

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-236390

(P2007-236390A)

(43) 公開日 平成19年9月20日(2007.9.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 5 0
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02 A	4 C O 8 5
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 A	
審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2007-79164 (P2007-79164)	(71) 出願人	592130699
(22) 出願日	平成19年3月26日 (2007.3.26)		ザ・レジエンツ・オブ・ザ・ユニバーシテ
(62) 分割の表示	特願2000-107604 (P2000-107604)		ィ・オブ・カリフォルニア
	の分割		The Regents of The
原出願日	平成3年9月23日 (1991.9.23)		University of Calif
(31) 優先権主張番号	07/586536		ornia
(32) 優先日	平成2年9月21日 (1990.9.21)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		クランド フランクリン ストリート 1
			111 12ス フロア オフィス オブ
			テクノロジー トランスファー
		(74) 代理人	100080850
			弁理士 中村 静男
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 クローン化グルタミン酸デカルボキシラーゼ

(57) 【要約】

【課題】 組換えグルタミン酸デカルボキシラーゼ₆₅ (GAD₆₅) ポリペプチド、及び GAD₆₅ ポリペプチドを、自己免疫疾患において診断的及び治療的に使用する方法を提供する。

【解決手段】 以下の (a) - (c) から選択される組換え GAD₆₅ ポリペプチド：

- (a) 図2 - 図4 に示すアミノ酸配列をもつタンパク質；
- (b) 図5 - 図8 に示すアミノ酸配列をもつタンパク質；
- (c) 図2 - 図4 又は図5 - 図8 に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる (a) もしくは (b) 由来のタンパク質であって、かつグルタミン酸デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) - (c) から選択される組換え GAD₆₅ ポリペプチド：

(a) 図 2 - 図 4 に示すアミノ酸配列をもつタンパク質；

(b) 図 5 - 図 8 に示すアミノ酸配列をもつタンパク質；

(c) 図 2 - 図 4 又は図 5 - 図 8 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる (a) もしくは (b) 由来のタンパク質であって、かつグルタミン酸デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 2】

(a) サンプルを GAD ポリペプチドと接触させ、ここで該ポリペプチドは非 - GAD 真核生物性ポリペプチドを実質的に含まないものであり； 10

(b) 工程 (a) の成分を、自己抗体がポリペプチドと結合するのに十分な条件下で、一定時間インキュベーションし；

(c) ポリペプチドと結合した自己抗体をサンプルから分離し；そして

(d) ポリペプチドと結合した自己抗体の存在を検出する、ことからなる、GAD に対する自己抗体の検出方法。

【請求項 3】

GAD が GAD₆₅ である、請求の範囲第 2 項に記載の方法。

【請求項 4】

GAD₆₅ が以下の (a) - (c) から選択されるタンパク質をコードする cDNA でコードされるものである請求項 3 記載の方法； 20

(a) 図 2 - 図 4 に示すアミノ酸配列をもつタンパク質；

(b) 図 5 - 図 8 に示すアミノ酸配列をもつタンパク質；

(c) 図 2 - 図 4 又は図 5 - 図 8 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる (a) もしくは (b) 由来のタンパク質であって、かつグルタミン酸デカルボキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 5】

GAD₆₅ がヒト GAD₆₅ である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

GAD が GAD₆₇ である、請求項 2 記載の方法。 30

【請求項 7】

GAD₆₇ がヒト GAD₆₇ である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

GAD が GAD₆₅ と GAD₆₇ との混合物である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 9】

サンプルがヒト由来のものである、請求項 2 記載の方法。

【請求項 10】

自己抗体と結合することのできる検出可能な標識タンパク質を用いて検出を行う、請求項 2 記載の方法。

【請求項 11】 40

結合タンパク質が検出可能な標識された第 2 抗体である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

検出可能な標識が、放射性同位体、蛍光化合物、コロイド金属、化学発光化合物、生物発光化合物、及び酵素からなる群から選択される、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

治療的に有効量の GAD ポリペプチドを含み、ここで該 GAD ポリペプチドはリセプターと結合するものである、自己免疫応答を改善するための医薬組成物。

【請求項 14】

GAD が GAD₆₅ である、請求項 13 記載の医薬組成物。

【請求項 15】 50

G A D が G A D_{6 7} である、請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

G A D が G A D_{6 5} と G A D_{6 7} との混合物である、請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

G A D がヒト G A D である、請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

リセプターが、抗体及び T - ヘルパー細胞からなる群から選択される、請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

自己免疫疾患が、I D D M 及びスティーフマン病からなる群から選択される、請求項 1 3 10
記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

非経口的に投与される、請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

非経口的投与を、皮下、筋肉内、腹腔内、空洞内、経皮、又は静脈内注射によって行う、
請求項 2 0 記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

投与を、約 0 . 0 1 m g / k g / 回から約 2 0 0 0 m g / k g / 回までの投与量で行う、
請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

組換え G A D_{6 5} ポリペプチドを治療的に標識する、請求項 1 3 記載の医薬組成物。 20

【請求項 2 4】

治療的標識が、放射性同位体、医薬、レクチン、及び毒素からなる群から選択される、請
求項 2 3 記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

1 又はそれ以上の容器を密に封じ込めるために仕切られた担体からなり、ここで、

(a) 第 1 の容器は G A D_{6 5} を含み；そして

(b) 第 2 の容器は検出可能な標識された第 2 抗体を含み、ここで該第 2 抗体は自己抗
体上に存在するエピトープ性決定基と結合する、

G A D_{6 5} に対する自己抗体の検出に使用するキット。 30

【請求項 2 6】

G A D_{6 5} が担体と結合する、請求項 2 5 記載のキット。

【請求項 2 7】

担体が不溶性である、請求項 2 6 記載のキット。

【請求項 2 8】

第 1 の容器が更に G A D_{6 7} を含む、請求項 2 5 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明はグルタミン酸デカルボキシラーゼ_{6 5} (G A D_{6 5}) ポリペプチドの発現のため 40
に、G A D_{6 5} で宿主生物を形質転換する組換え D N A 手法の使用に関する。また、G
A D_{6 5} ポリペプチドを、自己免疫疾患において診断的及び治療的に使用する方法をも包
含する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

インシュリン - 依存性真性糖尿病 (i n s u l i n - d e p e n d e n t d i a b e
t e s m e l l i t u s : I D D M ; I 型糖尿病) は、最も普遍的な代謝性疾患の一つ
である。アメリカ合衆国では、I D D M はおよそ 3 0 0 から 4 0 0 人に 1 人の割合で見ら
れ、免疫的研究によると、この疾患は増加していることを示唆している。この疾患は膵臓
のインシュリン生産性 β - 細胞の自己免疫破壊の結果生じる。更に特定すれば、この疾患 50

の始まる前段階は、リンパ球が膵臓の（ランゲルハンス）島細胞に浸潤し、 β -細胞を選択的に破壊する、“インスリテイス”という状態を特徴とする。典型的なI D D Mの過血糖症は、インシュリン-生産性 β -細胞の少なくとも80%が失われた後に、初めて現れる。残りの β -細胞は引きつづく数年間に破壊される。

【0003】

インシュリン治療によって大半のI D D M患者は普通の生活を送ることができるが、この補充は不完全なものであって、代謝恒常性を完全に元に戻すものではない。従って、目、腎臓、心臓、及びその他の器官の機能低下に至る深刻な合併症が、インシュリン治療を受けているI D D M患者には多い。このために、 β -細胞破壊の開始時と、実際にインシュリン補充が必要となる時（即ち、 β -細胞の80%が破壊されたとき）との間の潜伏期間を伸ばすこと（例えば、免疫抑制剤の投与によって）が極めて望ましい。従って、 β -細胞破壊の開始を決定する診断テストがあれば、医者が潜伏期間を伸ばすための免疫抑制剤を投与することができ（非特許文献1参照）、それによってインシュリン補充による副作用の開始を遅らせることができる。

10

【0004】

I D D M患者の多くは、64 k D分子（非特許文献2参照）、島細胞細胞質（I C A）分子又は島細胞表面（I C S A）分子（非特許文献3参照）、或いはインシュリン（非特許文献4参照）に対する抗体を含む血清を有している。A t k i n s o nとその共同研究者ら（非特許文献5参照）は、ヒト血清中における64 k D分子に対する抗体の存在が、I D D M症状が実際に起きる始まりについての、最も初期でかつ最も信頼できる指標であることを示した。

20

【非特許文献1】Silverstein et al., New England Journal of Medicine, 319:599-604, 1988

【非特許文献2】Baekkeskov et al., J. Clin. Invest. 79:926-934, 1987; Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990

【非特許文献3】Bottazzo et al., Lancet, 1:668-672, 1980

【非特許文献4】Palmer et al., Science, 222:1137-1139, 1983; Atkinson et al., Diabetes, 35:894-898, 1986

【非特許文献5】Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

最近になって、B a e k k e s k o vとその共同研究者らは、64 k D分子と、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（G A D）とは幾つかの共通の抗原エピトープを有しており、従ってこれらは同じものであるか、或いは非常によく似た分子である、ということを確認した。この同定は重要な発見ではあるが、G A Dの分子生物学に関する知識が未知である限りは、この情報をI D D M予知の診断法として用いることは極めて厄介であり、かつ限定されている。結果として、大量の64 k D分子、又は64 k D分子と抗原的に実質的に同一なG A D分子をクローニングし、次いで量産することができれば、I D D M予知のための診断キットの開発が可能となろう。本発明は、かかる結果を達成するための手段を提供する。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、組換えD N A手法を用いて真核性G A D₆₅ポリペプチドの生産が可能であり、かつG A D₆₅ポリペプチドを自己免疫疾患の患者の診断及び治療に用い得るという知見に基づいてなされた。特定すれば、クローン化真核性G A D₆₅ポリペプチドを、インシュリン依存性真性糖尿病（I D D M）を有する患者、或いは有する危険性のある患者の診断に用いることに関する。

【0007】

本発明の主な利点は、天然の真核性G A D₆₅ポリペプチドをその他の真核性非-G A

50

D₆₅ ポリペプチドから分離する際に、その単離に関して生じる問題を回避しつつ、天然源から精製したものに対応する真核性 G A D₆₅ ポリペプチドの容易な生産源を当業界に提供することである。その他の真核性非 - G A D₆₅ ポリペプチドが存在しないことは、G A D₆₅ ポリペプチドと特異的に反応する抗体のみを検出する試験システムの開発が可能となるので、重要である。

【0008】

宿主細胞中にある真核性 G A D₆₅ ポリペプチドを提供する他の利点は、そうすることによって天然源から現在実際に得られているよりも、はるかに大量のポリペプチドを得ることが可能となることである。その結果、本発明のポリペプチドを用いて I D D M のような自己免疫疾患を有する患者をより正確に分類することが可能となるばかりでなく、診断システムに使用するための商業的に使用可能な量の G A D₆₅ ポリペプチドを提供することも可能となる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明は、グルタミン酸デカルボキシラーゼ₆₅ (G A D₆₅) に対する自己抗体と結合するための、1又はそれ以上のエピトープ(抗原決定基)の1次構造コンホメーションの一部又は全てを有するポリペプチドの生産を可能にする組換え手法によって、遺伝的物質を操作することに関する。これらのポリペプチドは、これと反応する自己抗体を免疫学的に検出するのに極めて有用である。なぜなら、このような自己抗体は、インシュリン依存性真性糖尿病や“スティッフマン(stiff man)”症候群のような自己免疫疾患の指標となるからである。これらのポリペプチドは、G A D 機能を変えるようなスクリーニング医薬として、また、G A D₆₅ を診断的に検出するために用いるポリクローナル及びモノクローナル抗体の製造用としても使用できる。

