質構造に適用することができる且つ機能的な及び構造的なホモログ及びパラログを検出するために使用することができるアミノ酸置換の分類に役立つ(Murphy LRら, Protein Eng. 2000, 13:149-52)。

10

【0035】

本発明のペプチドは、融合タンパク質の一部を形成してもよい。たとえば組換え生産の間に、たとえば分泌配列若しくはリーダー配列、プロ配列、精製を援助する配列、又はより高度なタンパク質安定性を付与する配列を含んでもよい1つ又は複数の付加的なアミノ酸配列を含むことは有利であることが多い。或いは又はさらに、成熟ペプチドは、ポリペプチドの半減期を増加させるための化合物(たとえばポリエチレングリコール)等の他の化合物と融合してもよい。ペプチドはまた、生物学的物質又は合成物質に融合してもよく、酵素、指標化合物、薬物、毒素、又は標識(放射性、蛍光性他)等の部分に抱合してもよい。

20

【0036】

本発明のペプチドは任意の適した方法で調製することができる。特に、調製の上記方法は、組換え生産、合成的生産、又はこれらの方法の組合せを含む。合成的生産については、t-Boc又はFMOCベースの化学反応を固相ペプチド合成方法において使用してもよい(Pierce Chem. Coから入手可能な“Solid Phase Peptide Synthesis”, Stewart & Young編を参照されたい)。或いは、液相合成を適用してもよい(“Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins”, Lloyd-Williams, P., Albericio, F., 及びGiralt, E., CRC Press, 1997を参照されたい)。

30

【0037】

本発明によるペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び96において上記に明確に同定されたペプチドと著しい構造上の相同性を共有している。特に、本発明によるペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び96において同定された超可変配列を有するある種の重要な超可変領域残基を共有している。配列番号6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び96に存在する重要な超可変領域残基は超可変領域配列の比較により同定された。

40

【0038】

6つの交差反応性のネズミ抗抗TCR V IgM及びIgGモノクローナル抗体の超

50

可変領域をクローニングし、配列決定した（本明細書中の実施例 1 及び 5 を参照されたい）。それらの抗体の超可変領域配列の分析は、交差反応性の抗 T C R V 結合に必要な残基に関する重要な情報を明らかにする（つまり、本明細書中に記載されるような、G P I 連結エピトープに対する多特異性反応性）。

【 0 0 3 9 】

第 1 に、配列の分析は、特異的なアミノ酸が、各 C D R 内のある種の位置で必須である可能性があることを示唆する（実施例 5 を参照されたい）。したがって、本発明のペプチドは、以下の配列のうちの 1 つを含んでもよく又ははから成ってもよく、ただし、「x」は任意のアミノ酸残基を示し、ただし、「-」はペプチド結合を示し、ただし、ペプチドは、N 末端から C 末端の向きで示される：

【化 1】

コンセンサス 1 G-Y-x-F-T-x-x-x-x-x-W (配列番号 :162)

コンセンサス 2 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x (配列番号 :163)

コンセンサス 3 x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x (配列番号 :164)

コンセンサス 4 x-x-S-x-x-x-S (配列番号 :165)

コンセンサス 5 Q-Q-x-x-x-x-P-x-x (配列番号 :166)

10

【 0 0 4 0 】

第 2 に、配列の分析は、クローニングされた配列に基づいた各 C D R に対する「一般式」の生成を可能にした（実施例 5 を参照されたい）。したがって、本発明のペプチドは、以下の「一般式」のうちの 1 つの必要を満たすアミノ酸配列を含んでもよく又ははから成ってもよく、ただし、括弧中に示されるアミノ酸のうちの 1 つは各位置に関連する場合に選択され、ただし、「-」はペプチド結合を示し、ただし、ペプチドは、N 末端から C 末端の向きで示される：

20

【化 2】

式 1 G-Y-[TA]-F-T-[RNS]-[YN]-[WGN]-[IM]-[NF]-W

式 2 [NWy]-I-[YND]-[PT]-[SY]-[DNT]-[SG]-[YDE]-[TP]-[NRT]-Y-[NSA]-
[QD]-[KD]-F-K-[DG]

式 3 [LKE]-[RG]-[GML]-[LTY]-[LTG]-[PGN]-[DY]-[YAF]

式 4 [KR]-A-S-[QS]-[NDS]-[VI]-[DSG]-[TNS]-[NY]-[VLY]-[ANL]

式 5 [SYR]-[AT]-S-[YRI]-[RL]-[YHA]-S

式 6 Q-Q-[YG]-[NS]-[TS]-[YFS]-P-[LTP]-[TF]

30

【 0 0 4 1 】

上記「一般式」は、発明者によりクローニングされ、配列決定された交差反応性の抗体の C D R 配列をすべて包含する。

【 0 0 4 2 】

第 3 に、配列の分析は、完全保存アミノ酸だけではなく、C D R の各位置で最も共通した（主要な）アミノ酸（複数可）も考慮に入れたアミノ酸式を各 C D R について生成することを可能にした（実施例 5 を参照されたい）。したがって、本発明のペプチドは、以下の式のうちの 1 つの必要を満たすアミノ酸配列を含んでもよく又ははから成ってもよく、ただし、括弧中に示されるアミノ酸のうちの 1 つは各位置に関連する場合に選択され、ただし、「-」はペプチド結合を示し、ただし、ペプチドは、N 末端から C 末端の向きで示される：

40

【化3】

- 式7 G-Y-T-F-T-R-[YN]-W-[IM]-N-W
 式8 N-I-Y-P-[SY]-D-[SG]-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-[DG]
 式9 L-[RG]-G-L-L-P-[DY]-Y
 式10 K-A-S-Q-N-V-[DSG]-T-N-V-A
 式11 S-A-S-Y-R-Y-S
 式12 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T

【0043】

10

1つ又は複数の上記のコンセンサ配列及び式の必要を満たすアミノ酸配列を含む又はから成るペプチドは、本明細書中の実施例6及び7において *in vivo* で試験されたペプチドに対して等価な生物活性を有しているだろう、そして本発明に従って有用となるであろうということが考えられる。

【0044】

実施例1及び5において同定された超可変領域配列はまた、発明者により同定された配列に対して高度なレベルの配列同一性を有し且つ関連する結合特性を有する知られている超可変領域配列を同定するためにも使用された(本明細書中の実施例8及び図12A~12Eを参照されたい)。知られている超可変領域配列は、交差反応性の抗TCRV結合にとって重要な超可変領域残基をさらに分析するために、実施例1及び5において同定された超可変領域配列と比較した(つまり、本明細書中に記載されるような、GPI連結エピトープに対する多特異性反応性)。さらなる一連のコンセンサ配列及び式は、実施例5において用いられる同一の種類の分析を使用して同定された(図12A~12Eを参照されたい)。

20

【0045】

したがって、本発明のペプチドは、以下の配列のうちの1つを含んでもよく又はから成ってもよく、ただし、「x」は任意のアミノ酸残基を示し、「-」はペプチド結合を示し、ペプチドは、N末端からC末端の向きで示される：

【化4】

- コンセンサス 6 G-Y-T-F-T-x-x-x-x-x-W (配列番号:167)
 コンセンサス 7 G-Y-x-F-x-x-Y-x-M-x-W (配列番号:168)
 コンセンサス 8 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x (配列番号:169)
 コンセンサス 9 x-I-x-P-x-x-x-x-T-x-Y-x-x-K-F-x-G (配列番号:170)
 コンセンサス 10 x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x (配列番号:171)
 コンセンサス 11 x-A-S-x-x-x-x-x-x-L-x (配列番号:172)
 コンセンサス 12 x-x-S-x-x-x-S (配列番号:173)
 コンセンサス 13 x-T-S-x-L-x-x (配列番号:174)
 コンセンサス 14 Q-Q-x-x-S-x-P-x-T (配列番号:175)
 コンセンサス 15 Q-Q-x-N-x-x-P-x-x (配列番号:176)

30

40

【0046】

本発明のペプチドはまた、以下の「一般式」のうちの1つの必要を満たすアミノ酸配列を含んでもよく又はから成ってもよく、ただし、括弧中に示されるアミノ酸のうちの1つは各位置で関連する場合に選択され、「-」はペプチド結合を示し、ペプチドは、N末端からC末端の向きで示される：

【化5】

式 13 G-Y-T-F-T-[RNYSTDEG]-[NYF]-[WGAY]-[IMV]-[NGQH]-W

式 14 G-Y-[ATS]-F-[T/S]-[SDG]-Y-[NWV]-M-[FQHN]-W

式 15 [NWEAY]-I-[YND]-[PT]-[SYG]-[DTGY]-[SGD]-[YEGS]-[TP]-[NTYGS]-
Y-[NAI]-[QDE]-[KD]-F-K-[DGN]式 16 [YWKNLRL]-I-[DN]-P-[YAEFS]-[NYS]-[GD]-[DSG]-T-[RESKN]-Y-[SAN]-
[QSEP]-K-F-[KQT]-G

式 17 [KR]-A-S-[QS]-[NSDT]-[VI]-[DGSR]-[TSYNK]-[NADY]-[VYGL]-[ALD]

10

式 18 [RK]-A-S-[QR]-[DSG]-[IV]-[SN]-[NSG]-[YW]-L-[NHA]

式 19 [SRW]-[AT]-S-[YIT]-[RL]-[YAE]-S

式 20 [YLDTK]-T-S-[RNKV]-L-[HAG]-[SP]

式 21 Q-Q-[YGWR]-[NSAG]-S-[YSDW]-P-[LPYI]-T

式 22 Q-Q-[GNSTY]-N-[TES]-[FDWY]-P-[TYRF]-[FT]

【0047】

20

本発明のペプチドはまた、以下の式のうちの1つの必要を満たすアミノ酸配列を含んでいてもよく又はから成ってもよく、ただし、括弧中に示されるアミノ酸のうちの1つは各位置で関連する場合に選択され、「-」はペプチド結合を示し、ペプチドは、N末端からC末端の向きで示される：

【化6】

式 23 G-Y-T-F-T-[RNS]-Y-W-[IM]-N-W

式 24 G-Y-T-F-T-S-Y-W-M-H-W

式 25 N-I-Y-P-S-D-S-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-G

式 26 [YW]-I-N-P-Y-N-G-D-T-[ES]-Y-N-Q-K-F-K-G

30

式 27 K-A-S-Q-N-V-S-T-N-V-A

式 28 R-A-S-Q-S-I-S-N-Y-L-[NA]

式 29 S-A-S-Y-R-Y-S

式 30 Y-T-S-N-L-A-S

式 31 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T

式 32 Q-Q-N-N-E-D-P-[YR]-T

40

【0048】

本発明のペプチドはまた、以下の式のうちの1つの必要を満たすアミノ酸配列を含んでいてもよく又はから成ってもよく、ただし、括弧中に示されるアミノ酸のうちの1つは各位置で関連する場合に選択され、「x」は任意のアミノ酸残基を示し、「-」はペプチド結合を示し、ただし、ペプチドは、N末端からC末端の向きで示される：

【化7】

式 33 [EYWSL]-I-[YSND]-[PSH]-[SGNY]-[GSNTD]-[SGD]-[YTGS]-[TIA]-
[NY]-[YN]-[NAP]-[QDSEP]-[KSL]-[FVK]-[KQS]-[GR]

式 34 E-I-[YSN]-[PS]-[SGN]-[GS]-[SG]-[TGS]-T-[NY]-Y-[NAP]-[QDS]-
[KS]-[FVK]-[KQ]-[GR]

式 35 x-I-x-P-S-G-G-x-T-Y-x-A-D-[KS]-[FV]-K-G

【0049】

10

1つ又は複数の上記のコンセンサス配列及び式の必要を満たすアミノ酸配列を含む又はから成るペプチドはまた、上記の実施例6及び7において *in vivo* で試験されたペプチドに対して等価な生物活性を有しているだろう、そして本発明で用いるのに有用となるであろうということが考えられる。

【0050】

本明細書中の他のところで述べられるように、本発明のペプチドはともに連結させて二量体又は多量体を形成してもよい。したがって、本発明は、1つ又は複数の上記のコンセンサス配列及び式の必要を満たすアミノ酸配列を含む又はから成るペプチドの二量体又は多量体をさらに提供する。たとえば、本発明は、本明細書中に記載される2つの異なるコンセンサス配列又は式の必要を満たすアミノ酸配列を含む2つのペプチドのヘテロ二量体を提供する。たとえば、本発明は、同一のコンセンサス配列又は式の必要を満たすアミノ酸配列を含む2つのペプチドのホモ二量体を提供する。

20

【0051】

本発明は、本明細書中に開示されるコンセンサス配列又は式の必要を満たすアミノ酸配列を含む又はから成るペプチドであって、アミノ酸配列は、配列番号6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び96のうちの任意の1つと25%を超える配列同一性の程度をさらに有するペプチドをさらに提供する。好ましくは、上記ペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び96のうちの任意の1つと、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%を超える同一性の程度をそれぞれ有している。

30

【0052】

本発明のペプチドは、上記のコンセンサス配列のうちの1つの必要を満たすアミノ酸配列を含む又はから成るペプチドをさらに含み、ペプチドは、1つ又は複数の可変位置(つまり完全に保存されていない「x」位置)で、本明細書中の対応するただし(つまり、同一のCDRに対応するただし)のその位置において開示されたアミノ酸のうちの任意の1つを含む。

40

【0053】

たとえば、クローニングされたCDR-H2配列(実施例5を参照されたい)から本明細書中において同定されたコンセンサス配列及び「一般式」は次のとおりである:

【化8】

コンセンサス 2 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

式 2 [NWy]-I-[YND]-[PT]-[SY]-[DNT]-[SG]-[YDE]-[TP]-[NRT]-Y-
[NSA]-[QD]-[KD]-F-K-[DG]

【0054】

50

したがって、本発明のペプチドは、以下の配列を含む又はから成るペプチド等のペプチドの配列の組合せを含む：

【化 9】

組合せ 1	[NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 2	x-I-[YND]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 3	x-I-x-[PT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 4	x-I-x-x-[SY]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 5	x-I-x-x-x-[DNT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 6	x-I-x-x-x-x-[SG]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 7	x-I-x-x-x-x-x-[YDE]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 8	x-I-x-x-x-x-x-x-[TP]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 9	x-I-x-x-x-x-x-x-x-[NRT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 10	x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-[NSA]-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x
組合せ 11	x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-[QD]-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x
組合せ 12	x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-[KD]-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x
組合せ 13	x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-[DG]

10

【 0 0 5 5】

20

本発明のペプチドは、本明細書中に開示されるコンセンサス配列及び式のより複雑な組合せをさらに含む。したがって、たとえば、本発明は、以下の配列を含む又はから成るペプチドをさらに提供する：

【化 10】

組合せ 14	[NWY]-I-[YND]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 15	[NWY]-I-x-[PT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 16	[NWY]-I-x-x-[SY]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 17	[NWY]-I-x-x-x-[DNT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 18	[NWY]-I-x-x-x-x-[SG]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 19	[NWY]-I-x-x-x-x-x-[YDE]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 20	[NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-[TP]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 21	[NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-[NRT]-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x
組合せ 22	[NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-[NSA]-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x
組合せ 23	[NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-[QD]-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x
組合せ 24	[NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-[KD]-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-x
組合せ 25	[NWY]-I-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-x-x-x-x-x-F-K-[DG]

30

【 0 0 5 6】

本明細書中の実施例 8 及び 9 は、関連する結合特異性についての知られている超可変領域配列の分析を記載する。その分析は、公共データベースで入手可能な重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列に基づいた。いくつかの実施形態では、アクセッション番号

40

【化 1 1】

1921302A, 1921302B, A39276, B39276,
 AAA20444.1, AAA20447.1, AAB32203.1, AAB32202.1, AAB46758.1, AAB46763.1,
 AAB46759.1, AAB46764.1, AAB46760.1, AAB46765.1, AAB46761.1, AAB46766.1,
 AAB46762.1, AAB46767.1, AAB58061.1, AAB58062.1, AAC53642.1, AAC53642.1,
 AAD00604.1, AAD00605.1, AAD00606.1, AAD00607.1, AAE72083.1, AAE72082.1,
 AAG30427.1, AAG30432.1, AAG30428.1, AAG30433.1, AAG30429.1, AAG30434.1,
 AAG30430.1, AAG30435.1, AAG33839.1, AAG40815.1, AAK11244.1, AAL59364.1,
 AAL59381.1, AAL59365.1, AAL59380.1, AAL59366.1, AAL59379.1, AAL59367.1,
 AAL59378.1, AAL59368.1, AAL59377.1, AAL59369.1, AAL59376.1, AAL59370.1,
 AAL59375.1, AAL59371.1, AAL59374.1, AAL59372.1, AAL59373.1, AAL67507.1,
 AAL67508.1, AAL67509.1, AAL67510.1, AAL67511.1, AAP19642.1, AAP19641.1,
 AAR90997.1, AAS01840.1, AAR90998.1, AAS01841.1, AAR90999.1, AAR91002.1,
 AAS01843.1, AAR91003.1, AAS01844.1, AAR91004.1, AAR91005.1, AAR91007.1,
 AAS01847.1, AAT68292.1, AAT76236.1, AAT76271.1, AAT76245.1, AAT76280.1,
 AAT76246.1, AAT76281.1, B30502, C30502, CAA46142.1, CAA51998.1, CAA52929.1,
 CAA56180.1, CAA52930.1, CAA56181.1, CAA52931.1, CAA56178.1, CAA52932.1,
 CAA56179.1, CAA63586.1, CAA63587.1, CAA63589.1, CAA63590.1, CAA84376.1,
 CAA84375.1, CAB45250.1, CAB45251.1, CAB45252.1, CAB45253.1, CAB46481.1,
 CAB46447.1, CAB46482.1, CAB46448.1, CAC22102.1, CAC22102.1, F30502, G30502,
 PC4280, PC4283, PC4281, PC4282, S67941, S67940, S69897 及び S69898

10

20

30

の下で保管された 1 つ又は複数の配列は、本発明の範囲から明確に除外される。

【 0 0 5 7 】

本発明の第 1 の態様は、本明細書中において明確に同定されるペプチドと機能的に等価であるリガンドをさらに含む。機能的に等価なリガンドは、生物学的に由来する構造であってもよく又はライブラリ（化学化合物のランダムライブラリ若しくはコンビナトリアルライブラリ等）から合成若しくは選択してもよく、機能的に等価なリガンドは、同一の機能を果たすことができ又は自己抗体若しくはその代表的なモノクローナル抗体及びそれらの誘導体と同一の標的構造に結合することができる。たとえば、上記化合物は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、及び 96 において本明細書中に明確に同定されるペプチド配列と著しい構造上の相同性を共有していてもよい。上記化合物は、スレッディング等の技術により同定されてもよい（たとえば、Jones, D. T. (1997). *Progress in protein structure prediction. Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (3), 377-387 を参照されたい）。上記化合物はまた、本発明の第 1 の態様のペプチド中和抗体又は機能的に等価なリガンドを利用するスクリーニング方法において同定されてもよい。

40

【 0 0 5 8 】

50

抗原に結合するために必要な位置にこれらのペプチドのアミノ酸側鎖を保有することができる任意の分子フレームワークは、本発明に従って使用するのに適しているだろうということが企図される。環状ペプチドの連結基及び結合によりの確なフレームワーク中に保持された環状ペプチドがこの点で特に適合している可能性がある。このアミノ酸側鎖は、野性型ペプチドにおけるアミノ酸側鎖の位置と実質的に同一の位置に保持されていてもよい。好ましくは、環状ペプチドは、5～30個のアミノ酸、好ましくは7～20個のアミノ酸を含む。

【0059】

本発明による抗原結合部位を模倣する抗原結合部位を有する生物活性ペプチドがファージライブラリを使用して産生されてもよい。抗原部位における仲間として同定されたアミノ酸残基をコードする核酸は、周囲のフレームワーク残基をコードする核酸と共に、融合させて、10～1000残基、好ましくは25～100残基のポリペプチドユニットを生じさせてもよい。この核酸断片と、ファージタンパク質、たとえばバクテリオファージφdのpIIIをコードする核酸断片との融合により、融合分子がファージの表面上に提示されてもよい。次いで、抗原を用いたファージライブラリのスクリーニングにより興味のあるそれらのクローンを同定することとなる。次いで、これらのクローンは、反復の一連の変異誘発及びスクリーニングにかけて、産生された分子の抗原に対する親和性を改善することができる。

【0060】

ペプチドベースの化合物に加えて、合成分子又は有機分子は、本明細書中において明確に同定されるペプチドと機能的に等価であってもよい。コンビナトリアルケミストリーについての見解及びコンビナトリアルライブラリの生成は近年非常な速度で発展し、且つ所望の特性を有する分子の合理的な設計及び改善を容易にした。これらの技術は、本明細書中において同定されたペプチドの結合部位と同一である又は類似する結合部位を所有する分子を生成するために使用することができる。

【0061】

上記化合物は、たとえば分子モデリングプログラム及びコンピュータ視覚化プログラムを組み合わせた標準的な合成技術を使用して、合理的な設計により生成されてもよい。これらの技術の下で、主ペプチドに類似するフレームワークを有する「リード」化合物は、様々な骨格及び成分置換基を組み合わせることにより最適化される。

【0062】

或いは又は分子の実体の構造先導型設計における1つのステップとして、コンビナトリアルケミストリーは、フレームワーク骨格のあたりの同属のコンビナトリアルアレイの生産により、これらのペプチドの抗原部位を模倣する化合物の構造を生成する又は洗練するために使用されてもよい。これらのステップは、固相の分離及び再結合のプロセスを有する標準的なペプチド合成若しくは有機分子合成又は固相技術若しくは溶液技術を使用するパラレルコンビナトリアルユニット合成を含む可能性がある(たとえば、Hogan, 1997及びそこに引用される参考文献を参照されたい)。

【0063】

ペプチドを含む抗体

本発明の第1の態様のさらなる実施形態によれば、配列番号2、18、34、50、66、又は82に提示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む抗体が提供される。配列番号4、20、36、52、68、又は84に提示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体がさらに提供される。

【0064】

したがって、本発明は、配列番号2に提示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号4に提示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。本発明は、配列番号18に提示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号20に提示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号34に提示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号36に提示

10

20

30

40

50

されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 5 2 に提示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号 5 4 に提示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 6 6 に提示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号 6 8 に提示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 8 2 に提示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号 8 4 に提示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体をさらに提供する。

【0065】

本発明は、配列番号 6、8、10、12、14、及び 16 に提示された 1、2、3、4、5、又は 6 つの CDR 配列を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 22、24、26、28、30、及び 32 に提示された 1、2、3、4、5、又は 6 つの CDR 配列を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 38、40、42、44、46、及び 48 に提示された 1、2、3、4、5、又は 6 つの CDR 配列を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 54、56、58、60、62、及び 64 に提示された 1、2、3、4、5、又は 6 つの CDR 配列を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 70、72、74、76、78、及び 80 に提示された 1、2、3、4、5、又は 6 つの CDR 配列を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 86、88、90、92、94、及び 96 に提示された 1、2、3、4、5、又は 6 つの CDR 配列を含む抗体をさらに提供する。

10

【0066】

本発明は、配列番号 2、18、34、50、66、又は 82 に提示されるアミノ酸配列に対して、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は 99% を超える同一性を有する重鎖可変領域配列を含む抗体をさらに提供する。本発明は、配列番号 4、20、36、52、68、又は 84 に提示されるアミノ酸配列に対して、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は 99% を超える同一性を有する軽鎖可変領域配列を含む抗体をさらに提供する。

20

【0067】

本発明は、配列番号 6、8、10、12、14、16、22、24、26、28、30、32、38、40、42、44、46、48、54、56、58、60、62、64、70、72、74、76、78、80、86、88、90、92、94、及び 96 に提示されるアミノ酸配列に対して、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は 99% を超える同一性を有する 1、2、3、4、5、又は 6 つの CDR を含む抗体をさらに提供する。

30

【0068】

本発明は、本明細書中に開示されるコンセンサス配列及び式の必要を満たす 1、2、3、4、5、又は 6 つのアミノ酸配列を含む抗体をさらに提供する。

【0069】

本発明は、本明細書中の他のところで述べられるように、Fab、F(ab')₂、Fv、及び ScFv の断片等のこれらの抗体の断片をさらに提供する。

40

【0070】

ペプチド中和抗体

本発明の第 1 の態様のさらなる実施形態によれば、本発明の第 1 の態様のペプチドに対する反応性を示す抗体又は機能的に等価なりガンドが提供される。上記抗体又は機能的に等価なりガンドは、特に、受身移入により治療上使用することができるので、疾患の治療及び診断に有用である。

【0071】

ポリクローナル抗体が所望される場合、マウス、ウサギ、ヤギ、又はウマ等の選択された哺乳動物は、本発明の第 1 の態様のペプチドで免疫化されてもよい。動物を免疫化するために使用されるペプチドは、組換え DNA 技術により誘導することができる又は化学的

50

に合成することができる。所望される場合、ペプチドは、担体タンパク質に抱合することができる。ペプチドが化学的にカップルされてもよい通常使用される担体は、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン、及びキーホールカサガイヘモシアニンを含む。次いで、カップルしたペプチドは動物を免疫化するために使用される。免疫化された動物からの血清は収集され、たとえば免疫親和性クロマトグラフィーによる知られている手順に従って処理される。

【0072】

本発明の第1の態様のペプチドに対するモノクローナル抗体はまた、当業者により容易に生産することができる。ハイブリドーマ技術を使用する、モノクローナル抗体を作製するための一般的な方法論はよく知られている(たとえば、Kohler, G. 及び Milstein, C., *Nature* 256: 495 - 497 (1975)、Kozborら, *Immunology Today* 4: 72 (1983)、Coleら, 77 - 96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985)。

10

【0073】

本発明の第1の態様のペプチドに対して生産されたモノクローナル抗体のパネルは、様々な特性について、すなわち、アイソタイプ、エピトープ、親和性等についてスクリーニングすることができる。モノクローナル抗体は、それらモノクローナル抗体が指向性の個々のペプチドの精製に特に有用である。或いは、興味のあるモノクローナル抗体をコードする遺伝子は、たとえば当技術分野で知られているPCR技術により、ハイブリドーマから単離し、適切なベクターにおいてクローニングし、発現させてもよい。

20

【0074】

非ヒト可変領域がヒト定常領域に結合される又は融合されるキメラ抗体もまた(たとえば Liuら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3439 (1987)を参照されたい)使用されてもよい。

【0075】

抗体は、個体における免疫原性を小さくするために、たとえばヒト化により修飾されてもよい(Jonesら, *Nature*, 321, 522 (1986)、Verhoeyenら, *Science*, 239: 1534 (1988)、Kabataら, *J. Immunol.*, 147: 1709 (1991)、Queenら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 10029 (1989)、Gormanら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 34181 (1991)、及び Hodgsonら, *Bio/Technology* 9: 421 (1991))。用語「ヒト化抗体」は、本明細書中に使用されるように、ヒト抗体における等価なアミノ酸の代わりに、非ヒトドナー抗体の重鎖及び/又は軽鎖の可変ドメインにおけるCDRアミノ酸及び選択された他のアミノ酸で置換した抗体分子のことを言う。したがって、ヒト化抗体は、ヒト抗体に非常によく似ているが、ドナー抗体の結合能力を有している。

30

【0076】

さらなる代替では、抗体は、「二特異性」抗体であってもよく、「二特異性」抗体は、2つの異なる抗原結合ドメインを有する抗体であり、各ドメインは、異なるエピトープに対して指向性である。

40

【0077】

関連する抗体の所有についてスクリーニングされたヒトからのリンパ球のPCR増幅V遺伝子のレパトリーから又はナイーブライブラリから本発明のペプチドに対する結合活性を有する抗体をコードする遺伝子を選択するためにファージディスプレイ技術は利用されてもよい(McCafferty, J.ら, (1990), *Nature* 348, 552 - 554、Marks, J.ら, (1992) *Biotechnology* 10, 779 - 783)。これらの抗体の親和性はまたチェインシャフリングにより改善することもできる(Clackson, T.ら, (1991) *Nature* 352, 624 - 628)。

50

【0078】

上記の技術により生成された抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルのいずれにせよ、免疫アッセイ、放射免疫アッセイ（RIA）、又は酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）における試薬として用いられてもよいという点で、付加的な有用性を有している。これらの用途において、抗体は、放射性同位体、蛍光性分子、又は酵素等の分析的に検出可能な試薬で標識することができる。

【0079】

核酸分子

本発明の第2の態様によれば、上記に記載した本発明の実施形態のいずれか1つによるペプチド、抗体、又は機能的に等価なリガンドをコードする核酸分子が提供される。上記ペプチドをコードする核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、又は95のうちの任意の1つに記載される核酸分子のコード配列と同一であってもよい。これらの分子は、遺伝子コードの縮重の結果として、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、又は96にそれぞれに記載されるペプチドをコードする異なる配列をさらに有していてもよい。好ましくは、精製核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、又は95のうちの任意の1つに記載される核酸配列を有する又はこれらの配列のうちの任意の1つの縮退等価物又は断片である。

10

20

【0080】

本発明の核酸分子は、mRNA等のRNAの形態又はたとえばcDNA、合成DNA、若しくはゲノムDNAを含むDNAの形態をしていてもよい。上記核酸分子は、クローニングにより、化学合成技術により、又はそれらの組合せにより得られてもよい。核酸分子は、たとえば、固相ホスホラミダイト化学合成等の技術を使用する化学合成により、ゲノムライブラリ若しくはcDNAライブラリから、又は生体からの分取により、調製することができる。RNA分子は、DNA配列の*in vitro*転写又は*in vivo*転写により通常生成されてもよい。核酸分子は、二本鎖であってもよく又は一本鎖であってもよい。一本鎖DNAは、センス鎖としても知られているコード鎖であってもよく、又は一本鎖DNAは、アンチセンス鎖とも呼ばれる非コード鎖であってもよい。

30

【0081】

用語「核酸分子」は、修飾された主鎖を含む類似体等のDNA及びRNAの類似体並びにペプチド核酸（PNA）をさらに含む。用語「PNA」は、本明細書中に使用されるように、リシンで好ましくは終わるアミノ酸残基のペプチド主鎖に連結した長さが少なくとも5つのヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを含むアンチセンス分子又は抗遺伝子作用物質のことを言う。末端のリシンは、組成物に対して溶解性を付与する。PNAは、細胞中でのPNAの寿命を延長するためにペグ化されてもよく、PNAは、相補的な一本鎖DNA及びRNAに優先的に結合し、転写伸長を停止させる（Nielsen, P. E.ら（1993）*Anticancer Drug Des.* 8: 53-63）。

40

【0082】

本発明の核酸分子は、成熟ペプチド又は抗体それ自体に対するコード配列；成熟ペプチド又は抗体に対するコード配列及びプロポリペプチド配列、プレポリペプチド配列、又はプレプロポリペプチド配列等のリーダー配列又は分泌配列をコードするコード配列等の付加的なコード配列；転写（終結シグナルを含む）、リボソーム結合、及びmRNAの安定

50

性に役割を果たす転写された、翻訳されない配列等の非コード5'配列及び非コード3'配列を含むさらに付加的な非コード配列と共に、前述の付加的なコード配列を有している又は有していない、成熟ペプチド又は抗体のコード配列、を含んでいてもよいが、これらに限定されない。核酸分子は、付加的な官能基を提供するアミノ酸等の付加的なアミノ酸をコードする付加的な配列をさらに含んでいてもよい。

【0083】

上記に記載される変異体ペプチドをコードする変異体核酸分子は、本発明の範囲内に含まれる。この点における変異体の中には、ヌクレオチドの置換、欠失、又は挿入により、本明細書中において明確に同定された核酸分子と異なる変異体がある。置換、欠失、又は挿入は、1つ又は複数のヌクレオチドに関わっていてもよい。変異体は、コード領域若しくは非コード領域又は両方において変更されてもよい。コード領域における変更により、保存的又は非保存的アミノ酸の置換、欠失、又は挿入を生じさせてもよい。

10

【0084】

本発明の核酸分子はまた、様々な理由で、遺伝子産物(ポリペプチド)のクローニング、プロセッシング、及び/又は発現を修飾することを含む、当技術分野で通常知られている方法を使用して、操作することもできる。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムな断片化及びPCR再構築によるDNAシャフリングは、ヌクレオチド配列を操作するために使用されてもよい特異的な技術として述べられる。部位特異的変異誘発は、新しい制限部位を挿入する、グリコシル化パターンを変更する、コドン優先度を変化させる、スプライス変異体を生産する、変異を導入する等のために使用されてもよい。

20

【0085】

本発明のこの態様の好ましい実施形態は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、又は95のうちの任意の1つに記載される核酸分子に対してそれらの全体の長さにわたり少なくとも25%同一である核酸分子である。好ましくは、本発明のこの態様による核酸分子は、これらの配列のうちの任意の1つを有する核酸分子に対して、その全体の長さにわたり少なくとも30%同一である、より好ましくは、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、99%、又はそれ以上同一である領域を含む。

30

【0086】

本発明の第3の態様によれば、本発明の第2の態様の核酸分子と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする精製核酸分子が提供される。本発明の第2の態様の核酸分子に部分的に又は完全に相補的である上記分子は、アンチセンスの目的又は探索目的に有用であってもよい。オリゴヌクレオチド等の上記アンチセンス分子は、当業者により知られているように、本発明のポリペプチドをコードする標的核酸を認識し、特異的に結合し、且つその標的核酸の転写を予防するために設計することができる。(たとえば、Cohen, J. S., Trends in Pharm. Sci., 10, 435 (1989)、Okano, J. Neurochem. 56, 560 (1991)、O'Connor, J. Neurochem. 56, 560 (1991)、Lee, Nucleic Acids Res. 6, 3073 (1979)、Cooney, Science 241, 456 (1988)、Derivan, Science 251, 1360 (1991)を参照されたい。用語「ハイブリダイゼーション」は、本明細書中に使用されるように、2つの核酸分子の水素結合による互いのつながりのことを言う。通常、一方の分子は固体担体に固定されることとなり、他方は溶液中に遊離することとなる。次いで、2つの分子は、水素結合に好都合である条件下で互いに接触して配置される可能性がある。標的分子に対する完全に相補的な分子のハイブリダイゼーションの阻害は、当技術分野で知られているハイブリダイゼーションアッセイを使用して検査されてもよい。(たとえば、Sambrookら[前掲]を参照されたい)。次いで、実質的に相同の分子は、Wahl

40

50

, G. M. 及び S. L. Berger (1987; Methods Enzymol. 152: 399-407) 並びに Kimmel, A. R. (1987; Methods Enzymol. 152: 507-511) に教示されるように、様々なストリンジェンシー条件下での標的分子に対する完全に相同の分子の結合に競合して、阻害するだろう。

【0087】

「ストリンジェンシー」は、異なる分子のつながりに対して非常に類似する分子のつながりに好都合である、ハイブリダイゼーション反応における条件のことを言う。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5×SSC (150 mM NaCl、15 mM クエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、及び変性させ、剪断した20マイクログラム/ml サケ精子DNAを含む溶液中での42℃での一晚のインキュベーション、続く約65℃での0.1×SSC中でのフィルターの洗浄として定義される。低ストリンジェンシー条件は、35℃で行われるハイブリダイゼーション反応に関わる (Sambrookらを参照されたい [前掲])。好ましくは、ハイブリダイゼーションに使用される条件は高ストリンジェンシーの条件である。