20

【0010】

D N A ベクター中にスプライシングするための真核性 G A D₆₅ ポリペプチドをコードする特異的 D N A 配列の作製は各種の方法を用いて実施できる。例えば、(1)真核生物のゲノム D N A から二本鎖 D N A 配列を単離する；(2)興味のあるポリペプチドにとって必要なコドンを提供するための D N A 配列を化学的に製造する；及び(3)真核生物ドナー細胞から単離した m R N A の逆転写によって *in vivo* で二本鎖 D N A 配列を合成する、といった方法を含む各種の方法を用いることができる。後者の場合、実際には、c D N A と一般に呼ばれる、m R N A と相補的な二本鎖 D N A が形成される。

30

【0011】

所望のポリペプチド産物のアミノ酸残基の全配列が公知の場合には、D N A 配列の製造方法はしばしば選択の問題である。所望のポリペプチドのアミノ酸残基の全配列が公知でない場合には、D N A 配列の直接製造は不可能で、選択しうる方法は c D N A 配列の形成である。興味のある c D N A 配列を単離するための標準的方法には、高レベルでの遺伝子発現を有するドナー細胞中に豊富にある m R N A の逆転写に由来する、プラスミド運搬性の c D N A ライブラリーを形成することがある。ポリメラーゼ鎖反応法と組み合わせて用いると、まれな発現産物でもクローニングすることができる。ポリメラーゼのアミノ酸配列の重要な部分が公知の場合には、ターゲットの c D N A 中に存在すると推定される配列と二重になるような、ラベルした一本鎖又は二本鎖 D N A 又は R N A プローブ配列を作成して、あらかじめ一本鎖形に変性しておいた c D N A のクローン化コピー上で行う D N A / D N A ハイブリダイゼーション法に用いることができる (Jay et al., Nucleic Acid Research, 11:2325, 1983)。

40

【0012】

ラベルした混合合成オリゴヌクレオチドプローブを用いることによって(ここで各プローブは、変性化二本鎖 D N A の異種混合物を含むハイブリダイゼーションサンプルにおいて、特定の D N A 配列の完全な相補体である可能性がある)、ハイブリタイゼーション法は組換え体クローンをスクリーニングするのに有用である。このようなスクリーニングのためには、ハイブリダイゼーションは、一本鎖 D N A か、或いは変性化二本鎖 D N A の

50

いずれかで実施するのが好ましい。このような方法は、興味のあるポリペプチドと関連する mRNA 配列の量が極めて少ししか存在しない材料に由来する cDNA クローンを検出する際には特に有用である。言い換えると、非特異的な結合を避けるためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を用いることによって、例えば、ターゲット DNA がその完全な相補体である、混合物中の 1 個のプローブとハイブリダイゼーションすることによって、特定の cDNA クローンをオートラジオグラフで可視化することができるようになる (Wallace et al., Nucleic Acid Research, 9:879, 1981)。

【0013】

更に、各種 cDNA をオーサイト (oocytes) に注入して、cDNA 遺伝子産物の発現が起きるのに十分な時間をおき、そして所望の cDNA 発現産物の存在を、例えば GAD₆₅ ポリペプチドに特異的な抗体を用いるか、或いは GAD₆₅ 酵素活性の機能アッセイを用いることによって試験することにより、GAD cDNA ライブラリーをスクリーニングすることができる。

10

【0014】

若しくは、GAD₆₅ に対する抗体を用いて、少なくとも 1 個のエピトープを有する GAD₆₅ ペプチドに対して、cDNA ライブラリーを間接的にスクリーニングすることができる (Chang and Gottlieb, J. Neurosci., 8:2123, 1988)。このような抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル由来であり、GAD₆₅ cDNA の存在を示す発現産物を検出するのに使用することができる。GAD₆₅ の N-末端部分の最初の 100 アミノ酸にみられるエピトープに対する抗体が好ましい。

20

【0015】

遺伝子組換えにおいて使用できる、特定の DNA 配列作製のための上記 3 つの方法のうちでは、ゲノム DNA 単離を用いる方法が最も一般的でない。これは、哺乳動物ポリペプチドを微生物の発現で得たいという場合には、イントロンの存在のために、特にそうである。

【0016】

本発明は、GAD₆₅ に対する抗体への少なくとも 1 個のエピトープを有する 1 次構造コンホメーション、即ち、アミノ酸残基の連続的配列の一部又は全てを有する、GAD₆₅ の新規ポリペプチドを提供する。

【0017】

GAD₆₅ に対する自己抗体を検出するためには、完全な GAD₆₅ よりもむしろ本発明のポリペプチド断片を用いることができる。GAD₆₅ ポリペプチドに用いる場合の“ポリペプチド”の語は、GAD₆₅ に対する自己抗体へのエピトープを有するいかなるアミノ酸配列をも示すが、ここで該アミノ酸配列は、本発明の cDNA 配列の一部又は全てによってコードされる。

30

【0018】

本発明の DNA 配列の微生物発現から得られるポリペプチドは、他の真核性ポリペプチド、或いは天然の細胞環境中で、又は血漿 (Plasma) や尿のような細胞外液体中で、GAD₆₅ と関連している他の汚染物を含まない、という特徴を更に有している。

【0019】

本発明者による研究により、GAD₆₅ が GAD₆₇ とは別々の遺伝子でコードされ、例えば、共通のゲノム性配列が転写後、又は翻訳後に修飾されることによって生産されるのではないことが明白に確立された。GAD₆₅ と GAD₆₇ とが別々の遺伝子によってコードされることを示す証拠には以下のものが含まれる：(a) GAD₆₅ 及び GAD₆₇ cDNA の間の正確に一致する部分の最大の連続した配列は、たった 17 ヌクレオチドの長さである、(b) GAD₆₅ 及び GAD₆₇ からの cDNA は、低ストリンジェントな条件下で (2.0 × SSC, 0.01 % SDS, 23) お互いにクロスハイブリダイゼーションしないし、またお互いの mRNA ともクロスハイブリダイゼーションしない、そして (c) GAD₆₅ 及び GAD₆₇ cDNA は、それぞれ GAD₆₇ 及び GAD₆₅ をコードする単離したゲノム性クローンとクロスハイブリダイゼーションしない。

40

50

【0020】

“宿主”の語は、原核生物のみでなく、酵母菌、糸状菌のような真核生物、また植物及び動物細胞のように、複製可能で、かつ真核性GAD₆₅のイントロンを含まないDNA配列を発現することのできるものを意味する。しかしながら、宿主生物としては原核生物が好ましい。

【0021】

“原核生物”の語は、GAD₆₅の発現のための遺伝子で形質転換又はトランスフェクションされる全てのバクテリアを含む。原形生物宿主は、グラム陰性菌や、例えば*E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*及び*Bacillus subtilis*などのグラム陽性菌を含む。

10

【0022】

GAD₆₅ポリペプチドをコードする組換えDNA分子によって、当業者に公知の方法を用いて、宿主を形質転換又はトランスフェクションすることができる。特に好ましいのは、GAD₆₅コーディング配列を含むプラスミド又はウィルスを、それぞれ原形生物の形質転換又はトランスフェクションのために用いることである。

【0023】

融合し、作動するように連結した遺伝子を調製し、またそれらをバクテリア中で発現させる方法は当業者に公知である (Maniatis et. al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。ここで記載する遺伝的構築物及び方法は、原核生物宿主中でのGAD₆₅の発現に用いることができる。

20

【0024】

一般に、挿入された真核生物性遺伝子配列の効率よい転写を容易にするプロモーター配列を含む発現ベクターを、宿主との関連で使用する。発現ベクターは典型的には複製起点、プロモーター、及びターミネーター、並びに形質転換細胞の表現型 (phenotypic) 選択を与えることのできる特定遺伝子を含む。形質転換された原核生物宿主は、発酵槽中で成長させて、当業者に公知の方法によって最適成長条件で培養することができる。次いで本発明のポリペプチドを成育培地、細胞分解物、又は細胞膜分画から単離することができる。

【0025】

微生物で発現された本発明のポリペプチドの単離及び精製は、例えば、プレパラティブクロマトグラフ分離や、モノクローナル又はポリクローナル抗体の使用を含む免疫学的分離のようないかなる慣用的方法によってもよい。

30

【0026】

GAD₆₅のアミノ酸残基の配列を提供したことによって、本発明は、1又はそれ以上のアミノ酸残基の種類又は位置において天然型と異なっており、かつ天然型ポリペプチドの幾つかの又は全てのエピトープを共有する、GAD₆₅のポリペプチド類似体又は誘導体の宿主発現をコードするDNA配列の製造を提供する。

【0027】

本発明の新規なDNA配列は、GAD₆₅に対する自己抗体と反応することができる1又はそれ以上のエピトープのための1次構造コンホメーションの少なくとも一部を有するポリペプチドを、原核生物又は真核生物宿主細胞中で発現させるのに有用な全ての配列を含み、該GAD₆₅は以下のものと理解される：(a)図2 - 図4又は図5 - 図8に示されるDNA配列、又はその相補的鎖；(b)(a)で定義したDNA配列又はこの断片とハイブリダイズするDNA配列；及び(c)遺伝暗号の縮重のために、(a)及び(b)で定義したDNA配列とハイブリダイズするDNA配列。特に(b)で定義したものは、GAD₆₅の対立遺伝子変異型をコードするゲノムDNA配列と理解される。(c)では特に、そのDNA配列が、無脊椎動物宿主中でのmRNAの翻訳を容易にするコドンを導入するような、GAD₆₅、GAD₆₅断片、及びGAD₆₅類似体をコードするDNA配列を製造するものと理解される。

40

50

【 0 0 2 8 】

本発明の c D N A 配列は本質的にヒト又はラット G A D_{6 5} 分子をコードするものである。これから c D N A の小さいポリペプチド断片、又はヒト又はラット G A D_{6 5} に対する自己抗体のための少なくとも 1 個のエピトープをコードする対応する c D N A 配列を調製し、サブクロニングし、そして発現させることは今や日常的なことである。次いでクローン化ポリペプチド上にこのようなエピトープが存在することを、例えば G A D_{6 5} に対する自己抗体を有する患者からの血清を用いて確認できる。このような小さいペプチドの例としては、G A D_{6 5} の N - 末端からの最初の約 1 0 0 アミノ酸がある (図 1 1 に示す)。このアミノ酸配列には本質的に G A D_{6 7} が欠けている。

【 0 0 2 9 】

本発明の G A D_{6 5} はイムノアッセイに用いるのに特に適しており、液相又は固相担体に結合して使用できる。更に、これらのアッセイに用いる G A D_{6 5} は各種の方法で検出できるように標識することができる。

【 0 0 3 0 】

本発明の G A D_{6 5} を用いるイムノアッセイの例としては、直接又は間接法における、競合的又は比競合的イムノアッセイがある。このようなイムノアッセイの例としては、ラジオイムノアッセイ (R I A)、サンドイッチイムノアッセイ及びウェスタンブロットアッセイがある。本発明の G A D_{6 5} と結合する抗体の検出は、生理学的サンプルでの免疫組織化学的アッセイを含む、順相、逆相、又は同時モードのいずれかでを行うイムノアッセイを用いて実施することができる。用いる G A D_{6 5} の濃度は、イムノアッセイのタイプ及び使用する検出可能な標識の性質に依って変化する。しかしながら、どのようなタイプのイムノアッセイを用いるにせよ、使用する G A D_{6 5} の濃度は定法を用いて、当業者には容易に決定できる。

【 0 0 3 1 】

本発明の G A D_{6 5} は多くの種類の担体と結合させて、このポリペプチドと特異的に反応する抗体の存在を検出することができる。よく知られた担体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、及びマグネタイトがある。担体の性質は本発明の目的のためには可溶性又は不溶性のいずれであってもよい。当業者は G A D_{6 5} と結合するためのその他の適当な担体を知ることができるし、また定法によってこれを確認することができる。

【 0 0 3 2 】

多くの異なる標識及び標識法が当業者には公知である。本発明に使用できる標識のタイプの例としては、酵素、放射性同位体、コロイド金属、蛍光化合物、化学発光化合物、及び生物発光化合物がある。

【 0 0 3 3 】

更に、本発明のポリペプチドは G A D 酵素活性を測定することによって、G A D_{6 5} に対する抗体を検出することができる。例えば、G A D_{6 5} と、G A D_{6 5} に対する抗体を有している疑いのある標本とを、一定期間、G A D_{6 5} と抗体との間に結合を起こさせるに十分な条件下にインキュベーションする。反応生成物を沈殿化して、この G A D 酵素活性を試験する。

【 0 0 3 4 】

本発明の目的のためには、本発明の G A D_{6 5} と結合する抗体は、各種の生物学的液体及び組織中に存在する。検出可能な量の G A D_{6 5} に対する抗体を含むいかなるサンプルも用いることができる。普通、サンプルは尿、唾液、脳脊髄液、血液、血清などの液体であるか、或いは組織、糞などの固体又は半固体である。

【 0 0 3 5 】

本発明のアッセイに用いる物質は、そのままキットの製造にも適している。このようなキットは、バイアル、チューブなどの 1 又はそれ以上の容器手段を密に閉じ込めるために仕切られた担体手段を含み、該容器手段の各々はこの方法で使用する別々の要素のうちの

10

20

30

40

50

1つを含む。例えば、容器手段のうちの1つは担体と結合したGAD₆₅を含む。第2の容器は可溶性の検出可能な第2の抗体を凍結乾燥又は溶液の形で含む。

【0036】

更に、担体手段はまた複数の容器を含み、各容器は異なる、あらかじめ定められた量のGAD₆₅を含む。次いでこの後者の容器を用いて標準曲線を描き、これに未知の量のGAD₆₅に対する自己抗体を含むサンプルから得られた結果を挿入する。

【0037】

キットを使用するに当たって使用者がしなければならないことは、測定可能であるが、未知の量の検出されるべきGAD₆₅に対する自己抗体を含む、あらかじめ測定した量の検出用サンプルと、第1の容器中に存在するあらかじめ測定した量の担体結合したGAD₆₅と、第2の容器中に存在するあらかじめ測定した量の検出可能な標識化第2抗体とを容器に加えることである。若しくは、検出不能な標識化GAD₆₅を容器に付けて提供し、これにサンプルと、検出可能な標識化第2抗体とを加えることもできる。適当な時間インキュベーションした後、免疫複合体が形成され、これを上澄み液から分離し、免疫複合体又は上澄み液を、放射能カウントするか、又は酵素基質を加えて発色させるなどによって検出する。

【0038】

“改善する(ameliorate)”の語は、患者が受け取る治療において自己免疫応答の有害な効果を減少することを意味する。“治療的に有効な”の語は、使用するGAD₆₅ポリペプチドの量が自己免疫応答による疾患誘発を改善するのに十分な量であることを意味する。

【0039】

本発明の組換えGAD₆₅ポリペプチドは、GAD₆₅に対する自己免疫応答を有する患者の治療に用いることもできる。このような治療は、例えば、組換えGAD₆₅ポリペプチドを投与することによって実施できる。このような投与には非標識化又は標識化GAD₆₅ポリペプチドを用いることができる。非標識化GAD₆₅ポリペプチドを用いるのが有利な場合には、例えば、免疫応答を刺激するには小さすぎるが、自己免疫応答の継続を束縛したりブロックしたりするには十分大きい断片の形でGAD₆₅ポリペプチドを投与する。例えば、GAD₆₅をエピトープサイズのパプチド(典型的には5-12アミノ酸の長さ)に酵素的に消化して、自己免疫疾患を有する患者の体液中、又は免疫細胞の表面上に存在するFab結合部分に結合させる。

【0040】

或いは、本発明の組換えGAD₆₅ポリペプチドは、治療剤で標識して投与することができる。これらの治療剤は本発明のGAD₆₅ポリペプチドと直接又は間接にカップリングさせることができる。間接的カップリングの一例はスペーサー部分を用いることである。このスペーサー部分は可溶性又は不溶性であることができ(Diener et al., Science, 231:148, 1986)、ターゲット部分でGAD₆₅ポリペプチドから医薬の放出をできるように選択される。免疫治療用に本発明のGAD₆₅ポリペプチドとカップリングすることができる治療剤の例としては、医薬、放射性同位体、レクチン、及び毒素がある。

【0041】

本発明のGAD₆₅ポリペプチドと結合することができる医薬には、マイトマイシンC、ダウノルビシン、及びビンブラスチンのような古典的に医薬と呼ばれていたものを含む。

【0042】

免疫治療用に放射性同位体と結合した本発明のGAD₆₅ポリペプチドを使用する際には、白血球の分布、安定性及び放射のような要因に依って、一定の同位体が他の同位体よりも好ましいことがある。自己免疫応答に依って、一定の放射体が他のものよりも好ましいことがある。一般に、免疫治療ではα及びβ粒子放射性的放射性同位体が好ましい。²

^{1 2} Biのような近距離、高エネルギーのα放射体が好ましい。治療の目的のために本発明のGAD₆₅ポリペプチドと結合することができる放射性同位体の例としては、^{1 2 5}

10

20

30

40

50

I, ^{1 3 1} I, ^{9 0} Y, ^{6 7} Cu, ^{2 1 2} Bi, ^{2 1 1} At, ^{2 1 2} Pb, ^{4 7} Sc, ^{1 0 9} Pd 及び ^{1 8 8} Re がある。

【0043】

レクチンは通常植物から単離されるタンパク質であって、特定の糖部分と結合する。多くのレクチンが細胞を凝集させ、リンパ球を刺激することができる。しかし、リシン (r i c i n) は免疫治療に用いられてきた毒性レクチンである。これは、毒性の原因であるリシンの α -ペプチド鎖を、抗体分子と結合させて、毒性効果の特異的に配給することによって達成できる。

【0044】

毒素は植物、動物、又は微生物によって産出される毒性物質であって、十分な投与量でしばしば死に至る。ジフテリア毒素は治療的に用い得る *Corynebacterium diphtheria* によって産出される物質である。この毒素は α 及び β サブユニットからなっており、一定条件下に分離できる。

10

【0045】

毒素 A 部分は、GAD₆₅ ポリペプチドと結合させて、GAD₆₅ ポリペプチドに対するリセプターを発現する白血球への部分特異的な配給に用いられる。

【0046】

本発明の GAD₆₅ ポリペプチドとカップリングすることができるその他の治療剤は、ex vivo 及び in vivo の治療法共に、公知であり、又は当業者によって容易に確認できる。

20

【0047】

本発明の GAD₆₅ ポリペプチドの投与量は、自己免疫応答の症状又は細胞破壊が改善されるような所望の効果を生じるのに十分な量である。投与量は、好ましくない交差反応や、アナフィラキシー反応 (過敏症) などの副作用を引き起こす程大きいものであってはならない。一般に、投与量は年齢、症状、性別、及び患者の病気の重症度によって変化し、当業者によって決定される。万一何か好ましくない症状があった場合には、投与量は個々の医師によって調節される。投与量は、一回の投与当たり、約 0.1 mg/m² から約 2000 mg/m² まで、好ましくは約 0.1 mg/m² から約 500 mg/m² までで、1日に1回又は数回、1日又は数日間投与する。

【0048】

本発明の GAD₆₅ ポリペプチドは、注射又は時間をかけた勾配還流によって非経口的に投与される。本発明の GAD₆₅ ポリペプチドは、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、空洞内、又は経皮的に投与される。

30

【0049】

非経口的投与のための製剤は、滅菌水性、又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルジョンを含む。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、及びエチルオレエートのような注射可能な有機エステルがある。水性担体は、食塩水及び緩衝液を含む、水、アルコール/水性溶液、エマルジョン、又は懸濁液を含む。非経口的担体は、塩化ナトリウム溶液、リンガーのデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸化リンガー液、又は不揮発性油を含む。

40

【0050】

静脈内担体は、液体及び栄養補充物、電解補充物 (リンガーのデキストロースに基づくようなもの) などを含む。保存料、及びその他の添加物、例えば抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガスなども存在する。

【0051】

本発明はまた、本発明の GAD₆₅ ポリペプチドを含む医薬、又は医薬組成物の製造法にも関し、該医薬は GAD₆₅ に対する自己免疫応答の治療に使用する。

【0052】

上記の記載は本発明を一般的に述べたものである。以下の特定の実施例を参照することによって、より完全な理解が得られるが、ここで述べる実施例は説明のためのみになされ

50

るものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0053】

実施例1：GAD₆₅のクローニング及び発現

A. 組換えDNA手法

GAD₆₅及びGAD₆₇に特異的なcDNAプローブを得るために、Chirgwin et al., Biochemistry, 18:5294, 1979の方法を用いて、成熟ラットの脳から、グアニジンイソチオシアネート-セシウムグラジエントによって、全RNAを抽出した。Bethesda Research Laboratories (BRL)による実験書を用いて、ポリ(A)RNAをオリゴdTセルロース上で精製した。ポリd(N₆)-mers (Pharmacia)プライマーとして用いた以外は、指示された条件を用いて、MMLV-逆転写酵素(BRL)を用いて一本鎖合成を行った。このcDNA-RNA混合物を65で15分間加熱して不活性化して、-20に貯蔵した。PCRのためには、サンプルの1/50を反応物100μlに加えた。ネコ(cDNAから)(Kobayashi et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987)及びラット(ペプチドから)(Chang and Gottlieb, J. Neurosci. 8:2123, 1988)GAD(図1)の下線を施した共通のアミノ酸配列をコードするために変性(degenerate)オリゴヌクレオチドを合成した(Applied Biosystems)。各変性オリゴヌクレオチドの5'末端配列は、SstI及びHindIII(5'末端オリゴ)又はSstI及びSstII(3'末端オリゴ)のいずれかによって認識されるDNA配列の1本鎖を含む。これらのプライマーを用いて、Gould et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:1934, 1989に記載されたように、生じたcDNA鋳型のポリメラーゼ鎖反応によって選択的増幅を行った。PCR産物をHindIII/SstIで二重消化されたBluescript SKベクター(Stratagene)にサブクローニングし、DH5(BRL)に形質転換して、標準法(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)によってプレートした。

【0054】

ネコGAD₆₇に特異的な5'-³²P末端標識化オリゴヌクレオチドでコロニーハイブリダイゼーションを行った(Kobayashi et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987)。ニトロセルロースフィルターを50で15分間洗浄した以外は、文献(Wallace et al., in Guide to Molecular Cloning Techniques; Berger et al., Eds. in Methods of Enzymology; Abelson et al., Eds. Academic Press, Inc. San Diego, 432-442, 1987)記載のようにして、オリゴヌクレオチドの末端標識、ハイブリダイゼーション条件、及び洗浄条件を実施した。ハイブリダイゼーションで陽性及び陰性であったコロニーを個々に取り上げて、Terrific液体培地中で一夜成長させた(Tartof et al., Focus, 9:12, 1987)。煮沸法(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)を用いてDNAを単離し、0.2N NaOHで鋳型を変性し、Sepharose 4B S400スパンカラム(Pharmacia)で精製した。変性された二本鎖鋳型の配列決定は、T7-シーケンスキット(Pharmacia)を用いて、鎖-末端法(Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463, 1977)によって行った。

【0055】

図1に示すように、PCRで生じたラットGAD₆₅及びGAD₆₇cDNAをプローブとして用いて、標準的手法(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)によって、S. Heinemann(Salk Institute)から供与されたラムダZAP(Stratagene)ラット海馬ライブラリーをスクリーニングした。2400ヌクレオチドのGAD₆₅cDNA(最大クローン)を単離して、Stratageneに記載するように“ザッピング(zapping)”によってサブクローニングした。手元に既にあった3.2kbのラットGAD₆₇cDNAクローンよりも小さいラットGAD₆₇cD

NAを得たら、より大きなcDNAの配列決定を行った。GAD₆₅及びGAD₆₇について両方の方向にExo I I I削除(Henikoff, Gene, 28:351, 1984)を行って、鋳型を調製し、上記のようにして配列決定を行った。ライブラリスクリーニングにおいて単離された元のcDNAクローン中には現れていなかったGAD₆₅及びGAD₆₇mRNAの残りの5'末端をクローニングするために、アンカーPCRを行った(Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8998, 1988)。これらのクローンの配列決定を行ったところ、GAD₆₅又はGAD₆₇mRNAのいずれも、フレーム中に元のcDNAクローンの開始コドンであると以前に同定されたものと共に、更に別の開始コドン(AUG)をなんら含んでいないことが明らかとなった。