【0088】

ベクター

第4の態様では、本発明は、本発明の第2又は第3の態様の核酸分子を取り込んだ発現ベクター等のベクターを提供する。本発明のベクターは、本発明の核酸分子を含み、クローニングベクター又は発現ベクターであってもよい。したがって、本発明のペプチドは、宿主細胞内に含まれるベクター中のペプチドのコード化核酸分子の発現により組換えの形態で調製されてもよい。上記発現方法は当業者によく知られており、多数がSambrookら (前掲) 及び Fernandez & Hoefler (1998年版 "Gene expression systems. Using nature for the art of expression". Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto) により詳細に記載される。

【0089】

通常、所要の宿主中でポリペプチドを生産するための核酸分子を維持する、増殖させる、又は発現させるのに適している任意の系又はベクターを使用してもよい。適切なヌクレオチド配列は、たとえば、Sambrookら (前掲) に記載される技術等の、任意の様々なよく知られているルーチン的な技術により発現系に挿入してもよい。通常、コード遺伝子は、プロモーター、リボソーム結合部位 (細菌の発現のための)、及び任意選択でオペレーター等の制御要素の制御下に配置することができ、所望のポリペプチドをコードするDNA配列は形質転換宿主細胞においてRNAに転写される。

【0090】

特に適した発現系は、組換えのバクテリオファージ、プラスミド、若しくはコスミドのDNA発現ベクターで形質転換した細菌等の微生物；酵母発現ベクターで形質転換した酵母；ウイルス発現ベクター (たとえばバキュロウイルス) に感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター (たとえば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV) 又は細菌発現ベクター (たとえばTiプラスミド若しくはpBR322プラスミド) で形質転換した植物細胞系；或いは動物細胞系を含む。無細胞翻訳系もまた、本発明のペプチドを生産するために用いることができる。

【0091】

本発明のペプチドをコードする核酸分子の宿主細胞中への導入は、Davisら, Basic Methods in Molecular Biology (1986) 及び Sambrookら, [前掲] 等の多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法により達成することができる。真核細胞では、発現系は、系の必要性に従って、一過性 (たとえばエピソーム) 又は持続性 (染色体組込み) であってもよい。

【0092】

10

20

30

40

50

コード化ベクターは、たとえば、小胞体の内腔への、細胞膜周辺腔への、又は細胞外環境への翻訳されたポリペプチドの分泌のための、シグナルペプチド又はリーダー配列等の制御配列をコードする配列を所望のとおりを含んでいてもよい。これらのシグナルは、ペプチドに対して内在性であってもよく、又はシグナルは異種のシグナルであってもよい。リーダー配列は、細菌宿主により、翻訳後プロセッシングにおいて除去することができる。

【0093】

制御配列の他に、宿主細胞の成長に関連するポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を追加することは望ましいかもしれない。調節配列は、エンハンサー、プロモーター、並びに5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域等の、それらのベクターの翻訳されない領域である。これらは、転写及び翻訳を行うために宿主細胞タンパク質と相互作用する。調節配列の例は、調節化合物の存在を含む化学的若しくは物理的的刺激又は様々な温度若しくは代謝の条件に応じて、遺伝子の発現を増加させる又は減少させる調節配列である。制御配列及び他の調節配列は、ベクターへの挿入前に、核酸コード配列にライゲーションしてもよい。或いは、コード配列は、制御配列及び適切な制限部位をすでに含んでいる発現ベクター中に直接クローニングすることができる。

10

【0094】

本発明による核酸分子はまた、形質転換動物、特にげっ歯類動物を作り出すために使用されてもよい。上記形質転換動物は本発明のさらなる態様を形成する。これは、体細胞の修飾により又は遺伝的修飾を取り込むための生殖細胞系療法により局所的に行われてもよい。上記形質転換動物は、本発明のペプチドの修飾因子として有効な薬物分子のための動物モデルの産生に特に有用であるかもしれない。

20

【0095】

宿主細胞

第5の態様では、本発明は、本発明の第4の態様のベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。本発明の宿主細胞は、本発明のベクターで形質転換、形質移入、又は形質導入されてもよいが、原核生物又は真核生物であってもよい。

【0096】

組換えペプチドの長期的で高収量の生産については、安定した発現が好ましいかもしれない。発現のための宿主として入手可能な適した哺乳動物細胞系の例は、当技術分野で知られており、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、HeLa、ベビーハムスター腎臓(BHK)、サル腎臓(COS)、C127、3T3、BHK、HEK293、ボウズ黒色腫(Bowes melanoma)、及びヒト肝細胞癌(たとえばHep G2)の細胞を含むが、これらに限定されない、米国菌培養収集所(the American Type Culture Collection)(ATCC)から入手可能な多くの不死化細胞系を含む。

30

【0097】

さらなる好ましい系はバキュロウイルス系である(とりわけ、Invitrogen社、サンディエゴCAからキット形態で市販されている)。これらの技術は、当業者に一般に知られており、Summers及びSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)に十分に記載される。この系での使用のための特に適した宿主細胞は、ショウジョウバエS2細胞及びスポドプテラSf9細胞等の昆虫細胞を含む。

40

【0098】

当技術分野で知られている多くの植物細胞培養系及び全植物遺伝子発現系がある。適した植物細胞遺伝子発現系の例は、US5,693,506、US5,659,122、及びUS5,608,143に記載される発現系を含む。植物細胞培養における遺伝子発現の付加的な例はZenk, (1991) Phytochemistry 30, 3861-3863により記載された。

【0099】

特に好ましい細菌宿主細胞の例は、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌、放線菌、及び枯草

50

菌の細胞を含む。菌類の発現に特に適した宿主細胞の例は、酵母細胞（たとえば *S. セレビス*）及びコウジカビ細胞を含む。

【0100】

発現の方法

本発明の第6の態様によれば、本発明の第1の態様の実施形態のうちの任意の1つによるペプチド、抗体、又は等価なリガンドを発現させる方法であって、本発明の第2又は第3の態様による核酸分子又は本発明の第4の態様によるベクターを宿主細胞中で発現させることを含む方法が提供される。

【0101】

疾患の治療

第7の態様では、本発明は、患者における疾患を治療する方法であって、本発明の第1の態様のペプチド、抗体、若しくは等価なリガンド又は本発明の第2若しくは第3の態様の核酸分子又は本発明の第4の態様のベクター又は本発明の第5の態様の宿主細胞を患者に投与することを含む方法を提供する。本発明のこの態様は、疾患の療法又は診断で使用するための、本発明の第1の態様のペプチド、抗体、又は等価なリガンド又は本発明の第2若しくは第3の態様の核酸分子又は本発明の第4の態様のベクター又は本発明の第5の態様の宿主細胞をさらに提供する。

【0102】

このように治療又は診断に適した疾患は、GPI連結エピトープに対する反応性を有する自己抗体の存在により特徴づけられ、これら抗体はまた、好ましくは、抗TCR V抗体、シグナリング能力を有する分子、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、及びカルジオリピン（ジアシルグリセロール）、並びにリン脂質グリカンを含むリン脂質、インスリン作用のセカンドメッセンジャー、一本鎖DNA及び二本鎖DNA、並びにGPI連結の要素におけるエピトープに対しても反応性である。これらの自己抗体は本出願人により同定されており、体内における上記抗体の存在は、老化関連疾患及び年齢関連疾患を速め、癌を促進し、遺伝的素因に基づくにせよ基づかないにせよ疾患の顕性を媒介し、且つ感染作用物質に対する第一線の防御を妨害すると考えられる。したがって、上記抗体の存在は、本発明による治療又は診断に適しているすべての疾患に共通した因子である。これらの状態の多くは、インスリン依存性真性糖尿病（IDDM）、インスリン非依存性真性糖尿病（NIDDM）、器官特異的若しくは器官非特異的自己免疫疾患、心血管疾患、癌性悪液質、並びに癌、又は抗リン脂質抗体及び/若しくは高インスリン血症及び/若しくは高グルカゴン血症及び/若しくはグルコース不耐性及び/若しくはインスリン抵抗性が存在する他の疾患の一般的な定義下に入る。これらの状態のいくつかは以下に記載される；しかしながら、これらの疾患は例として記載され、この記載は網羅的ではないことに注目すべきである。

【0103】

このように治療又は診断に適した疾患は、I型真性糖尿病、II型真性糖尿病、乾癬、湿疹、白斑、黒色表皮腫、円形脱毛症、アルツハイマー病、統合失調症、うつ病、パーキンソン病、片頭痛、多発性硬化症、重症筋無力症、筋萎縮性側索硬化症及び他の運動ニューロン障害、進行性核上性麻痺、ピック病及び他の神経変性疾患、甲状腺疾患、多発性内分泌腫瘍症2A型及び2B型、クッシング症候群、アジソン病、多嚢胞性卵巣症候群、性腺機能低下症、男性の早発性の禿頭症、肥満、X症候群、再発性の胎児の衰え、再発性の自然流産、再発性の血栓症、全身性エリテマトーデス、セリアック病、自己免疫胃疾患、炎症性腸疾患、関節リウマチ、強直性脊椎炎、喘息、嚢胞性線維症、骨粗鬆症及び骨減少症、扁平苔癬、白板症、再生不良性及び他の貧血、発作性夜間血色素尿症、睡眠時無呼吸、不眠、癌、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、感染、並びに免疫調節疾患を含むが、これらに限定されない。

【0104】

ヒト患者についての実験は、本発明によるペプチドが、経口グルコース耐性（実施例6を参照されたい）及び糖尿病患者における自己血糖調節（実施例7を参照されたい）を改

10

20

30

40

50

善するためにうまく使用することができることを示した。したがって、本発明による治療又は診断に適した疾患は、グルコース不耐性に関連する疾患（つまり、経口グルコース耐性試験における異常な応答に関連する）及び自己血糖調節の低下又は悪化に関連する疾患を含むが、これらに限定されない。

【0105】

治療に適した機構は、能動的に又は受動的に、問題の自己抗体を除去する又は自己抗体産生細胞を破壊のために標的にすることができる上記に記載されるペプチド又は同一の立体配置若しくは三次元構造を有する機能的に等価なリガンドの使用を含んでもよい。本発明のこの態様によれば、ペプチドは、1つずつ又は組み合わせで、単独で又はそれらペプチドの効力を促進するよう設計された作用物質と共に、リンカー要素及び担体を有する又は有していない一本鎖、二本鎖、又は複数鎖で使用されてもよい。治療の1つの機構は、これらの自己抗体に対する中和抗体を産生することによるものであって、産生された抗体が自己抗体に結合し、したがって、それら自己抗体の標的細胞又は標的分子の認識を予防する又は自己抗体と複合体を形成し、したがってそれら自己抗体の除去を支援する又はこれらの自己抗体の生産をオフにするためのものである。

10

【0106】

或いは、中和抗体又は等価なリガンドは受動的治療に使用されてもよく、そして、ポリクローナルの生産若しくはモノクローナル抗体の誘導をもたらす動物免疫化から又はヒトB細胞、ヒトモノクローナル抗体の不死化から又はライブラリのスクリーニングにより誘導することができる。上記抗体及び等価なリガンドの産生は上記に記載される。

20

【0107】

治療の他の方法は、クローン除去、アネルギー、サプレッサー細胞又はveto細胞の生成等の耐性誘発の原理を利用して、サプレッサー細胞、veto細胞、クローン除去、クローンアネルギー、又は関連する自己抗体の予防若しくは形成若しくは放出をもたらす他の機構を生成することとなる様式で自己抗体と反応する本発明のペプチド又は上記ペプチドの最小の反応性のユニット又はペプチド中和抗体を使用して、自己抗体が作製される及び/又は分泌されるのを予防してもよい。これらの方法は、自己抗体により又はこれらの自己抗体及びそれらの配列を代表するモノクローナル抗体及びそれらの断片により認識されるペプチドの使用を含んでもよい。自己抗体はまた、本発明のペプチドを含む競合的又は非競合的阻害因子により、自己抗体の標的に結合することが予防され得る。さらに、標的分子又は上記分子の最小の反応性のユニットは、プラスマフェレーシス型の手順において関連する自己抗体を選択的に除去するために、マトリックスに連結するために使用されてもよい。

30

【0108】

自己抗体はまた、細胞又は分子上の関連する標的部位に対する本発明のペプチド又は等価なリガンドの結合を予防するよう設計された競合的又は非競合的阻害因子により自己抗体の標的に結合することを予防され得る。

【0109】

ペプチド又はそれらのRNA誘導體及びcDNA誘導體又は効力を保有する変更体又は産物が本明細書中に記載される同一の作用機構を利用する他の配列は本明細書中において教示される状況において使用されてもよく、ワクチンとして適したベクターでパッケージ化されてもよい。

40

【0110】

本発明による治療又は診断に適した疾患は、より詳細に以下に記載される。

【0111】

I型及びII型真性糖尿病

I型糖尿病は、ヒト白血球抗原HLA DQ座に位置する強く関連する遺伝的素因を有している。90%を超えるI型糖尿病を有する患者は、素因になるようなDQ8及び/又はDQ2対立遺伝子を持つが、^(8,9)少数の敏感性の個体のみが臨床的な疾患に進行する。一卵性双生児においてでさえ、合致率はわずか50%である。⁽¹⁰⁾環境因子は

50

I型糖尿病の病原性において重要な役割を果たす。(11)

【0112】

症状発現前の期間中の膵島における細胞に対する損傷は、糖尿病に関連する自己抗体の発生により特徴づけられる。最も研究された抗体は、インスリン(I A A)、(12)グルタミン酸デカルボキシラーゼ(G A D A)に対するもの、(13)タンパク質チロシンホスファターゼ関連I A - 2分子に対する抗体(14)、及び細胞質内島細胞抗体である。(15)

【0113】

遺伝的敏感性を有する年齢が3か月から2歳までの小児における上記に命名された糖尿病関連抗体の出現に関する最近報告されたフィンランドの研究は、セロコンバージョンが6か月の年齢から着実に増加し、セロコンバージョンが秋及び冬の月に春及び夏と比較して著しくより高度な比率で出現したことを明らかにした。自己抗体の上昇及び糖尿病の診断におけるこの季節変動は、これらの月の間の圧倒的多数の感染に起因すると考えられた。(9)この研究において小児で検出された第1の自己抗体はインスリン(I A A)に対するものであり、これは、著者に、インスリンが自己免疫性I型糖尿病のほとんどの症例における主要な自己抗原である可能性があるという結論づけるよう導いた。この仮説のために提示された知見は、インスリンは、唯一の知られている真の細胞特異的自己抗原であること、第2に、I A Aは、新たに診断されたI型糖尿病を有する小児に非常に共通していること、及び、第3に、I型糖尿病は、インスリン反応性T細胞により実験的に転移させることができるということである。(16, 17)

【0114】

抗インスリン反応性の発達は抗原模倣によるためであると仮定された；しかしながら、感染作用物質及びインスリン反応性を抗原性的に関連づける実験データは現在までない。I型糖尿病の診断に先行する又は新たに診断されたI型糖尿病患者において注目される重要な知見は、この疾患の因果関係に関する概念の明確化という点で無視された。上記知見は、診断に先立つ、細胞に対するストレスを示す、免疫反応性インスリンに対するプロインスリンの比の増加並びに新たに診断されたI型糖尿病患者における末梢インスリン抵抗性及びグルカゴン等の逆調節ホルモンの分泌における機能不全である。(18-20)これらの知見は、ついにはI型糖尿病患者における細胞の死となる進行中の疾患プロセスを実証する。インスリンに対するプロインスリン比の上昇、インスリン抵抗性、及びグルカゴン分泌の障害性プロファイルといった同一の異常はまたII型糖尿病にも当てはまる。(21, 22)さらに、両疾患は、合併症についての類似するプロファイルを有している。

【0115】

前糖尿病性及び後糖尿病性の現象を包含する、I型及びII型糖尿病の両方の誘発についての統一された仮説は、広域スペクトルの交差反応性特異性を有する新たに同定された自己抗体に基づき提示された。この自己抗体の重要な特異性は、その誘導を示すが、T C R V 鎖に対する抗体に対して反応性である。モノクローナル抗T C R V 抗体に対して生産されたモノクローナル抗体は、類似する特異性の自己抗体の可能性として考えられる影響の指標として使用された。抗T C R V 試薬に対して産生された上記モノクローナルは、in vitroでヒト膵島からのインスリン分泌を調節不全にする能力を有し、分泌減退が後に続く分泌過多のサイクルを島細胞が分泌を停止するまで引き起こした。

【0116】

抗T C R V 抗体に対して産生されたモノクローナルは、ヒトgt11 cDNAライブラリ及びGP-2タンパク質(グリコシルホスファチジルイノシトール(G P I)連結分子)、セクレトグラニンI(接着性タンパク質、N末端ジスルフィド結合ループペプチドを介して膜に結合するセリンリン酸化チロシン硫酸化O-グリコシル化ダブレット)、ラミニン結合タンパク質(転移に関連する67kDの脂肪酸アシル化接着性タンパク質)、特にE S R P I(新たに同定された、N末端ジスルフィド結合分子)をコードした

10

20

30

40

50

同定されたクローンをスクリーニングするために使用された。これらの分子はシグナリング特性を有している。

【0117】

モノクローナル抗体により、ヒト島細胞、甲状腺、副腎、胃、消化管、並びに筋肉及び結合組織等の他の組織を含む多くの他の内分泌器官における細胞が強度に染色された。モノクローナル抗体生産クローンは、抗TCRVモノクローナル試薬及びリン脂質の指標として使用されたカルジオリピンに対するスクリーニングにより選択された。上記交差反応性特異性を有するクローンからの上澄液もまた、ホスファチジルイノシトール及びホスファチジルセリン等の他の陰イオン性リン脂質と反応することが示された；上澄液はまた、一本鎖DNA及び二本鎖DNAとも反応した。

10

【0118】

抗TCRV試薬と反応する自己抗体は上記のような同一の交差反応性をさらに有しており、したがって、類似する特異性のモノクローナル抗体について実証されるように調節不全インスリン分泌の原因となることが仮定される。これらの抗体がインスリン分泌を調節不全にする機構は、グルカゴン分泌の増加をもたらす細胞の調節不全により引き起こされた、インスリンを分泌するよう細胞にかけられる圧力の増加によるものと仮定される。インスリン分泌に対するグルカゴンの影響の強化はよく知られている。分離細胞によるインスリンの分泌は、グルカゴン、細胞、又はcAMPの追加により増幅する。(6)自己抗体は、GPI連結のイノシトールホスホグリカン部分に結合することにより、インスリン活性化ホスホリパーゼによるそれら部分の開裂を予防し、その結果として、それら部分のシグナリング特性に影響を与え得る。上記分子のシグナリング特性は十分に記載された。(5, 23)ホスホイノシトールグリカンに結合する同一の能力により、自己抗体は、インスリン作用の媒介物を掃討し、その結果として、インスリン抵抗性又は障害性インスリン作用を引き起こし得る。イノシトールホスホグリカンの不適当な産生/放出はインスリン抵抗性のヒトにおいて実証された。(24)

20

【0119】

乾癬

乾癬は糖尿病に関連する疾患である；(25, 26)標準体重又は過体重を有する、遺伝性糖尿病の素因を有していない乾癬患者はインスリン抵抗性である。(27)正常な血漿グルコースを有する乾癬対象は、2時間OGTTの間、対照と比較して著しく高度なインスリンレベルを有していた。(28)同一の研究では、15分間静脈インスリン耐性試験の間のグルコース消失率により、対照と比較した乾癬のインスリン抵抗性の状況が実証された。高度な値のコレステロール、トリグリセリド、及びHDLコレステロールの低下は、高インスリン血症及びインスリン抵抗性に関連する異脂肪血症に付きものの乾癬において実証された。(29)ホスホリパーゼC/タンパク質キナーゼシグナル伝達系の活性化過剰もまた乾癬において報告され、乾癬皮膚におけるGPI連結型分子の予想された低減及び乾癬病変におけるそれら分子の事実上の消失をもたらした。(30)

30

【0120】

湿疹

グルコース耐性は湿疹を有する患者において障害性である。著しいレベルのグルコース不耐性を実証する静脈グルコース耐性試験により39人の患者を研究した。(31)

40

【0121】

白斑

白斑は、大多数の症例においてメラニン形成細胞の低下に対応する後天性メラニン減少症である。表皮の基底層中に位置するメラニン形成細胞は、メラニンを生産し、メラノソームと呼ばれる細胞器官を含むが、ケラチン生成細胞はまた、メラニン形成細胞に対する抗酸化分子及びメラニンの合成における補因子を提供することにより関わっている。(32)

【0122】

白斑は、母集団の1%に生じるが、IDDM患者の9%に生じる。(33)白斑はまた

50

、自己免疫性甲状腺炎、悪性貧血、血小板減少症等のような他の自己免疫障害と共存する。

【0123】

皮膚色素沈着に影響を与える因子の1つは、アルファメラニン細胞刺激ホルモン（ α -MSH）である。 α -MSHのその受容体に対する結合はチロシナーゼ活性及び真正メラニン生産を増加させる。⁽³⁴⁾ α -MSHの生産はインスリンレベルにより影響され、インスリン抵抗性、空腹時インスリンレベル、及び肥満度指数と直接相互に関連する。⁽³⁵⁾ α -MSHの影響下でのメラノソームはメラニン形成細胞からエキソサイトーシスにより放出され、ケラチン生成細胞中に糸状仮足によって転移される。^(36, 37) しかしながら、白斑の皮膚中に生存するメラニン形成細胞はプレメラノソームを異所的に脱落させることが示され⁽³⁸⁾、これは、メラノソーム成熟及びエキソサイトーシスの調節が白斑において異常であることを示す。プレメラノソームの脱落は、前IDDM⁽¹⁸⁾及び前NIDDM⁽²¹⁾の高プロインスリン血症（hyperproinsulinaemia）と並列し、糖尿病における α -細胞ストレスと類似している。

10

【0124】

形質転換成長因子1（TGF β 1）はまた、チロシナーゼをダウンレギュレートすることによるメラニン形成における役割を有し、その結果として、色素沈着低下を引き起こす。⁽³⁹⁾ TGF β 1はまた、メラノソームの数における α -MSH誘発性の増加をブロックする。TGF β 1は、糖尿病誘発性の状況において蔓延している高グルコース状態においてアップレギュレートされる⁽⁴⁰⁾。TGF β 1はまた、メラニン形成細胞に対して補因子を提供するケラチン生成細胞に対して深刻な影響を与える。ケラチン生成細胞は、それらの表面上にTGF β 1結合受容体を有しており、TGF β 1結合タンパク質は150kDaのGPI連結型分子である。この分子に対する抗体は、すべてのTGF β 1結合タンパク質と複合体を形成することが示され、これは、150kDa GPI連結型受容体が他のTGF β 1受容体とヘテロマー複合体を形成することを実証する。ケラチン生成細胞は、それらの受容体をダウンレギュレートし、DNA合成を阻害することにより、TGF β 1ベータに応答する。⁽⁴¹⁾したがって、上記シグナリング分子のGPI連結に対する自己抗体は、ケラチン生成細胞が正常に機能するのに必要なシグナリング事象を崩壊し得る。

20

【0125】

白斑の病変及び病変周囲の両方の皮膚の表皮では、膜補因子タンパク質及び解離促進因子CD59の発現は、非病変の皮膚においてよりも低度である。CD59は、自己補体溶解を防止するGPI連結型分子であり、CD59の非存在又はダウンレギュレーション（本明細書中に記載される自己抗体による）は、白斑における抗メラニン形成細胞及び補体媒介性のメラニン形成細胞の破壊と関連する可能性がある。⁽⁴²⁾

30

【0126】

黒色表皮腫

白斑及び黒色表皮腫はIDDM及びNIDDMと類似しており、黒色表皮腫は色素沈着過剰の状況であり（NIDDMの高インスリン血症と類似）、白斑は色素沈着低下の状況である（IDDMの低インスリン血症と類似）。遺伝因子により、高インスリン血症及びインスリン抵抗性を引き起こす基本的な因子により両方とも引き起こされる両方のこれらの症状の状況が説明される。インスリンの増加による α -MSHの増加等のストレス因子に遺伝的に敏感性のメラニン形成細胞は死に得る又はメラニン形成を低減し得るが、敏感性の遺伝的欠如は色素沈着過剰を引き起こし得る。

40

【0127】

黒色表皮腫を有する患者は、高度な有病率で、異常なグルコース耐性及び高インスリン血症を有している。⁽⁴³⁾ 肥満の青年における黒色表皮腫もまた、頻繁に、高インスリン血症及びインスリン抵抗性に関連する。⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ 8~15歳の102,733人のスクリーニングされた小児について報告されたデータは、14.4%が黒色表皮腫を有していることを示した。インスリン抵抗性及び高インスリン血症を低減するための手段は

50

、この状態を改善するために重要と考えられる。(47)

【0128】

皮膚

老化する皮膚は、エラスターゼ活性の増加、マトリックスメタロプロテイナーゼの発現の増加、及びコレステラーゼ合成における異常と相互に関連する。(48-50) GPI 連結型プロテオグリカングリピカンは、ケラチン生成細胞の細胞周囲の領域に存在し、増殖因子利用能を調節し、マトリックス受容体として作用する。(51) GPI 連結型ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体、uPAR もまた、ケラチン生成細胞上に存在し、ケラチン生成細胞により分泌された uPA に結合する。ウロキナーゼ系の活性化は、創傷治癒の間及び自己免疫性の水疱形成皮膚病である天疱瘡において観察された。紫外線 B はこの系を活性化し、その結果は 36 時間まで延長される。(52) uPAR が、GPI 連結の要素に対する抗体により危険にさらされる場合に引き起こされ得る損傷は、関節炎及び関連する疾患の下で記載された。エラスターゼ及びマトリックスメタロプロテイナーゼ発現に対するインスリンの影響はよく知られている。(53, 54) 本発明の抗体は、年齢、UV、及び自己免疫に関連する皮膚状態の促進において並びに遅延性創傷治癒においても役割を有すると考えられる。

10

【0129】

円形脱毛症

これは、50 歳までの母集団の約 1% に影響を与える、疑われる自己免疫性の状態である。最大の発生は小児及び若年成人においてである。(55) 円形脱毛症は、様々なアトピー性の及び自己免疫性の状態と関連する。真性糖尿病は、患者の間では増加しないが、親類の間で非常に増加する。(56-58) 早期発病の脱毛症の男性における研究によりインスリン抵抗性との関連が明らかにされた。(59)

20

【0130】

その様々な形態における脱毛症は遺伝的に敏感性の個体におけるインスリン抵抗性の他の顕性化であり、本発明が含む疾患のスペクトルの一部であると提唱される。

【0131】

アルツハイマー病

アルツハイマー病は、インスリン抵抗性及び異常なグルコース耐性の特徴と関連する。アポリポタンパク質 E4 対立遺伝子を有していない 532 人の非糖尿病対象では、アルツハイマー病の罹患率は、正常インスリン性の (normoinsulinaemic) 対象における 1.4% と比較して、高インスリン性の対象では 7.5% であった。(60)

30

【0132】

遊離アミノ基に対する還元糖の非酵素的共有結合的付加により形成された進行性糖化最終産物 (AGE) は、老化の間に且つ真性糖尿病において加速度的な速度で生じる。AGE は、影響を与えられた分子の物理化学的特性を変化させ、糖尿病合併症及びアルツハイマー病の一因となる細胞シグナリング及び遺伝子発現を誘発する。(61)

【0133】

アルツハイマー病及び II 型糖尿病の両方は、アミロイドタンパク質；膵島中の島アミロイドポリペプチド (アミリン) 及びアルツハイマー病における脳中のアミロイドベータタンパク質の沈着と関連する。アミリン及びアミロイドベータタンパク質の両方はインスリン分解酵素 (IDE) により正常に分解される。IDE によるこれらの両方のアミロイドタンパク質の不完全な分解は共通の病原性機構を示す。(62, 63) GPI 連結によって連結したタンパク質はまた、アルツハイマー病における神経変性の一因となる可能性がある。補体防御タンパク質 CD59 は、アルツハイマー病患者の前頭皮質及び海馬において、非痴呆高齢患者と比較して著しく減少する。PIPLC により、アルツハイマー病大脳皮質の切片から放出された CD59 は、非痴呆患者から放出されるよりも著しく少ない。アミロイドベータタンパク質は、CD59 をダウンレギュレートすることがわかった。(64) GPI 連結に対する自己抗体は、ダウンレギュレーションを引き起こし、補体溶解に対するニューロンの感受性を増加する可能性がある。

40

50

【0134】

他のGPI連結型タンパク質は、辺縁系構造と関連する脳中の成人ニューロンの部分母集団の細胞体及び樹状突起中に発現する辺縁系関連膜タンパク質(LAMP)である。大脳皮質内では、Lamp転写物は、学習及び記憶に関連するエリアにおいてより豊富であり、古典的に辺縁系であると考えられた前脳及び間脳のエリアにおいて極度に発現し、非辺縁系、中央、及び後脳の領域においては低密度に発現する。Lamp転写物は、in situハイブリダイゼーション技術により成人脳中に存在することが示された。(65)抗GPI自己抗体によるこれらのLAMP分子のダウンレギュレーション又は調節不全は、アルツハイマー病又は学習及び記憶に関わる他の年齢関連精神的無能力における認知機能の低下と関連し得る。

10

【0135】

GPI連結型(アスパラギン酸プロテイナーゼ)リソソーム酵素であるカテプシンD(66)もまた、アルツハイマー病における役割を有している可能性がある。カテプシンDは、アルツハイマー病患者の前頭皮質において、非アルツハイマー病対照と比較してダウンレギュレートされるように思われる。(67)この酵素が欠乏したマウスにおけるカテプシンDの欠乏のいくつかの影響は、ニューロンのセロイドリポフスチンの深刻な蓄積、腸管粘膜及びリンパ器官の萎縮であることがわかり、これは、カテプシンDが組織恒常性に必須であることを示唆する。(68)

【0136】

GPI連結型分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)は、基底膜及び細胞膜上に遍在的に存在し、アルツハイマー病に関わることが示された。上記HSPGの1つ、グリピカン-1は、脳アミロイド血管症及びアルツハイマー病において豊富に発現する。(69)HSPGは、アルツハイマー病患者の脳における神経炎斑及びコンゴ好染血管障害において存在するアミロイド線維に局在した。HSPGはまた初期班においても実証され、これは、HSPGが、班発達の早期の段階において役割を有していることを示唆する。(70)HSPGは、脳中の血管の完全性に寄与する、脳からの過剰コレステロールの除去の際にHDL及びApo Eと相互作用する(71)。老人斑は、毛細血管の近傍において頻繁に見られ、血液脳関門の破綻が班形成の前提条件である可能性があることを示唆する。(72)血管損傷は、アルツハイマー病における重要な病原性因子であり、本発明に記載される病原性の抗体の役割と一致する。

20

30

【0137】

最終的に、老化する脳において変化したグルコース/エネルギー代謝並びにII型糖尿病におけるようなニューロンのインスリン受容体の脱感作(インスリン抵抗性)並びにシグナリング分子及び神経向性分子の調節不全はともに、アルツハイマー病において影響を与えられたニューロンにおけるアミロイド形成的カスケード並びに高リン酸化タウタンパク質並びに神経原線維変化の発達の一因となる。

【0138】

統合失調症とうつ病

統合失調症は、インスリン抵抗性に関連する脳中のグルコース代謝における異常による「セレブロース尿症」として記載された。(73, 74)グルコース不耐性及びII型糖尿病の両方は、この群において、正常な母集団においてよりも共通している(The British Journal of Psychiatry (2004) 184: s112-S114) (Diabetes Care 28: 1063-1067, 2005)。そう病及び陽性統合失調症は、高血糖、高ドーパミン失調(hyperdopaminergia)、及び高セロトニン失調(hyperserotonergia)と関連し、一方、うつ病及び陰性統合失調症は、低血糖、低ドーパミン失調(hypodopaminergia)、及び低セロトニン失調(hyposerotonergia)と関連する。これらの2つの状況は疾患のスペクトルの両端にある。(74)内因性うつ病を有する患者の約50%において、インスリン抵抗性及び疾病の期間の間に正の相関がある。上記患者はまた、コルチゾールを過剰に分泌する。(75)

40

50

【0139】

パーキンソン病

パーキンソン病（PD）は、黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの70～80%の進行性の低下により特徴づけられる。（76）ニューロンの変性は、高度なレベルのドーパミンによる酸化ストレスによるものと考えられる。（76）PD患者からの死後の脳組織の研究により、ニューロン集団における酸化ストレスの増加及び障害性グルコース取込みの証拠が提供された。（77）

【0140】

50%～80%のPD患者は異常なグルコース耐性を有していることが報告された。（78）この結果として高血糖となり、結果的に高インスリン血症となる。インスリンは、ニューロン代謝及びシグナル伝導における高度な調節の役割を有していることで知られている。ラットにインスリンの量を増加しながら注射するとドーパミン分泌の増加がもたらされることが示された。（79）さらに、インスリンはドーパミン輸送体の合成及び活性を調節することが実証され、（80）インスリン鎖のC末端からのノナペプチドは、ラットドーパミン輸送体によるドーパミン取込みを強く阻害することがわかった。（81）上記輸送体分子は、シナプス間隙から神経伝達物質を一掃することによりドーパミン作動性シグナリングを終結させる。ドーパミン自体は、肝細胞から直接グルコースを放出することにより高血糖を生じさせることで知られている。（82）これは、PD患者における異常なグルコース耐性の一因となり得る。

【0141】

脳由来の及びグリア細胞系由来の神経栄養因子は、PDにおいて変性するドーパミン作動性ニューロン並びに筋萎縮性側索硬化症、睡眠障害、統合失調症、及びアルツハイマー病を含む他の神経学的障害において変性する他の交感ニューロン、感覚ニューロン及び中枢神経系ニューロンに対する強力な生存因子であることが示された。in vitro系では、グリア細胞由来の神経栄養因子（GDNF）は、ドーパミン誘発性の細胞死を60～70%低減した。（83）

【0142】

ニューロニン（NTN）と呼ばれる構造的に関連するポリペプチドもまた、ドーパミン作動性ニューロン、運動ニューロン、交感ニューロン、及び感覚ニューロンに対する強力な生存因子であることが示された。GDNFに対する受容体（GDNFR-）及びNTNに対する受容体（NTNR-）の両方は、膜貫通型チロシンキナーゼ受容体Retを共有するGPI連結型タンパク質である。（84）これらの受容体タンパク質のGPI連結要素に対する自己抗体は、受容体タンパク質のシグナリング活性を不活性化し、その結果として、それらの神経栄養能力を排除し得る。

【0143】

片頭痛

抗リン脂質抗体及び異常なグルコース調節は片頭痛において注目された。（85，86）

【0144】

多発性硬化症

他の自己免疫障害とのMSの関連を決定するための、MS診療からの357人の続発性MS患者の研究では、15.4%の患者は、MS及び他の自己免疫疾患を有する第1親等の親類を有することがわかった。グレーブス病、関節リウマチ、白斑、1型インスリン依存性真性糖尿病、及びブドウ膜炎は、MSと関連する最も共通の自己免疫障害であった。（87）

【0145】

糖尿病患者及びMS患者からの自己反応性T細胞は、古典的な島及びCNS自己抗原の両方に応答した。38人のMS患者の約90%は、T細胞増殖アッセイにおいてミエリン塩基性タンパク質（MPB）に応答した。プロインスリン及びIA-2島細胞自己抗原に対する応答は糖尿病とほぼ同じくらい共通しており、MPB応答と同一の大きさを有して