10

【0056】

実施例2：クローン化GAD₆₅の特徴

A. ノーザンブロットハイブリダイゼーション

GAD₆₇及びGAD₆₅cDNAは2個の異なるmRNAに由来するのかどうかを決定するために、2個のPCR-由来のcDNAプローブを、ラットの脳RNAを含むノーザンブロットにハイブリダイゼーションした。RNAは実施例1に記載したように抽出した。ホルムアルデヒド中の電気泳動によってポリ(A)RNAを分離し、Biotrans (ICN)膜上に移して、100µm/mlのポリ(A)を加えた以外は、Well et al., J. Neurosci., 16:311, 1986に記載の方法によってハイブリダイゼーションを行った。Feinberg and Vogelstein, Anal. Biochem., 132:6, 1983に記載のオリゴラベリング法によって、プローブを約10⁹ dpm/µgまで標識した。次いでGAD₆₅及びGAD₆₇cDNAの全長クローンで同じ結果が得られた。

20

【0057】

図11に示すように、レーン1及び2は、ラット小脳から抽出したポリ(A)選択RNA 1µgを含む。レーン1はネコGAD₆₇(Kobayashi et al., J. Neurosci., 7:2768, 1987)のラット起源のcDNAプローブとハイブリダイゼーションさせたものであり、レーン2はラットペプチド配列(GAD₆₅と対応する)のcDNAプローブとハイブリダイゼーションさせたものである。

【0058】

ラットペプチド配列のcDNAプローブは5.7kbのRNAとハイブリダイゼーションし、一方ネコcDNAのラット起源のcDNAプローブは3.7kbのRNAとハイブリダイゼーションした。これは、GAD₆₅とGAD₆₇が同じmRNAに由来するものではないことを示している。

30

B. GAD₆₇及びGAD₆₅のゲノム性ハイブリダイゼーション

GAD₆₇及びGAD₆₅が別々の遺伝子に由来する可能性を調べるために、GAD₆₇及びGAD₆₅の両方のcDNAを、ゲノム性DNAを含むDNAプロットとハイブリダイゼーションした。

【0059】

サザンブロットのために、ゲノム性DNAはKaiser et al., in DNA Cloning, vol.1, A Practical Approach, D.M.Glover ed., IRL Press, Oxford, 38-40, 1985に記載に従って、ラット肝臓から抽出した。製造者(BRL, Gaithersburg, MD)の指示する条件を用いて、DNA(10µg/サンプル)をEcoRI及びHindIIIで完全に消化した。0.8%アガロース中、1.5v/cmで16時間、電気泳動を行ったDNA断片を分離した。次いで、Denhardt溶液の代わりに5µg/mlのCarnationドライミルクを用いた以外は、Gatti et al., Biotechniques, 2:148, 1984に記載に従って、DNAをZeta-Probe膜(Bio-Rad)に移して、ハイブリダイゼーションし、洗浄した。サザンブロットのためのプローブは、上記実施例1に記載したように標識した。

40

【0060】

50

図 12 に示すように、H i n d I I I 及び E c o R I で消化したゲノム性 D N A は、それぞれレーン 1、3 とレーン 2、4 にある。G A D₆₇ c D N A はレーン 1 及び 2 とハイブリダイゼーションさせ、一方 G A D₆₅ c D N A はレーン 3 及び 4 とハイブリダイゼーションさせた。ゲル横にある数字はキロベースで表した D N A 断片サイズである。

【0061】

このデータは、2 個の c D N A は、異なるサイズのゲノム断片とハイブリダイズすることを示している。更に、G A D₆₅ と G A D₆₇ c D N A との同一のヌクレオチド配列のうち最大の連続した配列は、たった 17 ヌクレオチド塩基の長さである。従って、G A D₆₇ と G A D₆₅ とは 2 個の異なる遺伝子によってコードされている。

C. G A D₆₇ 及び G A D₆₅ の酵素的比較

G A D₆₇ 及び G A D₆₅ の活性における P L P の効果を比較する研究を行った。そのために、両方の c D N A をバクテリア中でその発現ができるようなベクター中にサブクローニングした (Studier et al., J. Mol. Biol., 189:113, 1986)。G A D₆₅ c D N A を p E T - 8 c ベクターの N c o I 部位にサブクローニングし、かつ G A D₆₇ c D N A を p E T - 5 c ベクターの N h e I 部位にサブクローニングすることによって、“融合しない (f u s i o n l e s s)” G A D₆₅ 及び G A D₆₇ の過発現 (o v e r e x p r e s s i o n) を実施した (Studier et al., J. Mol. Biol., 189:113, 1986)。

【0062】

両方の c D N A を正しいフレーム内でサブクローニングするための両立性の付着末端を得るために、U n i t e d S t a t e s B i o c h e m i c a l (U S B) の指示する条件を用いて、混合物中における 200 μ M d N T P s と 1.5 m M M g C l₂ で、P C R による選択的増幅を行い、A m p l i T A Q (U S B) の不確実さを減少するために 55、20 サイクルでアニーリングした。G A D₆₅ 及び G A D₆₇ に特異的なプライマーは、それぞれ N c o I 及び S p e I 認識部位の 1 本の D N A 鎖を含んでいた。G A D₆₇ のコーディング領域には N h e I 制限部位があるので、S p e I (N h e I と両立性) を用いた。

【0063】

P C R 産物をそれぞれの p E T ベクターにサブクローニングし、D H 5 に形質転換して、上記のようにプレートした (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。コロニーを取り出して、アンピシリン 50 μ g / m l を含む L B 液体培地中で一夜成育させた。正しい方向性を有するサブクローンを過発現のために B L 21 (D E 3) 株 (Studier et al., J. Mol. Biol. 189:113, 1986) に形質転換した。ネガティブコントロールとして、挿入物をもたない p E T - 8 c ベクターを形質転換して、誘導した。1 個のコロニーを取り出して、成育し、1 m M のイソプロピル - B - D - チオガラクト - ピラノシド (I P T G) で誘導して、文献 (Sambrook et al., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 17. 15-17. 16, 1989) 記載のように S D S - P A G E ゲル上で分析した。

【0064】

G A D 活性を測定するために、O D₆₀₀ - 0.5 のバクテリア培養物 10 m l を 1 m M の I P T G で誘導した。誘導後 2 時間で、バクテリアを遠心して、ホモジェナイズ用バッファー (1 m M フッ化フェニルメチルスルホニル (P M S F)、1 m M 臭化 2 - アミノエチルイソチオウロニウム (A E T)、及び 60 m M リン酸カリウム、p H 7.1) 1 m l 中に再懸濁して、超音波処理した。超音波処理後、細胞カスを遠心で除去し、上澄み (少量の上澄みを - 70 で貯蔵した) 中のタンパク質濃度を測定した (Bradford, Anal. Biochem., 72:248, 1986)。文献 (Legay et al., J. Neurochem., 46:1478, 1986) 記載のように脳のホモジェネートを調製した。Krieger et al., J. Neurochem., 33:299, 1984 の記載に従って、0.2 m M P L P の存在下、又は不存在下に、インキュベーション混合物中に脳ホモジェネート又はバクテリア溶菌物 20 μ l を入れて、G A D 活性を測定した。バクテリア溶菌物中の ¹⁴ C O₂ の生産量は、インキュベーション時間及びタンパ

10

20

30

40

50

ク質濃度に比例していた。

【 0 0 6 5 】

【 表 1 】

試料	GAD特異的活性 ^a		誘導による 増加倍率
	- P L P	+ P L P	
BL21(DE3) + pET-8c	1 2 ± 0. 4	9 ± 1	—
BL21(DE3) + pET-GAD ₆₅	1 1 5 ± 3	7 7 3 ± 6 1	6. 7
BL21(DE3) + pET-GAD ₆₇	1 6 0 ± 2	3 8 9 ± 8	2. 4
ラット脳	1 3 1 ± 5	2 1 6 ± 2	1. 6

^a : 三重試験の¹⁴C O₂/μgタンパク質/時間のc p m ± S. E. M.

10

20

30

40

50

表 1 に示すように、G A D₆₅ 又は G A D₆₇ を含むバクテリア溶菌物は [1 - ¹⁴ C] - グルタミン酸と、G A B A 及び ¹⁴ C O₂ との変換を触媒する。

【 0 0 6 6 】

P L P は、G A D₆₇ よりも G A D₆₅ の酵素活性を刺激する。このより大きな刺激は多分、M a r t i n 及びその共同研究者 (Martin, Cell. Mol. Neurobiol., 7:237, 1987) が提唱した不活化サイクルを通して、G A D₆₅ がより速く循環することを示している。このより速い循環は、i n v i v o で存在する a p o - G A D のプールに、G A D₆₅ がより貢献していることを示している (Miller et al., Brain Res. Bull., 5(Suppl. 2):89, 1980)。従って、i n v i v o では P L P は、G A D₆₇ 活性よりも G A D₆₅ 活性をより制御していると考えられる。

【 0 0 6 7 】

バクテリア溶菌物中の G A D₆₅ 活性は、ラット黒質から調製したシナプトソーム中に見られる G A D 活性の 5 倍の P L P 刺激にほぼ等しい (Miller et al., J. Neurochem., 33:533, 1979)。いずれの G A D も、粗ラット脳ホモジェネート中の G A D 活性よりもバクテリア中に加えた P L P により依存するので、バクテリア溶菌物の内

D . G A D₆₅ 及び G A D₆₇ の免疫学的同定

上記のようにしてラット脳ホモジェネートとバクテリア溶菌物を抽出した。Harlow et al., Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988 に記載されたように、各サンプルに等量の電気泳動用バッファーを加えた。S D S 中の 1 0 % アクリルアミドゲルで電気泳動を行って、タンパク質を分離し、電気泳動的にニトロセルロースに移した (Harlow et al., Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988)。未反応部位を、2 % ウシ血清アルブミン (フラクシオン V)、1 % ゼラチン、及び 1 % トリトン - X - 1 0 0 を含むリン酸緩衝生理食塩水溶液 (P B S) を用いて、4 2 °C で、1 時間ブロックした。洗浄後、ニトロセルロースフィルターを 3 つの部分に切断し、以下の一次抗体と共にインキュベーションした：レーン 1 から 4 は、G A D₆₇ 及び G A D₆₅ の両方を認識する Oertel et al., Neuroscience, 6:2689, 1981 の抗血清の 1 / 2 0 0 0 希釈液と共に；レーン 5 から 8 は、G A D₆₅ のみを認識する K - 2 抗血清の 1 / 2 0 0 0 希釈液と共に；レーン 9 から 1 2 は、G A D₆₅ に特異的な G A D - 6 モノクローナル抗体 (Chang et al., J. Neurosci., 8:2123, 1988) の 1 / 2 0 0 0 希釈液と共にインキュベーションした。全てのフィルターをよく洗浄して、適当な二次抗体をインキュベーションして、洗浄した。結合した抗体を ¹²⁵I - 標識蛋白質 A 及びオートラジオグラフィーにより検出した。各レーンは以下のものを含んでい

た：レーン 1、5 及び 9 は、B L 2 1 (D E 3) + p E T - G A D_{6 7}；レーン 2、6 及び 10 は、B L 2 1 (D E 3) + p E T - G A D_{6 5}；レーン 3、7 及び 11 は、ラット脳ホモジェネート；そしてレーン 4、8 及び 12 は、B L 2 1 (D E 3) + p E T - 8 c。

【 0 0 6 8 】

バクテリア産出性の G A D_{6 5} 及び G A D_{6 7} のイムノブロットは、G A D_{6 5} が脳抽出物中の小さい G A D とよく対応し、そして G A D_{6 7} は大きい形とよく対応することを示している (図 1 3)。これまでの研究は、G A D_{6 7} がネコ G A D_{6 7} 及びマウス G A D_{6 7} にとっての大きい G A D と対応することを示している (Katarova et al., Eur. J. Neurosci., 2:190, 1990; 235, 1987)。バクテリア産出性の G A D_{6 5} 及び G A D_{6 7} の可動性 (Oertel et al., Neuroscience, 6:2689, 1981 の抗血清で検出した場合) は、ラット脳ホモジェネートに見られる免疫反応ダブレットと同じである。

【 0 0 6 9 】

ラット脳中の G A D の低分子量及び高分子量形は、それぞれ G A D_{6 5} 及び G A D_{6 7} c D N A の産物と、抗原的にまた大きさに同じものである。その結果、ラット脳中の 2 つの G A D は、G A D_{6 5} と G A D_{6 7} である。このデータから、既に報告されているタピア (T a p i a) による P L P - 依存性 G A D と、P L P - 非依存性 G A D (Bayon et al., J. Neurochem., 29:519, 1977) は、それぞれ G A D_{6 5} 及び G A D_{6 7} と分子的に同じものである、と結論付けることができる。M a r t i n 及びその共同研究者 (Spink et al., Brain Res., 421:235, 1987) は、ラット脳 G A D には 4 つの運動力学的に異なる形が存在することを報告している。しかしながら、これらの形のイムノブロッティング試験 (ここで用いたような抗血清を用いる) については報告されていない。

E . 脳組織中の R N A における G A D_{6 5} 及び G A D_{6 7} の分布

インサイチュ (i n s i t u) ハイブリダイゼーションを用いて、小脳の R N A における G A D_{6 5} 及び G A D_{6 7} の分布を決定するための実験を行った。

【 0 0 7 0 】

G A D_{6 5} 及び G A D_{6 7} c D N A からの、それぞれ 3 . 2 k b 及び 2 . 3 k b の転写物を、Wuensche et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:6193, 1986 の方法に従って、3 5 S で放射性標識した。2 0 0 b p の加水分解断片を、ラット小脳の冠状セクションとハイブリダイズさせた。動物はハロタンで麻酔して断首した。脳をドライアイス中で急速に冷凍して、冠状凍結セクション (1 2 μ m) を、新たに調製したリン酸緩衝液 (P B S ; 1 3 0 m M N a C l , 1 0 m M リン酸ナトリウム、p H 7 . 0) 中の 4 % ホルムアルデヒド中で、3 0 分間固定した。組織を勾配化エタノール溶液中で脱水し、- 7 0 で貯蔵した。

【 0 0 7 1 】

組織の透過性を増加するために、セクションを以下の前処理に付した：勾配化エタノール溶液 (9 5 %、8 5 %、7 0 %、5 0 % 及び 3 0 % エタノール中に各 5 分) 中での再水和；P B S (5 分)；0 . 0 2 N H C l (1 0 分)；P B S (5 分)；P B S 中の 0 . 0 1 % トリトン N - 1 0 1 (1 分)；P B S (2 × 5 分)；1 μ g / m l プロテイナーゼ K (7 . 5 分)；及び P B S 中のグリシン (プロテイナーゼ K を阻害するため) (3 × 5 分)。プロテイナーゼ K は使用前に 3 7 で 3 0 分間消化した。次いでセクションを 3 7、5 0 % ホルムアミド、7 5 0 m M N a C l、2 5 m M E D T A、0 . 2 % S D S、0 . 0 2 % B S A、0 . 0 0 2 % フィコル、0 . 0 2 % ポリビニルピロリドン、2 5 0 μ g / m l イースト t R N A、2 5 0 μ g / m l ポリ A、及び 2 5 m M P P E S (p H 6 . 8) 中でインキュベーションした。

【 0 0 7 2 】

ハイブリダイゼーションのためには、1 0 0 m M D T T、1 0 % 硫酸デキストラン、及びセンス又はアンチセンスの^{3 5}S - R N A を、プレハイブリダイゼーション溶液に加えた。プローブ (センス又はアンチセンス) 約 3 n g (1 0⁶ c p m) を含むハイブリダイゼーション溶液の少量 (5 0 μ l) をスライド上に加えた。各スライドはカバーをし

て、50 で16時間インキュベーションし、次いでシリコン処理したカバーを4×SSC (1×SSC - 150 mM NaCl、60 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.0) で短時間洗浄することによって除去した。

【0073】

次いでセクションをリボヌクレアーゼA (0.5 M NaCl、10 mM チオ硫酸ナトリウム、1 mM EDTA、10 mM TrisHCl、pH 8.0中、50 µg/ml) で、37、20分間処理して、2×SSC中、室温で2時間リンスし、10 mM チオ硫酸ナトリウム中、55 で30分間リンスした。セクションをエタノール中で脱水し、キシレン中で脱脂して、Kodak NTB2エマルジョンでコーティングし、4で10日間露光した。エマルジョンをKodak D19で現像して、組織をクレシルバ
10
イオレットで対比染色した。

【0074】

反射偏光を用いてオートラジオグラフ粒子を検出し、粒子数、密度、nd細胞領域をAnalytic Imaging Conceptsイメージアナライザーシステムで測定した。バックグラウンドレベルが低いために、細胞が“標識された”と定義するための基準を、5以上の集団化した粒子の存在においた。GAD標識された細胞が脳中に分散して見受けられ、個々の細胞上の粒子数の測定を可能とした。細胞と、粒子によって覆われた領域との境界によって、1細胞当たりの領域数の計算が可能となった。染色された細胞と、上におかれた粒子とを同時に見るように、反射偏光と透過光との両方を用いて、高倍率(800×)で分析を行った。数は、“n”細胞の平均±S.E.M.であ
20
る。

【0075】

【表2】

表2

粒子/細胞			
細胞タイプ	GAD ₆₇ mRNA	GAD ₆₅ mRNA	GAD ₆₇ :GAD ₆₅
プルキニエ	172±34 (87) ^a	43±2 (70)	4.0
ゴルジII	96±8 (80)	64±9 (65)	1.5
籠	61±12 (102)	16±1 (57)	3.8
星	55±15 (65)	18±3 (37)	3.1

a: ±S.E.M. (n)

30

全ての神経性細胞タイプにおいて、GAD₆₇mRNAレベルの方が大きい。in situでのハイブリダイゼーションにおける観察は、小脳中の非依存性GAD活性に対するPLPの依存率は、試験した脳領域中で最も低いものの一つである、という従来知見
40
(Nitsch, J. Neurochem., 34:822, 1980; Denner et al., J. Neurochem., 44:957, 1985; Itoh et al., Neurochem. Res. 6:1283, 1981)と一致している。更に、表2に示すように、GAD₆₇mRNAに対する量は、プルキニエ>ゴルジII>籠>星細胞の順であり、一方GAD₆₅に対する量は、ゴルジII>プルキニエ>籠>星細胞の順である。

【0076】

このようにGAD₆₅及びGAD₆₇mRNAの発現はニューロンのクラスによって異なる。つまり、全GAD活性に対するそれぞれの貢献度が、いかにGABA生産が制御されているかに影響している。例えば、黒質は、PLP-非依存性GAD活性に対して、最も高いPLP-依存率の一つを含む(Nitsch, J. Neurochem., 34:822, 1980)。GAB
50

A 異化作用の阻害剤を局部的に注射することによって、黒質における G A B A 濃度を増加させることは、発作感受性 (s e i z u r e s u s c e p t i b i l i t y) の減少に特に有効である (Gale, Fed. Proc., 44:2414, 1985)。従って、P L P - アンタゴニストによって誘導される発作を受ける実験動物は、特に黒質内の神経末端における G A D₆₅ の阻害のために、発作の伝達を阻害することができない。

F . G A D₆₅ 及び G A D₆₇ の無細胞系配置

G A D₆₅ 及び G A D₆₇ の分布を S₂ 及びシナプトソーム無細胞分画において評価した。S₂ は、脳中の全細胞の細胞質ゾルからなる高速上澄みであり、一方シナプトソーム分画は、主として神経終末からなる (Gray et al., J. Anat., Lond, 96:79, 1962)。これらの研究のためには、全ラット脳分画を、Booth and Clark (Booth, et al.) Biochem. J., 176:365, 1978 に記載するように行った。タンパク質濃度を Schaffner and Weissman (Schaffner et al., Anal. Biochem. 56:502, 1973) の方法によって測定した。Kaise et al., DNA Cloning, Vol. 1, A Practical Approach, D. M. Glover ed., IRL Press, Oxford, 1985, pp. 38-40 に記載の方法でサンプルを調製し、G A D - 6 モノクローナル抗体及び K - 2 抗血清を用いて上記のようにしてイムノブロッティングを行った。等量のタンパク質 (16 µg) を各レーンに加えた。オートラジオグラフィーは、1、3、10、30、100 µg のタンパク質濃度で、K - 2 抗血清及び G A D - 6 モノクローナル抗体の両方と抗体結合した¹²⁵I - タンパク質 A の量が線状に増加する応答を示している (データ示さず)。

【 0 0 7 7 】

この結果は、どちらの分画にも等量の G A D₆₇ が存在することを示している。S₂ 分画は神経膠 (及びその他の非ニューロン性) の細胞質ゾルタンパク質と、ニューロン細胞とを含んでいるので、G A D₆₇ の濃度は、神経末端よりもニューロン細胞体部における方が大きいに違いない。これとは対照的に、G A D₆₅ の濃度は S₂ よりもシナプトソームにおける方が大きい。これらの無細胞分画実験は、G A D₆₅ とは対照的に、神経末端よりもニューロンの細胞体部において、はるかに大きい G A D₆₇ 分画が存在することを示唆している。従って、免疫組織化学的研究におけるのと同様に、無細胞分画化は、G A D₆₅ 及び G A D₆₇ が異なる無細胞分布を有していることを示している。

【 0 0 7 8 】

G A B A の合成及び分解阻害剤を用いる i n v i v o の実験において、ニューロン細胞体部における G A B A プールは、神経末端における G A B A プールとは異なることを示唆している (Iadarola et al., Mol. Cell. Biochem., 39:305, 1981)。G A D₆₇ によって生産される G A B A は細胞代謝において (例えば G A B A シヤントにおいて)、そして神経細胞樹状突起シナプスにおいて、より係わっている。僧帽樹状突起と共に神経細胞樹状突起シナプスを形成し (Shepard, Physiol. Rev., 52:864, 1972)、そして多分 G A B A を放出している (McLennan, Brain Res., 29:177-184, 1971) 嗅神経球にある顆粒細胞の樹状突起は、K - 2 抗血清で強く標識する。ここに示してはいないが、嗅神経球においては G A D₆₅ よりも G A D₆₇ m R N A レベルの方が大きい (2 - 3 倍) ことが見いだされている。この分布は、嗅神経球における G A D 活性のほとんどがシナプトソームではなく、S₂ 及び P₁ (粗核ペレット) に存在する、という知見 (Quinn et al., Neurochem., 35:583, 1980) と一致している。

【 0 0 7 9 】

G A D₆₅ と G A D₆₇ の無細胞分布の相違は、細胞体質の係留性 (c y t o s k e l e t a l a n c h o r i n g) 又は未知のタンパク質標的機構によるものかも知れない。いくつかの細胞体質タンパク質では、G A D₆₅ と G A D₆₇ で似た分布を有している。例えば、培養交感神経細胞において、Peng et al., J. Cell. Biol., 102:252, 1986 は、タウの 84 % は軸索に存在するが、一方 M A P - 2 の 100 % が細胞体及び樹状突起に存在することを示した。更に、細胞体質タンパク質である、43 k d のタンパク質が、アセチルコリンレセプターをその下にある膜細胞体質に係留するためのものである、と考えられている (Flucher et al., Neuron, 3:163, 1989