10

20

30

40

50

いた。(88)これらの応答は対照ではまれであった。54人の新たに診断された糖尿病小児のT細胞応答の研究により、53%がMPBに反応することが示された。(88)これらの重複するT細胞応答は、臨床的な第2の疾患を示さなかったが、両方の疾患に対する共通の機構を非常に示唆するものである。

【0146】

MS患者は、空腹時低血糖に対する敏感性が増加しており、これは、グルカゴン及びホルチゾールに関わるグルコース逆調節応答が損なわれたことを示す。(89)高プロインスリン血症の機構はすでに記載されており、MS患者がプロインスリンに対するT細胞応答を有するという事実は、無症状の細胞損傷がMS患者において蔓延していることを示す。抗TCR V及びGPI連結型分子を認識する同一の自己抗体は、膵臓細胞の調節不全を介した細胞損傷及び希突起膠細胞成熟の間にミエリン鞘に局在化するGPIアンカータンパク質を介したミエリン鞘に対する損傷を引き起こし得る。(90)

10

【0147】

重症筋無力症

重症筋無力症(MG)は、自己免疫性多腺性症候群I型及びII型の構成疾患であることが報告された。(91,92)アセチルコリン受容体(ACHR)及びアセチルコリンエステラーゼに対する抗体は、MGの病原性における役割を有すると考えられる。(93,94)しかしながら、これらの抗体に対して血清陰性である、全身性MGを有する患者がおり、その他の自己抗体又は因子が疾患誘発に関わることを示す。全身性MGでは、DNA自己抗体のレベルの増加が報告され(95)、高度なレベルのループス抗凝固因子抗体もまたMG患者において注目された。(96)

20

【0148】

MGは、ACHRに対するアセチルコリン(ACM)の結合に関わる神経筋接合部の疾患である。アセチルコリンエステラーゼはアセチルコリンを分解し、したがって、新たな作業及びシグナル伝導のために受容体を遊離する。ACH及びアセチルコリンエステラーゼの両方は、インスリン及びグルコースのレベルによる調節に敏感性である。インスリン誘発性の低血糖は、ラット脳におけるアセチルコリンエステラーゼ活性の著しい減少を引き起こすことが報告された。(97)高血糖性ラット脳では、アセチルコリンレベルは低減した；インスリンはこれらのレベルを増加させた。(98)糖尿病ラットでは、アセチルコリン受容体の脱感作もまた増強される。(99)

30

【0149】

本発明の見解から、シグナリング分子、DNA、及びリン脂質を認識する自己抗体は、グルコース代謝及びシグナリング分子の調節不全による、MGにおける神経筋異常の原因である。アセチルコリンエステラーゼは、GPI連結型であり(100)、これらの分子により調節不全となつて、ACHのレベルの増加をもたらし、したがって、ACH受容体を損傷する可能性がある。線毛神経栄養因子受容体(GPI連結型でもある)の発現は、糖尿病性ニューロパシーに関わることが示された。(101)この受容体は、血清陽性MG患者の筋肉において減少し(102)、MG及び糖尿病性ニューロパシーの間の原因の類似性を示す。

40

【0150】

筋萎縮性側索硬化症、運動性ニューロン、及び関連疾患

かなりの割合の、筋萎縮性側索硬化症(ALS)を有するの患者はグルコース不耐性である。しかしながら、これは、一次的代謝異常又は筋萎縮に対する二次的なものかどうかという論議があった。ALS患者及び疾患に対する2つの対照群における正常血糖インスリンクランプ研究並びに体重により、インスリン感受性が、ALSにおいて、両対照群と比較して小さくなることが明らかにされた(103)。異常な血漿グルカゴンレベルもまたALS患者において対照と比較して実証された。2つの試験食を1週間ずらして与えられた患者は、対照と比較して、空腹時並びに食後の1/2時間及び2時間で高グルカゴン性(hyperglucagonaemic)であることが示された。(104)多くのALS患者は、II型真性糖尿病の特徴を有することが報告された。(105)

50

【0151】

糖尿病の慢性的な合併症に係る進行性糖化最終産物 (AGE) はまた、進行性核上性麻痺、ピック病、グアム島の筋萎縮性側索硬化症 / パーキンソン認知症複合等の神経変性疾患の病原性に役割を果たすことが報告された。(106) 運動ニューロンの生存及び成長は神経栄養因子に依存することで知られている。インスリン様成長因子 1 (IGF-1) 及びグリア細胞由来の神経栄養因子 (GDNF) は運動ニューロンのための強力な神経栄養 / 生存因子である。(107) 栄養因子の欠如は、成人ニューロンの変性をもたらすと思われる。ALS 患者においていくつかの IGF 結合タンパク質の増加は見つかったが、血清 IGF-1 及びインスリンレベルは著しく低減した(108)。したがって、グルコース / インスリン / グルカゴン代謝の改善は、運動ニューロンの生存及び成長に対してかなりの価値となるであろう。

10

【0152】

インスリン及び IGF-1 以外に、GDNF 及びニューロトロフィンもまた、ニューロンの生存に強力な影響を有している。GDNF は、*in vivo* 及び *in vitro* での運動ニューロンの生存を促進し、細胞死からそれら運動ニューロンを救出する。GDNF は、ヒトの骨格筋、特に神経筋接合部において最も高度に発現する。GDNF はまた、末梢神経の軸索及び周囲のシュワン細胞内に検出された。(109) GDNF 受容体、GFR-1 は、免疫組織学により有髄末梢神経及び神経筋接合部に局在した。RT-PCR による分析もまた、GFR-1 の mRNA が骨格筋中ではなく脊髄の前角中に存在したことを示したが、これは、この分子が神経筋接合部での GDNF の取込み及び内部移行に主要な役割を果たすことを示唆する。(110) GDNF に関連する神経栄養因子であるニューロトロフィンはその受容体 GFR-2 に結合し、ニューロンの生存も支持する。(111) GDNF ファミリーのリガンドに結合する、これまで同定されたすべての GFR-1 ~ 4 の受容体は、GPI 連結型であり、Src ファミリーキナーゼのメンバーとの Ret 相互作用を介するシグナルであり、これは、神経突起の生長及び生存に必要である。(112)

20

【0153】

遺伝因子は神経変性に関わり、非 MHC 遺伝子が関係した。(113) したがって、遺伝的に危険にさらされた個体では、抗 GPI 連結要素抗体は、神経細胞生存を予防するために GPI 連結型分子のシグナリングを十分に变化させ得ることが予想される。

30

【0154】

甲状腺疾患

甲状腺疾患は、グレース病で見つかるような分泌過多から橋本甲状腺炎における分泌減退までの状態のスペクトルを含む。甲状腺疾患の発生は、糖尿病患者間で著しく増加する。1310 人の糖尿病成人のランダムに選択された群では、甲状腺疾患は、遊離チロキシン及び甲状腺刺激ホルモン (TSH) の濃度の測定により評価された。最大有病率は 13.4% であり、最高レベルは I 型糖尿病女性における 31.4% であった。(114)

【0155】

甲状腺ホルモンの合成及び分泌におけるステップは TSH により調節される。この調節機能は、イノシトールホスホグリカン (IPG) セカンドメッセンジャーを介するシグナリングに関わる。TSH は、IPG の極性頭部の遊離を刺激する。この可溶性 IPG は、甲状腺細胞におけるヨウ素代謝を調節することが示された。(115) ブタ甲状腺細胞から単離された IPG は、線維芽細胞及びブタ甲状腺細胞の増殖を誘発する。(116)

40

【0156】

甲状腺細胞は、頂端及び側底の両方に分布する GPI 連結型分子に富む。(117) HSPG 等のいくつかの GPI 連結型分子は、甲状腺細胞の濾胞腔から側底膜までのサイログロブリン (Tg) の輸送に関わり、側底膜から Tg は血流へ放出される。サイログロブリンは、メガリン結合部位と機能的に関連する部位を介して表面 HSPG と相互作用する。メガリンは、HSPG 結合 Tg を上皮細胞を介して輸送する低密度リポタンパク質エンドサイトーシス受容体である。(118, 119)

50

【0157】

HSPG及び他の基底膜構成要素に関わる免疫組織化学的研究は、橋本甲状腺炎において、硝子化索状腺腫、乳頭癌及び未分化癌、並びに甲状腺疾患の他の組織病理学的変異体において病理学的な基底膜変化を明らかにした。(120) GPI連結型分子(GFR 1~4)のファミリーは、グリア細胞系由来の神経栄養因子(GDNF)に対する受容体である。これらの分子は、正常な腫瘍及び甲状腺腫瘍中、多発性内分泌腫瘍症2A型及び2B型として集合的に知られている甲状腺髄様癌(GFR 4)、褐色細胞種、副甲状腺過形成、腸神経節細胞腫症、骨格異常、及び粘膜神経腫中に存在する。(121)

【0158】

クッシング症候群とアジソン病

クッシング病は、グルコース不耐性、糖尿病、中心性肥満、多毛、及び動脈血圧の上昇と通常関連する。主な診断の特徴は、20~40%の患者における長年のACTH分泌過多に起因する可能性がある高コルチゾール血症である；(122)これは、下垂体腺腫の非存在下で生じ得、コルチゾール分泌の増加は、自律的に分泌する微小結節又は巨大結節を伴う又は伴わない、片側の又は両側の副腎過形成によるものとする事ができる。(123)

10

【0159】

肥満及び糖尿病を有する90人の患者についての最近の横断的研究では、クッシング症候群の有病率は3.3%であることが報告された。(124)制御不良の糖尿病として存在する、クッシングの症状発現前の及び無症状の症例は、この数値をかなり増大させる。類似したやり方で、軽度の慢性的な高コルチゾール血症は、空腹時コルチゾール及び尿中遊離コルチゾールの上昇並びにヒツジコルチコトリピン放出ホルモンに対する応答の増加により反映されたI型糖尿病において報告された。(125)

20

【0160】

ACTH分泌過多は、下垂体腺腫非存在下では生じ得るが、高コルチゾール血症(hypercortisolemia)存在下では生じ得て、(126)これは、正常な負のフィードバック制御の調節不全を示唆する。いくつかの報告は、GPI連結型分子及びホスホリパーゼCの活性化により放出されたイノシトールホスホグリカンの、下垂体ホルモン分泌及びイノシトールホスホグリカンが刺激する、副腎、甲状腺、性腺等からのホルモンの分泌の両方の調節における役割を示す。(127-129)したがって、本明細書中に記載される自己抗体は、GPI連結型分子に対する抗体が活性化シグナルに対する阻害入力低下を引き起こすことにより細胞増殖を誘発することも示されたように、ホルモンのパルス状分泌の破壊から分泌の阻害又は悪化及び腫瘍の形成までの病原性の影響を有しているだろうということが予想される。(130, 131)

30

【0161】

アジソン病もまた、インスリン依存性真性糖尿病、白斑、脱毛症、悪性貧血、セリアック病、重症筋無力症、及び原発性性腺機能低下症を発症する危険性が増加した自己免疫性多腺性症候群IIの構成疾患である。(91)クッシング症候群及びアジソン病は、ともに、自己抗体に起因する内分泌過剰刺激の予後の他の例を提供する。頑強な内分泌腺は過剰分泌し続けるだろうが、遺伝的に損なわれた腺は衰えて、分泌減退が予後となるだろう。

40

【0162】

PCOS、性腺機能低下症、及び男性における早発性禿頭症

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)は、女性における高アンドロゲン症の95%を占め、多毛、座瘡、中心性肥満、男性型禿頭症、及び他の物理的な男性化する変化により通常顕性となる。PCOS以外の鑑別診断は、クッシング症候群並びにアンドロゲン生産性の卵巣新生物及び副腎新生物を含む。アンドロゲンの障害は最も共通した内分泌病であり、10~20%の女性に影響を与えている。(132)

【0163】

高アンドロゲン症は、卵巣又は副腎が起源となり得るステロイド合成の全身性調節不全

50

から起こる。この調節不全は、ホルモン作用を制御する中枢因子及び末梢因子の両方の調節から起こると思われる。GnRH及びLHの増加並びに不十分なFSHは、PCOSにおける慢性的な無排卵につながる誘起因子である。(133)しかしながら、高インスリン血症は、遺伝的に損なわれた個体におけるステロイド合成の調節において潜伏性の異常の引き金となることに重要な役割を有していると思われる。男性型禿頭症では、損なわれた女性及び男性の両方において、インスリンは、アンドロゲンと相互作用し、毛包及び関連する皮脂腺の発達を調節する。(134)

【0164】

PCOSを有する対象の男性及び女性の家族のメンバーにおいてインスリン分泌の障害を検査するための5つの家族についての研究では、高インスリン血症は、24人の女性の家族のメンバーの69%において見付き、そのうちの79%はPCOSを有していた。8人の男性メンバーの中で、88%は早発性禿頭症を有していた。(135)

10

【0165】

PCOSにおける高インスリン血症は、グルコース不耐性、空腹時インスリンレベルの増加、及びインスリン抵抗性と関連する。アテローム生成脂質プロファイルもまた存在する可能性がある。PCOS患者は、II型糖尿病及び心血管疾患の発生の増加を示す。(136)

【0166】

インスリン抵抗性の女性における高アンドロゲン症は、卵巢ステロイドホルモン生産に対するインスリンの刺激性の影響によるものと思われる。インスリン及びインスリン様成長因子1(IGF-1)は、卵巢細胞における重要なステロイド調節遺伝子の発現の増強により、性腺刺激ホルモン刺激性のステロイド合成を増幅することができる。(137)インスリン及びIGF-1はまた黄体形成ホルモンとも相乗的に作用して、副腎におけるシトクロムP450c17の活性を増加させる。インスリンは、培養ヒト顆粒膜細胞からのIGF-1結合タンパク質(IGFBP-1)生産の阻害を誘発する。(138)IGF-1レベル及び顆粒膜細胞上のIGF-1受容体の低下はステロイド芳香化を低減する。(139)高インスリン血症による莢膜細胞におけるステロイド合成の増加を含む他の因子の中でも、アンドロステジオン及びテストステロンのエストロン及びエストラジオールへの非効率的な芳香化は循環における過剰な遊離アンドロゲンホルモンにつながる。さらに、インスリンで培養した卵巢細胞では、プロゲステロン濃度は、対照と比較して、 $2.5 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$ から $5.4 \pm 0.3 \text{ mg/ml}$ まで劇的に増加した。このホルモンは、下垂体前葉からのLH及びFSHの分泌を刺激する性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)のための視床下部パルス発生装置とのフィードバック関係を有している。逆に、低性腺刺激ホルモン性性腺機能低下症を有する患者は障害性インスリン感受性を有している。(140)

20

30

【0167】

インスリンがその調節の役割を発揮する多数の過程以外に、GPI連結型分子もまた排卵プロセスに関わる。顆粒膜細胞は、GPI連結型であるヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)に富んでいる。標識実験は、細胞表面上のヘパラン硫酸プロテオグリカンの20~30%がGPI連結型であり、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリラーゼCにより除去されたことを実証した。(141)濾胞刺激ホルモン(FSH)及びヒト絨毛性性腺刺激ホルモンはGPI濃度における変化を誘発したが、これは、これらの分子がホルモン感受性であることを示す。(142)

40

【0168】

プロラクチン存在下での顆粒膜細胞上のプロラクチン受容体のシグナル伝達効果もまた、可溶性グリコシルホスファチジルイノシトール部分の産生を介するものであることが示された。FSHで初回刺激された顆粒膜細胞では、プロラクチン及びGPI部分の両方は、性腺刺激ホルモン刺激性の3-HSD活性を予防した。(143)3-HSDはコレステロールをテストステロン経路に転換し、したがって、負のフィードバック機構はGPI部分により制御される。

50

【0169】

HSPGはまた、抗凝固効果も有しており、濾胞において排卵前に発現し、排卵後の濾胞において一過性に減少する。HSPGはプロテアーゼ阻害因子と相互作用し、これは、濾胞における線維素沈着の制御へのHSPGの関与を示唆する。(144)組織リモデリング及びタンパク質分解は排卵にとって必要とされるので、HSPGの破壊は無排卵と関連し得る。

【0170】

HSPGはまた濾胞の発達における役割も有している可能性がある。肝臓癌細胞系について行われた研究は、外因的に追加されたHSPGが内部移行され、遊離鎖が核中に出現したことを実証した。これは、G1期における細胞の停止をもたらした。(145)成長発達の類似する調節不全は上記GPI連結型分子に対する抗体により濾胞細胞において生じる可能性がある。

10

【0171】

肥満

インスリン及びレプチンは、エネルギーバランス及び体重を調節する、視床下部に対する協調シグナルを提供する。インスリンレベルを増加させるとレプチン生産が刺激されることが示された。(146)レプチン受容体は、神経ペプチドY(NPY)及びプロオピオメラノコルチン(POMC)をさらに発現する視床下部ニューロン上にある。血漿レプチンを増加させるとNPY生産が阻害され、食物摂取の低減につながることを示された。(147)レプチンはまた、 α -メラニン細胞刺激ホルモン(MSH)のPOMC前駆体の発現を増加させる。(148)アルファ-MSHは視床下部において作用し、食物摂取を減少させて、満腹を媒介する。(149)

20

【0172】

肥満では、高インスリン血症及び高レプチン血症はインスリン抵抗性及びレプチン抵抗性と共存する。(150)レプチン生産に対するインスリンの影響はインスリン抵抗性が増加するにつれて低減する。(151)インスリンでの3日間の前治療はレプチン誘発性の応答を無効にしたことが動物研究においても実証された。(150)高インスリン血症及びインスリン抵抗性が、食物摂取及び体重のレプチン誘発性の制御の調節における決定的な因子であることは明らかである。さらに、遊離脂肪酸の血漿レベルは生理的高インスリン血症の間、抑制される。(152)したがって、本発明によるこの状態の治療は、インスリン抵抗性の状況に関連する肥満の問題を寛解させるはずである。

30

【0173】

X症候群

これは、高インスリン血症、高コレステロール血症、高血圧症、及び冠動脈疾患により特徴づけられる代謝障害である。(153)アテローム硬化性病変では、Tカドヘリン等のGPI連結型分子が関係した。(154)主要な欠陥は、関連する異常を引き起こすインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症であると考えられる。(155)この症候群についての原文の記載から、疾患のスペクトルは、当初認識されたよりも広いことが明らかになった。アンギナを有し冠動脈疾患を有していない男性の非肥満患者は、インスリン抵抗性で高インスリン性であることがわかり、健常対照よりも高度なトリグリセリド及び低密度高密度リポタンパク質を有していた；したがって、心筋虚血もまたX症候群の一部である。(156)高尿酸血症(157)及び原発性非アルコール性脂肪性肝炎(158)は高インスリン血症及びインスリン抵抗性と相互に関連すると思われ、したがって、代謝症候群の構成要素と考えられ得る。

40

【0174】

インスリン抵抗性及び高インスリン血症は、先天性高血圧症を有する非肥満の非糖尿病対象の70%において観察された。血圧は、食塩感受性及びアンジオテンシンIIとも相互に関連するインスリン抵抗性と相互に関連している。(159)in vitro実験でのインスリン濃度及びin vivoでのインスリン感受性における変化は、Li⁺/Na⁺及びNa⁺/H⁺対向輸送(CT)に影響を与えることが示された。高度なCTは

50

、高血圧症、I D D M、及び肥大型心筋症における心臓及び血管のリモデリングと関連する。(160)一般に良性の一過性の肥大型心筋症は糖尿病の母親の乳児において認識される。この状態による胎児の死が報告された。(161)一般に、X症候群に関連する事象は年齢に関連するが、この状態は小児期及び青年期に開始し得るという証拠がある。(162-164)

【0175】

抗リン脂質抗体及びループス抗凝固因子抗体に関連する疾患

抗リン脂質抗体及びループス抗凝固因子抗体は、再発性の胎児の衰え、自然流産、及び血栓症と関連する。抗リン脂質抗体を有する51人の患者での研究では、53回の妊娠が遂行された。33回の妊娠における集中的な療法は、90.0%の成功成績をもたらした；しかしながら、これらの成功事例の48.6%では妊娠真性糖尿病が発症した。(165)これは、抗リン脂質抗体が、継続的な妊娠のストレス追加により明らかにされた糖尿病敏感性に対する素因になるような因子である可能性があることを示す。妊娠期間16~37の間の非選択性の妊娠の1698回の検査では、正常範囲より上の抗カルジオリピンレベルが、妊娠誘発高血圧症、子癩前症、妊娠糖尿病、真性糖尿病I型、静脈血栓症、血小板減少症、及びリウマチ学的疾患を有する患者において見つかった。(166)

10

【0176】

29人の糖尿病の小児及び青年についての研究では、抗カルジオリピン抗体が、I D D M患者において、対照においてよりも頻繁に見つかった。抗体は、診断6か月未満の患者において、5年よりも長く糖尿病であった群においてよりも蔓延していた。これは、真性糖尿病の早期段階における異常な免疫学的応答と見なされた。(167)他の糖尿病研究では、カルジオリピン抗体の蔓延は、合併症を伴う糖尿病患者において、合併症を伴わない群においてよりも高度であり、(168)これは、糖尿病合併症におけるこれらの抗体の可能性のある役割を示唆する。

20

【0177】

血管内皮の機能不全は糖尿病合併症の発達における早期ステップであることが知られている。臨床的に明白な血管合併症を有していない45人のI D D M患者の研究では、3分の1は、エンドセリン1のレベルと直接相互に関連する抗カルジオリピン抗体を対照レベルよりも高度に有していた。(169)

【0178】

カルジオリピンは、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、及びホスファチジルコリン等の様々な関連するリン脂質の存在を示す標的として一般に使用される。70個の試料についての研究では、カルジオリピン反応性は個々の実在となることが実証された。抗カルジオリピンも抗凝固因子も、他のリン脂質についてのレベルと相互に関連しなかった。(170)病理学的な妊娠からの大量の血清において、抗カルジオリピンについて陽性の妊娠の28.6%は抗ホスファチジルセリン及び抗ホスファチジルイノシトールについて陽性であり、23.8%は抗ホスファチジルコリンについて陽性であり、19%は抗ホスファチジルエタノールアミンについて陽性であった。割合は、I g M抗カルジオリピン抗体を有していた人々について、より高度であった。(171)

30

40

【0179】

S L E患者での類似する研究では、患者の最も高度な反応性%はカルジオリピンに対するものであり、抗ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、抗ホスファチジルイノシトールが後に続いた。(172)最後のリン脂質つまりホスファチジルイノシトールに対する反応性は、未確定の病因の脳血管疾患を有する51歳未満の77人の非S L E患者の群において最も高度に蔓延していることがわかった。(173)

【0180】

S L E又は他の結合組織障害を有していない原発性抗リン脂質抗体症候群を有する39人の患者の10年間にわたる研究は、10年の追跡後に15人の患者が器官損傷を示したことを明らかにした。8人は半側不全麻痺を発症し、一方、3人は認知症を示した；四肢

50

麻痺、拡張型心筋症、心筋梗塞、肺梗塞、及び末期腎疾患は、それぞれ1人の患者に存在した。(174)

【0181】

セリアック病

臨床症状を有する及び有していないセリアック病はI型糖尿病と通常関連する。最近の研究では、糖尿病患者中のセリアック病の有病率は5.7%であることがわかり、親類中では1.9%であった。(175)

【0182】

高度なレベルの無症状の又は無症候性のセリアック病は、胃腸科診療に関する未解明又は非応答性の疾患を有する患者中で注目された；108人の上記患者の42.8%は、無症状の/無症候性のセリアック病を有していることが示された。(176)無症状のセリアック病の腸外マーカーは、鉄欠乏性貧血(27%)、脱毛症及び疱疹状皮膚炎(11.3%)、並びにIDDM(20%)であった。セリアック病に関連する抗体は、糖尿病患者又は彼らの第1親等の親類において発生頻度が増加することが報告された。(177)セリアック病の非存在下では、グルタミン転移酵素抗体の蔓延は、糖尿病患者において13.4%、彼らの非糖尿病性の親類において7%であった；913人の親類の3.5%はIgGグルタミン転移酵素抗体を有しており、これらのうちの44%はIgA筋内膜抗体を有していた。(177)同様に、糖尿病関連抗体は、セリアック患者中で増加した。抗インスリン抗体は、診断時にセリアック病を有する15人の小児の27%において及び無グルテン食後のセリアック病を有する15人の小児の20%において存在した。(178)グルタミン酸デカルボキシラーゼに対する抗体もまたセリアック病患者の23%において存在した。(179)

10

20

【0183】

吸収不良はセリアック病の共通の特徴である。セリアック病における鉄分欠乏の原因となり得る分子は、トランスフェリンに対して40%の相同性を有する鉄結合膜糖タンパク質であるメラノトランスフェリン(p97)である。この分子はGPI連結型であり、腸管上皮細胞における頂端の分布を有している。(180)他のGPI連結型分子であるムチン結合タンパク質は、保護的関門を構成する胃腸粘膜の頂端の上皮の不可欠な構成要素である。(181)GPI連結エピトープを認識する抗体による、この分子及び類似する分子の調節不全は、ムチンの結合及び保護的関門の侵害に影響を与え、遺伝的に敏感性の個体における胃腸粘膜に対する損傷及びグリアジンペプチドに対する不耐性をもたらし得る。

30

【0184】

胃炎

I型糖尿病において胃壁細胞抗体(PCGA)が高度に蔓延しており、自己免疫胃疾患を伴い得る。(182, 183)壁細胞は、それらの表面上にGPI連結型分子を有しており(184)、したがって、GPI連結エピトープを認識する抗体はこの状態に関連し得る。

【0185】

炎症性腸疾患

慢性的な炎症性腸疾患は、障害性分泌ではなく、過剰な成長ホルモンの貯蔵に直面する、腹部症状に数年先行する可能性がある成長障害を有する奇異な状態である。(185)空腹時及び食後の脂質酸化は、活性クローン病を有する患者において、不活性疾患においてよりも著しく高度である。(186)ケトン体生産もまた患者において著しく多量である。(187)全身グルコース取込みもまた、クローン病患者において、正常対照においてよりも高度であることが示され、これは、正常血糖高インスリン性クランプ研究により評価された。(188)しかしながら、グルコース酸化のように、動脈のグルコース濃度は患者において対照と比較して10%低かった。(186, 187)

40

【0186】

脂肪酸化及びケトン体生産の増加の代謝像は、グルカゴン駆動性のものと思われる。低

50

度の血漿LDLコレステロール及び高度のトリグリセリドに関わる異脂肪血症もまた十分に文書化されており(189)、高インスリン血症及びインスリン抵抗性の状況との類似性を有している。BBラットにおける糖尿病の動物モデル及びセリアック病のイヌモデルの両方において、腸管の透過性の増加もまた、疾患の発病前に存在している。(190)腸管の透過性の増加はまた、クローン病患者及び彼らの冒されていない親類においても存在する。(191)クローン病を発症する危険性が高度な個体はまた、ベースライン透過性も増加しており、又は損傷を与える作用物質に対する消化管透過性応答も悪化している。(192)

【0187】

組織の完全性及び構造を維持する機能を有するGPI連結型分子は胃腸組織において豊富である。これは、抗抗TCRVモノクローナル抗体での消化管薄片の非常に強度な染色により実証される。腸管上皮細胞(193)及び平滑筋細胞中のGPI連結型分子は、LDL結合接着分子であるTカドヘリンである。(194)Tカドヘリンはまた、平滑筋細胞成長の負の調節因子でもある。(195)Tカドヘリン遺伝子を含む染色体セグメントの損失は癌の発達と相互に関連し、TカドヘリンcDNAでの腫瘍細胞の形質移入は増殖活性減少及び増殖因子に対する細胞感受性の低下をもたらす。(196)他のGPI連結型分子OCI-5は、グリピカン及びセレプログリカンに関連するヘパラン硫酸プロテオグリカンである。(197)ヘパラン硫酸プロテオグリカンはラミニンに結合する。セレプログリカンの部分的なタンパク質分解は、ラミニン結合親和性の400倍を超える低下をもたらした。(198)上記分子のGPI要素に対する自己抗体の結合は、予知可能に上皮閉鎖を崩壊し、腸管の透過性を増加させ得るが、これは、おそらく、疾患発達に対する前提条件となるだろう。

【0188】

特に粘膜筋板の腸壁の肥厚はクローン病における疾患活性の徴候である。(199)消化管において発現する上記に特に述べられたGPI連結型分子の調節不全は、透過性の増加、平滑筋増殖、及び腸壁肥厚、並びに平滑筋細胞によるコラーゲン合成の増加について説明することができる。(200)

【0189】

炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、及びクローン病は、静脈血栓症及び動脈血栓症の危険性の増加と関連している。潰瘍性大腸炎を有する83人の患者及びクローン病を有する45人についての、100人の対照と比較した研究では、抗カルジオリピン抗体のより高度な蔓延が健常対照と比較して患者において観察された。(201)137人の患者及び137人の対照での類似する研究では、抗カルジオリピン力価は、対照と比較してクローン病及び潰瘍性大腸炎において著しく上昇した。(202)

【0190】

関節炎及び関連疾患

関節リウマチ(RA)は滑膜関節に影響を与える慢性的な進行性の炎症性疾患であり、関節破壊につながる。マクロファージ及び線維芽細胞、通常わずか2~3の細胞層から成る滑膜内層は、随伴性の血管形成と共に過形成になり、軟骨及び骨との滑膜の接触部分での局所的な浸潤性の能力を獲得する。RA患者における死亡の増加は、加速度的なアテローム性動脈硬化及び心血管疾患と関連する。多くの感染作用物質はRAの原因となる作用物質として関係した。(54)

【0191】

RA並びに全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、及び痛風等の関連疾患を有する患者はインスリン抵抗性であり、異常なグルコース耐性を有している。(203, 204)正常な体重の、以前未治療の関節炎患者は、正常血糖クランプ研究において、対照と比較して、インスリン応答の増強及びグルコース利用速度の低減を示した。(205)したがって、高インスリン血症及びインスリン抵抗性はこの疾患群の病原性の特徴である。

【0192】

活性RAを有する45人の未治療患者では、血漿グルカゴンレベルは、静脈グルコース

10

20

30

40

50

耐性試験の間、対照におけるよりも著しく低度であったが、これは、逆調節ホルモンの異常を示す。(206)

【0193】

活性強直性脊椎炎(AS)を有する14人の患者についての経口グルコース耐性試験(OGTT)は、患者が、対照と比較して、OGTTの曲線の下で測定された著しく増加したインスリンレベルを有していたことを明らかにした。(207)RA及び脊椎関節症の両方において、インスリン抵抗性は異脂肪血症と相互に関連した。(208)

【0194】

RA及び他の自己免疫障害の共通の原因となる機構の存在はまた、健常な血液ドナーにおける6%と比較した、RA患者の31%における島細胞抗原69(ICA69)に対する抗体(209)並びに若年性慢性関節炎及びSLEを有する多くの小児における抗サイログロブリン抗体の存在により実証される。(210)

10

【0195】

血管形成に伴う滑膜内層細胞の増殖は、パンプス形成及び関節炎での骨侵食における重要な因子である。ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子(uPA)及びその表面に結合したuPA受容体uPARは、マトリックス分解及び組織リモデリングにおける重要な役割を有している。その受容体uPARに結合したuPAは、プラスミノゲンからのタンパク質分解酵素プラスミンの形成を触媒し、細胞表面にプラスミンを集中させる。(211)プラスミノゲンは、細胞外マトリックスタンパク質のタンパク質分解を媒介し、細胞浸潤を促進する。ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体はGPI連結型分子であり、インテグリンに対するリガンドである。uPAR-インテグリン相互作用により、uPAの結合の際に、増殖シグナル又は遊走シグナルを細胞に伝達する。(212)ウロキナーゼは、その受容体を開裂する能力を有しており、その結果として、uPA及びビトロネクチン両方に対する受容体の結合ポテンシャルを不活性化する。しかしながら、この開裂は、開裂部位が分子の第1及び第2のドメインの間にあり、GPI連結が第3のドメイン上にあるのに、uPARのGPI連結が無傷である場合に生じるのみである。(213)無傷のウロキナーゼ受容体はまた、インテグリンビトロネクチンに対する効率的な結合に必要とされる。(214)v3及びビトロネクチンの他の受容体は血管形成、細胞の接着、及び遊走に、したがってパンプス形成に関わる。(215)通常的环境下で、uPAによるuPARの開裂は、uPAのその受容体に対する結合並びにuPARのビトロネクチン及びPAI-1に対する結合を調節不全にし、その結果として、uPAによるプラスミンの産生並びにビトロネクチン受容体及びPAI-1を介する増殖シグナル及び血管形成シグナルを低減するであろう。uPARに対するuPA親和性のこれらの変化は、GPIアンカーの脱脂によりもたすことができる。GPIアンカーのリンカー領域におけるuPARペプチドに対する抗体はGPI連結型を認識するのみで、可溶性uPARを認識しない。この変化並びにThy-1、Ly-6、及び癌胎児性抗原等の他のGPI連結型分子の抗原特性における類似する変化は、立体構造変化に帰する。(213)本発明は、GPI連結型要素に対する抗体は、上記分子の立体構造を十分に変化させ、uPA及びビトロネクチンとのuPAR相互作用について示されたように、シスでもトランスでも作用する特異的なリガンドとのそれら分子の反応性を変化させ、その結果として、自己免疫疾患、癌、及び子宮内膜症等の血管形成疾患を引き起こし得るということを提唱する。

20

30

40

【0196】

uPARは、ビトロネクチンとの相互作用を介して細胞接着を促進し、細胞表面にuPAを局在させることにより細胞の遊走及び浸潤を促進する。(213)接着及び遊走の間のバランスは、ビトロネクチン上のuPARと同一の部位に結合するPAI-1により制御される。(216)プロテアーゼ阻害因子としてのその機能以外に、PAI-1は、血管形成の間の毛細血管発芽において必須の役割を有している。(217)

【0197】

高インスリン血症及び高血糖は、インスリン抵抗性及びグルコース不耐性の状況におけ

50

るように、この系において役割を果たし、インスリン及び高血糖の両方は P A I - 1 遺伝子転写を増加させることが示された；インスリンはまた、M M P - 1 等のマトリックスメタロプロテイナーゼも刺激する。これらは線維芽細胞様滑膜細胞により生産され、細胞外マトリックスのリモデリング及び破壊に関わる。(5 4)

【 0 1 9 8 】

喘息

最近のフィンランドの研究では、セリアック病、関節リウマチ (R A)、及び I D D M を有する小児における喘息の累積発生を生まれてからの最初の 7 年間比較した。喘息は、セリアック病、R A、及び I D D M を有する小児において、これらの疾患を有していない小児においてよりも著しく共通する傾向があった。(2 1 8) 自己免疫性又は免疫媒介性の研究の 2 3 の公開されたゲノム研究からの発見を整理する最近公開された研究は、疾患関連遺伝子の正の連鎖の約 6 5 % が 1 8 の別々のクラスターに非ランダムに位置することを実証する。(2 1 9) 多くの喘息、I D D M、及びセリアック病の遺伝子は、他の自己免疫疾患遺伝子も含む小さなクラスター中に並ぶ。(2 2 0)

10

【 0 1 9 9 】

喘息を有する患者は、環境刺激に対して悪化した気管支収縮に罹患し、安静時の気道緊張度は喘息対象において正常対照よりも高度である。安静時の気道緊張度及び気管支収縮は、気道平滑筋細胞上のムスカリン M 3 受容体の刺激及び続く収縮を引き起こす、肺迷走神経から放出されるアセチルコリンにより制御される。アセチルコリンはまた、節後神経上の M 2 ムスカリン受容体を介する負のフィードバックループも刺激し、さらなるアセチルコリン放出を予防する。(2 2 1)

20

【 0 2 0 0 】

喘息患者における迷走神経により媒介された気管支収縮の増加は、M 2 ムスカリン受容体の機能の障害によるものであることが実証された。この障害を引き起こす際のインスリンの役割は、糖尿病動物及びインスリン治療糖尿病動物における気管支収縮応答を検査することにより、厳格に調査された。(2 2 2) 気管支収縮性の刺激に対して低応答性の未治療糖尿病動物は、インスリンでの治療の際に応答性亢進になった。低応答性は、気管支中の炎症細胞 (好酸球) の蓄積のレベルの低減と関連し、糖尿病動物の神経と関連した。インスリンでの治療は好酸球の流入を回復させ、応答性亢進を引き起こした。ニューロンの M 2 ムスカリン受容体機能の低下は、静電的相互作用を介して M 2 受容体に結合する好酸球主要塩基性タンパク質によるものである。したがって、インスリンは、気道炎症の発達に重要な役割を果たすと思われる。高インスリン血症はまた、ラットの脳に注射されたインスリンがアセチルコリンレベルの著しい増加を引き起こしたようにより高度な安静時のアセチルコリンレベルによるものとなり得る、喘息個体におけるより高度な安静時の気道緊張度の説明となり得る。(9 8)

30

【 0 2 0 1 】

気道平滑筋過形成は、慢性的な喘息における重要な組織病理学的所見である。(2 2 3) これは、平滑筋細胞により分泌されたコラーゲンの過形成が伴い、そして、クローン病における平滑筋細胞過形成及び腸壁肥厚に非常に類似する。(2 0 0) したがって、平滑筋細胞上で発見された G P I 連結型接着分子及び細胞増殖阻害分子である T カドヘリンは、クローン病について述べられた同一の過程において関係する。

40

【 0 2 0 2 】

I G F 軸及び I G F B P 軸は、クローン病においてのように関わり、I G F B P のダウンレギュレーションに関わる。インスリンは、培養ヒト卵巣細胞における I G F B P - 1 生産の阻害を誘発する。(1 3 8) したがって、インスリン分泌の調節不全は、同様に、気道平滑筋細胞における I G F B P レベルをダウンレギュレートし、その結果として、平滑筋細胞増殖を促進するであろう遊離 I G F の生物学的利用能を増加させ得る。

【 0 2 0 3 】

嚢胞性線維症

嚢胞性線維症 (C F) は、呼吸系、消化系、内分泌系、及び生殖系に影響を与える疾患

50

である。多くの可能性として考えられる変異は、慢性閉塞性肺疾患、肝臓繊維症、真性糖尿病、胆石症、及び関節炎を主に含む疾患顕性化の一因となる。原発性CF欠陥は、分泌上皮の頂端膜におけるサイクリックAMP媒介性塩化物経上皮輸送タンパク質である嚢胞性線維症膜貫通型コンダクタンス調節因子(CFTR)を介するイオン輸送の調節不全である。(224)CFにおけるCFTR機能不全は、CFTRチャネルをMUC1遺伝子過剰発現と結びつけるチロシンキナーゼSrc経路を介してムチンの過剰発現をもたらす。(225)塩化物の障害性放出は、呼吸器(及び腸管粘膜)内層の脱水をもたらす、気道をふさぐ粘着性の粘液をもたらす。

【0204】

アクチン細胞骨格の構成はCFTR分子の機能にとって重大である。サイトカラシンDでのアクチン細胞骨格の部分的な破壊はCFTR活性化を誘発した(226)。原子間力顕微鏡により、アクチンフィラメントは、CFTR分子と直接関連することが示された。(227)

10

【0205】

細胞運動及び細胞接着の両方に関してのアクチン細胞骨格の生理学的調節は、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)発現により強く影響されると思われる。これは、p130Cas/Rac依存性シグナリング経路を開始するために、ピトロネクチンに対するuPAR結合を必要とする。(228)インテグリン並びにRhoファミリーRho、Rac、及びCdc42の小さなGTPase等の細胞骨格関連性構造物とのuPARの相互作用は、張力線維、膜状仮足、ひだ(ruffle)、及び糸状仮足の組み立てのためのアクチン細胞骨格の調節に関わる。

20

【0206】

uPA及びピトロネクチンに対するuPARの結合は、ピトロネクチンに対する結合はuPARのD1ドメインを介するものであるが、完全長受容体の完全性、特にuPARのGPI連結を必要とする。(213)

【0207】

uPAR及びアクチン網様構造と関連することが示された他のGPI連結型分子は(229)、最適なCFTR機能のために細胞骨格の維持を担っている可能性がある。GPI連結エピトープに対する本発明の抗体の結合は、細胞骨格を十分に混乱させ、遺伝的に損なわれたCFTR分子のさらなる機能的悪化を引き起こす可能性がある。

30

【0208】

肺上皮細胞におけるuPARの発現及びuPAによるuPARのアップレギュレーション及び傷害の後での肺炎組織リモデリング又は肺新形成におけるこの系の関与が報告された。(230)さらに、uPARは、緑膿菌に応じた好中球の補充における役割を有すると思われる。緑膿菌は、慢性的にCFにおける肺にコロニー形成し、肺機能の低下を引き起こし、死をもたらす。uPARが欠損したマウス(uPAR^{-/-})は、野性型マウスと比較して、緑膿菌に応じた好中球補充が極めて減少することが最近実証された。野性型マウスにおける好中球補充は、 α 2インテグリン依存性の機構に依存している。(231)したがって、抗GPI抗体修飾性uPARは、 α 2インテグリン依存性の好中球補充のこの機能が十分に損なわれるであろうということが考えられる。

40

【0209】

嚢胞性線維症における肺の病状は、アポトーシス性炎症細胞の非効率的な除去により悪化する。CF及び非CF気管支拡張症患者からの痰は、豊富なアポトーシス細胞を含み、これは、正常なアポトーシス細胞除去機構が障害性であることを示唆する。(232)

【0210】

マクロファージの表面上のGPI連結型糖タンパク質CD14は、アポトーシス細胞の認識及び排除を媒介する。(233)炎症の消炎をもたらすアポトーシス細胞の除去は、正常な組織の構造及び機能に重大である。アポトーシス細胞は表面変化を受けて、ホスファチジルセリンの露出をもたらす、これは、食細胞のマクロファージにより認識される決定的な表面マーカーとなる。(234)アポトーシス細胞上のホスファチジルセリン及び

50

ホスファチジルイノシトールの認識は、CD14のGPI連結を介するアポトーシス細胞の内部移行をもたらす。細菌リポ多糖(LPS)もまた、リン脂質結合部位と同一又は隣接する部位に結合する。(235)マクロファージはそれら自体アポトーシスを受けることができ、CD14のダウンレギュレーションがこれに先行する。(236)したがって、GPI連結の要素に対する抗体は、認識部位のブロックを介するアポトーシス細胞の食作用及びアポトーシス細胞の内部移行を調節不全にする可能性がありCD14のダウンレギュレーションを引き起こす可能性もある。これらの機構は、食細胞系の非常に重要な構成要素にひどく損害を与え得る。好中球もまた食作用に関わり、走化刺激に応じて炎症の部位に移動する。GPI連結型分子であるモノADPリボシルトランスフェラーゼは好中球の表面上で同定されたが、シグナリング経路に関わっている。この分子は、走化性の間の細胞骨格の再アラインメントに関わる。(237)GPI連結は、アクチンとのGPI連結型分子の関連に関わる。したがって、抗体により損なわれたGPI連結型分子は、走化性の調節因子として効率的に機能しない可能性がある。

10

【0211】

嚢胞性線維症は、膵臓の外分泌及び内分泌の機能不全の両方と関連する。CFTR(-/-)マウスにおける外分泌腺房細胞機能不全は、膵臓腺房細胞の頂端形質膜での障害性エンドサイトーシスと関連する。これは、内腔中への管の炭酸水素塩分泌につながる。エンドサイトーシスは、エンドサイトーシスの活性化と密接に関連する腺房細胞上のGPIアンカータンパク質であるGP-2の開裂と関連する。GP-2の開裂はCFTR(-/-)マウスにおいて減少する。(238)これは、抗GPI抗体による及び/又は抗体によるGPI開裂部位の妨害のためのGP-2のダウンレギュレーションが、嚢胞性線維症において見られるように、エンドサイトーシスを害し得ることを示す。

20

【0212】

静脈内に投与されたグルコースに対する第1期C-ペプチド応答は、外分泌が不十分なCF患者において著しく障害性であった。低血糖に応じた最大グルカゴン分泌として測定されたアルファ細胞機能もまたこれらの患者において減少した。(239)障害性及び糖尿病のグルコース耐性を有するCF患者におけるインスリン感受性もまた対照対象においてよりも低度である。(240)

【0213】

肺疾患は、CFにおける罹患及び死亡の主な原因であるが、疾患の重症度は、CFTR表現型から常に予測することができるものではない。遺伝的及び臨床的データを肺機能の減退の率と相互に関連させるための、7歳を超える全スウェーデン人のCF母集団の縦断的研究において、CF患者の随伴性の真性糖尿病は、シュードモナス属コロニー形成及び膵不全と比較して、肺機能の急速な悪化と最も著しく相互に関連したことが観察された。(241)nul1変異又は重篤な変異は、膵臓外分泌不全と相互に関連するが、肺病の重症度とそれほど強く関連しない、CFTRの生産の欠如をもたらすことも観察された。一部のCF患者は、10~15歳まで診断されない。気管支拡張症を含む軽度の肺疾患を有する高齢患者は、CF型症状を示さない可能性があるが、調査上、CFTR変異を有することがわかった。(242)呼吸器の症状及び炎症は、必ずしも肺感染と相互に関連しないこともまた明らかになってきている。(243)肺機能と相互に関連する、高解像度コンピュータ断層撮影により視覚化されたCFの気管支病状は、喀痰細胞診及び炎症マーカーと相互に関連しないことが示された。(244)

30

40

【0214】

これらの所見は、肺病状が、CFにおいて進行性であり、肺感染により悪化するが、肺感染に依存していないことを実証する。膵臓病状、特に真性糖尿病は、肺機能悪化の重症度の最も重大な予測因子である。関節症もまたCFにおける随伴性疾患であり、ここでは、肺機能及び肺感染は関節炎の存在と相互に関連しない。(245)本発明は、CFTR変異が、CF患者を、CFにおいて共通する肺炎症及び真性糖尿病を含む他の器官の病状を引き起こす抗GPI連結エピトープ抗体の影響に対して特に感受性にすることを提唱する。

50

【0215】

骨粗鬆症及び骨減少症

インスリン及びインスリン様成長因子は骨代謝に影響がある。糖尿病において骨形成が減少する；これは骨減少症について説明するものである可能性があるが、骨組織における微小血管症も関与する可能性がある。(246, 247)破骨細胞活性の増加は、骨粗鬆症、パジェット病、骨転移、及び悪性腫瘍の高カルシウム血症における骨破壊の増強の原因となる。破骨細胞様多核細胞から単離された、GPI連結型分子である破骨細胞阻害ペプチド-1(OIP-1)は破骨細胞活性を阻害することが示された。(248)本発明の抗体はインスリン分泌を調節不全にし、OIP-1又は類似する分子の作用をブロックし、したがって、骨形成を減少させて破骨細胞活性を増加させることが提唱される。

10

【0216】

扁平苔癬及び白板症

いくつかの研究では、活性扁平苔癬を有し且つ糖尿病の家族歴のない42%までの患者が異常なグルコース耐性を有することが示された。グルコースに対するインスリン応答は軽度の2型糖尿病で典型的であった。(249, 250)

【0217】

口腔白板症もまた異常なグルコース代謝と関連する。対照におけるよりも糖尿病患者において高度に蔓延している。(251)以前診断未確定の糖尿病を有する患者においてそれほど共通していない口腔の顕性化は、血糖制御を改善するための治療で通常改善した口腔灼熱症候群、菌類及び細菌の感染、味覚、唾液分泌、及び流涎の変化を含んだ。(252)

20

【0218】

貧血

再生不良性貧血は、高インスリン血症及びインスリン抵抗性と関連する。検査した29人の患者のうち、14人は、正常なグルコース耐性を有する以前治療された症例であり、8人は、異常なグルコース耐性を有する治療された症例であり、そのうちの6人は糖尿病を有しており、7人は、正常なグルコース耐性を有する新たに診断された症例であった。すべてインスリン抵抗性であり、高インスリン性であった。異常なグルコース耐性を有する患者は、インスリン分泌の遅延を有したが、これは、細胞中のインスリン貯蔵の悪化を示す。(253)

30

【0219】

再生不良性貧血を有する26人の患者のうちで、5人は彼らの血小板及び赤血球上でGPIアンカータンパク質が欠陥していたが、10人の患者では、GPI欠陥は、単核細胞及び多形核細胞上で検出された。(254)

【0220】

他の種類の貧血は顕性糖尿病と関連する。重大な合併症、つまり腎症、ニューロパシー、体位性低血圧症等を有する15人のI型糖尿病患者は、重大な合併症を有していない糖尿病患者と比較して、貧血性であった。エリトロポイエチン減損以外に貧血に対して実証できる原因がなかった。(255)重大な腎症を有していない糖尿病患者では、貧血に対するエリトロポイエチンの応答性の類似する低減が、同定可能な原因を有していない貧血を有する28人の対象において注目された。(256)

40

【0221】

インスリン抵抗性の個体又は糖尿病患者における同定不可能な起源の貧血に関連する可能性があるGPI連結型分子は、葉酸受容体である。葉酸受容体は、葉酸輸送の間に内部移行され、再利用される。(257)しかしながら、そのGPI連結要素に対する抗体は葉酸輸送を重大に妨げ得る。葉酸は、コバラミンと共に、赤血球生成に必要なDNA合成におけるデオキシウリジルのデオキシチミジルの変換に必要とされるメチル基を利用可能にする共役反応に参加する。これらの反応は、赤血球の発達において葉酸の供給が不十分なために障害性である可能性がある。

【0222】

50

発作性夜間血色素尿症

発作性夜間血色素尿症（PNH）は、GPI連結型補体阻害因子CD55及びCD59における欠損に起因することで知られており、赤血球の溶解の素因になる。赤血球及び白血球上並びに血小板の実質的な集団上に存在する欠損は（²⁵⁸）、産物であるグリコシルトランスフェラーゼがGPIアンカー合成の第1ステップに参加する遺伝子変異（PIG-A）により引き起こされる。（²⁵⁹）GPI欠損クローンが成長優位を獲得する理由はまだ未解決である。

【0223】

Campath-1Hは、GPI連結型CD52分子が欠損している細胞を選択することが実証された。（²⁶⁰）GPI連結要素に対する抗体の存在により、PNH中のGPI欠損クローンを類似したやり方で選択できることを本明細書中において提唱する。しかしながら、PIG-A遺伝子欠損は後天性体細胞変異である。（²⁶¹）実際、多くのPIG-A遺伝子異常は3人のPNH患者において検出され、顆粒球及び赤芽球における異常は患者の2人において異なっていた。（²⁶²）したがって、GPI連結要素に対する自己抗体の継続的な存在は、造血幹細胞レベルでの体細胞変異を引き起こすことが可能性として考えられる。

10

【0224】

38歳の男性の症例は、急速に進行する溶血性貧血及び血小板減少症を有する病歴12年のNIDDMと報告された。糖尿病を除いて微小血管症性貧血の原因がなかった。患者はまた、ループス抗凝固因子抗体及び抗リン脂質IgG抗体も有していた。血液透析は、溶血及び血小板減少症の両方の自発的な改善をもたらした。（²⁶²）血液透析は、おそらく、研究において報告された抗GPI抗体だけでなく、その病原性抗GPI抗体も除去したのだろう。

20

【0225】

睡眠時無呼吸

睡眠の間の乱れた呼吸は、個体の昼間機能の障害及び代謝異常の素因になる可能性がある共通した状態である。糖尿病又は心肺疾患を有していない150人の健常な男性の研究では、睡眠時無呼吸の有病率の範囲は、無呼吸-寡呼吸指数（AHI）カットオフに依存して、40～60%であった。状態の重症度は、障害性又は糖尿病のグルコース耐性と相互に関連した。増加するAHIもまた、肥満と無関係に、悪化するインスリン抵抗性と関連した。（²⁶³）知られている真性糖尿病を有していない270人の対象の他の研究では、185人は睡眠時無呼吸を有すると考えられた。肥満及び非肥満の対象においてインスリン抵抗性とこれらの症例の著しい関連があった。これらの対象におけるインスリン抵抗性及び高血圧症の関係のさらなる分析は状態が著しく関連することを確認した。（²⁶⁴）

30

【0226】

不眠

睡眠不規則は、若い人たち及び老人たちの両方で共通している。これらは、入眠困難、頻繁な夜間中途覚醒、及び早朝覚醒を含む。ヒトにおいて夜間にのみ分泌される松果体ホルモン及びメラトニンは、夜間に生じる用量を与えられた場合、昼間睡眠を誘発することが示された。メラトニンは、高齢な人々において減少することが知られており、生理的なレベルへの補正は睡眠を回復することが示された。（²⁶⁵）

40

【0227】

メラトニンの分泌は、松果腺とシナプス連絡を成し且つ小胞からノルアドレナリンを放出する上頸神経節ニューロンから来るシグナルにより制御される。ノルアドレナリンは、cAMP形成を介してメラトニン合成を刺激する。（²⁶⁶）cAMPは、メラトニン合成における最後から2番目の酵素、アシルアルキルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ（NAT）に作用する。（²⁶⁷）これは多型酵素であり、その変異パターンは、薬物代謝に影響があり、ある種の癌、食物アレルギー、及び他の状態に感受性の増加を与える。（²⁶⁸⁻²⁷¹）

50

【0228】

ノルアドレナリン分泌は、血漿インスリン濃度により影響を与えられる。健常なボランティアにおける脂質注入による基礎の高インスリン血症及びグルコースに対するインスリン応答の悪化の誘発は、対照と比較して、著しく低減した血漿ノルアドレナリンレベルをもたらした。(272)

【0229】

したがって、インスリン抵抗性等の生理的原因による高インスリン血症の状況は、低減した血漿ノルアドレナリンレベルと相互に関連することが予期されるであろう。糖尿病患者は、心不全代償不全の間、非糖尿病患者と比較して、より低度なノルアドレナリンレベルを有している。(273) I型糖尿病患者はまた、診断の1年目において、低血糖に対するノルアドレナリン応答が50%低減している。(274)

10

【0230】

上記の観察は、メラトニン分泌における年齢関連性の低減は、健常な老年母集団における、増加するグルコース不耐性及びインスリン抵抗性による高インスリン血症に関係する可能性があることを示唆する。(275) 松果体メラトニン生産の年齢関連性の減退は、松果体組織の変性ではなく、松果腺に神経を分布させるセロトニン作動性ニューロン及びノルアドレナリン作動性ニューロンの変性変化によるものと考えられる。(276) これは、老年母集団におけるグルコース代謝の変化によるノルアドレナリン欠乏と一致している。

【0231】

睡眠調節を制御する他の因子はプリオンタンパク質(PrP)である。PrPは GPI 連結型糖タンパク質である。(277) PrPは、大脳及び非大脳組織に存在し、ニューロンの機能における重要な役割を示す高度なレベルのシナプス分布を有し、且つ細長い軸索の表面上に見つられる。(278, 279) 正常なプリオンタンパク質は銅と結合し、結果としての複合体は抗酸化剤活性を有している。(280) プリオンタンパク質は、睡眠及び多くのホルモンの日周リズムにおける深刻な変化がある、致死性家族性不眠症を含む神経変性疾患に関わることで知られている。(281) プリオンタンパク質ノックアウトマウスは、メラトニンレベルの変化及び睡眠断片化の両方を示し、短い、目が覚めている発作の量がほぼ2倍になり、睡眠調節におけるこのタンパク質の役割を示す。(282, 283)

20

30

【0232】

本発明の抗体は、グルコース代謝の変化及びノルアドレナリン分泌及びメラトニン分泌に対するその影響により並びにさらに GPI アンカー結合ポテンシャルを介してプリオンタンパク質に影響を与えることにより良性の睡眠異常及び病的なプリオン誘発性の状態に影響を与え得る。さらに、抗体は、ノルアドレナリンを含む小胞の成分であるセクレトグラニン1又はクロモグラニンBを認識する。(284) これはまた、ノルアドレナリン分泌を調節不全にする可能性がある。

【0233】

癌

乳房、結腸直腸、胃腸、肉腫、子宮内膜、前立腺、頭、首、及び肺を含む多くの癌は高インスリン血症、グルコース不耐性、インスリン抵抗性、及び肝臓グルコース生産の速度の増加と関連することで知られている。(285 - 289) 1期又は2期乳癌を有する223人の女性についての1992年の研究では、彼女らが、441人の対照対象よりも著しく高度なC-ペプチドの血清レベルを有していたことを実証した。乳癌の対数相対危険度は、肥満度指数又はウエスト対ヒップ比と無関係に、対数C-ペプチドレベルと直線的に関係した。(290) 組織学的に確認された乳癌の症例を有する2569人の女性についての、2588人の対照女性と比較した、より最近の研究は、遅発性糖尿病との乳癌の関連に注目しており、(291) 証拠により、インスリンが腫瘍形成のための成長因子であることが示唆される。(292)

40

【0234】

50

癌性悪液質もまた、グルコース取込み及び利用の減少をもたらすグルコース不耐性、全身グルコース代謝回転速度の増加、グルコース新生の増加、並びにインスリン抵抗性により特徴づけられる。(293)ラットモデルにおいて、ホルモン療法によりインスリン/グルカゴン比を増加させることにより宿主同化を選択的に支持し、腫瘍成長動態を阻害した。(294)したがって、代謝混乱の糖尿病誘発性の複合の発達を予防することは、癌の発生を低減し、癌性悪液質の症状を緩和するだろう。

【0235】

血管形成、転移、癌進行、及び癌阻害におけるGPI連結型分子の関与が認識されるようになってきている。上記分子の1つは、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体uPARである。uPAR発現及び浸潤癌細胞表現型の間に強力な相関がある。(295)そのリガンドuPAで占められた非開裂GPI連結型uPARのヘパリン硫酸プロテオグリカン(HSPG)との及びインテグリンビトロネクチンとの関連は、タンパク質分解を誘発するプラスミンを細胞表面に及び血管形成を促進するその受容体v3に対するビトロネクチンのライゲーションに集中させる。(211-217)uPARはまた、アクチン細胞骨格と相互作用し、膜状仮足、ひだ、及び糸状仮足の形成並びにその結果として細胞運動を引き起こす。(228)

10

【0236】

uPARの正常な生理機能は、無傷のGPI連結を必要とする、uPAによるuPARの開裂を介して調節される。(213)疾患を引き起こすuPARの特性は、本発明の抗体によるGPI連結のブロックによるものである可能性があることはすでに提唱された。

20

【0237】

高インスリン血症は、細胞関連HSPG(296)及びプラスミノゲン活性化因子阻害因子-1(PAI-1)の発現の増強によりuPAR駆動性の機構を強める役割を有している。(297)uPAに対する結合の他に、PAI-1はビトロネクチンに結合し、腫瘍遊走及び浸潤を促進する。(298)uPAR-uPA-PAI-1複合体はまた、低密度リポタンパク質関連タンパク質(LRP)にも結合し、全複合体は遊走する癌細胞中に内部移行される。PAI-1は、糸状仮足形成及び癌細胞の遊走の両方を増加させることが示された。(299)PAI-1はまた血管形成にも関わる。血管形成は、PAI-1-/マウスの大動脈輪において完全に非存在であり、精製組換えPAI-1の追加により回復することができた。(300)

30

【0238】

高度なレベルのuPA及びuPARは、乳癌患者における再発の危険性の増加と関連する。(301)uPARはまた、甲状腺癌(302)及び卵巣癌(303)においても強く発現する。HSPG、特に、GPI連結型グリピカンのアップレギュレーションはある種の癌と関連した。グリピカン1は、膵癌及び乳癌においてアップレギュレートされる。(304,305)グリピカン3は、ウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、及び肝芽腫において発現する。(306,307)グリピカンは、ヘパリン結合成長因子の可能性のある調節因子であると考えられ、IGF-I及びIGF-IIにより刺激される。(308)インスリンは、IGF結合タンパク質を抑制し、IGFをより利用可能にする。(309)IGFは、様々な癌の進行に関わる。(310)GPI連結型分子もまた、腫瘍成長の負の調節因子として腫瘍形成の病態生理に関わる。GPI連結型Tカドヘリンは、IGFを含む成長因子によりダウンモジュレートされる。(311)Tカドヘリン遺伝子の損失は、膵臓、肺、胃、及び卵巣の癌の発達と相互に関連し、一方、TカドヘリンcDNAを用いた腫瘍細胞の形質移入は、炎症性腸疾患の増殖活性及び浸潤活性の減少をもたらす。(308)本発明の抗GPI抗体を介するTカドヘリンのダウンレギュレーション又は調節不全により、Tカドヘリン及び腫瘍成長に好都合である類似する分子の負の成長調節の役割を損なう可能性がある。

40

【0239】

GPI連結型分子は、ナチュラルキラー細胞による腫瘍細胞の認識に関わる可能性がある。UL16結合タンパク質(ULBP)は、熱ショック、ウイルス、腫瘍形質転換、発

50

癌物質、UV等により引き起こされる細胞障害の際に誘発される又はアップレギュレートされるGPI連結型分子である。これらの分子は、NK細胞、NKT細胞、T細胞、及びCD8+T細胞上のNKGD2-D受容体に対するリガンドである。これらのGPI連結型ULBPのマスクングは、NK細胞又はT細胞媒介性の認識からの形質転換細胞の回避を引き起こす可能性がある。(312)

【0240】

HIV

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は、感染初期の間、優先的に、単核細胞/マクロファージ向性及び非シンシチウム誘発(NSI)となる。(313)NSIウイルスは、 α -ケモカイン受容体5(CCR5)を補助受容体として使用し、CCR5+T細胞のみに感染する。(313)症例の50%において、疾患進行は、シンシチウム誘発(SI)であり、ナイーブT細胞を含むCD4+T細胞すべてに感染し、欠失させる変異体の発生と関連する。(313)これは、SIウイルスが、T細胞前駆体及び未熟な胸腺細胞上で高度に発現するCCR5及びCXCR4の受容体を利用する性能に基づく。(314)NSI表現型ウイルスは、CCR5結合 α -ケモカインであるRANTES、MIP-1、及びMIP-1により阻害されることが示された;NSI株による感染は、これらの α -ケモカインの生産の増加と相互に関連する。(315)主要なHIV補助受容体CCR5及びCXCR4に結合するケモカインは、HIVの強力な自然の阻害因子である。最近のデータは、ケモカインがHIV感染をブロックする性能は、それらの受容体結合能力から切り離すことができることを示す。(316)

【0241】

ケモカインは、内皮細胞及び他の細胞の表面上並びに組織マトリックス中に見つけられる、ヘパラン硫酸プロテオグリカン等のグリコサミノグリカンの領域へのライゲーション及び中での重合により、細胞外マトリックスにわたってグラジエントを確立する。(317, 318)ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)はまた、HIV糖タンパク質gp41_{FD}の細胞膜融合ドメインとも相互作用する。この相互作用は、T細胞表面上の特異的なヘパラン硫酸プロテオグリカン結合ドメインとのものであり、空間的に異質であり、膜上の好ましい部位に局在する。(319)物理的な除去又はIL-8でのブロックングによるヘパラン硫酸結合部位の除去は、T細胞膜とのgp41_{FD}の相互作用を抑制した。可溶性ヘパラン硫酸は、gp41_{FD}に結合したが、膜局在を増強しなかった。したがって、膜に結合したHSPGは、細胞膜へのgp41_{FD}の結合に必要とされる。細胞活性化はウイルス複製に必要とされ、膜相互作用は局所的な部位にあるので、GPI連結型グリピカンは、gp41_{FD}-HSPG相互作用の最も有望な候補者である。

【0242】

HSPGに対するHIV及びケモカインの優先的な結合はウイルス粒子蓄積の部位へのケモカインの阻害効果を集中するに違いない。本発明はGPI連結要素に対する抗体の結合は、GPI連結型HSPGの立体構造を十分に变化させ、阻害性ケモカインのライゲーション及びウイルスに対するケモカイン影響の集中においてGPI連結HSPGを無効にすることができることを提唱する。さらに、GPI連結型ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)及びそのリガンド(uPA)は、HIV進行に著しく関わる。高度なレベルの血清uPAR(suPAR)は、AIDS患者における乏しい生存の指標であることが示された。(320)ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子uPAは、HIV-1gp120に結合し、マクロファージのHIV-1感染を促進することが示された。(321)uPA及びgp120の相互作用は、gp120の機能的に重要なV-3ループ及びuPAの触媒ドメインを含み、uPARとの相互作用に利用可能なuPAのリガンド結合ドメインを放置している。(321)uPAを介するuPARに対するgp120の架橋はuPARに対するHIV補助受容体機能に帰する可能性がある。

【0243】

gp120に対する細胞受容体はCD4であり(322)、gp120及びCD4の両方は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用を介してピトロネクチンに結合する。

(^{3 2 3}) u P A Rもまたピトロネクチンに結合する。(^{2 1 4})ピトロネクチンに対する v 3 受容体は、T細胞受容体 (T C R) 会合の結末を決定する同時刺激分子である。
v 3 へのピトロネクチン結合は、T細胞のアポトーシスを効率的に誘発する。(^{3 2 4})
これは、その受容体 u P A R に結合した u P A に g p 1 2 0 を介して H I V ウイルスが会合することにより、インテグリン v 3 を介してアポトーシスシグナルをT細胞に送ることができる機構を提供する。

【0244】

前に記載したように、u P A は、u P A R に会合するとすぐに u P A R を切断する性能を有している。切断された u P A R は、ピトロネクチンに結合しない。(^{2 1 4}) 次いで、非結合ピトロネクチンはその受容体 v 3 に会合しないであろう。しかしながら、u P A は、無傷の u P A R 分子を切断するのみだろう、そして、たとえ切断部位が G P I アンカーに対して遠位にあっても、無傷のアンカーがこのプロセスに必要とされる。ホスホリパーゼ C 処理 u P A R は、u P A による開裂に対して抵抗性があることが示された。(^{3 2 3})
したがって、本発明は、G P I 連結要素に対する抗体は立体構造的に u P A R を変更させ、u P A 開裂に対する抵抗性を誘発するであろうということを提唱する。u P A R に対する u P A の結合は u P A R 発現を正に調節し、これは、特異的な u P A R m R N A の増加と相互に関連している。(^{3 2 5})

10

【0245】

立体構造的に変化した u P A R を u P A が切断することができないことにより、ピトロネクチンに結合することができる u P A R のアップレギュレーションを引き起こすのみならず、H I V ウイルス付加のための結合部位及びアポトーシス誘発性 v 3 受容体を介するシグナリングを提供することができる。T細胞アポトーシスの増加は、認識されており、H I V 感染のほとんど未説明の特徴である。(^{3 2 6})

20

【0246】

H I V 感染における G P I 連結型分子の関与の他の側面はウイルス粒子の放出のレベルにある。感染T細胞により優先的に生産された H I V ウイルスは、T細胞の表面上に、細胞膜上の脂質ラフト中に隔絶されていることで知られている G P I 連結型タンパク質を獲得することが実証された。(^{3 2 7}) C D 5 5 及び C D 5 9 他等のこれらの分子は、i n v i t r o 試験において、補体媒介性の破壊に対する抵抗性を与える(^{3 2 8} , ^{3 2 9}) 。感染T細胞の表面上で G P I 被覆ウイルスは、抗体と相互作用し、他の感染T細胞と連結し、したがって、S I ウイルスによるシンシチウム形成を支援する。

30

【0247】

最終的に、H I V - 1 による感染は、異脂肪血症、グルコースレベルの上昇、及びインスリン感受性の低減と関連する。これらの代謝の混乱は、高活性抗レトロウイルス剤療法 (H A A R T) により増悪する。(^{3 3 0}) H I V 患者において高度なレベルの抗リン脂質抗体があるということは意外ではないかもしれない。(^{3 3 1})

【0248】

感染

細菌、菌類、及び原生動物を含む感染性生物はそれらの表面上に G P I 連結型分子を発現する。これらは、マイコバクテリウム属、カンジダ属、リーシュマニア属、住血吸虫属、ジアルジア属、トキソプラズマ属、トリパノソーマ属、プラスモディウム属他を含む。(^{3 3 2} - ^{3 3 9})

40

【0249】

クルーズ トリパノソーマ トリポマスチゴート G P I ムチンは、i n v i t r o でマクロファージを活性化し、サイトカイン、ケモカイン、及び一酸化窒素を生産することが最近実証された。(^{3 3 7})

【0250】

外来性の ケモカインである M I P - 1 、 M I P - 1 、 R A N T E S の追加は、T . クルーズ取込みの増加を誘発し、用量依存的に N O 生産の増強及び寄生生物複製の制御をもたらした。(^{3 4 0})

50

【0251】

ケモカインは、ウイルス、マイコプラズマ、菌類、及び蠕虫等の他の微生物病原体に対する宿主抵抗性に重要な役割を果たしている。(341-345)ケモカインは、細胞の表面で及び組織マトリックス中で利用能を増強するために、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)へのライゲーション及び重合により細胞外マトリックスにわたってグラジエントを確立する。(317, 318)HSPGは、膜貫通型たとえばシンデカン又はGP Iアンカーたとえばグリピカンである。感染作用物質の表面タンパク質は、感染を制御するために炎症性ケモカイン及び炎症性サイトカインを集結させることにより防御の第一線を提供する宿主HSPGと相互作用する。(346, 347)

【0252】

感染作用物質は、脂質ラフト中のGP I連結型分子に対する付加を介して、非オプソニ的に内部移行され得るといった考慮すべき一連の証拠がある。大腸菌の病原性株は、腸管上皮細胞上のGP I連結型CD55分子に接着し、細胞骨格の再配列及び細胞感染を誘発することが示された。(348)これは、GP Iアンカーを切断することで知られているホスホリパーゼCで細胞を処理することによりブロッキングされるだろう。(347)大腸菌による結合及び感染による張力線維再配列により、腸管細胞の融合性単層からの細胞剥離が引き起こされるのを見ることができる。

【0253】

本発明は、HSPGの上のGP I連結要素を認識する抗体が、感染作用物質上へのケモカインの集中を調節不全にし、その結果として、宿主の第一線の防御を減弱し得ることを提唱する。生物の非オプソニン内部移行はまた第一線の防御の構成要素であり、それによって、生物は、内部移行され、分解され得る又は、感染細胞は、GP Iシグナリングにより達成されたアクチン再配列を介して管腔表面から分離し得る。GP Iのブロックは、生物の上記の取込み及び排泄を予防するであろう。