10

20

30

40

50

）。

【 0 0 8 0 】

実施例 3：臨床標本中の G A D 自己抗体の検出

A．材料及び方法

1．患者標本： A t k i n s o n 及びその共同研究者 (Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990) の以前の研究から、4 グループの患者の血清を選択した。このグループは以下のものからなる：グループ (1) 以前には U n i v e r s i t y o f F l o r i d a , D i a b e t e s C l i n i c s と呼ばれていた権威ある N a t i o n a l D i a b e t e s D a t a G r o u p (N D D G) の基準 (Gleichman et al., Diabetes, 36:578-584, 1987) に従って診断された、1 人の新規発病 I D D 患者；グループ (2) 家族に自己免疫疾患の病歴をなんら持たない、5 人の無作為に選択された小島細胞細胞質抗体 (i s l e t c e l l c y t o p l a s m i c a n t i b o d y : I C A) ネガティブの非 - 糖尿病性コントロール；グループ (3) I D D の発病が記録される前の 3 から 6 6 カ月間、血清が収集されてきた 13 人；グループ (4) 非 - 糖尿病性コントロール及び親族、及び I D D 発病前に研究された人達；及びグループ (5) I D D M の危険があるが、まだ発病には至っていない 3 人の患者。この後者のグループは、I D D 発端者の第 1 級親族 5 0 0 0 人以上、及び一般人 8 2 0 0 人 (このうち 4 8 1 3 人が学童である) の継続的 I C A スクリーニングによって確認した。

2．小島細胞自己抗体：血液型 O のクリオカット (c r y o c u t) 脾炎を間接免疫蛍光法で I C A アッセイした (Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990)。全ての結果をコードしたサンプルで、各バッチにおけるネガティブ及びポジティブコントロール血清と比較しつつ解釈した。I C A ポジティブの程度は I C A 標準化 (Gleichman et al., Diabetes, 36:578-584, 1987) のための I m m u n o l o g y D i a b e t e s W o r k s h o p (I D W) によって確立されたガイドラインに沿って分析した。全てのポジティブな血清を端点 (e n d p o i n t) 希釈によって滴定し、あらかじめ 8 0 ユニットの国際若年層糖尿病協会 (J u v e n i l e D i a b e t e s F o u n d a t i o n : J D F) 標準に調製しておいた標準血清との比較によって、J D F ユニットを測定した。ここで報告する研究においては、ポジティブな I C A 結果とは 1 0 J D F ユニット又はそれ以上の応答力価で定義される。

3．H L A D R タイピング：D R トレイ (O n e L a m d a L a b o r a t o r i e s , L o s A n g e l e s , C A) を用いて、Van Rood and Van Leuwen (Nature, 262:795-797, 1976) に記載の方法で H L A D R タイピングを実施した。

4．ヒトの小島細胞：ヒト脾臓小島をカダベリン性 (c a d a v e r i c) 脾炎から単離し、上記したように (Ricoedi et al., Diabetes, 37:413-420, 1988) i n v i t r o で維持した。小島細胞を i n v i t r o で (9 5 % 空気 / 5 % C O ₂) ^{3 5} S メチオニン (A m e r s h a m , A r l i n g t o n H e i g h t s , I L) で代謝的に標識した。

5．小島細胞の抽出及び免疫沈降：Atkinson et al., (Lancet, 335:1357-1360, 1990) に記載の方法で、以下の修飾を用いて小島細胞を抽出した。免疫沈降の研究のためには、小島細胞溶解物を、各 1 0 0 0 小島細胞毎にコントロール、I D D 血清 (1 0 0 μ l) 、又は G A D - 6 (Chang et al., J. Neuro., 8:2123-2130, 1988) (トリスバッファー 9 9 μ l 中に 1 μ l) (Atkinson et al., Lancet, 335:1357-1360, 1990) のいずれかと共にインキュベーションする (2 時間、4) ことによって、2 度前処理した。次いで免疫複合体を、過剰のタンパク質 A セファロース C L - 4 B (P h a r m a c i a , N J) に吸着させた。次いで、非結合性 (前処理した) 溶解物を含む 1 0 0 0 個の小島細胞を含む少量を、I D D 又はコントロール血清 (2 5 μ l) 、又は G A D - 6 (Chang et al., J. Neuro., 8:2123-2130, 1988) (トリスバッファー 2 5 μ l 中に 1 μ l) でインキュベーションした。タンパク質 A セファロース C L - 4 B でもう一度インキュベーションした (1 時間、4) 後、複合体を 0 . 1 % S D S 、1 . 0 % トリトン X - 1 1 4 、及び 2 m M E D T A を含む 5 0 m M トリス塩酸 (p H 7 . 4) で 5 回洗浄し、次いで二重

蒸留水で1回洗浄した。タンパク質AセファロースCL-4Bを次いでLaemmliサンプルバッファー (Laemmli, Nature, 227:680-685, 1970) 中で煮沸し、そのサンプルをSDS-PAGE及びEnhance (New England Nuclear) を用いる蛍光ラジオグラフィー (Kodak, X-omat AR5) に付した。或いは、オートラジオグラフをBETAGEN (Boston, MA) アナライザーによって分析した。64KAのポジティブ又はネガティブの血清を各アッセイで用いて、アッセイ内コントロールとした。全ての蛍光ラジオグラフィーを分析して、既知のアッセイ内コントロールと比較してポジティブ又はネガティブと区分けした。ポジティブな血清サンプルは、もしもサンプルが64, 000M_x バンドの低い強度の免疫沈降であったなら、これを1とし、もしも中程度の強度のバンドが観察されたら2とし、そしてもしも免疫沈降タンパク質の強度が大きいときは、これを3とした。免疫沈降した³⁵S-GAD₆₅ 及び³⁵S-GAD₆₇ に対応するバンドの強度についても同様の区分けを用いた。

6. 免疫沈降: ³⁵S-GAD₆₅ 又は³⁵S-GAD₆₇、及びヒト脳ホモジェネートからのGADを含むバクテリア溶解物の免疫沈降を、上記のヒト小島細胞抽出物の免疫沈降研究で記載したのと同様に行った。

7. GADアッセイ: ヒト脳ホモジェネートを、上記のヒト小島細胞で記載したように、患者血清と共にインキュベーションした。吸着及び洗浄後、タンパク質Aアガロースラリーの少量を3回、等量で採取し、GAD活性をKrieger et

al., Neurochem. 33:299, 1984に記載のように測定した。簡単に言うと、タンパク質Aアガロースビーズを(1-¹⁴C)-グルタミン酸(Amersham)と共に、指定のインキュベーション混合物(Krieger et al., Neurochem., 33:299, 1984) 中でインキュベーションし、液体シンチレーションカウンターで¹⁴CO₂の生産を定量した。

8. ³⁵S-GAD₆₅ 及び³⁵S-GAD₆₇の生産: ラットGAD₆₅ 及びGAD₆₇ cDNAを上記したようにバクテリア発現系にサブクローンした。³⁵S-GADの標識は、IPTG誘導化バクテリア(最小培地で成育)をTRAN³⁵S-ラベル(ICN)15分間パルスすることによって行った。次いで培養物を遠心して、ホモジェナイズバッファー[1mM フェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF), 1mM 2-アミノエチルイソチオウロニウムプロミド(AET)及び60mM リン酸カリウム、pH 7.1]中に再懸濁して、超音波処理した。超音波処理の後、遠心によって細胞カスを除き、上澄み(上澄みは-70で少量貯蔵した)中のタンパク質濃度を測定した(Bradford, Anal. Biochem., 72:248, 1986)。

B. IDDM標本の免疫反応性

IDDMを有する患者からの血清を用いて、ヒト脳ホモジェネートからのGADを沈降させる能力を試験した。

【0081】

【表 3】

患者	I D D M	I D D M患者からの血清の免疫沈降GAD活性			GAD活性 ⁴ (c p m' s)
		I D D M前の期間	6 4 K ²	J D F ³	
D A	* ⁵	> 2 4	3	1 6 4	1 3, 7 6 2
D C	*	> 1	3	2 0	1, 7 1 9
R S	+	5	3	4 0	5 8 8
N L	+	0	2	8 0	4 4 0
D M	*	> 1	2	1 0	1 8 4
C	-	n a	0	0	2 8 0
C	-	n a	0	0	2 8 5
C	-	n a	0	0	3 2 5
C	-	n a	0	0	2 7 5
C	-	n a	0	0	2 7 0

1 : 月で表示

2 : 実験法の部で記載した6 4 K力価

3 : Juvenile Diabetes Foundation (JDF)ユニットで表した小島細胞抗体試験

4 : バックグラウンドに調整せず

5 : 糖尿病の危険あり (グルコース試験せず)

n a : 適用できず

表 3 に示すように、I D D Mの危険があるか、或いはI D D M患者の (5 例のうち) 4 例の血清は、コントロール患者の血清よりも、有意に大量のヒト脳抽出物の酵素的に活性が G A D と結合している。更に、患者のうちの 1 人からの血清は前 - I D D M 時期に採取されており、従って G A D に対する自己抗体は I D D M 症状の発病前に存在していたことになる (下の C 参照) 。

【 0 0 8 2 】

更に別の実験 (結果を示さず) では、I D D Mの危険がある患者 2 人 (D A , D C) からの血清は、組換え法で生産された^{3 5} S - G A D_{6 5}を免疫沈降させるが、一方組換え法で生産された^{3 5} S - G A D_{6 7}は、患者 D A の血清のみによって認識された (そしてこれは^{3 5} S - G A D_{6 5}よりも弱い) ことを示した。またそれ以降の研究で、神経病の合併症を有する I D D M 患者の血清中には、G A D_{6 5}よりも G A D_{6 7}自己抗体の力価が大きいことが見いだされた (ここでは示さず) 。

【 0 0 8 3 】

患者 D A の血清を用いる別の研究において、ヒト膵臓小島細胞で生産される特異的ポリペプチドを認識する抗体の存在が示された。結合ポリペプチドの電気泳動分析によって、

10

20

30

40

50

他の研究者によって以前にヒト I D D M (Baekkeskov et al., Nature, 298:167-169, 1982) 及び動物モデル (Baekkeskov et al., Science, 224:1348-1350, 1984; Atkinson et al., Diabetes, 37:1587-1590, 1988) で示されたような、64 k D の成分に対する自己抗体の存在が明らかとなった。G A D₆₅ を認識するが、G A D₆₇ は認識しない、G A D - 6 モノクローナルで、或いはバクテリアで生産される G A D₆₅ でこれらの血清をあらかじめ吸着させると、64 k D の膵臓ポリペプチドを血清が認識する能力が失われる。従って64 k D の自己抗原に対する自己抗体によって認識されるエピトープが G A D₆₅ 中に存在し、このことは該自己抗原が G A D₆₅ であることを示唆している。G A D₆₅ の予測される値を調査するために、I D D M の臨床的発現の発病前の患者から血清を採取して、この G A D₆₅ に対する自己抗体を調べた。

10

【 0 0 8 4 】

【 表 4 】

表 4 I D D M 患者における疾患発病前の自己抗体の分析									
患者	性別	H L A	発病時の年齢 ¹	I D D M 前の期間 ²	J D F	6 4 K A ³	G A D ₆₅ ³	G A D ₆₇ ³	
T A	M	3, 2	17	11	20	2	0	1	
C A	F	4, 5	38	4	0	1	1	0	
R A	M	2, 1	5	34	0	2	1	0	
T B	M	2, 4	11	66	40	1	1	0	
A B	M	N. D.	23	6	160	3	3	2	
V C	F	4, 6	15	3	40	1	0	1	
J D	M	6, 1	34	25	10	3	1	1	
D R	F	3, 4	14	42	320	2	1	0	
J G	M	3, 3	12	8	40	1	0	0	
B R	M	3, 3	5	9	0	0	1	1	
K R	F	4, X	34	14	10	3	2	0	
J T	F	4, 6	7	10	N. D.	1	1	1	