【0254】

感染作用物質からの毒素もまたGP I連結型分子に結合する。GP Iアンカータンパク質に結合することで知られている、アエロモナス種からのチャンネル形成タンパク質であるアエロリジンは、構造的に及び機能的に悪性水腫菌のアルファ毒素に関連する。GP Iアンカーを合成することができない変異体細胞系は、アエロリジン及びアルファ毒素の両方に対して非感受性である。(349)ヘリコバクターピロリvacA毒素及び破傷風菌により生産される破傷風神経毒(TeNT)はクラスリン依存性であるGP Iアンカー不活性化エンドサイトーシス経路に結びつき、この経路により内部移行される。(350, 351)

【0255】

GP I連結型分子は、エンドサイトーシス経路に関わるだけでなく、GP I連結分子は、たとえば胆管の肝細胞において、エンドサイトーシス小胞の一部を形成する。(352)ホスファチジルイノシトール3-リン酸は、エンドソームの成熟に関わるGTPaseと相互作用する早期エンドソーム自己抗原EEA1の結合を達成するエンドソーム膜の一部であることが報告されている。結核菌を含むファゴソームは、ファゴリソームに成熟せず、カテプシンDの未熟な中間形を有している。(353)

【0256】

本明細書において、GP I連結を介する毒素の取込みは、血液及び組織間隙から毒素を除去するために設計された防御機構であるということ及び本発明の抗体はこのプロセスを妨害し、毒素が標的器官に到達することを可能にする可能性があるということが提唱される。さらに、抗体被覆GP I部分の内部移行は、ファゴソーム成熟及びエンドサイトーシス経路といった細胞内機構に抗体を接触させ、その結果として、生体の細胞内制御及び毒素の解毒を妨害し得る。

【0257】

感染に応じた又は生体の表面上のGP I連結型分子に直接応じたポリクローナル又はモノクローナルT細胞の増殖により抗抗TCR V抗体及び抗GP I要素抗体が発生する

10

20

30

40

50

という仮説は、特に G P I を有する寄生虫感染において、宿主のグルコース代謝が障害性であるという事実により確証される可能性がある。合併症を伴わない熱帯熱マラリア原虫マラリアを有する以前未治療の男性では、空腹時血漿グルコース及びインスリンレベルは、急性疾病の間、回復期よりも高度であった。2時間グルコース注入研究の間、血漿グルコース及びインスリンの濃度は、疾病の間、回復期においてよりも著しく高度であった。(354) 住血吸虫症を有する小児では、糖尿病患者の同胞と比較して、I C A 抗体がより高度に蔓延しており、第1期インスリン応答は、i . v . グルコース耐性試験の間、抑制される。(355) 空腹時血漿インスリン及びグルコース注入後60分でのインスリンレベルもまた、健常対照においてよりも高度であった。障害性グルコース耐性があった。(356)

10

【0258】

高血糖及び糖尿病は、シャガス病を有する患者において、対照におけるよりも蔓延している。(357)

【0259】

血糖障害は、カンジダ属に関連する口内炎において蔓延している。50歳を超えるのすべての視診された患者の35パーセントは、以前診断未確定の2型糖尿病を有し、36%は障害性グルコース耐性を有していた。(358)

【0260】

マイコバクテリウム結核感染では、長期的な疾患中の、インスリン分泌の増強、持続性高血糖、及び重篤な真性糖尿病の発達が注目された。(359) 同様に、2年を超える期間のハンセン病では、糖尿病グルコース耐性曲線が共通して観察される。(360)

20

【0261】

免疫調節

多くの G P I 連結型分子は免疫応答の調節に関わる。これらは、中でも、好中球及び単核細胞上の G P I - 8 0、(361) 好中球上の C D 1 6、(362) 腸上皮間リンパ球及び N K 細胞を含む循環性リンパ球のサブセット上の C D 1 6 0、(363) リンパ球機能抗原である L F A - 3、(364) I L - 2 誘発性シグナルを調節する C D 4 8 (365)、及び血管内皮細胞上の C D w 1 0 9 (366) を含む。免疫応答は、老化とともに障害性となり(367)、G P I 連結の要素に対する抗体はこれの一因となり得る。

30

【0262】

結論

上記の開示から、明らかになった統一概念は、感染性若しくは非感染性の起源の、遺伝的素因を有する若しくは有していないほとんどの疾患又は老化過程と関連する状態が上記に記載した多特異性自己抗体の発生により顕性になる又は悪化するというものである。母集団のうちの多くがこの自己抗体を産生し、この自己抗体は、インスリン及び/若しくは G P I 連結型分子、自己抗体により認識された他の調節分子、並びにリン脂質により制御された又はこれらに影響を与える血中グルコースレベル、インスリンレベル、他のホルモンレベルにより影響を与えられるすべての組織並びに器官を危険にさらす。これらの自己抗体は、潜在的に、老化関連疾患及び年齢関連疾患を速め、癌を促進し、遺伝的素因に基づくにせよ基づかないにせよ疾患の顕性を媒介し、且つ感染作用物質に対する第一線の防御を妨害する。すなわち、個々の敏感性に依存して、いくつかを上記に記載した1つ又は複数の問題の状態につながる自己抗体の生産となる、根底にある病原性の問題がある。類似するものとしては、任意の所定の医薬品に対するものであろう。1つ又は複数の副作用がある可能性があり、その医薬品の非存在下では副作用は存在しないであろう。

40

【0263】

以下の表は、本発明による治療又は診断に適している疾患を要約し、本明細書中並びに W O 9 9 / 0 5 1 7 5 に開示された各疾患及び一元化された疾患機構の間のリンクの指標をさらに提供する。表において、A 桁のスコア (+) は、疾患が、異常な経口グルコース耐性と関連することを示し (O G T T において)、B 桁のスコアは、疾患が、抗リン脂質抗体が存在する疾患であることを示し、C 桁のスコアは、疾患が、G P I 連結型分子に関

50

わる疾患であることを示し、D桁のスコアは、疾患が、異常なインスリンレベル又はインスリン抵抗性と関連する疾患であることを示し、E桁のスコアは、疾患が糖尿病患者においてより共通していることを示し、F桁のスコアは、疾患が、糖尿病1型又は2型を発症する危険性の増加と関連することを示す。

【0264】

以下の表中のスコア(+)の非存在は、関連するリンクが報告されていない又は存在しないことを示すものではなく、単に発明者が文献の上記リンクのいずれの報告にも現在気づいていないだけであることを示すということに注目すべきである。

【0265】

【表1-1】

疾患	A	B	C	D	E	F
乾癬	+		+	+		+
湿疹	+					
白斑			+	+	+	
黒色表皮腫	+			+		
円形脱毛症				+		
アルツハイマー	+		+	+		
統合失調症	+			+		+

10

20

【表 1 - 2】

疾患	A	B	C	D	E	F
うつ病				+		+
パーキンソン病	+		+	+		
片頭痛	+	+				
多発性硬化症	+	+	+		+	
重症筋無力症		+	+	+		
筋萎縮性側索硬化症及び 他の運動ニューロン障害	+		+	+		+
進行性核上性麻痺、ピック病、及び他の 神経変性疾患			+			
甲状腺疾患			+		+	+
多発性内分泌腫瘍症2A型及び2B型			+			
クッシング症候群	+		+			+
アジソン病			+			+
PCOS 性腺機能低下症	+		+	+		+
男性における早発性禿頭症				+		
肥満				+		
X症候群			+	+		
再発性の胎児の衰え		+			+	+
再発性自然流産		+			+	+
再発性血栓症		+			+	
全身性エリテマトーデス		+				+
セリアック病			+		+	+
自己免疫胃疾患			+		+	
炎症性腸疾患		+	+			
関節リウマチ	+		+	+		
強直性脊椎炎	+			+		
喘息			+	+	+	
嚢胞性腺維症			+			+
骨粗鬆症及び骨減少症			+		+	
扁平苔癬	+			+		
白板症	+				+	
再生不良性及び他の貧血	+		+	+	+	
発作性夜間血色素尿症			+			
睡眠時無呼吸	+			+		
不眠	+		+	+		+
癌	+		+	+	+	+
HIV	+	+	+	+		

10

20

30

40

【表 1 - 3】

疾患	A	B	C	D	E	F
感染			+		+	
免疫調節疾患			+			

【0266】

医薬組成物

第8の態様では、本発明は、本発明の第1の態様のペプチド、抗体、若しくは等価なりガンド又は本発明の第2若しくは第3の態様の核酸分子又は本発明の第4の態様のベクター又は本発明の第5の態様の宿主細胞を薬学的に許容し得る担体と共に含む医薬組成物を提供する。以下に詳細に概説されるように、これらの組成物は、治療試薬若しくは診断試薬として、ワクチンとして、又は他の免疫原性組成物として適していてもよい。

10

【0267】

医薬組成物は、本発明によるペプチドの組合せを含んでいてもよい（たとえば、本明細書中の実施例6及び7を参照されたい）。上記ペプチドは、単量体実体として組成物に取り込まれてもよく、二重鎖又は複数鎖を形成するよう連結されてもよい。上記鎖は、単量体成分分子間にリンカー要素を含んでいてもよく又は含んでいなくてもよい。

【0268】

医薬組成物は、好ましくは、治療上有効量の本発明のペプチド、抗体、若しくは等価なりガンド、核酸分子、ベクター、又は宿主細胞を含むべきである。本明細書中に使用される用語「治療上有効量」は、標的の疾患若しくは状態を治療する、寛解させる、若しくは予防するために又は検出可能な治療の若しくは予防の効果を示すために必要な治療剤の量のことを言う。任意の化合物について、治療上有効な用量は、たとえば新生細胞の細胞培養アッセイにおいて又は動物モデル、通常、マウス、ウサギ、イヌ、若しくはブタにおいて最初に見積もることができる。動物モデルはまた、適切な濃度範囲及び投与経路を決定するために使用されてもよい。次いで、上記情報は、ヒトへの投与のための有用な用量及び経路を決定するために使用することができる。

20

【0269】

ヒト対象に対する的確な有効量は、疾患状況の重症度、対象の全般的な健康、対象の年齢、体重、及び性別、食餌、投与の時間及び頻度、薬物の組合せ（複数可）、反応感受性、及び療法に対する耐性/応答に依存していてもよい。この量は、ルーチン的な実験法により決定することができ、臨床医の判断の範囲内にある。通常、有効な用量は0.0001 mg/kg ~ 50 mg/kg、好ましくは0.001 mg/kg ~ 10 mg/kg、より好ましくは0.05 mg/kg ~ 10 mg/kg、さらにより好ましくは0.1 mg/kg ~ 10 mg/kg だろう。組成物は、患者に個々に投与してもよく、又は他の作用物質、薬物、若しくはホルモンと組み合わせて投与されてもよい。

30

【0270】

0.005 mg/kg ~ 0.05 mg/kg の用量での本発明によるペプチドを含む組成物は、著しい望ましくない副作用を伴うことなく、ヒト患者における有用な治療効果を提供することが示された（本明細書中の実施例6及び7を参照されたい）。したがって、より少量の用量、等価な用量、又はより多量の用量のペプチドが本発明の組成物中に使用することができることは発明者により想定される。したがって、好ましい用量は、少なくとも0.001 mg/kg、少なくとも0.002 mg/kg、少なくとも0.003 mg/kg、少なくとも0.004 mg/kg、少なくとも0.005 mg/kg、少なくとも0.006 mg/kg、少なくとも0.007 mg/kg、少なくとも0.008 mg/kg、少なくとも0.009 mg/kg、少なくとも0.01 mg/kg、少なくとも0.015 mg/kg、少なくとも0.02 mg/kg、少なくとも0.03 mg/kg、少なくとも0.04 mg/kg、又は少なくとも0.05 mg/kg の本発明によるペプチドを含んでいてもよい。好ましい用量は、1 mg/kg 未満、0.9 mg/kg 未

40

50

満、0.08 mg/kg未満、0.07 mg/kg未満、0.06 mg/kg未満、又は0.05 mg/kg未満の本発明によるペプチドをさらに含んでいてもよい。好ましい用量は、0.001 mg/kg~1.0 mg/kg、0.0025 mg/kg~0.075 mg/kg、又は0.005 mg/kg~0.05 mg/kgの本発明によるペプチドを含んでいてもよい。

【0271】

医薬組成物は、治療剤の投与のための、薬学的に許容し得る担体をさらに含んでいてもよい。上記担体は、担体自体が、組成物を受ける個体に対して有害な抗体の生産を誘発しないという条件で、抗体及び他のポリペプチド、遺伝子、並びにリポソーム等の他の治療剤を含み、担体は、過度の毒性がなければ投与されてもよい。適した担体は、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーのアミノ酸、アミノ酸コポリマー、及び不活性ウイルス粒子等の大きな、ゆっくり代謝される巨大分子であってもよい。

10

【0272】

薬学的に許容し得る塩、たとえば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩等のような無機酸塩及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩等のような有機酸の塩はその中に使用することができる。薬学的に許容し得る担体の完全な解説は Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991) において入手可能である。

【0273】

治療組成物における薬学的に許容し得る担体は、水、食塩水、グリセロール、及びエタノール等の液剤をさらに含んでいてもよい。さらに、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝物質等のような補助物質は、上記組成物中に存在してもよい。上記担体は、医薬組成物が患者による摂取のための錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル、シロップ剤、スラリー、懸濁剤等として処方されるのを可能にする。

20

【0274】

処方されるとすぐに、本発明の組成物は対象に直接投与することができる。治療される対象は動物とすることができる；特に、ヒト対象を治療することができる。

【0275】

本発明に利用される医薬組成物は、経口手段、静脈内手段、筋肉内手段、動脈内手段、髄内手段、鞘内手段、脳室内手段、経皮手段、経皮的な手段、皮下手段、腹腔内手段、鼻腔内手段、腸内手段、局所的な手段、舌下手段、腔内手段、又は直腸手段を含むが、これらに限定されない任意の数の経路により投与されてもよい。遺伝子銃又はハイポスプレーもまた、本発明の医薬組成物を投与するために使用されてもよい（たとえば、www.powderject.comを参照されたい）。通常、治療組成物は、液体溶剤又は懸濁剤として、注射剤として調製されてもよい；注射前の液体媒体中の溶剤に又は懸濁剤に適した固体形態もまた調製されてもよい。

30

【0276】

組成物の直接的な送達は、皮下に、腹腔内に、静脈内に、若しくは筋肉内に注射により通常達成されるだろう、又は、組織の間質空間に送達されるだろう。投薬治療は、単一用量スケジュール又は複数用量スケジュールとしてもよい。

40

【0277】

1つのアプローチでは、上記に記載された問題の自己抗体をコードする遺伝子の発現は、内部的に産生された又は個別に投与されたアンチセンス核酸分子（上記に記載）の使用等の発現ブロック技術を使用して阻害することができる。遺伝子発現の修飾は、自己抗体をコードする遺伝子の制御領域、5'領域、又は調節領域（シグナル配列、プロモーター、エンハンサー、及びイントロン）に対する相補的配列又はアンチセンス分子（DNA、RNA、又はPNA）の設計により得ることができる。同様に、阻害は、「三重らせん」塩基対合方法論を使用して達成することができる（Huber, B. E. 及び B. I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY中のGe

50

e, J. E. ら (1994) を参照されたい)。相補的配列又はアンチセンス分子はまた、転写物がリボソームに結合するのを予防することにより mRNA の翻訳をブロックするように設計されてもよい。上記オリゴヌクレオチドは投与されてもよく又は *in vivo* での発現から *in situ* で産生されてもよい。

【0278】

遺伝子治療は、対象における関連する細胞による本発明のペプチドの内在的な生産を達成するために用いられてもよい。遺伝子治療は、*in vivo* 又は *ex vivo* で行うことができる。*ex vivo* 遺伝子治療は、患者細胞の単離及び精製、治療遺伝子の導入、並びに患者において遺伝的に変化した細胞を戻す導入を必要とする。対照的に、*in vivo* 遺伝子治療は、患者の細胞の単離及び精製を必要としない。

10

【0279】

治療遺伝子は、患者に対する投与のために通常「パッケージ化される」。遺伝子送達媒体は、リボソーム等の非ウイルス性又はアデノウイルス等の複製欠損ウイルス (Berkner, K. L., *in Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 39-66 (1992) を参照されたい) 又はアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (Muzyczka, N., *in Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158, 97-129 (1992) 及び米国特許第 5,252,479 号を参照されたい) であってもよい。たとえば、本発明のペプチドをコードする核酸分子は、複製欠陥レトロウイルスベクターにおける発現のために操作されてもよい。次いで、この発現構築物は、単離され、ペプチドをコードする RNA を含むレトロウイルスプラスミドベクターで形質導入されたパッケージング細胞に導入されてもよく、パッケージング細胞は、それから、興味のある遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を生産する。これらの生産細胞は、*in vivo* での細胞の操作及び *in vivo* でのポリペプチドの発現のために対象に投与されてもよい (Human Molecular Genetics (1996), T Strachan 及び A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd 中の Chapter 20, Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches (及び記載される参考文献) を参照されたい)。

20

【0280】

他のアプローチは、治療遺伝子が血流又は筋組織に直接注射される、「裸の DNA」の投与である。

30

【0281】

本発明は、本発明のペプチド、核酸分子、ベクター、及び宿主細胞が自己抗体を引き起こす疾患に対する抗体を産生するようワクチン中に使用することができることをさらに規定する。したがって、本発明のこの態様は、上記に記載した本発明の実施形態の任意の 1 つによるペプチド、核酸分子、ベクター、又は宿主細胞を含むワクチン組成物を提供する。本発明によるワクチンは、予防的 (つまり疾患を予防すること) 又は治療的 (つまり疾患の発生後に疾患を治療すること) であってもよい。上記ワクチンは、上記に記載された薬学的に許容し得る担体と通常組み合わせた免疫化するペプチド又は核酸を含み、担体は、それ自体、組成物を受ける個体に対して有害である抗体の生産を誘発しない任意の担体を含む。上記担体は免疫刺激剤 (「アジュバント」) として機能してもよい。本発明のワクチン組成物中に使用されてもよいアジュバントは、無機物を含むアジュバント (水酸化物、リン酸塩、硫酸塩等を含んでいてもよい、アルミニウム塩及びカルシウム塩等の無機塩を含む)、油乳剤、サポニン製剤、ピロソーム及びウイルス様粒子、細菌誘導體及び微生物誘導體、ヒト免疫修飾因子、バイオ接着剤及びムコ接着剤 (*mucoadhesive*)、微小粒子、リボソーム、ポリオキシエチレンエーテル製剤及びポリオキシエチレンエステル製剤、ポリホスファゼン (PCPP)、ムラミルペプチド、イミダゾキノロン化合物、チオセミカルバゾン化合物、並びにトリプタントリン化合物、又はそれらの組合せを含むがこれらに限定されない。

40

【0282】

50

さらに、ペプチドは、ジフテリア、破傷風、コレラ、H.ピロリ、及び他の病原体からのトキソイド等の細菌トキソイドに抱合してもよい。本発明によるペプチドは、1つずつ又は組み合わせて、単独で又はそれらペプチドの効力を促進するよう設計された作用物質と共に、リンカー要素及び担体を有する又は有していない一本鎖、二本鎖、又は複数鎖で使用されてもよい。

【0283】

ペプチドは胃中で分解される可能性があるため、ペプチドを含むワクチンは好ましくは非経口的に投与される(たとえば皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射、又は皮内注射)。非経口投与に適した製剤は、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、及び製剤をレシピエントの血液と等張にする溶質を含んでいてもよい水性の及び非水性の滅菌注射溶剤並びに懸濁化剤又は増粘剤を含んでいてもよい水性の及び非水性の滅菌懸濁剤を含む。

10

【0284】

本発明のワクチン製剤は、単位用量容器又は複数用量容器中に提供されてもよい。たとえば、密閉されたアンプル及びバイアルは、使用直前に滅菌液体担体の追加のみを必要とする凍結乾燥状態で保管されてもよい。投薬は、ワクチンの特異的な活性に依存するだろう、そしてルーチン的な実験法により容易に決定することができる。

【0285】

本発明のこの態様は、疾患又は障害に対して個体にワクチン接種する方法であって、上記に記載した本発明の実施形態の任意の1つによるペプチド又はワクチン組成物を個体に投与することを含む方法を含む。

20

【0286】

単一の投与から長期間にわたり、たとえば、1日を超える間、1週間を超える間、1か月を超える間、数か月を超える間、患者に本発明の組成物を送達することは望ましいかもしれない。様々な徐放性剤形、持効性剤形、又は移植片剤形は発明者により想定される。たとえば、剤形は、薬学的に許容し得る無毒性の、体液における低度の溶解性を有するペプチドの塩を含むことができる。さらに、ペプチドはゲル、たとえばモノステアリン酸アルミニウムゲル中に、注射に適したたとえばゴマ油と共に処方することができる。注射のための他の種類の徐放性持効性製剤は、たとえばUS 3,773,919に記載されるように、ポリ乳酸/ポリグリコール酸ポリマー等の遅分解性、無毒性、非抗原性のポリマー中でのカプセル化のために分散したペプチド又は塩を含むであろう。適した徐放性製剤、持効性製剤、又は移植片製剤は当業者により特定することができる。

30

【0287】

本発明の他の態様によれば、自己免疫抗体の存在又はレベルについて個体を診断する方法が提供され、方法は、血液試料、血漿試料、若しくは血清試料、又は他の体液を、上記に記載した本発明の実施形態の任意の1つによるペプチドと、自己免疫抗体に対する標的の存在下で接触させること及び特異的に標的に結合する自然発生の自己抗体の量を評価することを含む。上記方法は、自己免疫抗体に結合することができる標的分子がペプチドと結合について特異的に競合する競合結合アッセイを含む。このように、ペプチドは、個体中に存在する自己免疫抗体の存在及び含量を検出するために使用することができる。上記アッセイは、放射免疫アッセイ、ウエスタンブロット分析、蛍光活性化細胞分類(FACS)、又はELISA技術に基づくものであってもよい)。対象、生検を行った組織からの対照試料及び疾患試料中で発現した自己抗体の含量は、このように、標準値と比較することができる。標準値及び対象値の間の偏差は疾患を診断するためのパラメータを確立する。診断アッセイは、自己免疫抗体の非存在、存在、及び過剰発現を区別するために及び治療的処置の間のポリペプチドレベルの調節を監視するために使用されてもよい。上記アッセイはまた、動物研究において、臨床治験において、又は個々の患者の治療の監視において、特定の治療的治療投与計画の効力を評価するために使用されてもよい。

40

【0288】

上記の方法は、標識ペプチドが複合体を形成するために自己抗体と標的分子について競合するように標識されたペプチドを利用してよい。上記アッセイでは、複合体中で結合

50

した標識の量は試料中に存在する自己抗体の濃度に反比例する。ペプチドは、複合体の形成が酵素の活性を阻害する又は不活性化するように、酵素で標識されてもよい。或いは、ペプチドは、放射性又は蛍光性標識されてもよい。代替シナリオでは、標的分子は、標的分子への自己免疫抗体の結合が酵素を活性化し、分光光度計で測定可能な色変化を引き起こすよう、基質に連結された酵素に結合していてもよい。標的分子は、基質に連結された酵素に結合され、試料と接触することができる計量棒上に存在してもよい。

【0289】

すべてのこれらの方法論では、標的分子は、好ましくは、ヒト又は任意の動物種におけるT細胞受容体V鎖上の少なくとも1つのエピトープを同定する抗TCRVポリクローナル免疫グロブリン分子若しくは抗TCRVモノクローナル免疫グロブリン分子又はその任意の一部であってもよい。

10

【0290】

自己抗体の検出を容易にするために、本発明は、上記に記載された本発明の実施形態の任意の1つによるペプチド；T細胞受容体V鎖上の少なくとも1つのエピトープを同定する抗TCRVポリクローナル標的免疫グロブリン分子若しくは抗TCRVモノクローナル標的免疫グロブリン分子又はその任意の一部；並びに自己免疫抗体及び標的免疫グロブリン分子の間の結合反応の検出に有用な試薬を含む診断キットを提供する。上記キットは、疾患又は疾患に対する感受性の診断において相当に役に立つだろう。

【0291】

本発明のさらなる態様によれば、本発明の第1の態様による1つ又は複数のペプチドを取り込んだアレイが提供される。上記アレイは、疾患又は疾患に対する感受性の診断に有用である。ペプチドアレイ、タンパク質アレイ、及び抗体アレイの分野における最近の開発により多くのポリペプチドの同時検出が可能になっている。全般的タンパク質アレイシステム(universal protein array system)(Ge H, (2000) Nucleic Acids Res. 28(2), e3)等のフィルター膜上の低密度タンパク質アレイは、標準的なELISA技術及び96個のウェルを含む光学板ガラスプレート上の走査型電荷結合素子(CCD)検出器を使用して整列した抗原の画像化を可能にする。臨床分析物の同時検出を可能にする免疫センサーアレイもまた開発された。上記タンパク質アレイを使用することにより、健常対象又は病気の対象の血清における並びに薬物治療前及び後の患者における等の体液においてタンパク質発現(自己抗体等)をプロファイリングすることができる。

20

30

【0292】

代替実施形態では、本発明の第1の態様の生物学的に発現した若しくは合成されたペプチドに対して産生されたポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体又は等価なりガンドは、分析技術において、自己抗体又は自己抗体に対して作製された中和抗体の存在を定性的に又は定量的に検出するために使用されてもよい。

【0293】

ここでは、本発明の様々な態様及び実施形態を、例としてより詳細に、特異的なペプチドに特に関連して記載することとする。細部の修飾が本発明の範囲から逸脱することなく成されてもよいことは十分に理解されるだろう。

40

【図面の簡単な説明】

【0294】

【図1A】クローニングした抗体VH領域及びVL領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の図である。

【図1B】クローニングした抗体VH領域及びVL領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の図である。

【図2】対照の関連がないモノクローナル抗体存在下でのヒト腫瘍細胞系の図である。

【図3A】アクチン細胞骨格及び細胞突起の典型的な形態を示す、抗抗TCRV抗体存在下でのヒト腫瘍細胞系の図である。

【図3B】アクチン細胞骨格及び細胞突起の典型的な形態を示す、抗抗TCRV抗体

50

存在下でのヒト腫瘍細胞系の図である。

【図 4 A】クローニングした抗体 V H 領域及び V L 領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の図である。

【図 4 B】クローニングした抗体 V H 領域及び V L 領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の図である。

【図 4 C】クローニングした抗体 V H 領域及び V L 領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の図である。

【図 4 D】クローニングした抗体 V H 領域及び V L 領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の図である。

【図 4 E】クローニングした抗体 V H 領域及び V L 領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の図である。

【図 5】NDX - 1 治療群における 0 1 日目及び 4 3 日目の 7 5 g グルコースの摂取前及び後の血清グルカゴン (平均値 \pm S D) の図である。

【図 6】抗糖尿病薬物の中止後の真性糖尿病 2 型患者における H b A 1 c レベルの図である。すべての対象からの平均データを示す ; バーは平均値の標準誤差を示す。抗糖尿病薬物治療の復活後に対象から得られたデータは除外した。

【図 7】抗糖尿病薬物の休止後の真性糖尿病 2 型患者における空腹時毛細血管グルコースレベルの図である。すべての対象からの平均データを示す ; バーは平均値の標準誤差を示す。抗糖尿病薬物治療の復活後に対象から得られたデータは除外した。

【図 8】抗糖尿病薬物の中止後の真性糖尿病 2 型患者における、アルブミンに対して補正した血清フルクトサミンレベルの図である。すべての対象からの平均データを示す ; バーは平均値の標準誤差を示す。抗糖尿病薬物治療の復活後に対象から得られたデータは除外した。

【図 9】抗糖尿病薬物の中止後の男性真性糖尿病 2 型患者における H b A 1 c レベルの図である。平均データの対象を示す ; バーは平均値の標準誤差を示す。抗糖尿病薬物治療の復活後に対象から得られたデータは除外した。

【図 1 0】抗糖尿病薬物の中止後の男性真性糖尿病 2 型患者における空腹時毛細血管グルコースレベルの図である。平均データを示す ; バーは平均値の標準誤差を示す。抗糖尿病薬物治療の復活後に対象から得られたデータは除外した。

【図 1 1】抗糖尿病薬物の中止後の男性真性糖尿病 2 型患者における、アルブミンに対して補正した血清フルクトサミンレベルの図である。平均データを示す ; バーは平均値の標準誤差を示す。抗糖尿病薬物治療の復活後に対象から得られたデータは除外した。

【図 1 2 A】本明細書中で同定された超可変領域配列に対する、知られている V H 配列及び V L 配列からの超可変領域配列のアラインメントの図である。

【図 1 2 B】本明細書中で同定された超可変領域配列に対する、知られている V H 配列及び V L 配列からの超可変領域配列のアラインメントの図である。

【図 1 2 C】本明細書中で同定された超可変領域配列に対する、知られている V H 配列及び V L 配列からの超可変領域配列のアラインメントの図である。

【図 1 2 D】本明細書中で同定された超可変領域配列に対する、知られている V H 配列及び V L 配列からの超可変領域配列のアラインメントの図である。

【図 1 2 E】本明細書中で同定された超可変領域配列に対する、知られている V H 配列及び V L 配列からの超可変領域配列のアラインメントの図である。

【実施例】

【 0 2 9 5 】

実施例 1 : 抗体配列決定

方法

全 RNA 単離

ポリ A⁺ mRNA を、抗抗 T C R V 及び G P I 連結の要素を認識する抗体を分泌した 1 0⁹ 凍結モノクローナル細胞からグアニジンイソチオシアネート法を使用して抽出した。全 RNA 単離は、Ambion 社製 RNA q e o u s キット (カタログ No . 1 9 1

10

20

30

40

50

2、ロットNo. 019K0158) を使用して行った。約0.3mgの凍結ハイブリドーマ細胞を5ml溶解/結合溶液中に再懸濁した。溶解の後で、5mlの64%エタノールを追加して、混合し、溶解物/エタノール混合物をRNAqueousフィルターユニットに充て、RNAをフィルターマトリックスに結合させるために遠心分離した。次いで、フィルターを700 μ l洗浄溶液No. 1で1回、500 μ l洗浄溶液2/3で2回洗浄し、そして、最終洗浄後の最終遠心分離ステップを伴って、各洗浄ステップ後に遠心分離した。RNAは、フィルターの中心に2 \times 60 μ lの予熱した(95 $^{\circ}$ C)溶離溶液を充て、遠心分離をかけることによりフィルターから溶離した。溶離したRNAは、一晚、-20 $^{\circ}$ Cで0.5 \times 体積塩化リチウムで沈殿させた。70%冷エタノール中での洗浄の後で、RNAペレットを風乾し、20 μ l滅菌水中に再懸濁し、-70 $^{\circ}$ Cで保管した。

10

【0296】

第1のcDNA鎖へのRNAの逆転写

相補的DNA鎖は、上記で単離した1 μ gのRNAを使用して構築した。

【0297】

逆転写反応は、Ambion社製Retroscripキット(カタログNo. 1710、ロットNo. 078K0262)を使用して以下のように設定した：

μ l

- 1 RNA (1 μ g)
- 4 混合dNTP (各2.5mM)
- 2 オリゴdTの第1のプライマー鎖
- 9 滅菌水

20

【0298】

この溶液を75 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベートし、次いで氷上に置いた。次いで次のものを追加した：

μ l

- 2 10 \times 別のRT-PCR緩衝液
- 1 胎盤RNAase阻害因子
- 1 M-MLV逆転写酵素

【0299】

反応は、42 $^{\circ}$ Cで90分間進ませ、92 $^{\circ}$ Cでの10分間のインキュベーションにより不活性化した。次いで、反応を-20 $^{\circ}$ Cで保存する。

30

【0300】

Ig重鎖断片及び軽鎖断片のポリメラーゼ連鎖反応

マウスIgプライマーセット(添付1、Novagen社、カタログNo. 69831-3、ロットNo. N14754)をメーカーの使用説明書に従って、上記で調製した第1のcDNA鎖を使用し、重鎖及び軽鎖Ig断片のPCRに使用した。

【0301】

反応は、必要になるまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0302】

PCR産物のクローニング

40

すべてのPCR産物は、配列決定を容易にするために平滑末端クローニングシステムにクローニングした。使用したシステムは、pSTBlue-1 Perfectly Blunt(商標)クローニング(Novagen社、カタログNo. 70191-3)及びZero Blunt(商標)PCRクローニングキット(Invitrogen社、25-0162)であった。次いで、PCR産物を標準的な手順により配列決定した。

【0303】

結果

重鎖及び軽鎖可変領域について得られたヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図1A及び1B(配列番号1~4)に示す。超可変領域を推定し、図1A及び1B中で下線を引いた(配列番号6~16)。

50

【0304】

実施例2：ホモ二量体CDRペプチド

N末端システインを、Fmocペプチド合成により合成し、二量体化してホモ二量体を形成した超可変領域配列(CDR-L1~3及びCDR-H1~3、配列番号6~16)のそれぞれに追加した。ホモ二量体のそれぞれのいくつかをビオチン化した；次いで、ビオチン化ホモ二量体を、蛍光顕微鏡により、ヒト膵臓細胞(指標ヒト組織として使用)に結合するホモ二量体の性能について、第2のステップ試薬として蛍光化抗ビオチンを使用することにより試験した。CDR-H2(配列番号8)、CDR-H3(配列番号10)、及びCDR-L3(配列番号16)からのホモ二量体は、膵臓細胞に結合することがわかった。次いで、非ビオチン化ホモ二量体ペプチドを、ELISAにより、抗TCRV抗体に及びリン脂質の指標としてのカルジオリピンに結合するペプチドの性能について試験した(表1)。

【0305】

表1. モノクローナル抗抗TCRV抗体又はホモ二量体ペプチドCDR-H2、CDR-H3、及びCDR-L3の抗TCRV抗体に対する結合を示すELISAの光学密度示度

【表2】

抗原	α -TCRV _{β} 抗体	CDR-H2	CDR-H3	CDR-L3
α -TCRV _{β} 抗体	$0.806 \pm 0.056^{\#}$	$0.307 \pm 0.018^*$	$0.182 \pm 0.009^*$	$0.243 \pm 0.008^*$
培地 [#] /PBS [*]	$0.372 \pm 0.037^{\#}$	$0.168 \pm 0.010^*$	$0.091 \pm 0.020^*$	$0.140 \pm 0.018^*$
比試験/対照	2.17	1.83	2.00	1.74
カルジオリピン ^{**}	0.142 ± 0.070	0.151 ± 0.020	0.132 ± 0.009	0.254 ± 0.012
アルコール ^{**}	0.038 ± 0.014	0.063 ± 0.012	0.061 ± 0.006	0.114 ± 0.021
比試験/対照	3.74	2.40	2.16	2.23

マイクロタイタープレートに -TCRV で被覆し、 -TCRV 又は培地に対して試験した。

* マイクロタイタープレートに CDR-H2、CDR-H3、及び CDR-L3 で被覆し、 -TCRV 又は培地に対して試験した。

** マイクロタイタープレートに、エチルアルコール中のカルジオリピン又はエチルアルコールで被覆し、 -TCRV 又は CDR-H2、CDR-H3、及び CDR-L3 に対して試験した。

それぞれの平均値及び標準偏差は3つの観察についてのものである。

【0306】

実施例3：in vivoでの自己抗体の同定

抗TCRV抗体に結合する自己抗体(抗抗TCRV及び本発明のペプチドにより代表される)のヒト血清における存在の証拠を表2に示す。自己抗体は、成人母集団内ではおそらく遍在性となるので、検出不可能なレベルは、小児において最も見つかかりそうである。これは、ICA陽性対照及びICA陰性対照と比較した、新たに診断されたI型糖尿病小児において高度なレベルを示す、表2中のデータにより支持される。