N. D. : 測定せず

1 : I D D M 発病年齢を月で表示

2 : 血清採取と I D D M 発病との間隔を月で表示

3 : 1 - 弱い ; 2 - 中程度 ; 3 - 強いバンド強度

20

30

40

表 4 に示すように、12 標本中の 9 標本 (75 %) は^{3 5} S - G A D₆₅ と免疫反応性

50

であった。更に、2人の患者（J A及びV C）はこの条件下でG A D_{6 7}と免疫反応性であったが、G A D_{6 5}とは免疫反応性でなかった。従って、組み合わせると、これらの患者の血清の12例中、11例（91%）にG A D_{6 5}及びG A D_{6 7}に対する自己抗体が存在した。このことは、G A D_{6 5}に対する自己抗体はG A D_{6 7}に対する自己抗体よりも一般的であるが、アッセイにおいて両方の組換えG A D（G A D_{6 5}及びG A D_{6 7}）を用いると、I D D Mをより広く予測できるようになることを示唆している。これらの血清についての以前の試験（Atkinson et al., Langet, 335:1357-1360, 1990）は、12例のうちの11例、又は92%がヒト膵臓小島細胞からの35S - 64kD分子と免疫反応性であることを示している。64kD分子に対する検出可能な自己抗体を含むが、G A D_{6 5}に対する自己抗体は含んでいない血清は、64kD分子にとって最低の力価（又は“1”）を含む血清であった。従って、ここで得られた誤りのネガティブはこのアッセイの感度が低いために起きたことである。更に、このアッセイは、64Kに対してネガティブな1人の患者（B R）においてI D D Mを予測している。

10

20

30

40

【0085】

これらの結果は、ヒト膵臓のβ - 細胞中に同定された64kD分子は、ラットG A D_{6 5}とサイズ及び抗原性が同一であることを示している。更に、I D D M発病前の患者から採取した血清は、G A D_{6 5}に対する自己抗体を含んでいる。結論として、G A D_{6 5}組換え分子は、I D D M予測の診断手段として非常に有用である。実際に症状がでる前に医師がI D D Mを診断できるということは、疑いもなくインシュリン治療が必要となるまでの時間がおおいに伸びる結果となる。このような免疫アッセイの感度は、膵臓のβ - 細胞に存在するG A D形を表すヒト由来の組換えG A D_{6 5}を用いて改良されるであろう。

【0086】

ここに本発明を十分に開示したので、本発明の範囲を逸脱することなく、多くの変更並びに修飾が可能なが当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】G A D_{6 5}及びG A D_{6 7}特異的c D N Aプローブを得るためのクローニング手順を示す。

【図2】ラットG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示す（その1）。図2 - 図4が連続してラットG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示すものである。

【図3】ラットG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示す（その2）。

【図4】ラットG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示す（その3）。

【図5】ヒトG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示す（その1）。図5 - 図8が連続してヒトG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示すものである。

【図6】ヒトG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示す（その2）。

【図7】ヒトG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示す（その3）。

【図8】ヒトG A D_{6 5}のD N A配列及び対応するアミノ酸配列を示す（その4）。

【図9】ラットG A D_{6 5}とヒトG A D_{6 5}のアミノ酸配列の比較を示す（その1）。

【図10】ラットG A D_{6 5}とヒトG A D_{6 5}のアミノ酸配列の比較を示す（その2）。

【図11】G A D_{6 5}及びG A D_{6 7}c D N Aの異なるサイズのR N Aへのハイブリダイズを示す。

【図12】G A D_{6 5}及びG A D_{6 7}に特異的なc D N Aプローブでハイブリダイスしたサザンブロットを示す。

【図13】G A D_{6 5}及びG A D_{6 7}の免疫学的同定を示す。

【 図 1 】

ネコ (cDNA 由来) YETAPVFLMEQITLAKKREIVGSSKDGIFSPGGAISNNYSIMAAKYKFFPEVKVKG

ラット (ペプチド由来) YETAPVFLVLEFYV-----RIEIGPGGS-DGIFSPGGAISN-YAMLIARYKMFPEVKVKG

【 図 2 】

GGCGCTGGGGTTCGACCGAAGCAGCTTGGCCGACGCACTCGGAGCGGACCGACCGCGCA
10 M A S P G S F W S F G S E D G
GACTAGACGACCGTCACTTCGGGGCTGGCTTTCGCTTCGCACTTGAAGAT
70 S G D P E N P T A R A W C Q V A O K F
GCTCTGGGGCTTCGACACCGGAACGAGCAGCTGGTTCGACGTTGGCCCAAGT
130 TCGCGGIGIANKKLTATGGCTCTCTTCAGGAGACTCTCEKPA
170 TCGCGGIGIANKKLTATGGCTCTCTTCAGGAGACTCTCEKPA
190 E S G G S V T S R A A T R K V A C T C D
230 CHAGACGCGGAGCTGACTCGGCGGCGCCTCGGAGTGGCTGCACCTGTG
Q K P C S C P K G 270 V N Y A L 290 H A T D
ACCAAAACCTCGACGCTCCCAAGGAGATCAATGTCATTCGACGCAACAG
310 LCTGACACGEPPTTLAFLQLQADGVMTA
350 ACTCTGCGCACTGGAAGAGAACGCCACTCGCATTCQLQAGAGATTAATGA
370 I L L Q Y V V K S F D R S T K V I D F H
410 ACATTTTCCTAGTCTGGTGAAGTTTGTATGATCAACTAAATGATGATTTTC
450 Y P F E L Q E V H E L A D Q P Q N L A T
ATTACCCCATGACCTTCCTCAAGATCTTATTGGGATTCGACCAACCGCAATC
490 TGGALTLHGCQTTLTKYAIKTKTGHP
530 EGAATAATTGCGCACTGCCAACACTCTAAATATGGATTCAACAGCGCATC
570 R Y F N Q L S T G L D M V G L A A D W L
590 CCGGATTTAATCAGCTGTCTACCGGATTCGATATGTTGGATTACGACGATGGT
610 T S A N T N M F T Y E I A P V F V L L
650 TGACATCAACGCAACGCAATCTTACATGATGAGCCCTCTTTTCTACTAC

【 図 3 】

670 E V V T L K K M P P E I I C W P G G S G D 710
 TGGAAATGTGACCTAAGCAAAATGAGCAAAATCATGTGCTGCCAGAGAGCTGTGGC
 G I F S P G G A I S 750 N M V A I 760 I A R V
 ATGGAATCTTTTCTGTGTGGCATCTTCCCAACTGTAGCGCATGTCTATGTGCCCCCT
 790 P 800 810 820 830
 K M F P E V K E K M A A V P L R I A F
 ATAAAGATGTTTCCAGAGAGTCAGGAAGAAGGATGGCGCGTGGCCAGGCTCATCGAT
 850 860 870 880 890
 T S E H S H C F L T L K K A A G G A G C T G A G C C T G G G A T C G G A
 TCACCTCAGACATGATGCTATTTCTTCCAKAGAGGAGCTCGAGCGCTGGGATCGGAA
 910 920 930 940 950
 D S V I L I K C D E R G K M I P S D L E
 CAGACACCGTGATCTGATTAATGATGTAGAGAGGGAATAATGCATCCATCGACCTTG
 970 980 990
 R R I L E V K Q K G F V F L V S A T A
 AAAGAAGATCTTGAAGTCAAKAGAGAGATTTTCTTCTGTGTGAGTGCACAG
 R R I L E V K Q K G F V F L V S A T A
 AAAGAAGATCTTGAAGTCAAKAGAGAGATTTTCTTCTGTGTGAGTGCACAG
 1030 1040 1050 1060 1070
 G T T V V G A F D P L L A V A D L C K K
 CTGGAACCATCTGTACGGGGCTTTGATCTCTCTCTGTGTAGCTGACATCTGCAGAA
 1090 1100 1110
 Y K I I M W H D A A W G G G L L M S R K R
 AATATAGATCTGGATGCATGTGAGCTGTCTGGGTGGAGGTACTGATCTGTCCGA
 1150 1160 1170 1180 1190
 H K W K L N G V E R A N S V T W N P H K
 AACCAAGTGGAACTCGACCGTCTGGAGAGGGCAACTCTGTGACATGGAAATCCCCACA
 1210 1220 1230 1240
 M M G V P L Q C S A L L V R A E E G L M T G
 AGATGATGGGGTCCCTTGCAGATTTGGGCTCTCTGGTCCAGAGAGAGGACGTGATG

【 図 4 】

1270	1290	1310
S C N Q M G H A S Y L F C Q Q D K H Y D L S		
1330	1350	1370
GAGCTGCAACGAGTCTTACTCTTCACGAGAATGACCTGT		
1390	1410	1430
TCTATGACGCGGACAGAAGCGCTTGACGTGGACGCCAGCTCATCTTTAAATAT		
1450	1470	1490
LMGTGWRGACAGCGGACTGTGGFATCAHITDKKCTGTGG		
1510	1530	1550
AGTGTGGACGCTCAGACAAATGTCCTCTGTTGATCTTGTTCCTAGTTCCGAGTTC		
1570	1590	1610
E D N E E R M S R L S K V A P V I K A R		
1630	1650	1670
GGAGCAATGAAGAGAGATGACGCCCTCTCAAGGTGGCGCATGATTAAGCCA		
1690	1710	1730
H N Y V G G T M V S Y C P L G D K N V A C T		
1750	1770	1790
TAATGATGATGAGACACATGCTGCTGCTCAACCTTAGAGATGAGTCAAT		
1810	1830	1850
F F M V I S N P A T H Q D I F L I E		
1870	1890	1910
CTTCGGATGGTCACTCAAGCTCGACACTCACAAGACATCATGCTTCATGT		
1930	1950	1970
E Y E R L G Q D L *		
1990	2010	2030
LAGAATGCAAGCTCGGACAGATTTGTAATCACTTTGCTCACAAGCTTCATGTTCT		
2050	2070	2090
TATAGTAGACAGCTAAGTTGTCACAACCTGTGTAAATGTTATTGTGATTTGTTCCAGAGT		
2110	2130	2150
LATTCTATTCTATCGTGGTGTGTCACAGTAGAGTCCAGTTTAAAA		
2170	2190	2210

【 5 】

agctgcgcgcagctgcgaactgcgagcgacactgctccagctctccaaagccgagtgccac M A S
 10 P G S G F W S F G S E D G S G D S E N P
 20 tccgggctcctgctgttctgctcttcggggggaagatggcctcgggagatcccgagatcc
 30 G T A R A W C Q V A Q K F T G G L G N K
 40 cggcacagcgagcgctgggtcccaagtggctcagaagtccacggcgagcgagaaaca
 50 L C A L Y G D A E K P A E S G S Q P
 60 actgtgcgcctgctctacgagcgacgcgaggaagcgcgagagcggggagccaacc
 70 P R A A A R K A A C A C A C D Q K P C S C S
 80 ccgcggcgccgcgcgcggaagcgctgcctgcgacccaagcctgcgagctgctc
 90 K V D V N Y A F L H A T D L L P A C D G
 100 caaagtgcgtcaactacgctgttctccatgcaacagacactgctgcgggtgtgatgg
 110 E R P T L A F L Q D V M N I L L Q Y V V
 120 agaaaggcccaacttgggtttctgcaagatgttatgaaatttctccagtatgtgtt
 130 K S F D R S T K V I D F H Y P N E L Q
 140 gaaaagtctgacagatcaacaaagtgattgattccattccatgagtgagctccca
 150 E Y N W E L A D Q P Q N L E E I M H C
 160 agaatcaatcgggaattggcagaccacacaaatttggaggaaatttggagctcg
 170 Q T L K Y A I K T G H P R Y F N Q L S
 180 ccaaacactcaaatatgcaattaaacagggtacctcagatactcaatcaacttc
 190 T G L D M V G L A A D W L T S T A N T N
 200 tactgtgtgatatgtgttgattagcagcagactggtgacatcaacagcaaatactaa