【0307】

表2. 新たに診断された糖尿病小児及び非糖尿病小児からの血清の、モノクローナル抗TCRV抗体に対する反応性。

【表 3】

対象の種類	対象の総数	抗 TCR V β に対して 反応性の数	試験/対照 指数範囲 *	平均指数
新たに診断した 糖尿病患者	8	7	1.8 - 3.8	2.7 \pm 0.8
非糖尿病患者 ICA陽性	10	5	1.2 - 1.5	1.3 \pm 0.1
非糖尿病患者 ICA陰性	10	3	1.2 - 2.1	1.6 \pm 0.5

10

* 指数範囲は、1対30に希釈した試験血清を希釈剤のみ（培地）と比較する、光学密度実測値の比を利用することにより導き出す。

- ・マイクロタイプレートは抗 TCR V 抗体で被覆した。
- ・血清は培地中で1対30に希釈した。
- ・結合は、抗ヒト Ig ペルオキシダーゼ及び適切な基質を使用して検出した。

【0308】

実施例 4：癌転移

自己抗体はまた、細胞運動を引き起こすアクチン細胞骨格と相互作用する uPAR 等の GPI 連結型分子に結合することにより癌転移にも関係する（51ページを参照されたい）。uPAR 又は類似する分子が細胞骨格の維持を担う可能性がある他の例は、嚢胞性線維症（54ページを参照されたい）において又は上記分子を持つ滑膜細胞が軟骨及び骨に浸潤する関節炎において（50ページを参照されたい）損なわれる最適な CFTR 機能についてのものである。

【0309】

図 2 は、関連がない抗体存在下でのヒト腫瘍細胞系を示すが、図 3 a 及び 3 b は、同一の腫瘍細胞系に対する抗抗 TCR V モノクローナル抗体の影響を示し、30分間のインキュベーション後の運動を示す、アクチン細胞骨格及び細胞突起の変化を実証する。

【0310】

実施例 5：さらなる抗体配列決定

5つのさらに交差反応性のネズミ抗抗 TCR V モノクローナル抗体をコードする遺伝子を、上記実施例 1 に記載された方法を使用してクローニングし、配列決定した。モノクローナル抗体配列を得た細胞系は、本明細書中において名付けた細胞系 13.42 a、32.15、32.17、32.75、及び 32.2 である。細胞系 32.15、32.17、32.75、及び 32.2 により生産された抗体は、IgM 抗体であり、実施例 1 においてクローニングされ配列決定された抗体と同様である。細胞系 13.42 a により生産された抗体は IgG 抗体である。

【0311】

結果

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図 4 A ~ 4 E に示す。細胞系 13.42 a VH 及び VL ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図 4 A（配列番号 17 ~ 20）に示す。細胞系 32.15 VH 及び VL ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図 4 B（配列番号 33 ~ 36）に示す。細胞系 32.17 VH 及び VL ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図 4 C（配列番号 49 ~ 52）に示す。細胞系 32.75 VH 及び VL ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図 4 D（配列番号 65 ~ 68）に示す。細胞系 32.2 VH 及び VL ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図 4 E（配列番号 81 ~ 84）に示す。

30

40

50

【0312】

超可変領域を推定し、図4A～4Eで下線を引いた。細胞系13.42a超可変領域ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図4A(配列番号21～32)に示す。細胞系32.15超可変領域ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図4B(配列番号37～48)に示す。細胞系32.17超可変領域ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図4C(配列番号53～64)に示す。細胞系32.75超可変領域ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図4D(配列番号69～80)に示す。細胞系32.2超可変領域ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を図4E(配列番号85～96)に示す。

【0313】

細胞系13.42a、32.15、32.17、32.75、及び32.2について決定した超可変領域配列を実施例1で同定した超可変領域配列と比較し、どの超可変領域残基が、交差反応性の抗TCRV結合にとって重要なかを確立した(つまり、GPI連結エピトープ及び抗TCRV抗体、シグナリング能力を有する分子、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、及びカルジオリピン(ジアシルグリセロール)を含むリン脂質、リン脂質グリカン、インスリン作用のセカンドメッセンジャー、一本鎖DNA、又は二本鎖DNAに対する多特異性反応性にとって重要な超可変領域残基)。比較した超可変領域を表3及び4において以下に示す：

表3：重鎖超可変領域(CDR)配列

【表4】

	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
実施例1	GYTFTRNWINW	NIYPSDSYTNYNQKFKD	LRGLLPDY
細胞系 13.42a	GYAFTSYNMFW	YIDPYNGDTRYSQKFKG	KGMTTGYA
細胞系 32.15	GYTFTNYGMNW	WINTYTGEPTYADDFKG	EGLYGNYF
細胞系 32.17	GYTFTRNWINW	NIYPSDSYTNYNQKFKD	LRGLLPDY
細胞系 32.75	GYTFTRNWINW	NIYPSDSYTNYNQKFKD	LRGLLPDY
細胞系 32.2	GYTFTNYGMNW	WINTYTGEPTYADDFKG	EGLYGNYF
保存残基	GY-FT-----W	-I-----Y---FK-	-----

表4：軽鎖超可変領域(CDR)配列

【表5】

	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
実施例1	KASQNVDTNVA	SASYRYS	QQYNSYPLT
細胞系 13.42a	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQGNTFPTF
細胞系 32.15	KASQNVGTNVA	SASYRYS	QQYNSYPLT
細胞系 32.17	RASSISSNYL	RTSILAS	QQGSSSPLT
細胞系 32.75	KASQNVDTNVA	SASYRYS	QQYNSYPPT
細胞系 32.2	KASQNVGTNVA	SASYRYS	QQYNSYPLT
保存残基	-AS-----	--S---S	QQ----P--

【0314】

これらの超可変領域配列の分析は、交差反応性の抗TCRV結合に必要な残基に関する重要な情報を明らかにする(つまり、本明細書中に記載されるような、GPI連結エピトープに対する多特異性反応性)。

【0315】

第1に、配列の分析は、特異的なアミノ酸が、各CDR内のある種の位置で必須である可能性があることを示唆する。コンセンサ配列を各CDRについて生成した、コンセンサ配列は、発明者によりクローニングされ、配列決定されたすべての6つの抗体にわたって完全に保存されているアミノ酸を取り込む。以下のコンセンサ配列では、「x」は任意のアミノ酸とすることができ、「-」はペプチド結合を示す。

【0316】

【化12】

CDR-H1	G-Y-x-F-T-x-x-x-x-x-W	
CDR-H2	x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x	10
CDR-H3	完全な保存残基なし	
CDR-L1	x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x	
CDR-L2	x-x-S-x-x-x-S	
CDR-L3	Q-Q-x-x-x-x-P-x-x	

【0317】

第2に、配列の分析は、各CDRに対する「一般式」の生成を可能にした。以下の式では、2つ以上のアミノ酸残基がCDR中の所定の位置に生じることがわかり、それらの残基は括弧で示す。

【0318】

【化13】

CDR-H1	G-Y-[TA]-F-T-[RNS]-[YN]-[WGN]-[IM]-[NF]-W	
CDR-H2	[NWX]-I-[YND]-[PT]-[SY]-[DNT]-[SG]-[YDE]-[TP]-[NRT]-Y-[NSA]-[QD]-[KD]-F-K-[DG]	
CDR-H3	[LKE]-[RG]-[GML]-[LTY]-[LTG]-[PGN]-[DY]-[YAF]	
CDR-L1	[KR]-A-S-[QS]-[NDS]-[VI]-[DSG]-[TNS]-[NY]-[VLY]-[ANL]	
CDR-L2	[SYR]-[AT]-S-[YRI]-[RL]-[YHA]-S	
CDR-L3	Q-Q-[YG]-[NS]-[TS]-[YFS]-P-[LTP]-[TF]	30

【0319】

したがって、上記の「一般式」は、発明者によりクローニングされ、配列決定された6つのIgM及びIgGのモノクローナル抗体のCDR配列のそれぞれを包含する。

【0320】

第3に、配列の分析は、保存アミノ酸だけではなく、CDRの各位置で最も共通した（主要の）アミノ酸（複数可）も考慮に入れるアミノ酸式を各CDRについて生成することを可能にした。以下の式では、保存アミノ酸又は主要なアミノ酸は、アミノ酸が所定の位置で共に主要であるとわかった（すなわち、クローニングされ、配列決定されたCDRにおいてアミノ酸が等回数生じるとわかった）場合を除いて、記載し、共に主要なアミノ酸は括弧で記載する。

【0321】

【化14】

CDR-H1	G-Y-T-F-T-R-[YN]-W-[IM]-N-W	
CDR-H2	N-I-Y-P-[SY]-D-[SG]-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-[DG]	
CDR-H3	L-[RG]-G-L-L-P-[DY]-Y	
CDR-L1	K-A-S-Q-N-V-[DSG]-T-N-V-A	
CDR-L2	S-A-S-Y-R-Y-S	
CDR-L3	Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T	50

【0322】

1つ又は複数の上記のコンセンサス配列及び式の必要を満たすアミノ酸配列を含む又はから成るペプチドは、後述の実施例6及び7において *in vivo* で試験されたペプチドに対して等価な生物活性を有しているだろう、そして本発明に従って有用だろうということが考えられる。

【0323】

実施例6：I / I I a 相治験

グルコース不耐性を有する12人の男性対象が、NDX-1の安全性及び耐用性を評価するためにI / I I a相二重盲検偽薬対照臨床治験に参加した。NDX-1は、2:1:1の比率で混合した、本発明による3つのペプチド(B71、C80、及びF90)の混合物である。B71は、CDR-H2由来の単量体ペプチドのホモ二量体であり、各単量体は、配列番号8に提示されるアミノ酸配列及びさらにN末端システイン残基を含む。B71単量体ペプチドのアミノ酸配列は配列番号159に与えられる。C80は、CDR-H3由来の単量体ペプチドのホモ二量体であり、各単量体は、配列番号10に提示されるアミノ酸配列及びさらにN末端システイン残基を含む。C80単量体ペプチドのアミノ酸配列は配列番号160に与えられる。F90は、CDR-L3由来の単量体ペプチドのホモ二量体であり、各単量体は、配列番号16に提示されたアミノ酸配列及びさらにN末端システイン残基を含む。F90単量体ペプチドのアミノ酸配列は配列番号161に与えられる。患者は、試験物質、NDX-1ペプチド混合物、又は偽薬の注射の01日目から1週間間隔を置いた、合計4回の筋肉内(IM)注射を受けるためにランダム化された。3人の対象は、1.1ml食塩水中0.1%アルハイドロゲルから成る偽薬の注射を受けた。9人の対象は、0.1%アルハイドロゲルを含む1.1ml食塩水中0.99mgのNDX-1ペプチド混合物を受けた。偽薬及び試験の注射は見かけ上同一であった。

【0324】

NDX-1ペプチド混合物は十分に耐性があった。治療対照では、グルコース、インスリン、及びグルカゴンの空腹時濃度はベースラインと比較して著しく変化しなかった。対象は、第1の注射前の01日目及び43日目に経口グルコース耐性試験(OGTT)を受けた。血液は、75gグルコースの摂取前及び摂取後の30、60、90、及び120分の両方の場合でサンプリングされた。

【0325】

NDX-1ペプチド混合物を受けた対象は、偽薬群と比較して、2時間血清グルコース濃度において著しい減少を示した($p = 0.03$)。グルカゴンがNDX-1群におけるその最低のレベルに到達するのに必要な時間は、01日目で 113.3 ± 13.2 分であり、43日目で 63.3 ± 41 分に達した($p = 0.0027$; 図5を参照されたい)。治験の終了までの、ベースラインからの、血漿クレアチニン($p = 0.0009$)、ナトリウム($p = 0.0344$)、塩化物($p = 0.0041$)、及び血漿尿素($p = 0.0156$)における割合の変化にもNDX-1群及び偽薬群を比較して有意差があった。これらの変化は、治療群においてではなく偽薬群において疾患進行と一致していた。さらに、試験群におけるOGTT研究の2時間のグルコース及びグルカゴンの結果は、自己血糖調節におけるNDX-1ペプチド混合物の効力を実証する。

【0326】

実施例7：2型糖尿病患者におけるI I b相治験

1回又は複数回の経口抗糖尿病薬物治療中の2型真性糖尿病を有する31人の対象(男性21人及び女性10人)が、16週間の期間のランダム化二重盲検研究に参加した。01日目で、抗糖尿病薬物治療はすべて停止された。患者を、偽薬群(C群)又はA群、B群、若しくはD群として記載される3つの治療群のうちの1つにランダム化した。すべての群は、01日目から開始して、1週間離して間隔を置いた合計4回のIM注射を受けた。偽薬群(8人の対象)は、0.1%アルハイドロゲルを含む1.2mlの食塩水を受けた。A群(7人の対象)は、0.1%アルハイドロゲルを含む1.2ml食塩水中の本発明による1.51mgのペプチド(本明細書中においてNDX-71と名付けられた)を

10

20

30

40

50

受けた。B群（8人の対象）は、0.1%アルハイドロゲルを含む1.2ml食塩水中0.86mg ND X - 71を受けた。D群（8人の対象）は、0.1%アルハイドロゲルを含む1.2ml食塩水中の本発明の3つのペプチド（0.92mg ND X - 71、0.68mg C 80、及び0.71mg F 90）の混合物を受けた。偽薬及び研究の薬物治療は見かけ上同一であった。この実施例で使用されたND X - 71ペプチドは、実施例6で使用されたB 71ペプチドであった。この実施例で使用されたC 80及びF 90のペプチドは、実施例6で使用したC 80及びF 90のペプチドであった。

【0327】

研究期間を通じて一定の間隔で、患者は、臨床的な安全性パラメーター及び血糖効力パラメーターについての血液試験を受けた。試験物質は十分に耐性があった。すべての群における臨床的な安全性パラメーターはベースラインから不変であった。試験物質に起因する、研究において報告された有害事象はなかった。

10

【0328】

薬物休止後の4か月にわたり、Hb A 1 c、空腹時血中グルコース、及びフルクトサミンで測定されたように、偽薬群において血糖制御の著しい悪化があった（図6～8を参照されたい）。Hb A 1 cの平均レベルは、ベースラインでの6.3%から113日目の8.3%まで増加した。しかしながら、高用量の治療群では、Hb A 1 cレベルは、ベースラインでの6.3から113日目の6.9まで、長い間にわたってほぼ一定のままであり、偽薬群と著しく異なった（ $p = 0.02$ ；図6を参照されたい）。

20

【0329】

21人の男性ボランティアのサブセット分析は、偽薬（C群）並びにA群、B群、及びD群の間で、研究したすべての血糖パラメーターについて併せ持って、全体的な有意性又は高度な有意差を示した、すなわち、Hb A 1 c（ $p = 0.004$ ；図9を参照されたい）、空腹時血中グルコース（ $p = 0.024$ ；図10を参照されたい）、及び補正フルクトサミン（ $p = 0.015$ ；図11を参照されたい）。様々なパラメーターについての、偽薬（C群）及び高用量群（A群）の間の統計的に有意な治療の差異は次のとおりだった：Hb A 1 c $p < 0.001$ 、空腹時グルコース $p = 0.005$ 、及び補正フルクトサミン $p = 0.001$ 。偽薬と比較した、治療群における血糖制御は自己血糖調節の所望の効果を実証する。

30

【0330】

この実施例は、抗糖尿病薬物治療の休止後、1.51mg用量のND X - 71を受けた患者がND X - 71の経口抗糖尿病薬物治療非存在下で良好な血糖制御を維持することができたことを実証する。さらに、ND X - 71の効果は、効果がND X - 71の最終投薬後のちょうど3か月観察されたという点で、長く持続した。より低用量の0.86mg ND X - 71及び3つのペプチドの混合物を受けた対象もまた偽薬と比較して改善を示し、これは、ND X - 71が用量反応効果を有しており、より高用量又はより頻繁な注射がよりいっそうの好都合な結果をもたらす可能性があることを示す。

【0331】

実施例8：知られている配列の分析

実施例1及び5において同定された超可変領域配列を使用し、関連する結合特性を有する、知られているVH領域及びVL領域の超可変領域配列を同定した。次いで、知られているVH領域及びVL領域の超可変領域配列を、実施例1及び5において同定された超可変領域配列と比較し、交差反応性の抗TCR V結合にとって重要な超可変領域残基を分析した（すなわち、本明細書中に記載されるGPI連結エピトープに対する多特異性反応性にとって重要な超可変領域残基）。実施例5に記載されたプロセスと同一の配列分析プロセスを適用することにより、図12A～12Eに例示されるように、さらなる一連のコンセンサス配列及び式を同定した。

40

【0332】

先行技術の同定されたVH領域及びVL領域についてのアクセッション番号は、図12A～12Eに記載する。それらのVH領域及びVL領域についての、先行技術において開

50

示された結合特異性もまた、以下の略語を使用して図 1 2 A ~ 1 2 E に記載する：

【化 1 5】

抗-RF	抗リウマチ因子
抗-CL	抗カルジオリピン
抗-RNA	抗RNA
抗-sDNA	抗sDNA
抗-NA	抗一本鎖DNA
抗-VA	抗核抗体
抗-CD8	抗CD8
抗-TG	抗サイクログロブリン
抗-3H1	抗イディオタイプ抗体3HI
抗-RO	抗Ro
抗-TRKA	抗TrkA(高親和性NGF受容体)

10

【0 3 3 3】

実施例 1 及び 5 において同定された I g G 及び I g M 超可変領域配列は、異なるコンセンサス配列及び式を同定することがわかったので、この実施例において個別に分析した。

【0 3 3 4】

I g M C D R - H 1 配列については、以下のコンセンサス配列及び式が同定された (図 1 2 A を参照されたい) ；

【化 1 6】

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-x-x-x-x-x-W

20

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-[RNYSTDEG]-[NYF]-[WGAY]-[IMV]-[NGQH]-W

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-[RNS]-Y-W-[IM]-N-W

【0 3 3 5】

I g G C D R - H 1 配列については、以下のコンセンサス配列及び式が同定された (図 1 2 A を参照されたい) ；

【化 1 7】

IgG CDR-H1 G-Y-x-F-x-x-Y-x-M-x-W

30

IgG CDR-H1 G-Y-[ATS]-F-[T/S]-[SDG]-Y-[NWV]-M-[FQHN]-W

IgG CDR-H1 G-Y-T-F-T-S-Y-W-M-H-W

【0 3 3 6】

I g M C D R - H 2 配列については、以下のコンセンサス配列及び式が同定された (図 1 2 B を参照されたい) ；

【化 1 8】

IgM CDR-H2 x-I-x-x-x-x-x-x-x-x-Y-x-x-x-F-K-x

IgM CDR-H2 [NWEAY]-I-[YND]-[PT]-[SYG]-[DTGY]-[SGD]-[YEGS]-[TP]-
[NTYGS]-Y-[NAI]-[QDE]-[KD]-F-K-[DGN]

40

IgM CDR-H2 N-I-Y-P-S-D-S-Y-T-N-Y-N-Q-K-F-K-G

【0 3 3 7】

I g G C D R - H 2 配列については、以下のコンセンサス配列及び式が同定された (図 1 2 B を参照されたい) ；

【化 1 9】

IgG CDR-H2 x-I-x-P-x-x-x-x-T-x-Y-x-x-K-F-x-G

IgG CDR-H2 [YWKNLRL]-I-[DN]-P-[YAEFS]-[NYS]-[GD]-[DSG]-T-[RESKN]-Y-
[SAN]-[QSEP]-K-F-[KQT]-G

IgG CDR-H2 [YW]-I-N-P-Y-N-G-D-T-[ES]-Y-N-Q-K-F-K-G

【0338】

CDR-H3 については、その CDR には、高度なレベルの配列及び長さの変化があることがわかったので、コンセンサ配列又は式は同定されなかった。 10

【0339】

IgM CDR-L1 配列については、以下のコンセンサ配列及び式が同定された（図 1 2 C 参照されたい）：

【化 2 0】

IgM CDR-L1 x-A-S-x-x-x-x-x-x-x-x

IgM CDR-L1 [KR]-A-S-[QS]-[NSDT]-[VI]-[DGSR]-[TSYNK]-[NADY]-[VYGL]-
[ALD]

IgM CDR-L1 K-A-S-Q-N-V-S-T-N-V-A 20

【0340】

IgG CDR-L1 配列については、以下のコンセンサ配列及び式が同定された（図 1 2 C 参照されたい）：

【化 2 1】

IgG CDR-L1 x-A-S-x-x-x-x-x-x-L-x

IgG CDR-L1 [RK]-A-S-[QR]-[DSG]-[IV]-[SN]-[NSG]-[YW]-L-[NHA]

IgG CDR-L1 R-A-S-Q-S-I-S-N-Y-L-[NA] 30

【0341】

IgM CDR-L2 配列については、以下のコンセンサ配列及び式が同定された（図 1 2 D を参照されたい）：

【化 2 2】

IgM CDR-L2 x-x-S-x-x-x-S

IgM CDR-L2 [SRW]-[AT]-S-[YIT]-[RL]-[YAE]-S

IgM CDR-L2 S-A-S-Y-R-Y-S

【0342】

IgG CDR-L2 配列については、以下のコンセンサ配列及び式が同定された（図 1 2 D を参照されたい）：

【化 2 3】

IgG CDR-L2 x-T-S-x-L-x-x

IgG CDR-L2 [YLDTK]-T-S-[RNKV]-L-[HAG]-[SP]

IgG CDR-L2 Y-T-S-N-L-A-S

【0343】

IgM CDR-L3 配列については、以下のコンセンサ配列及び式が同定された（ 50

図 1 2 E を参照されたい) :

【化 2 4】

IgM CDR-L3 Q-Q-x-x-S-x-P-x-T

IgM CDR-L3 Q-Q-[YGWR]-[NSAG]-S-[YSDW]-P-[LPYI]-T

IgM CDR-L3 Q-Q-Y-N-S-Y-P-L-T

【0 3 4 4】

I g G C D R - L 3 配列については、以下のコンセンサ配列及び式が同定された (図 1 2 E を参照されたい) :

【化 2 5】

IgG CDR-L3 Q-Q-x-N-x-x-P-x-x

IgG CDR-L3 Q-Q-[GNSTY]-N-[TES]-[FDWY]-P-[TYRF]-[FT]

IgG CDR-L3 Q-Q-N-N-E-D-P-[YR]-T

【0 3 4 5】

この実施例で分析した V H 領域及び V L 領域配列はすべて、図 1 2 A ~ 1 2 E に例示されるように、本明細書中及び W O 9 9 / 0 5 1 7 5 に開示された一元化された疾患機構に 20
関係する分子に結合することで知られている。さらに、分析された超可変領域配列は、実施例 1 及び 5 において発明者らにより同定された超可変領域配列と著しい構造上の相同性を共有する。したがって、上記のコンセンサ配列及び式のうちの 1 つの必要を満たすアミノ酸配列を含む又はから成るペプチドもまた、上記の実施例 6 及び 7 において i n v i v o で試験されたペプチドに対して等価な生物活性を有しているだろう、そして本発明で用いるのに有用であろうということが考えられる。

【0 3 4 6】

実施例 9 : C D R - H 2 配列のさらなる分析

知られている V H 領域及び V L 領域配列中の C D R - H 2 配列のさらなる分析を実行し、交差反応性の抗 T C R V 結合に関わると考えられる付加的なアミノ酸残基を明らかにした。特に、関連する結合特異性を有する 6 7 個の知られている V H 領域配列からの C 30
D R - H 2 配列を発明者らにより同定された C D R - H 2 配列と比較し、必要とされる結合特異性を有する C D R - H 2 の各位置で共通して生じる残基を決定した。

【0 3 4 7】

以下の式を同定した、式は、C D R - H 2 内の各位置で、6 7 個の分析した C D R - H 2 配列のうち 6 個以上においてその位置で生じることがわかった任意の残基を含む :

【化 2 6】

CDR-H2 [EYWSL]-I-[YSND]-[PSH]-[SGNY]-[GSNTD]-[SGD]-[YTGS]-
[TIA]-[NY]-[YN]-[NAP]-[QDSEP]-[KSL]-[FVK]-[KQS]-[GR]

【0 3 4 8】

以下の式を同定した、式は、C D R - H 2 内の各位置で、6 7 個の分析した C D R - H 2 配列のうち 1 0 個以上においてその位置で生じることがわかった任意の残基を含む :

【化 2 7】

CDR-H2 E-I-[YSN]-[PS]-[SGN]-[GS]-[SG]-[TGS]-T-[NY]-Y-[NAP]-
[QDS]-[KS]-[FVK]-[KQ]-[GR]

【0 3 4 9】

以下の式を同定した、式は、C D R - H 2 内の各位置で、6 7 個の分析した C D R - H 2 配列のうち 2 0 個以上においてその位置で生じることがわかった任意の残基を含む :

10

20

30

40

50

どのアミノ酸も20回以上生じないことがわかった位置は、分析された67個のCDR-H2配列において「x」と表示し、任意のアミノ酸がその位置に存在してもよいことを意味する：

【化28】

CDR-H2 x-I-x-P-S-G-G-x-T-Y-x-A-D-[KS]-[FV]-K-G

【0350】

1つ又は複数の上記式の必要を満たすアミノ酸配列を含む又はから成るペプチドもまた、上記の実施例6及び7において*in vivo*で試験されたペプチドに対して等価な生物活性を有しているだろう、そして本発明で用いるのに有用であろうということが考えられる。

【0351】

(参考文献)

1. Payne J., Huber B. T., Cannon N. A., Schneider R., Schilham M. W., Acha-Orbea H., MacDonald H. R. and Hengartner H. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:7695-7698.
2. Hooper N. M., Broomfield S. J. and Turner A. J. (1991). *Biochem. J.* 273:301-306.
3. Saltiel A. R. (1990). *Diabetes Care* 13:244-256.
4. Romero G., Luttrell L., Rogol A., Zeller K., Hewlett E. and Larner J. (1988). *Science* 240:509-511. 10
5. Perez F. R., Casabiell X., Camina J. P., Zugaza J. L. and Casanueva F. F. (1997). *Endocrinology* 138:264-272.
6. Pipeleers D. G., Schuit F. C., in't Veld P. A., Hooghe-Peters E. L., Van de Winkel M. and Gepts W. (1985). *Endocrinology* 117:824-833.
7. Marchetti P., Scharp D. W., McClear M., Gingerich R., Finke E., Olack B., Swanson C., Giannarelli R. and Laacy P. E. (1994). *Diabetes* 43:827-830.
8. Todd J., Bell J. and McDevitt H. O. (1989). *Nature* 329:599-604. 20
9. Kimpimaki T., Kupila A., Hamamainen A-M., Kukko M., Kulama P., Savola K., Simell T., Keskinen P., Ilonen J., Simell O. and Knip M. (2001). *J. Clin. Endocrin. Metab.* 86:4782-4788.
10. Barnett A. H., Eff C., Leslie R. D. G. and Pyke D. A. (1981). *Diabetologia* 20:404-409.
11. Tisch R. and McDevitt H. (1996). *Review Cell* 85:291-297.
12. Castano L. and Eisenbarth G. S. (1990). *Ann. Rev. Immunol.* 8:647-680. 30
13. Hagopian W. A., Karlsen A. E., Gottsater A., Landin-Olsson M., Grubin C. E., Sundkvist G., Petersen J. S., Boel E., Dysberg T. and Lernmark A. (1993). *J. Clin. Invest.* 91:368-374.
14. Passini N., Larigan J. D., Genovese S., Apella E., Sinigaglia F. and Rogge L. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:9412-9416.

15. Rowe R. E., Leech N. J., Nepom G. T. and McCulloch D. K. (1994). *Diabetes* 43:87-94.
16. Eisenbarth G. S. (1994). *Diabetes Care* 17:605-607.
17. Daniel D., Gill R. G., Schloot N. and Vegmann D. (1995). *Eur. J. Immunol.* 25:1056-1062.
18. Roder M. E., Knip M., Hartling S. G., Karjalainen J., Akerblom H. K., Binder C. and the Childhood diabetes in Finland Study Group (1994). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:1570-1575. 10
19. Dinneen S., Alzaid A., Turk D. and Rizza R. (1995). *Diabetologia* 38:337-343.
20. Kleinbaum J. and Shamon H. (1983). *Diabetes* 32:493-498.
21. Kahn S. and Halban P. (1997). *Diabetes* 46:1725-1731.
22. Bolli, G. B., Tsalikian E., Haymond M. W., Cryer P. E. and Gerich J. E. (1984). *J. Clin. Invest.*, 73:1532-1541. 20
23. Low M. G. (1989). *FASEB J.* 3:1600-1608.
24. Shashkin P. N., Shashkina E. E., Fernquist-Forbes E., Zhou Y-P., Grill V. and Katz A. (1997). *Diabetologia* 40:557-563.
25. Lindgard B. (1986). *Dermatologica* 172:298-304.
26. Christophers E. (2001). *Clin. Exp. Dermatol.* 26:314-320.
27. Jucci A., Vignini M., Pelfini C., Criffo A. and Fratino P. (1977). *Arch. Dermatol. Res.* 257:239-246. 30
28. Brenelli S. L., Moraes A. M., Monte-Alegre S., Carvalho O. M. and Saad M. J. (1995). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28:297-301
29. Ena P., Madeddu P., Glorioso N., Cerimele D and Rappelli A. (1985). *Acta Cardiol.* 40:199-205.
30. Venneker G. T., Das P. K., Meinardi M. M., van Marle J., van Veen H. A., Bos J. D. and Asghar S. S. (1994). *J. Pathol.* 172: 189-197. 40
31. Hamza S. H., el-Mazny H. R. and Abdallah M. A. (1978). *Br. J. Dermatol.* 99:289-292.
32. Taieb A. (2000). *Pigment Cell Res.* 13 Suppl 8:41-47.

33. Romano G., Moretti G., Di Benedetto A., Giofre C., Di Cesare E., Russo G., Califano L and Cucinotta D. (1998) *Diabetes Res. Clin. Pract.* 39: 101-106.
34. Tsatmali M., Ancans J. and Thody A. J. (2002). *J. Histochem. Cytochem.* 50:125-134.
35. Katsuki A., Sumida Y., Murashima S., Furuta M., Araki-Sasaki R., Tsuchihashi K., Hori Y., Yano Y. and Adachi Y. (2000). *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24:1260-1264.
36. Scott G., Leopardi S., Printup S. and Madden B.C. (2002). *J. Cell Sci.* 115:1441-1451. 10
37. Virador V. M., Muller J., Wu X., Abdel-Malek Z. A., Yu Z. X., Ferrans V. J., Kobayashi N., Wakamatsu K., Ito S., Hammer J. A. and Hearing V. J. (2002). *FASEB J.* 16:105-107.
38. Tobin D. J., Swanson N. N., Pittelkow M. R., Peters E. M. and Schallreuter K. U. (2000). *J. Pathol.* 191:407-416.
39. Martinez-Esparza M., Ferrer C., Castells M. T., Garcia-Borron J. C. and Zuasti A. (2001). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33:971-983. 20
40. Grande J. P., Warner G. M., Walker H. J., Yusufi A. N., Cheng J., Gray C. E., Kopp J. B. and Nath K. A. (2002). *Exp. Biol. Med.* 227:171-181.
41. Tam B. Y., Germain L. and Philip A. (1998). *J. Cell. Biochem.* 70:573-586.
42. van den Wijngaard R. M., Asghar S. S., Pijnenborg A. C., Tigges A. J., Westerhof W. and Das P. K. (2002). *Br. J. Dermatol.* 146:80-87.
43. Bener A., Lestringant G. G., Nyomba B. L., Frossard P. and Saardi H. (2000). *East. Mediterr. Health J.* 6:416-424. 30
44. Hermanns-Le T., Hermanns J. F. and Pierard G. E. (2002). *Pediatr. Dermatol.* 19:12-14
45. Katz A. S., Goff D. C. and Feldman S. R. (2000). *Dermatol. Online J.* 6:1.
46. Nguven T. T. and Kell M. F. (2001). *J. Pediatr.* 138:453-454.
47. King-Tryce K., Garza L. and Ozias J. M. (2002). *Texas Department of Health Disease Prevention News* 62(2):1-3. 40
48. Bosset S., Barre P., Chalon A., Kurfurst R., Bonte F., Andre P., Perrier P., Disant F., Le Varlet B. and Nicolas J. F. (2002). *Eur. J. Dermatol.* 12:247-252.
49. Chung J. H., Seo J. Y., Choi H. R., Lee M. K., Youn C. S., Rhie G., Cho K. H., Kim K. H., Park K. C. and Eun H. C. (2001). *J. Invest. Dermatol.* 117:1218-1224.

50. Elias P. M. and Ghadially R. (2002). *Clin. Geriatr. Med.* 18:103-120.
51. Lundqvist K. and Schmidtchen A. (2001). *Br. J. Dermatol.* 144:254-259.
52. Marschall C., Lengyel E., Nobutoh T., Braungart E., Douwes K., Simon A., Magdolen V., Reuning U. and Degitz K. (1999). *J. Invest. Dermatol.* 113:69-76.
53. Ciaria M. V., Bocciarelli A., Di Gregorio S., Tordi A., Cotroneo P., Marra G., Ghirlanda G. and Strom R. (2001). *Atherosclerosis* 158:241-246. 10
54. Buch M. and Emery P. (2002). *Hospital Pharmacist* 9:5-10.
55. Sahn E. E. (1995). *Semin. Dermatol.* 14:9-14
56. Kumar B., Sharma V. K. and Sehgal S. (1995). *Int. J. Dermatol.* 34:542-545.
57. Shellow W. V., Edwards J. E. and Koo J. Y. (1992). *Int. J. Dermatol.* 31:186-189.
58. Wang S. J., Shohat T., Vadheim C., Shellow W., Edwards J. and Rotter J. L. (1994). *Am. J. Med. Genet.* 51:234-239. 20
59. Matilainen V., Koskela P. and Keinanen-Kiukaanniemi S. (2000). *Lancet* 356:1165-1166.
60. Kuusisto J., Koivisto K., Mykkanen L., Helkala E. I., Vanhanen M., Hanninen T., Kervinen K., Kesaniemi Y. A., Riekkinen P. J. and Laakso M. (1997). *BMJ.* 315:1045-1049.
61. Bierhaus A., Hofmann M. A., Ziegler R. and Nawroth P. P. (1998). *Cardiovasc. Res.* 37:586-600. 30
62. Bennett R. G., Duckworth W. C. and Hamel F. G. (2000). *J. Biol. Chem.* 275:36621-36625.
63. Vekrellis K., Ye Z., Qiu W. Q., Walsh D., Hartley D., Chesneau V., Rosner M. R. and Selkoe D. J. (2000). *J. Neurosci.* 20:1657-1665.
64. Yang L. B., Li R., Meri S., Rogers J and Shen Y. (2000). *J. Neurosci.* 20:7505-7509.
65. Reinoso B. S., Pimenta A. F. and Levitt P. (1996). *J. Comp. Neurol.* 375:274-288.
66. Ogier-Denis E., Bauvy C., Couvineau A., De Stefanis D., Isidoro C. and Codogno P. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211:935-942. 40
67. Haas U and Sparks D. L. (1996). *Mol. Chem. Neuropathol.* 29:1-14.