【 6 】

M F T Y E I A P V F V L L E Y V T L K K
 610 catgttccactatgaaattgctccagttattgtgcttcttggaatatgtccactadgaa
 620 M R E I I G W P G S G D G I F S P G G
 630 aatgagagaatctattgttggcgagggtcttggcgatgggatatatttcccggtgg
 640 I S N M Y A M I A R F K M F P E V K
 650 cgcatactcaactgtatgccatgacgcagctttaaagatgttcccgagagtcac
 660 E K M A A L P R I A F T S E H S H F
 670 ggagaaagaaatggctgtcttccagctcattgcttcacgtctcgtctgacatgctatt
 680 S L K G A A A L G I G T D S V I L I K
 690 ttctccagaggggagctgcagcttaggtatgggaacagacagcggtgattccgattaa
 700 C D E R G K M I P S D L E R R I L E A K
 710 atgtgagagagggaaaatgattccatctgattcttgaagaagattcttgaagccaa
 720 Q K G F V P F L V S A T A G T I V Y G A
 730 acagaaagggtgttcttctctcgtgagtcacagtggaaccccggtgacggagc
 740 F D P L A V A D I C K K Y K I W M H V
 750 attgaccctcttagctgcgtgacatttgcacaaagatataagattcttgatgattg
 760 D A A W G G L L M S R K H K W K L S G
 770 ggaagcgtctgggtgggattatgattcccaacacaaagtggaacactgagtg
 780 V E R A N S V T W N P H K M G V P L Q
 790 cgtggagaggcccaactgtgacgtggaatccacacagagatggaggtccctttgca

【 7 】

C S A L L V R E E G L M Q N C N Q M H A
 1210 gtgctcgtctctctgttagagaagagggtatgatgcagaattgcaacaaatgcagtc
 1220 S Y L F Q Q D K H Y D L S Y D T G D K A
 1230 ctctactctttcagcaagataaacattatgacctgtcctatgacactggagacaaggc
 1240 L Q C G R H V D V F K L W L M W R A K G
 1250 ctacagtgcggagccacgctgtgttttaaaactatggctgatgtggaggggcaagg
 1260 T T G F E A H V D K C L E L A E Y L Y N
 1270 gactaccgggttgaagcgcatgttgataaaattgttgagttgagaggtattatacaa
 1280 I I K N R E G Y E M V F D G K P Q H T N
 1290 catcataaaaccgagaaggtatgatgtgtgttgagggaagcctcagcacacaaa

【 8 】

V C F W Y I P P S L R T L E D N E E R M
 1510 tgcctgctctgttacattctccagctgtggtactctggaacaaatgaagagaaat
 1520 S R L S K V A P V I K A R M M E Y G T T
 1530 ggtcgtcctcgaggtgctcagtgatataagccagaaatgatggatgtgaaccac
 1540 M V S Y Q P L G D K V N F R M V I S N
 1550 aatggcagctaccacccctggagacaaagtgcaattctccgcagtggtcatctcaa
 1560 P A T H Q D I D F L I E E I E R L G Q
 1570 ccagcggcaactcaccacacattgactctctgattgaagaatagaacgcttgaca
 1580 D L *
 1590 agattataaactgtccacaaagctgttccactctctagtgagacaataaagtgtg
 1600 tcacaaactgtggaatgtattgtgattgttccaaagtaaatctattcttatattg
 1610 ggtcgaagtagaggttaaaataaacacaaagacattgctctcttttaaaagtccttt
 1620 cttaagtttagaataacctctcgaagattcgtgacaaagcgtatgttctaataaag
 1630 gaaaagcttaaatgttatataactctccttacttcttcttaatatagttgtgcaagcaac
 1640 2050

【図 9】

ギャップウェイト: 3.000 平均 マッチ: 0.540
 レングスウェイト: 0.100 平均 ミスマッチ: -0.396
 クオリティ: 856.2 レングス: 585
 比率: 1.464 ギャップ: 0
 相似性パーセント: 97.436 同一性パーセント: 96.068
 4017, PEP HGT2.PEP 1992年8月22日8時20分

```

1 MASPGSGFVSFGSDGSGDPENPGTARAWCQVACKFTGGTGNKLCALLYG 50
1 MASPGSGFVSFGSDGSGDPENPGTARAWCQVACKFTGGTGNKLCALLYG 50
51 DSEKPAESGSGSVTSRAATKRVACTCDQKPCSCPKGDVNYALLHATDILPA 100
51 DAEKPAESGSGSDPPRAAARAAACACDQKPCSCSKVDVNYAFHATDILPA 100
101 CEGERTPLAFLDVMMNILLQYVVKSFDRSTKYIDFHYPNELLDEYMWELA 150
101 CEGERTPLAFLDVMMNILLQYVVKSFDRSTKYIDFHYPNELLDEYMWELA 150
151 DQPNLEELTHCQTLTKYAIKTGHPRYFNOLSTGLDMVGLAADWLSTA 200
151 DQPNLEELTHCQTLTKYAIKTGHPRYFNOLSTGLDMVGLAADWLSTA 200
201 NTNMTYEIAPVFLLEYVTLKKHREIIGWPGSGDGIISPGGATSNMYA 250
201 NTNMTYEIAPVFLLEYVTLKKHREIIGWPGSGDGIISPGGATSNMYA 250
251 MLTARYKMFPEVKEGMAAPRLIAFTSEHSFSLKKGAAALGIGTDSVI 300
251 MMTARFMFPEVKEGMAAPRLIAFTSEHSFSLKKGAAALGIGTDSVI 300
301 LIKCDERGMIPSDLERRILEVKKQGFVPLVSATAGTIVYGAFDPLAV 350
301 LIKCDERGMIPSDLERRILEVKKQGFVPLVSATAGTIVYGAFDPLAV 350
351 ADICKYKIVMHVDAWGGGLLSRKHKWKLVNGVERANSVTNPHKMGW 400
351 ADICKYKIVMHVDAWGGGLLSRKHKWKLVNGVERANSVTNPHKMGW 400

```

1 2

-5.7

3.7-

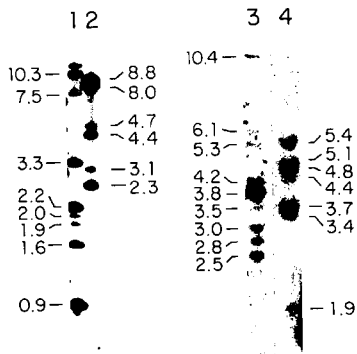
【図 10】

```

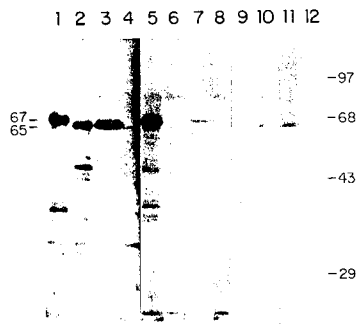
401 PLQCSALLVREEGLMNSCNOMHASYLFOODKHYDLSDYTGKALQCGRHV 450
401 PLQCSALLVREEGLMNSCNOMHASYLFOODKHYDLSDYTGKALQCGRHV 450
451 DVFKLVLMWRAGTGTGEAHIDKCLELAELYNIKNREGYEMVFDGKPO 500
451 DVFKLVLMWRAGTGTGEAHIDKCLELAELYNIKNREGYEMVFDGKPO 500
501 HTNVCVFVPPSLRVLEDNIEERMSRLSKVAPVIKARMMEYGTTHVSYQPL 550
501 HTNVCVFVPPSLRVLEDNIEERMSRLSKVAPVIKARMMEYGTTHVSYQPL 550
551 GDKVNFVRVINSNPAATHGDIIFLIEEIERLGQDL 585
551 GDKVNFVRVINSNPAATHGDIIFLIEEIERLGQDL 585

```

【図 12】



【図 13】



【手続補正書】

【提出日】平成19年4月9日(2007.4.9)

【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】

治療的に有効量の G A D ポリペプチドを含み、ここで該 G A D ポリペプチドはリセプターと結合するものである、自己免疫応答を改善するための医薬組成物。

【請求項 2】

G A D が G A D_{6 5} である、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】

G A D が G A D_{6 7} である、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 4】

G A D が G A D_{6 5} と G A D_{6 7} との混合物である、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 5】

G A D がヒト G A D である、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

リセプターが、抗体及び T - ヘルパー細胞からなる群から選択される、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

自己免疫疾患が、I D D M 及びスティッフマン病からなる群から選択される、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 8】

非経口的に投与される、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 9】

非経口的投与を、皮下、筋肉内、腹腔内、空洞内、経皮、又は静脈内注射によって行う、請求項 8 記載の医薬組成物。

【請求項 10】

投与を、約 0 . 0 1 m g / k g / 回から約 2 0 0 0 m g / k g / 回までの投与量で行う、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 11】

組換え G A D_{6 5} ポリペプチドを治療的に標識する、請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 12】

治療的標識が、放射性同位体、医薬、レクチン、及び毒素からなる群から選択される、請求項 1 1 記載の医薬組成物。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B

(72)発明者 アラン ジェイ トビン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州、 9 0 0 3 6、ロサンジェルス、サウス ハッセリン アベニ
ュー 8 5 0

(72)発明者 マーク ジー アーランダー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州、 9 1 3 5 6、タルザナ、エーピーティー . 2 0 4 番 レセダ
ボールブワード 5 8 3 0

(72)発明者 ダニエル エル カーフマン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州、 9 0 4 0 4、サンタモニカ、エーピーティー . C センティ
ネラ 1 4 5 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA07 BA21 CA04 DA06 EA04 GA11 HA03
4B050 CC01 CC03 DD11 LL01
4C084 AA02 AA06 AA07 DC50
4C085 HH03 HH20 KB82

专利名称(译)	克隆的谷氨酸脱羧酶		
公开(公告)号	JP2007236390A	公开(公告)日	2007-09-20
申请号	JP2007079164	申请日	2007-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	该Rejentsu大学加州		
[标]发明人	アランジェイトビン マークジーアーランダー ダニエルエルカーフマン		
发明人	アラン ジェイ トビン マーク ジー アーランダー ダニエル エル カーフマン		
IPC分类号	C12N9/88 C12N15/09 A61K38/00 A61K51/00 A61K49/00 A61P3/10 G01N33/53 G01N33/543 A61K38/51 A61P21/02 A61P37/02 C12N1/21 C12N11/00 C12N15/60 C12Q1/527 C12Q1/68 C12R1/01 G01N33/564 G01N33/573		
CPC分类号	A61K38/00 A61P21/02 C12N9/88 C12Y401/01015 G01N33/564 G01N2800/042		
FI分类号	C12N9/88.ZNA C12N15/00.A A61K37/02 A61K49/02.A A61K49/00.A A61P3/10 G01N33/53.N G01N33/543.541.B A61K38/00 A61K49/00 A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/08.200		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA07 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/DC50 4C085/HH03 4C085/HH20 4C085/KB82		
代理人(译)	贱男村		
优先权	07/586536 1990-09-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供重组谷氨酸脱羧酶 65 (GAD 65) 多肽，以及用于诊断和治疗上使用GAD >多肽在自身免疫性疾病。解决方案：重组GAD SB 65多肽选自以下 (a) 至 (c) ： (a) 具有由图2,3或4表示的氨基酸序列的蛋白质； (b) 具有由图5-8表示的氨基酸序列的蛋白质 (图中未示出) ；和 (c) 具有通过从图2-4或图5-5的 (a) 或 (b) 的氨基酸序列中删除，取代或添加一个或几个氨基酸而获得的氨基酸序列的蛋白质， 8，并具有谷氨酸脱羧酶活性。 Z

表3 IDDH型からの変異体GAD65					GAD活性 (cpm/s)	
変異	IDDH	IDDHの型	64K ¹	IDDH ²	13.762	1.719
DA	*	>24	3	164	13.762	1.719
DC	*	>1	3	20	13.762	1.719
RS	+	5	3	40	588	588
NL	+	0	2	80	440	440
DM	*	>1	2	10	184	184
C	-	na	0	0	280	280
C	-	na	0	0	285	285
C	-	na	0	0	325	325
C	-	na	0	0	275	275
C	-	na	0	0	270	270

注：1. 1ヶ月で表示
2. 実験は50℃で実施した64K力値
3. Juvenile Diabetes Foundation (JDF) エントリーで表した小腸細胞系培養
4. バックグラウンドに属せず
5. 糖鎖の位置あり (グルコースは表す)
na: 検出できず