68. Tsukuba T., Okamoto K., Yasuda Y., Morikawa W., Nakanishi H. and Yamamoto K. (2000). *Mol. Cells* 10:601-611.
69. van Horssen J., Otte-Holler I., David G., Maat-Schieman M. L., van den Heuvel L. P., Wesseling P., de Waal R. M. and Verbeek M. M. (2001). *Acta Neuropathol.* 102:604-614.
70. Snow A. D., Mar H., Nochlin D., Kimata K., Kato M., Suzuki S., Hassell J. and Wight T. N. (1988). *Am. J. Pathol.* 133:456-463. 10
71. Mulder M. and Terwel D. (1998). *Haemostasis* 28:174-194.
72. Donahue J. E., Berzin T. M., Rafii M. S., Glass D. J., Yancopoulos G. D., Fallon J. R. and Stopa E. G. (1999). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 6468-6472.
73. Holden R. J. and Mooney P. A. (1994). *Med. Hypotheses* 43:420-435.
74. Holden R. J. (1995). *Med. Hypotheses* 44:379-391.
75. Nathan R. S., Sachar E. J., Asnis G. M., Halbreich U. and Halpern F. S. (1981). *Psychiatry Res.* 4:291-300. 20
76. Offen D., Shtaf B., Hadad D., Weizman A., Melamed E. and Gil-Ad I. (2001). *Neurosci. Lett.* 316:129-132.
77. Mattson M. P., Pedersen W. A., Duan W., Culmsee C. and Camandola S. (1999). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893:154-175.
78. Sandyk R. (1993). *Int. J. Neurosci.* 69:125-130. 30
79. Potter G. M., Moshirfar A. and Castonguay T. W. (1999). *Physiol. Behav.* 65:811-816.
80. Figlewicz D. P., Patterson T. A., Zavosh A., Brot M. D., Roitman M. and Szot P. (1999). *Horm. Metab. Res.* 31:335-339.
81. Liu Z., Wang Y., Zhao W., Ding J., Mei Z., Guo L., Cui D. and Fei J. (2001). *Neuropharmacology* 41:464-471.
82. Shiroyama K., Moriwaki K. and Yuge O. (1998). *In vivo* 12:527-529.
83. Gong L., Wyatt R. J., Baker I. and Masserano J. M. (1999). *Neurosci. Lett.* 263:153-156. 40
84. Klein R. D., Sherman D., Ho W. H., Stone D., Bennett G. L., Moffat B., Vandlen R., Simmons L., Gu Q., Hongo J. A., Devaux B., Poulsen K., Armanini M., Nozaki C.,

- Asai N., Goddard A., Phillips H., Henderson C. E., Takahashi M. and Rosenthal A. (1998). *Nature* 387:717-721.
85. Tietjen G. E., Day M., Norris L., Aurora S., Halvorsen A., Schultz L. R. and Levine S. R. (1998). *Neurology* 50:1433-1440.
86. Jacome D. E. (2001). *Headache* 41:895-898.
87. Heinzlef O., Alamowitch S., Sazdovitch V., Chillet P., Joutel A., Tournier-Lasserre E. and Rouillet E. (2000). *Acta Neurolog. Scand.* 101:36-40. 10
88. Winer S., Astsaturov I., Cheung R. K., Gunaratnam L., Kubiak V., Cortez M. A., Moscarello M., O'Connor P. W., McKerlie C., Becker D. J. and Dosch H-M. (2001). *J. Immunol.* 166:2831-2841.
89. Procacci V., Altavilla R. A., Robert, M. G., Chicco D., Antonacci N., Vendemiale G. and Altomare E. (1990). *Bollettino-Societa Italiana Biologia Sperimentale.* 66:795-802.
90. Kramer E. M., Koch T., Niehaus A. and Trotter J. (1997). *J. Biol. Chem.* 272:8937-8945. 20
91. Siewert E., Silvestri A., Riehl J. and Mertens P. R. (2001). *Eur. J. Med. Res.* 6:21-26.
92. Green S. T., Ng J. P. and Chan-Lam D. (1988). *Scott. Med. J.* 33:213-214.
93. Hoch W., McConville J., Helms S., Newsom-Davis J., Melms A. and Vincent A. (2001). *Nat. Med.* 7:365-368.
94. Tang J., Yuan J. and Hao H. (1997). *Chin. Med. J. (Engl.)* 110:698-700.
95. Zhmurko V. A. (1999). *Lik. Sprava Mar:*67-69 30
96. Ishikawa S., Komiyama Y., Kobayashi H., Tsuyuzaki J., Tokunaga S., Miyazaki A., Hanyu N. and Ikeda S. (2001). *Intern. Med.* 40:952-955.
97. Kaur G. and Arora S. K. (1994). *Mol. Chem. Neuropathol.* 21:83-93.
98. Bhattacharya S. K. and Saraswati M. (1991). *Indian J. Exp. Biol.* 29:1095-1100.
99. Kiss G., Somogyi J., Csermely P., Szelenyi J. and Ver A. (2001). *Diabetologia* 44:220-223 40
100. Hooper N. M. (1997). *Clin. Chim. Acta* 266:3-12
101. Mizisin A. P., Calcutt N. A., DiStefano P. S., Acheson A. and Longo F. M. (1997). *Diabetes* 46:647-652.

102. Poca S., Guyon T., Levasseur P. and Berrih-Aknin S. (2001). *J. Neuroimmunol.* 120:180-189.
103. Reyes E. T., Perurena O. H., Feestoff B. W., Jorgensen R. and Moore W. V. (1984). *J. Neurol. Sci.* 63:317-324.
104. Hubbard R. W., Will A. D., Peterson G. W., Sanchez A., Gillan W. W. and Tan S. A. (1992). *Neurology* 42:1532-1534.
105. Festoff B. W., Yang S. X., Vaught J., Bryan C. and Ma J. Y. (1995). *J. Neurol. Sci.* 129 Suppl.114-121. 10
106. Sasaki N., Fukatsu R., Tsuzuki K., Hayashi Y., Yoshida T., Fujii N., Koike T., Wakayama I., Yanagihara R., Garruto R., Amano N. and Makita Z. (1998). *Am. J. Path.* 153:1149-1155.
107. Bilak M. M., Corse A. M. and Kuncel R. W. (2001). *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Disord.* 2:83-91. 20
108. Torres-Aleman I., Barrios V. and Berciano J. (1998). *Neurology* 50:772-776.
109. Suzuki H., Hase A., Miyata Y., Arahata K. and Akazawa C. (1998). *J. Comp. Neurol.* 402:303-312.
110. Hase A., Suzuki H., Arahata K. and Akazawa C. (1999). *Neurosci. Lett.* 269:55-57.
111. Hongo J. A., Tsai S. P., Moffat B., Schroeder K. A., Jung C., Chuntharapai A., Lampe P. A., Johnson E. M. Jr., de Sauvage F. J., Armanini M., Phillips H. and Devaux B. (2000). *Hybridoma* 19:303-315. 30
112. Encinas M., Tansey M. G., Tsui-Pierchala B. A., Comella J. X., Milbrandt J. and Johnson E. M. Jr. (2001). *J. Neurosci.* 21:1464-1472.
113. Lundberg C., Lidman O., Holmdahl R., Olsson T. and Piehl F. (2001). *J. Comp. Neurol.* 431:75-87.
114. Perros P., McCrimmon R. J., Shaw G. and Frier B. M. (1995). *Diabet. Med.* 12:622-627. 40
115. Jacquemin C. (1991). *Biochimie* 73:37-40
116. Petitfrere E., Sartelet H., Vivien D., Varela-Nieto I., Elbtaouri H., Martiny L. and Haye B. (1998). *Biochimie.* 80:1106-1067.

117. Zurzolo C., Lisanti M. P., Carás I. W., Nitsch L. and Rodriguez-Boulan E. (1993). *J. Cell Biol.* 121:1031-9.
118. Marino M., Pichera A., McCluskey R. T and Chiovato L. (2001). *Thyroid* 11:47-56.
119. Marino M., Andrews D. and McCluskey R. T. (2000). *Thyroid* 10:551-559.
120. Katoh R., Muramatsu A., Kawaoi A., Komiyama A., Suzuki K., Hemmi A. and Katayama S. (1993). 423:417-424. 10
121. Lindahl M., Poteryaev D., Yu L., Arumae U., Timmusk T., Bongarzone I., Aiello A., Pierotti M. A., Airaksinen M. S. and Saarma M. (2001). *J. Biol. Chem.* 276:9344-9351.
122. Doppman J. L., Miller D. L., Dwyer A. J., Loughlin T., Nieman L., Cutler G. B., Chrousos G. P., Oldfield E. and Loriaux D. L. (1988). *Radiology* 166:347-352.
123. Hermus A. R., Pieters G. F., Smals A. G., Pesman G. J., Lamberts S. W., Benraad T. J., van Haelst U. J. and Kloppenborg P. W. (1988). *N. Engl. J. Med.* 318:966-970.
124. Leibowitz G., Tsur A., Chayen S. D., Salameh M., Raz I., Cerasi E. and Gross D. J. (1996). *Clin. Endocrinol.* 44:717-722. 20
125. Roy M. S., Roy A., Gallucci W. T., Collier B., Young K., Kamilaris T. C. and Chrousos G. P. (1993). *Metabolism* 42:696-700
126. Grant W. and Liddle M. D. (1960). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 20:1539-1560.
127. Fanjul L. F., Marrero I., Estevez F., Gonzalez J., Quintana J., Santana P. and Ruiz de Galarreta C. M. (1993). *J. Cell Physiol.* 155:273-281.
128. Shaver J. K., Tezelman S., Siperstein A. E., Duh Q. Y. and Clark O. H. (1993). *Surgery* 114:1064-1069. 30
129. Vila M. C., Cozza E. N., Lima C., Ramirez M. I. and De Lederkremer R. M. (1995). *Cell. Signal.* 7:331-339.
130. Robinson P. and Hederer R. (1994). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27:263-267.
131. Benitez L., Fanjul L. F., Ruiz de Galarreta C. M., Quintana Aguiar J., Gonzalez Reyes J., Hernandez I., Santana Delgado P., Cabrera Oliva J., Alonso Solis R. and Estevez Rosas F. (1995). *Neurosci. Lett.* 187:37-40. 40
132. Redmond G. P. (1998). *Int. J. Fertil. Womens Med.* 43:91-97.
133. Kalro B. N., Loucks T. L and Berga S. L. (2001). *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 28:35-62.

134. Rosenfield R. L. (2001). *J. Am. Acad. Dermatol.* 45(3 Suppl.):S95-104.
135. Norman R. J., Masters S. and Hague W. (1996). *Fertil. Steril.* 66:942-947.
136. Pugeat M., Ducluzeau P. H. and Mallion-Donadieu M.(2000). *Horm. Res.* 54:322-326.
137. Sekar N. and Veldhuis J. D. (2001). *Endocrinology* 142:2921-2928.
138. Poretsky L., Seto-Young D., Shrestha A., Dhillon S., Mirjany M., Liu H. C., Yih M. C. and Rosenwaks Z. (2001). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:3115-3119. 10
139. Kreze A. Jr., Hrneciar J., Dobakova M. and Pekarova E. (1997). *Bratisl. Lek. Listy* 98:555-558.
140. Marsden P. J., Murdoch A. P. and Taylor R. (2000). *Hum. Reprod.* 15:1672-1678.
141. Yanagishita M. (1992). *J. Biol. Chem.* 267:9499-9504.
142. Fanjul L. F., Marrero I., Estevez F., Gonzalez J., Quintana J., Santana P. and Ruiz de Galarreta C.M. (1993). *J. Cell. Physiol.* 155:273-281. 20
143. Fanjul L. F., Marrero I., Gonzalez J., Quintana J., Santana P., Estevez F., Mato J. M. and Ruiz de Galarreta C.M. (1993). *Eur. J. Biochem.* 216:747-755.
144. Hasan S., Hosseini G., Princivalle M., Dong J. C., Birsan D., Cagide C. and de Agostini A. I. (2002). *Biol. Reprod.* 66:144-158.
145. Fedarko N. S., Ishihara M. and Conrad H. E. (1989). *J. Cell. Physiol.* 139:287-294.
146. Saad M. F., Khan A., Sharma A., Michael R., Riad-Gabriel M. G., Boyadjian R., Jingagouda S. D., Steil G. M. and Kamdar V. (1998). *Diabetes* 47:544-549. 30
147. Stephens T. W., Basinski M., Bristow P. K., Bue-Valleskey J. M., Burgett S. G., Craft L., Hale J., Hoffman J., Hsiung H. M. and Kriauciunas A. (1995). *Nature* 377: 530-532.
148. Baskin D. G., Figlewicz Lattemann D., Seeley R. J., Woods S. C., Porte D. Jr. and Schwartz M. W. (1999). *Brain Res.* 848:114-123.
149. Olszewski P. K., Wirth M. M., Shaw T. J., Grace M. K., Billington C. J., Giraudo S. Q. and Levine A. S. (2001). *Am. J. Physiol.* 281:R673-680. 40
150. Dunbar J. C. and Lu H. (2000). *Brain Res. Bull.* 52:123-126.
151. Maffei M., Halaas J., Ravussin E., Pratley R. E., Lee G. H., Zhang Y., Fei H., Kim S., Lallone R., Ranganathan S., Kern P. A. and Friedman J. M. (1995). *Nat. Med.* 1:1155-1161.

152. Fedarko N. S., Ishihara M. and Conrad H. E. (1989). *J. Cell. Physiol.* 139:287-294.
153. Reaven G. M. (1988). *Diabetes Metab. Rev.* 37:1595-1597.
154. Ivanov D., Philippova M., Antopova J., Gubaeva F., Iljinskaya O., Tararak E., Bochov V., Erne P., Resink T. and Tkachuk V. (2001). *Histochem. Cell. Biol.* 115:231-242.
155. Reaven G. M. (1991). *Am. Heart J.* 121:1283-1288.
156. Swan J. W., Walton C., Godsland I. F., Crook D., Oliver M. F. and Stevenson J. C. (1994). *Br. Heart J.* 71:41-44. 10
157. Vuorinen-Markkola H. and Yki-Jarvinen H. (1994). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78:25-29.
158. Pagano G., Pacini G., Musso G., Gambino R., Mecca F., Depetris N., Cassader M., David E., Cavallo-Perin P. and Rizzetto M. (2002). *Hepatology* 35:367-372.
159. Harano Y., Suzuki M., Koyama Y., Kanda M., Yasuda S., Suzuki K. and Takamizawa I. (2002). *J. Diabetes Complications* 16:19-23. 20
160. Semplicini A., Ceolotto G., Massimino M., Valle R., Serena L., De Toni R., Pessina A. C. and Dal Palu C. (1994). *Am. J. Med. Sci.* 307 Suppl.1:S43-46.
161. Sardesai M. G., Gray A. A., McGrath M. M. and Ford S. E. (2001). *Obstet. Gynecol.* 98:925-927.
162. Hardin D. S., Hebert J. D., Bayden T., Dehart M. and Mazur L. (1997). *Pediatrics* 100(2):E5.
163. Bergstrom E., Hernell O., Persson L. A. and Vessby B. (1996). *Metabolism* 45:908-914. 30
164. Facchini F. S., Hua N., Abbasi F. and Reaven G. M. (2001). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:3574-3578.
165. Landy H. J., Kessler C., Kelly W. K. and Weingold A. B. (1992). *Am. J. Perinatol.* 9:146-151.
166. Andelova K., Sula K. and Velebil P. (1998). *Ceska Gynekol.* 63:446-449. 40
167. Lorini R., d'Annunzio G., Montecucco C., Caporali R., Vitali L., Pessino P. and Severi F. (1995). *Eur J. Pediatr.* 154:105-108.
168. Galtier-Dereure F., Biron C., Vies M., Bourgeois V., Schved J. F. and Bringer J. (1998). *Lupus* 7:469-474.

169. Ciarla M. V., Bocciarelli A., Di Gregorio S., Tordi A., Cotroneo P., Marra G., Ghirlanda G. and Strom R. (2001). *Atherosclerosis* 158:241-246.
170. de Maistre E., Gobert B., Bene M. C., Briquel M. E., Lecompte T. and Faure G. C. (1996). *J. Clin. Lab. Anal.* 10:6-12.
171. Fialova L., Mikulikova L., Matous-Malbohan I., Benesova O. and Zwinger A. (2000). *Physiol. Res.* 49:299-305.
172. Lopez-Soto A., Cervera R., Font J., Bove A., Reverter J. C., Munoz F. J., Miret C., Espinosa G., Ordinas A. and Ingelmo M. (1997). *Clin. Exp. Rheumatol.* 15:143-149. 10
173. Toschi V., Motta A., Castelli C., Paracchini M. L., Zerbi D. and Gibelli A. (1998). *Stroke* 29: 1759-1764.
174. Erkan D., Yazici Y., Sobel R. and Lockshin M. D. (2000). *J. Rheumatol.* 27:2817-2821.
175. Not T., Tommasini A., Tonini G., Buratti E., Pocecco M., Tortul C., Valussi M., Cricchiutti G., Berti I., Trevisiol C., Azzoni E., Neri E., Torre G., Martelossi S., Soban M., Lenhardt A., Cattin L. and Ventura A. (2001). *Diabetologia.* 44:151-155. 20
176. Tursi A., Giogetti G., Brandimarte G., Rubino E., Lombardi D. and Gasbarrini G. (2001). *Hepato-Gastroenterol.* 48:462-464
177. Williams A. J., Norcross A. J., Lock R. J., Unsworth D. J., Gale E. A. and Bingley P. J. (2001). *Diabetes Care* 24:504-509.
178. Di Mario U., Anastasi E., Mariani P., Ballati G., Perfetti R., Triglionone P., Morellini M. and Bonamico M. (1992). *Acta Pediatr.* 81:593-597. 30
179. Galli-Tsinopoulo, A., Nousia-Arvanitakis S., Dracoulacos D., Xefteri M. and Karamouzis M. (1999). *Hormone Res.* 52:119-124.
180. Alemany R., Vila M. R., Franci C., Egea G., Real F. X. and Thomson T. M. (1993). *J. Cell Sci.* 104:1155-1162.
181. Slomiany A., Grabska M. and Slomiany B. L. (2001). *Mol. Med.* 7:1-10.
182. Riley W. J., Winer A. and Goldstein D. (1983). *Diabetologia* 24:418-421. 40
183. Landin-Olsson M., Karlsson F. A., Lernmark A. and Sundkvist G. (1992). *Diabetes* 41:1022-1027.

184. Koike S., Takeda Y., Hozumi Y., Okazaki S., Aoyagi M. and Sendo F. (2002). *Cell Tissue Res.* 307:91-99.
185. Tenore A., Berman W. F., Parks J. S. and Bongiovanni A. M. (1977). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44:622-628.
186. Al-Jaouni R., Hebuterne X., Pouget I. and Rampal P. (2000). *Nutrition* 16:173-178.
187. Eriksson L. S. (1983). *Gut* 24:1161-1168. 10
188. Mingrone G., DeGaetano A., Pugeat M., Capristo E., Greco A. V. and Gasbarrini G. (1999). *J. Investig. Med.* 47:319-325.
189. Levy E., Rizwan Y., Thibault L., Lepage G., Brunet S., Bouthillier L. and Seidman E. (2000). *Am. J. Clin. Nutr.* 71:807-815.
190. Meddings J. B., Jarand J., Urbanski S. J., Hardin J. and Gall D. G. (1999). *Am. J. Physiol.* 276:G951-957.
191. Hollander D., Vadheim C.M., Brettholz E., Petersen G. M., Delahunty T. and Rotter J. I. (1986). *Ann. Intern. Med.* 105:883-885. 20
192. Hilsden R. J., Meddings J. B. and Sutherland L. R. (1996). *Gastroenterology* 110:1395-1403.
193. Koller E. and Ranscht B. (1996). *J. Biol. Chem.* 271:30061-30067.
194. Resink T. J., Kuzmenko Y. S., Kern F., Stambolsky D., Bochkov V. N., Tkachuk V. A., Erne P. and Niermann T. (1999). *FEBS Lett.* 463:29-34. 30
195. Kuzmenko Y. S., Kern F., Bochkov V. N., Tkachuk V. A. and Resink T. J. (1998). *FEBS Lett.* 434:183-187.
196. Ivanov D. B., Philippova M. P. and Tkachuk V. A. (2001). *Biochemistry (Mosc.)* 66:1174-1186.
197. Filmus J., Shi W., Wong Z. M. and Wong M. J. (1995). *Biochem. J.* 311:561-565.
198. Herndon M. E., Stipp C. S. and Lander A. D. (1999). *Glycobiology* 9:143-155.
199. Koh D. M., Miao Y., Chinn R. J., Amin Z., Zeegen R., Westaby D. and Healy J. C. (2001). *Am. J. Roentgenol.* 177:1325-1332. 40
200. Graham M. F., Diegelmann R. F., Elson C. O., Lindblad W. J., Gotschalk N., Gay S. and Gay R. (1988). *Gastroenterology* 94:257-265.

201. Koutroubakis I. E., Petinaki E., Anagnostopoulou E., Kritikos h., Mouzas I. A., Kouroumalis E. A. and Manousos O. N. (1998). *Dig. Dis. Sci.* 43:2507-2512.
202. Aichbichler B. W., Petritisch W., Reicht G. A., Wenzl H. H., Eherer A. J., Hinterleitner T. A., Auer-Grumbach P. and Krejs G. J. (1999). *Dig. Dis. Sci.* 44:852-856.
203. Paolisso G., Valentini G., Giugliano D., Marrazzo G., Tirri R., Gallo M., Tirri G., Varricchio M. and D'Onofrio F. (1991). *Metabolism* 40:902-907.
204. Takahashi S., Moriwaki Y., Tsutsumi Z., Yamakita J., Yamamoto T. and Hada T. (2001). *Metabolism* 50:393-398. 10
205. Svenson K. L., Pollare T., Lithell H. and Hallgren R. (1988). *Metabolism* 37:125-130.
206. Svenson K. L., Lundqvist G., Wide L. and Hallgren R. (1987). *Metabolism* 36:940-943.
207. Jimenez-Balderas F. J., Solis J. L. and Mintz G. (1991). *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 22:121-125. 20
208. Dessesin P. H., Joffe B. I., Stanwix A., Botha A. S. and Moomal Z. (2002). *J. Rheumatol.* 29:462-466.
209. Martin S., Kardorf J., Schulte B., Lampeter E. F., Gries F. A., Melchers I., Wagner R., Bertrams J., Roep B. O. and Pflutzner A. (1995). *Diabetologia* 38:351-355.
210. Mihailova D., Grigorova R., Vassileva B., Mladenova G., Ivanova N., Stephanov S., Lissitchky K. and Dimova E. (1999). *Adv. Exp. Med. Biol.* 455:55-60.
211. Slot O., Brunner N., Locht H., Oxholm P. and Stephens R. W. (1999). *Ann. Rheum. Dis.* 58:488-492. 30
212. Tarui T., Mazar A. P., Cines D. B. and Takada Y. (2001). *J. Biol. Chem.* 276:3983-3990.
213. Hoyer-Hansen G., Pessara U., Holm A., Pass J., Weidle U., Dano K. and Behrendt N. (2001). *Biochem. J.* 358:673-679.
214. Hoyer-Hansen G., Behrendt N., Ploug M., Dano K. and Preissner K. T. (1997). *FEBS Lett.* 420:79-85. 40
215. McKeown-Longo P. J. and Panetti T. S. (1996). *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 8:327-340.

216. Deng G., Curriden S. A., Wang s., Rosenberg S. and Loskutoff D. J. (1996). *J. Cell Biol.* 134:1563-1571.
217. Bajou K., Devy L., Masson V., Albert V., Franckéne F., Noel A, and Foidart J. M. (2001). *Thérapie.* 56:465-472.
218. Kero J., Gisler M., Hemminki E. and Isolauri E. (2001). *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:781-783. 10
219. Becker K. G., Simon R. M., Bailey-Wilson J. E., Freidlin B., Biddison W. E., McFarland H. F. and Trent J. M. (1998). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95:9979-9984.
220. Becker K. G. (1999). *Diabetes* 48:1353-1358.
221. Costello R. W., Jacoby D. B. and Fryer A. D. (1998). *Thorax* 53:613-618.
222. Belmonte K. E., Fryer A. D. and Costello R. W. (1998). *J. Appl. Physiol.* 85:1708-1718. 20
223. Rajah R., Nachajon R. V., Collins M. H., Hakonarson H., Grunstein M. M. and Cohen P. (1999). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20:199-208.
224. Bufi P. L. (1997). *Alt. Med. Rev.* 2:104-115.
225. Gonzalez-Guerrico A. M., Cafferata E. G., Radrizzani m., Marcucci F., Gruenert D., Pivetta O. H., Favalaro R. R., Laguens R., Perrone S. V., Gallo G. C. and Santa-Coloma T. A. (2002). *J. Biol. Chem.* 277:17239-17247.
226. Cantiello H. F. (2001). *Pflugers Arch.* 443:S75-80. 30
227. Chasan B., Geisse N. A., Pedatella K., Wooster D. G., Teintze M., Carattino M. D., Goldmann W. H. and Cantiello H. F. (2002). *Eur. Biophys. J.* 30:617-624.
228. Koller L. and Hall. A. (2001). *J. Cell Biol.* 152:1145-1157.
229. Suzuki K. and Sheetz M. P. (2001). *Biophys. J.* 81:2181-2189.
230. Shetty. S. and Idell S. (2001). *J. Biol. Chem.* 276:24549-24556.
231. Gyetko M. R., Sud S., Kendall T., Fuller J. A., Newstead M. W. and Standiford T. J. (2000). *J. Immunol.* 165:1513-1519. 40
232. Letham M. I., James S. L., Marriot C. and Burke J. F. (1990). *Eur. Respir. J.* 3:19-23
233. Devitt A., Moffatt O. D., Raykundalia C., Capra J. D., Simmons D. L. and Gregory C. D. (1998). *Nature* 392:442-443.

234. Fadok V. A., deCathelineau A., Daleke D. L., Henson P. M. and Bratton D. L. (2001). *J. Biol. Chem.* 276:1071-1077.
235. Wang P., Kitchens R. L. and Munford R. S. (1998). *J. Biol. Chem.* 273:24309-24313.
236. Heidenreich S. (1999). *J. Leukoc. Biol.* 65:737-743.
237. Allport J. R., Donnelly L. E., Kefalas P., Lo G., Nunn A., Yadollahi-Farsani M., Rendall N. B., Murray S., Taylor G. W. and MacDermot J. (1996). *Br. J. Clin. Pharmacol.* 42:99-106. 10
238. Freedman S. D., Kern H. F. and Scheele G. A. (2001). *Gastroenterology* 121:950-957.
239. Moran A., Diem P., Klein D. J., Levitt M. D. and Robertson R. P. (1991). *J. Pediatr.* 118:715-723.
240. Langg S., Thorsteinsson B., Roder M. E., Orskov C., Holst J.J., Nerup J. and Koch C. (1993). *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 128:207-214.
241. Schaedel C., De Monestrol I., Hjelte L., Johannesson M., Kornfalt R., Lindblad A., Strandvik B., Wahlgren L. and Holmberg L. (2002). *Pediatr. Pulmonol.* 33:483-491. 20
242. Noone P. G. and Knowles M. R. (2001). *Respir. Res.* 2:328-332.
243. Armstrong D. S., Grimwood K., Carzino R., Carlin J. B., Olinsky A. and Phelan P. D. (1995). *BMJ* 310:1571-1572.
244. Dakin C. J., Pereira J. K., Henry R. L., Wang H. and Morton J. R. (2002). *Pediatr. Pulmonol.* 33:475-482. 30
245. Wulffraat N. M., de Graeff-Meeder E. R., Rijkers G. T., van der Laag H. and Kuis W. (1994). *J. Pediatr.* 125:374-378.
246. Leidig-Bruckner G. and Ziegler R. (2001). *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 Suppl. 2:S493-514.
247. Lopez-Ibarra P. J., Pastor M. M., Escobar-Jimenez F., Pardo M. D., Gonzalez A. G., Luna J. D., Requena M. E. and Diosdado M. A. (2001). *Endocr. Pract.* 7:346-351.
248. Choi S. J., Devlin R. D., Menaa C., Chung H., Roodman G. D. and Reddy S. V. (1998). *J. Clin. Invest.* 102:1360-1368. 40
249. Lowe N. J., Cudworth A. G., Clough S. A. and Bullen M. F. (1976). *Br. J. Dermatol.* 95:9-12.

250. Nigam P. K., Sharma L., Agrawal J. K., Singh G. and Khurana S. K. (1987). *Dermatologica* 175:284-289.
251. Albrecht M., Banoczy J., Dinya E. and Tamas G. Jr. (1992). *J. Oral Pathol. Med.* 21:364-366.
252. Gibson J., Lamey P. J., Lewis M. and Frier B. (1990). *J. Oral Pathol. Med.* 19:284-287.
253. Issaraagrisil S., Vannasaeng S. and Piakijagum A. (1989). *Metabolism* 38:204-207. 10
254. Vu T., Griscelli-Bennaceur A., Gluckman E., Sigaux F., Carosella E. D., Menier C., Scrobohaci M.L. and Socie G. (1996). *Br. J. Haematol.* 93:586-589.
255. Winkler A. S., Marsden J., Chaudhuri K. R., Hambley H. and Watkins P. J. (2000). *Diabet. Med.* 17:410.
256. Yun Y. S., Lee H. C., Yoo N. C., Song Y. D., Lim S. K., Kim K. R., Hahn J. S. and Huh K. B. (1999). *Diabetes Res. Clin. Pract.* 46:223-229.
257. Wu M., Fan J., Gunning W. and Ratnam M. (1997). *J. Membr. Biol.* 159:137-147. 20
258. Jarva H. and Meri S. (1999). *Scand. J. Immunol.* 49:119-125.
259. Maciejewski J. P., Young N. S., Yu M., Anderson S. M. and Sloan E. M. (1996). *Thromb. Res.* 83:433-447.
260. Rawstron A. C., Rollinson S. J., Richards S., Short M. A., English A., Morgan G. J., Hale G. and Hillmen P. (1999). *Br. J. Haematol.* 107:148-153.
261. Pakdeesuwan K., Muangsup W., Pratyay Y. U., Issaragrisil S. and Wanachiwanawin W. (2001). *Int. J. Haematol.* 73:64-70. 30
262. Noji H., Shichishima T., Saitoh Y., Kai T., Yamamoto T., Ogawa K., Okamoto M., Ikeda K. and Maruyama Y. (2001). *Exp. Hematol.* 29:391-400.
263. Punjabi N. M., Sorkin J. D., Katzel L. I., Goldberg A. P., Schwartz A. R. and Smith P. L. (2002). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165:677-682.
264. Ip M. S., Lam B., Ng M. M., Lam W. K., Tsang K. W. and Lam K. S. (2002). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165:670-676. 40
265. Zhdanova I. V., Wurtman R. J., Regan M. M., Taylor J. A., Shi J. P. and Leclair O. U. (2001). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:4727-4730.
266. Bruls E., Crasson M. and Legros J. J. (2000). *Rev. Med. Liege* 55:785-792.

267. Ganguly S., Gastel J. A., Weller J. L., Schwartz C., Jaffe H., Namboodiri M. A. A., Coon S. L., Hickman A. B., Rollag M., Obsil T., Beauverger P., Ferry G., Boutin J. A. and Klein D. C. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:8083-8088.
268. Meisel P., Arndt D., Scheuch E., Klebingat K. J. and Siegmund W. (2001). *Ther. Drug Monit.* 23:9-14
269. Ladero J. M., Agundez J. A., Olivera M., Lozano L., Rodriguez-Lescure A., Diaz-Rubio M. and Benitez J. (2002). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 58:115-118. 10
270. Varzim G., Monteiro E., Silva R., Pinheiro C. and Lopes C. (2002). *J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 64:206-212.
271. Gawronska-Szklaarz B., Pawlik A., Czaja-Bulsa G., Gornik W., Luszawska-Kutrzeba T. and Wrzesniewska J. (2001). *Clin. Pharmacol. Ther.* 69:372-378.
272. Magnan C., Cruciani C., Clement L., Adnot P., Vincent M., Kergoat M., Girard A., Elghozi J. L., Velho G., Beressi N., Bresson J. L. and Ktorza A. (2001). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:4901-4907. 20
273. Burger A. J. and Aronson D. (2001). *Int. J. Cardiol.* 81:243-249.
274. Damholt M. B., Christensen N. J. and Hilsted J. (2001). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (2001).61:531-537.
275. Elahi D. and Muller D. C. (2000). *Eur. J. Clin. Nutr.* 54 Suppl.3:S112-120.
276. Ruzsas C. and Mess B. (2000). *Neuroendocrinol. Lett.* 21:17-23.
277. Rudd P. M., Wormald M. R., Wing D. R., Prusiner S. B. and Dwek R. A. (2001). *Biochemistry* 40:3759-3766. 30
278. Moya K. L., Sales N., Hassig R., Creminon C., Grassi J. and Di Giamberardino L. (2000). *Microsc. Res. Tech.* 50:58-65.
279. Sales N., Hassig R., Rodolfo K., Di Giamberardino L., Traiffort E., Ruat M., Fretier P. and Moya K. L. (2002). *Eur. J. Neurosci.* 15:1163-1167.
280. Brown D. R. (2001). *Trends Neurosci.* 24:85-90. 40
281. Tobler I., Gaus S. E., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rulicke T., Moser M., Oesch B., McBride P. A. and Manson J. C. (1996). *Nature* 380:639-642.
282. Brown D. R., Nicholas R. S. and Canevari L. (2002). *J. Neurosci. Res.* 67:211-224.
283. Tobler I., Deboer T. and Fischer M. (1997). *J. Neurosci.* 17:1869-1879.

284. Bartlett S. F., Lagercrantz H. and Smith A. D. (1976). *Neuroscience* 1:339-344.
285. Tayek J. A. (1992). *J. Am. Coll. Nutr.* 11:445-456.
286. Copeland G. P., Leinster S. J., Davis J. C. and Hipkin L. J. (1987). *Br. J. Surg.* 74:1031-1035.
287. Copeland G. P., Al-Sumidaie A. M., Leinster S. J., Davis J. C. and Hipkin L. H. (1987). *Eur. J. Surg. Oncol.* 13:11-16. 10
288. Tayek J. A. (1995). *J. Am. Coll. Nutr.* 14:341-348.
289. Nagamani M., Hannigan E. V., Dinh T. V. and Stuart C. A. (1988). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:144-148.
290. Bruning P. F., Boonfrer J. M., van Noord P. A., Hart A. A., de Jong-Bakkar M. and Nooljen W. J. (1992). *Int. J. Cancer* 52:511-516.
291. Talamini R., Franceschi S., Favero A., Negri E., Parazzini F. and La Vecchia C. (1997). *Br. J. Cancer* 75:1699-1703. 20
292. Tran T. T., Medline a. and Bruce W. R. (1996). *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5:1013-1015.
293. Heber D., Byerley L. O. and Tchekmedyan N. S. (1992). *J. Parenter. Enteral Nutr.* 16:60S-64S.
294. Bartlett D. L., Charland S. L. and Torosian M. H. (1995). *Surgery* 118:87-97.
295. Wang Y. (2001). *Med. Res. Rev.* 21:146-170. 30
296. Thogersen V. B., Heickendorff L. and Ledet T. (1996). *Eur. J. Endocrinol.* 134:326-330.
297. Anfosso F., Chomiki N., Alessi M. C., Vague P. and Juhan-Vague I. (1993). *J. Clin. Invest.* 91:2185-2193.
298. Arroyo De Prada N., Schroeck F., Sinner E. K., Muehlenweg B., Twellmeyer J., Sperl S., Wilhelm O. G., Schmitt M. and Magdolen V. (2002). *Eur. J. Biochem.* 269:184-192. 40
299. Chazaud B., Ricoux R., Christov C., Plonquet A., Gherardi R. K. and Barlovatz-Meimon G. (2002). *Am. J. Pathol.* 160:237-246.
300. Devy L., Blacher S., Grignet-Debrus C., Bajou K., Masson V., Gerard R. D., Gils A., Carmeliet P., Declerck P. J., Noel A. and Foidart J. M. (2002). *FASEB J.* 16:147-154.

301. Harbeck N., Kates R. E. and Schmitt M. (2002). *J. Clin. Oncol.* 20:1000-1007.
302. Kim S. J., Shiba E., Taguchi T., Tsukamoto F., Miyoshi Y., Tanji Y., Takai S. and Noguchi S. (2002). *Anticancer Res.* 22:387-393.
303. Wilhelm O.G., Wilhelm S., Escott G. M., Lutz V., Magdolen V., schmitt., M., Rifkin D. B., Wilson E. L., Graeff H. and Brunner G. (1999). *J. Cell. Physiol.* 180:225-235.
304. Kleeff J., Wildi S., Kumbasar A., Friess H., Lander A. D. and Korc M. (1999). *Pancreas* 19:281-288. 10
305. Matsuda K., Maruyama H., Guo F., Kleeff J., Itakura J., Matsumoto Y., Lander A. D. and Korc M. (2001). *Cancer Res.* 61:5562-5569.
306. Saikali Z. and Sinnett D. (2000). *Int. J. Cancer* 89:418-422.
307. Toretsky J. A., Zitomersky N. L., Eskenazi A. E., Voigt R. W., Strauch E. D., Sun C. C., Huber R., Meltzer S. J. and Schlessinger D. (2001). *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 23:496-499. 20
308. Bar R. S., Dake B. L. and Stueck S. (1987). *Am. J. Physiol.* 253:E21-27.
309. Kaaks R. (2001). *Gynecol. Obstet. Fertil.* 29:185-191.
310. Yu H., Levesque M. A., Khosravi M. J., Papanastasiou-Diamandi A., Clark G. M. and Diamandis E. P. (1996). *Br. J. Cancer* 74:1242-1247.
311. Kuzmenko Y. S., Stambolsky D., Kern F., Bochkov V. N., Tkachuk V. A. and Resink T. J. (1998). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246:489-494. 30
312. Vivier E., Tomasello E. and Paul P. (2002). *Curr. Opin. Immunol.* 14:306-311.
313. Kwa D., Vingerhoed J., Boeser-Nunnink B., Broersen S. and Schuttemaker H. (2001). *J. Virol.* 75:10455-10459.
314. Correa R. and Munoz-Fernandez M. A. (2001). *AIDS* 15:1959-1963.
315. Mackewicz C. E., Barker E., Greco G., Reyes-Teran G and Levy J. A. (1997). *J. Clin. Invest.* 100:921-930.
316. Lusso P. (2002). *Vaccine* 20:1964-1967. 40
317. Laurence J. S., Blanpain C., De Leener A., Parmentier M. and LiWang P. J. (2001). *Biochemistry* 40:4990-4999.
318. Hoogewerf A. J., Kuschert G. S., Proudfoot A. E., Borlat F., Clark-Lewis I., Power C. A. and Wells T. N. (1997). *Biochemistry* 36:13570-13578.

319. Cladera J., Martin I. and O'Shea P. (2001). *EMBO J.* 20:19-26.
320. Sidenius, N., Sier C. F. C., Ullum H., Pedersen B. K., Lepri A. C., Blasi F. and Eugen-Olsen J. (2000). *Blood* 96:4091-4095.
321. Handley M. A., Steigbigel R. T. and Morrison S. A. (1996). *J. Virol.* 70:4451-4456.
322. Schreier H., Moran P. and Caras I. W. (1994). *J. Biol. Chem.* 269:9090-9098.
323. Su H. R. and Boackle R. J. (1994). *Int. Arch. Allergy Immunol.* 105:238-244. 10
324. Adler B., Ashkar S., Cantor H. and Weber G. F. (2001). *Cell. Immunol.* 210:30-40.
325. Montouri N., Salzano S., Rossi G. and Ragno P. (2000). *FEBS Lett.* 476:166-170.
326. Pinto L. M., Lecoeur H., Ledru E., Rapp C., Patey O. and Gougeon M. L. (2002). *AIDS* 16:329-339.
327. Raulin J. (2002). *Prog. Lipid Res.* 41:27-65.
328. Nguyen D. H. and Hildreth J. E. (2000). *J. Virol.* 74:3264-3272. 20
329. Saifuddin M., Hedayati T., Atkinson J. P., Holguin M. H., Parker C. J. and Spear G. T. (1997). *J. Gen. Virol.* 78:1907-1911.
330. Ware L. J., Wooton S. A., Morlese J. M., Gazzard B. G. and Jackson A. A. (2002). *Proc. Nutr. Soc.* 61:131-136.
331. Constans J., Guerin V., Couchouron a., Seigneur M., Ryman A., Blann A. D., Amiral J., Amara A., Peuchant E., Moreau J. F., Pellegrin I., Pellegrin J. L., Fleury H., Leng B. and Conri C. (1998). *Eur. J. Clin. Invest.* 28:115-122. 30
332. Ilangumaran S., Arni S., Poincelet M., Theler J. M., Brennan P. J., Nasir-ud-Din and Hoessli D. C. (1995). *J. Immunol.* 155:1334-1342.
333. Richard M., Ibata-Ombetta S., dromer F., Bordon-Pallier F., Jouault T. and Gaillardin C. (2002). *Mol. Microbiol.* 44:841-853.
334. Ralton J. E., Mullin K. A. and McConville M. J. (2002). *Biochem. J.* 363:365-375.
335. Sauma S. Y., Tanaka T. M. and Strand M. (1991). *Mol. Biochem. Parasitol.* 46:73-80.
336. Das S., Traynor-Kaplan A., Kachintorn U., Aley S. B. and Gillin F. D. (1994). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27:463-469. 40
337. Tomavo S., Dubremetz J. F. and Schwarz R. T. (1992). *J. Biol. Chem.* 267:21446-21458.

338. Coelho P. S., Klein A., Talvani A., Coutinho S. F., Takeuchi O., Akira S., Silva J. S., Canizzaro H., Gazzinelli R. T. and Teixeira M. M. (2002). *J. Leukoc. Biol.* 71:837-844.
339. Black C. G., Barnwell J. W., Huber C. S., Galinsski M. R. and Coppel R. L. (2002). *Mol. Biochem. Parasitol.* 120:215-224
340. Aliberti J. C., Machado F. S., Souto J. P., Campanelli A. P., Teixeira M. M., Gazzinelli R. T. and Silva J. S. (1999). *Infect. Immun.* 67:4819-4826.
341. Noe K. H., Cenciarelli C., Moyer S. A., Rota P. A. and Shin M. L. (1999). *J. Virol.* 73:3117-3124. 10
342. Kazachkov M. Y., Hu P. C., Carson J. L., Murphy P. C., Henderson F. W. and Noah T. L. (2002). *Exp. Biol. Med.* 227:330-335.
343. Cook D. N., Beck M. A., Coffinann T. M., Kirby S. L., Sheridan J. F., Pragnell I. B. and Smithies O. (1995). *Science* 269:1583-1585.
344. Doyle H. A. and Murphy J. W. (1997). *J. Leukoc Biol.* 61:147-155. 20
345. Gao J.-L., Wynn T. A., Chang Y., Lee E. J., Broxmeyer H. E., Cooper S., Tiffany H. L., Westphal H., Kwon-Chung J. and Murphy P. M. (1997). *J. Exp. Med.* 185:1959-1968.
346. Wadstrom T and Ljungh A. (1999). *J. Med. Microbiol.* 48:223-233.
347. Guibinga G. H., Miyanochara A., Esko J. D. and Friedmann T. (2002). *Mol. Ther.* 5:538-546.
348. Peiffer I., Servin A. L. and Bernet-Camard M. F. (1998). *Infect. Immun.* 66:4036-4042. 30
349. Gordon V. M., Nelson K. L., Buckley J. T., Stevens V. L., Tweten R. K., Elwood P. C. and Leppla S. H. (1999). *J. Biol. Chem.* 274:27274-27280.
350. Ricci V., Galmiche A., Doye A., Necchi V., Solcia E. and Boquet P. (2000). *Mol. Biol. Cell* 11:3897-3909.
351. Munro P., Kojima H., Dupont J. L., Bossu J. L., Poulain B. and Boquet P. (2001). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:623-629. 40
352. Ali N. and Evans W. H. (1990). *Biochem. J.* 271:193-199.
353. Fratti R. A., Backer J. M., Gruenberg J., Corvera S. and Deretic V. (2001). *J. Cell Biol.* 154:631-644.

354. Davis T. M., Pukrittayakamee S., Supanaranond W., Looareesuwan S., Krishna S., Nagachinta B., Turner R. C. and White N. J. (1990). *Clin. Endocrinol.* 33:739-749.
355. Soliman A. T., El-Nawawy A. A., El-Azzouni O. F., Amer E. A., Demian S. R. and El-Sayed M. H. (1996). *J. Trop. Pediatr.* 42:46-49.
356. Zaki K., Kantoosh M., Hamam M. A., Shoheib S., Mikhail N., Nour H. and Zaki F. (1980). *Hepatogastroenterology* 27:417-422. 10
357. dos Santos V. M., da Cunha S. F., Teixeira V. de P., Monteiro J. P., dos Santos J. A., dos Santos T. A., dos Santos L. A. and da Cunha D. F. (1999). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32:489-496.
358. Vitkov L., Weitgasser R., Lugstein A., Noack M. J., Fuchs K. and Krautgartner W. D. (1999). *J. Oral Pathol. Med.* 28:406-409.
359. Karachunskii M. A., Balabolkin M. I. and Beglarian N. R. (1995). *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* (7):18-21. 20
360. Garg R., Agrawal J. K., Bajpai H. S., Singh G. and Srivastava P. K. (1990). *Indian J. Lepr.* 62:50-54.
361. Yoshitake H., Takeda Y., Nitto T. and Sendo F. (2002). *J. Leukoc. Biol.* 71:205-211.
362. Middelhoven P. J., van Buul J. D., Kleijer M., Roos D. and Hordijk P. L. (1999). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:568-574.
363. Nikolova M., Marie-Cardine A., Boumsell L. and Bensussan A. (2002). *Int. Immunol.* 14:445-451. 30
364. Kirby A. C., Hill V., Olsen I. and Porter S. R. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:200-205.
365. Matko J., Bodnar A., Vereb G., Bene L., Vaamosi G., Szentesi G., Szollosi J., Gaspar R., Horejsi V., Waldmann T. A. and Damjanovich S. (2002). *Eur. J. Biochem.* 269:1199-1208.
366. Haregewoin A., Solomon K., Hom R. C., Soman G., Bergelson J. M., Bhan A. K. and Finberg R. W. (1994). *Cell. Immunol.* 156:357-370. 40
367. Schinowski K., Frohlich L., Maurer K., Muller W. E. and Eckert A. (2002). *Mech. Ageing Dev.* 123:375-390.

【 図 1 A 】

重鎖

MuIgV₅'-B L V A T A T G V H
AATGGAGCTG GGTATTCTC TTCTTGGTAG CAACAGCTAC AGGTGTCCAC
S Q V Q L Q Q P G A E L V R P G A
TCCCAGTCC AACTGCAGCA GCCTGGGGCT GAGCTGGTGA GGCCTGGGGC
S V K L S C K A S G Y T F T R N
TTCAGTGAAG CTGTCTCGCA AGGCTTCTGG CTACACCTTC ACCAGGAACT
W I N W V K Q R F G Q G L E W I G
GGATAAACTG GGTGAAGCAG AGGCCTGGAC AAGGCCTTGA GTGGATCGGA
N I Y P S D S Y T N Y N Q K F K D
AATATTTATC CTCTGTATG TTAATACTAAC TACAATCAAA AGTCAAGGA
K A T V T V D K S S S T A Y M Q
CAAGGCCACA GTGACTGTAG ACAAATCCTC CAGCACAGCC TACATGCAGC
L S S P T S E D S A V Y Y C T R L
TCAGCAGCCC GACTCTGTAG GACTCTGGCG TCTATTATTG TACAAGATTG
R G L L P D Y W G Q G T I L T V S
AGGGGTTTAT TACCTGACTA CTGGGGCCAA GGCACCATTC TCACAGTCTC
S E S Q S MuIgM₂3'-1
CTCAGAGAGT CAGTCTTCC CAAATGTCTT CCCCCTCGTA AGCTTGGG

【 図 1 B 】

軽鎖

MuIgxV₁5'-A V Y M L L W
GGGAATTCAT GGAGTACAG ACCCAGGTCT TTGTATACAT GTTGTCTGG
L S G V D G D I V M T Q S Q K F M
TTGTCTGGTG TTGATGGAGA CATTGTGATG ACCCAGTCTC AAAAATTCAT
S T S V G D R V S V T C K A S Q
GTCCACATCA GTAGGAGACA GGGTCAGCGT CACCTGCAAG GCCAGTCAGA
N V D T N V A W Y Q Q K P G Q S P
ATGTGGATAC TAATGTAGCC TGGTATCAAC AGAAACCAGG GCAATCTCCT
K A L I Y S A S Y R Y S G V P D R
AAAGCACTGA TTTACTCGCG ATCCTACCGG TACAGTGGAG TCCCTGATCG
F T G S G S G T D F T L T I S N
CTFCACAGCC AGTGGATCTG GGACAGATTT CACTCTCACC ATCAGCAATG
V Q S E D L A E Y F C Q Q Y N S Y
TCCAGTCTGA AGACTTGGCA GAGTATTTCT GTCAGCAATA TAACAGCTAT
P L T F G A G T K L E L K R A D A
CCTCTCAGCT TCGGTGCTGG GACCAAGCTG GAGCTGAAAC GGGCTGATGC
A P T V MuIgxV₁3'-1
TGCACCAACT GTA TCCATCT TCCCACCATC CAGTAAGCTT

【 図 4 A 】

細胞系 13.42a VH-1 DNA 配列 (配列番号 17)

AGGTCAAGCTCAGAGAGTCAAGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGTATC
CTGCAAGGCTTCTGGTTATGCAATTCAGTCTACACATGTTCTGGGTGAAGCAGAGCCAT
GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGATATATTGATCCTTACAATGGTGATACATAGATACAGCC
AGAAAGTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCCTCCAGCACAGCCATACATGCA
TCTCAACAGCCTGACATCTGAAGACTCTGAGTCTATTACTGTGCAAGAAAGGGGATGACG
ACGGGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCTCTCCTCA

細胞系 13.42a VH-1 アミノ酸配列 (配列番号 18)

VKLQESGPELVKPGASVKVSKASGYAFTSYNMFVWVQSHGKLSLEWIGYIDPYNGDTRYSQ
KFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLSLSEDSAVVYCARKGMITGYAMDYWGQTTVTVSS

細胞系 13.42a VL DNA 配列 (配列番号 19)

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCTCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCA
TCAGTTGTAGGCAAGTCAGGACATAGTAATATTTAAACTGTATCAGCAGAAACCAGA
TGGAACCTGTTAAACTCCTGCTCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGG
TTCAGTGGCAGTGGGCTGGAACAGATTATTTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACAAGAAG
ATGTTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGTTTCCGACGTTCCGTTGGAGGCCACCAA
GCTGGAAATCAACGG

細胞系 13.42a VL アミノ酸配列 (配列番号 20)

DIQMTQSPSSLSASLGRVITISCRASQDLSNLYNYQQKPDFTVKLLLYTTSRLHSGVPSR
FSGSGSDTYSLTISNLEQEDVATYFCQQGNTFTPTFGGGTKLEIKR

【 図 4 B 】

細胞系 32.15 VH DNA 配列 (配列番号 33)

AGGTGCAACTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACAACTATGGAATGAACCTGGTGAAGCAGGCTCCA
GGAAAGGTTTTAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAACATATGCTG
ATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTGCA
GATCAACAACCTCAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGGGAAGGGTTGTAT
GGTAACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCTCTCCTCA

細胞系 32.15 VH アミノ酸配列 (配列番号 34)

VQLQESGPELKKPGETVKISKASGYFTFNYGMMNVKQAPGKGLKWMGNINFTYGEPTYAD
DFKGRFAPFSLTSASTAYLQINNLKNEATATYFCAREGLYGNYPDYWGQTTVTVSS

細胞系 32.15 VL DNA 配列 (配列番号 35)

GACATCCAGATGACACAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGG
GCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATGCG
TTCACAGGCACTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
ACTTGGCAGATATTTCTGTGCAAGTATAACAGCTATCCTCTCAGCTTCCGTTGGTGGGAC
CAGCTGGAGCTGAACGG

細胞系 32.15 VL アミノ酸配列 (配列番号 36)

DIQMTQSPKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTINVAWYQKPGQSPKALIIYSASYRSGVPSR
FTGSGSDTFTLITISNVEDLAEIFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR

【 図 4 C 】

細胞系 32.17 VH DNA 配列 (配列番号 49)
AGGTCAAACCTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGCTGGTGAAGGCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGGAACTGGATAAACTGGTGAAGCAGAGGCTC
GGACAAGGCTTGAAGTGCAGAAATATTTATCCTCTGATAGTTATATACTAACTACAATC
AAAAGTTCAAGGACAGGCCACAGTACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCTACATGCA
GCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAAGATTGAGGGGTTA
TTACCTGACTACTGGGCAAGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA

細胞系 32.17 VH アミノ酸配列 (配列番号 50)
VKLQESGAEIVRPGASVKLSCKASGYTFTRNWINWVKQRPQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQ
KFKDKATVIVKSSSTAYMQLSSPTSSEDSAVYYCTRLRGLLEFDYWGQGTITVTVSS

細胞系 32.17 VL DNA 配列 (配列番号 51)
GACATTGTGCTAACCCAATCTCCAGTATCCATAACTGCATCTCGAGGGGAGAAGGTCACCA
TCACCTGCCGTGCCAGCTCAAGTATAAGTTCCAATTACTTACACTGTTACCAGCAGAAGCC
AGGATCTCCCTAAACTTTGATTTATAGGACATCCATCTGGCATCTGGAGTCTAGAC
AGCTTCAGTGGCAGTGGTCTGAGAGCTTCTACTCTGACAATCAGCTGCATGCAGGACG
AAGTGTCTGCCACTTACTATTGTGACGAGGGAGTAGTACCCCTCAGCTTCGGTCTGCG
GACCAAGCTGGAGCTGAAACGG

細胞系 32.17 VL アミノ酸配列 (配列番号 52)
DIVLTQSPVSIATASRGEKVTITCRASSISISNYLHCYQQKPGSSPKLLIYRTSILASGVLD
SFGSGSESSYTLTISCMQDEVAATYYCQQGSSSPLTFGAGTKLELKR

【 図 4 D 】

細胞系 32.75 VH DNA 配列 (配列番号 65)
AGGTCAAACCTGCAGGAGTCAGGGGCTGAGCTGGTGAAGGCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTC
CTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGGAACTGGATAAACTGGTGAAGCAGAGGCTC
GGACAAGGCTTGAAGTGCAGAAATATTTATCCTCTGATAGTTATATACTAACTACAATC
AAAAGTTCAAGGACAGGCCACAGTACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCTACATGCA
GCTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAAGATTGAGGGGTTA
TTACCTGACTACTGGGCAAGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA

細胞系 32.75 VH アミノ酸配列 (配列番号 66)
VKLQESGAEIVRPGASVKLSCKASGYTFTRNWINWVKQRPQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQ
KFKDKATVIVKSSSTAYMQLSSPTSSEDSAVYYCTRLRGLLEFDYWGQGTITVTVSS

細胞系 32.75 VL DNA 配列 (配列番号 67)
GACATCCAGATGACACAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAAATGGATATAATGTAGCTGGTATCAACAGAAACCAGG
GCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGCATCTACCCTGAGTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCCTACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAG
ACTTGGCAGATATTTCTGTAGCAATATAACAGCTATCCTCCTACGTTCCGTTCTGGGAC
CAAGCTGGAGCTGAAACGG

細胞系 32.75 VL アミノ酸配列 (配列番号 68)
DIQMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCRASQNVDTNVAWYQQKPGQSPKALIIYSASYRYSVGPDR
FTGSGSGTDFLTITISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPPTFGAGTKLELKR

【 図 4 E 】

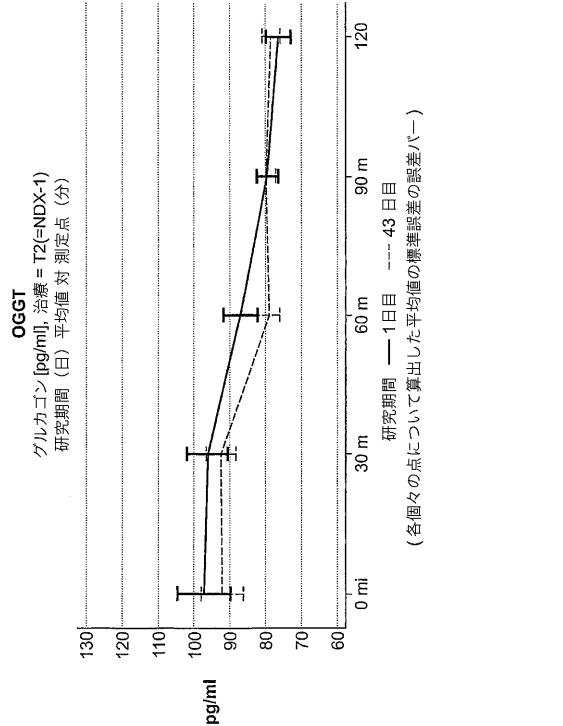
細胞系 32.2 VH-1 DNA 配列 (配列番号 81)
AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTC
CTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTACAAACTATGGAATGAAGTGGTGAAGCAGGCTCCA
GGAAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAAATATGCTG
ATGACTTCAAGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCA
GATCAACAACCTCAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAGGGAAGGTTGTAT
GTAACCTACTTTGACTACTGGGCAAGGGACCAGGTCACCGTCTCCTCA

細胞系 32.2 VH-1 アミノ酸配列 (配列番号 82)
VKLQESGPELKKPGETVKISCKASGYTFTRNWINWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPYAD
DFKGRFAFSLETSASTAYLQINLNKEDTATYFCAREGLYGNYPDYWGQGTITVTVSS

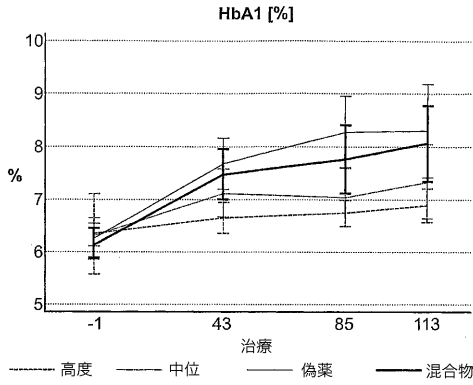
細胞系 32.2 VL DNA 配列 (配列番号 83)
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAAATGGGTAATAATGTAGCTGGTATCAACAGAAACCAGG
GCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCTACCCTGACAGTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
ACTTGGCAGATATTTCTGTGCAATATAACAGCTATCCTCCTCAGTTCGGTCTGGGAC
CAAGCTGGAATAAACCAG

細胞系 32.2 VL アミノ酸配列 (配列番号 84)
DIQMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCRASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIIYSASYRYSVGPDR
FTGSGSGTDFLTITISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR

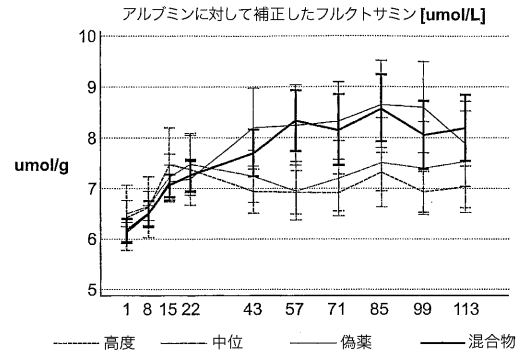
【 図 5 】



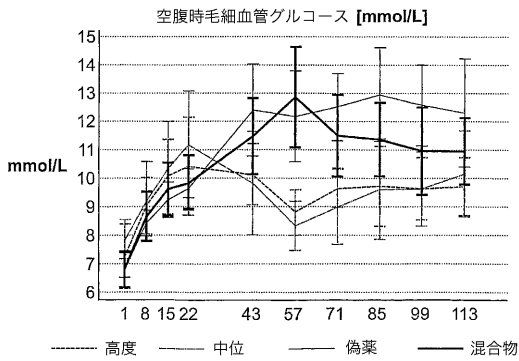
【 図 6 】



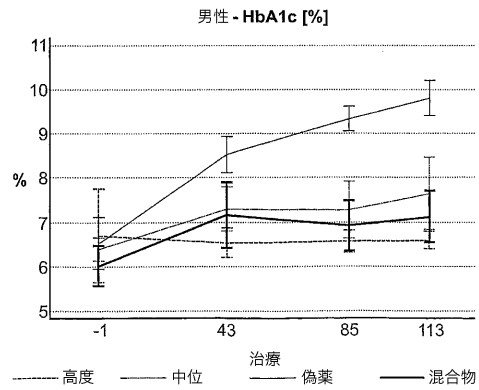
【 図 8 】



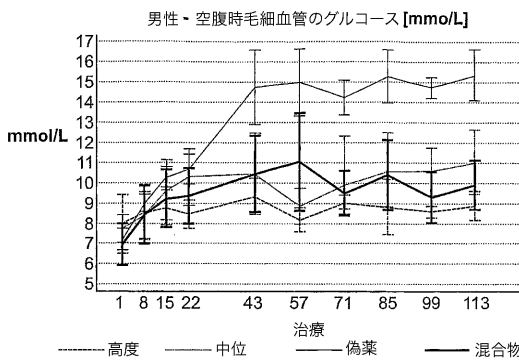
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 12 A 】

配列番号	IgM CDR-H1	反応性
配列番号 6 (実施例 1)	GYTFRNWINW	-
配列番号 31 (実施例 5)	GYTFTNYGMNW	-
配列番号 41 (実施例 5)	GYTFRNWINW	-
配列番号 51 (実施例 5)	GYTFRNWINW	-
配列番号 61 (実施例 5)	GYTFTNYGMNW	-
配列番号 97 (A39276)	GYTFNFWLQW	抗 RF
配列番号 98 (A815971.1)	GYTFTYNAIQW	抗 CL
配列番号 99 (A8B32203.1)	GYTFTSYVMQW	抗 RNA
配列番号 100 (AAT76246.1)	GYTFTYVMHW	抗 sDNA
配列番号 101 (AAR90999.1)	GYTFTDYVMNW	抗 NA
配列番号 102 (AAB46762.1)	GYTFTDYVMNW	抗 VA
配列番号 103 (AAG33839.1)	GYTFTDYVMHW	抗 RF
配列番号 104 (AAT76245.1)	GYTFTSYVMHW	抗 sDNA
配列番号 105 (CAA94376.1)	GYTFTGYVMHW	抗 RF
配列番号 106 (AAB46761.1)	GYTFTSYVMHW	抗 VA
保存残基	GYTFT----	-
配列番号 162	GYTFT----	-

コンセンサス配列

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-x-x-x-x-x-W

一般式

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-[RNYSTDEG]-[NYF]-[WGAY]-[IMV]-[NGQH]-W

保存された及び主要な残基

IgM CDR-H1 G-Y-T-F-T-[RNS]-Y-W-[IM]-N-W

配列番号	IgG CDR-H1	反応性
配列番号 21 (実施例 5)	GYAFTSYNNEW	-
配列番号 99 (A8B32203.1)	GYTFTSYVMQW	抗 RNA
配列番号 107 (A8B58061.1)	GYTFTDYVMHW	抗 CD8
配列番号 108 (F30502)	GYSFTGYVMNW	抗 RNA
配列番号 109 (AAR91003.1)	GYAFSSYVMNW	抗 NA
配列番号 110 (AAT76236.1)	GYTFTSYVMHW	抗 sDNA
配列番号 104 (AAT76245.1)	GYTFTSYVMHW	抗 sDNA
配列番号 106 (AAB46761.1)	GYTFTSYVMHW	抗 VA
保存残基	GY-F--Y-N-W	-
配列番号 163	GY-F--Y-N-W	-

コンセンサス配列

IgG CDR-H1 G-Y-x-F-x-x-x-x-M-x-W

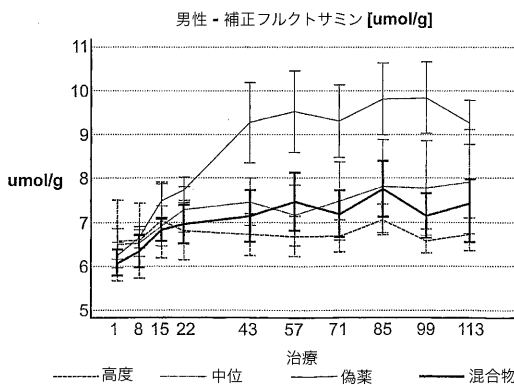
一般式

IgG CDR-H1 G-Y-[ATS]-F-[T/S]-[SDG]-Y-[NWW]-M-[FQHN]-W

保存された及び主要な残基

IgG CDR-H1 G-Y-T-F-T-S-Y-W-M-H-W

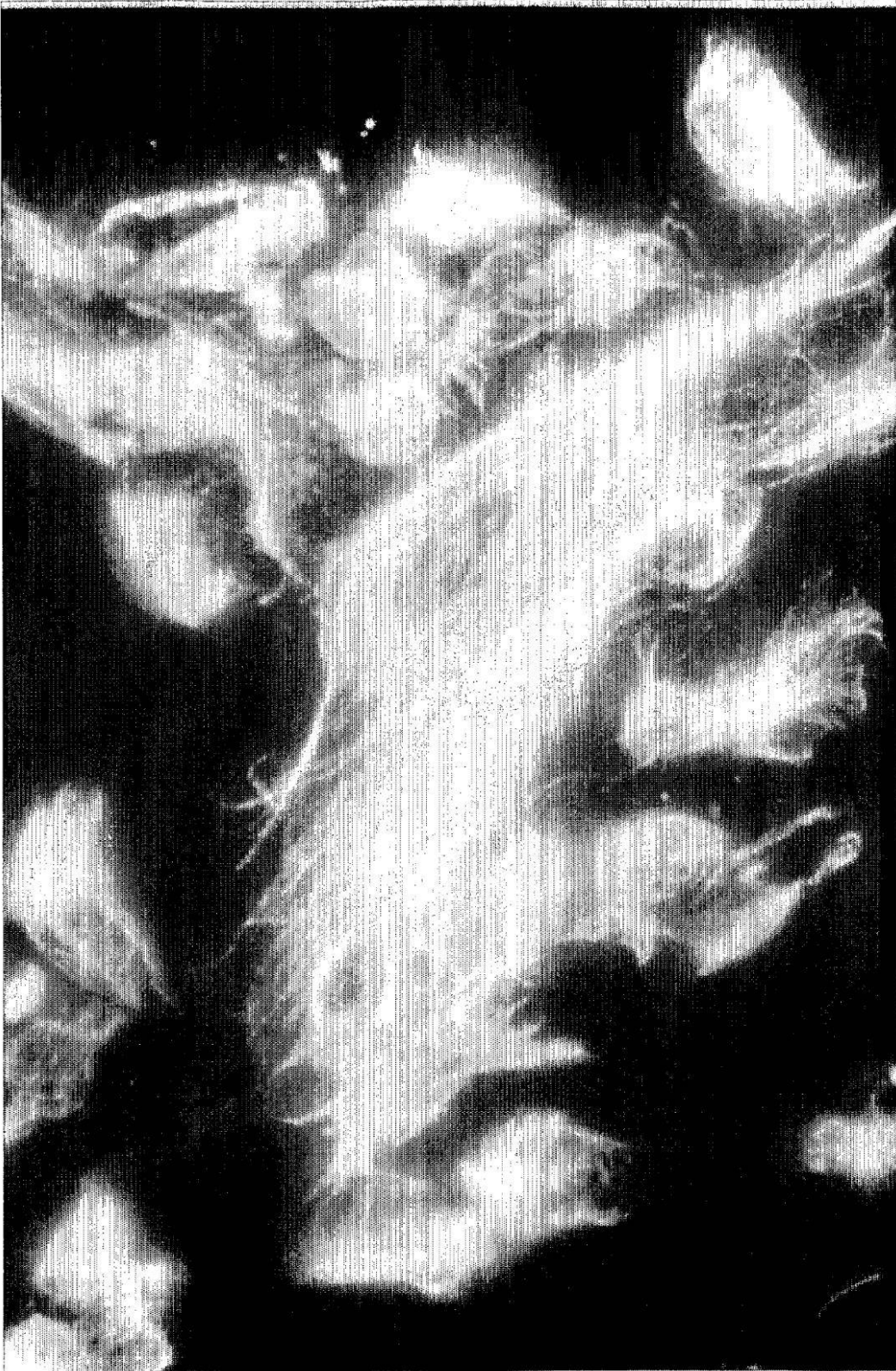
【 図 11 】



【 図 2 】



【図 3 A】



【図 3 B】



【配列表】

2013163673000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年2月12日(2013.2.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

GPI連結エピトープに対する反応性を有する抗体に由来するペプチド又は機能的に等価なりガンド。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード(参考)
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N

Fターム(参考) 4C085 AA03 CC21 DD62 DD88 EE01 GG02 GG03 GG04 GG05
4H045 AA11 BA10 DA76 EA22 EA31 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013163673A5	公开(公告)日	2014-03-06
申请号	JP2013024857	申请日	2013-02-12
[标]申请(专利权)人(译)	阿皮·马托西安 - 罗杰斯		
申请(专利权)人(译)	Matoshian - 罗杰斯, 阿尔皮		
[标]发明人	マトシアンロジャーズアルピ		
发明人	マトシアン - ロジャーズ、アルピ		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/28 C12N15/09 C12P21/08 A61K38/00 A61K39/00 A61P37/06 A61P37/04 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P11/00 A61P11/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/16 A61P25/20 A61P25/24 A61P25/28 C07K16/2809 C07K16/30 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/73 A61K38/08 A61K38/10 A61K39/39533 A61K39/39541 A61K39/39566 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/4258		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K16/28 C12N15/00.A C12P21/08 A61K37/02 A61K39/00.H A61P37/06 A61P37/04 G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA06 4B024/EA04 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/NA14 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C085/AA03 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74 4B065/AA94X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44		
优先权	2005016527 2005-08-11 GB 2006009920 2006-05-18 GB 2006009921 2006-05-18 GB		
其他公开文献	JP2013163673A JP5738333B2		

摘要(译)

提供了衍生自具有针对GPI连接表位和功能等同配体的反应性的抗体的肽。这些肽可用于治疗和诊断各种疾病，所有这些疾病都被认为是由于体内不适当存在与GPI连接表位反应的自身抗体引起的。还描述了这些自身抗体的作用机制，其损害生物体，从而引起疾病，以及预防疾病和检测自身抗体的方法。