

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-538555

(P2013-538555A)

(43) 公表日 平成25年10月17日(2013. 10. 17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 N 9/88 (2006.01)</b>	C 1 2 N 9/88	4 B 0 5 0
<b>C O 7 K 14/74 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/74	4 B 0 6 3
<b>C O 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00	4 C O 7 6
<b>C O 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-519216 (P2013-519216)	(71) 出願人	504127647
(86) (22) 出願日	平成23年7月14日 (2011. 7. 14)		テクニオン リサーチ アンド ディベロ ップメント ファウンデーション リミテ ッド
(85) 翻訳文提出日	平成25年3月14日 (2013. 3. 14)		イスラエル国、ハイファ 3 2 0 0 0 0 4
(86) 国際出願番号	PCT/IL2011/000564		、テクニオン シティ、 セネート ハウ ス
(87) 国際公開番号	W02012/007951	(74) 代理人	100103816
(87) 国際公開日	平成24年1月19日 (2012. 1. 19)		弁理士 風早 信昭
(31) 優先権主張番号	61/364, 443	(74) 代理人	100120927
(32) 優先日	平成22年7月15日 (2010. 7. 15)		弁理士 浅野 典子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	レイテル, ヨラム
			イスラエル, 3 4 9 8 7 ハイファ, エステル ラビン ストリート 2 3
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 MHCクラスIIとグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 自己抗原性ペプチドとの天然型複合体に対するT細胞受容体様特異性を有する単離された高親和性実体

## (57) 【要約】

主要組織適合性複合体 (MHC) クラスIIと、I型糖尿病関連GAD自己抗原性ペプチドとを含む、単離された複合体であって、前記MHCクラスIIと、前記I型糖尿病関連GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む、高親和性実体の単離を可能にする構造的立体配座を有する、単離された複合体が提供される。また、主要組織適合性複合体 (MHC) クラスIIと、I型糖尿病関連GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む、単離された高親和性実体であって、前記糖尿病関連GAD自己抗原性ペプチドの非存在下での前記MHCクラスIIには結合せず、かつ、前記MHCクラスIIの非存在下での前記糖尿病関連GAD自己抗原性ペプチドには結合しない、単離された高親和性実体、並びにこれらを診断および治療目的のために使用する方法およびキットが提供される。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅡと、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）自己抗原性ペプチドとを含む、単離された複合体であって、前記GAD自己抗原性ペプチドが、配列番号14によって示されるコアミノ酸配列（GAD556～565、FFRMVISNPA）を含み、かつ、前記GAD自己抗原性ペプチドが前記MHCクラスⅡのベータ鎖に共有結合により結合させられる、単離された複合体。

**【請求項 2】**

前記GAD自己抗原性ペプチドはそのC末端において前記MHCクラスⅡのベータ鎖の細胞外ドメインのN末端に共有結合により結合される、請求項1に記載の単離された複合体。

10

**【請求項 3】**

前記GAD自己抗原性ペプチドは前記MHCクラスⅡのベータ鎖の細胞外ドメインのアミノ酸1～6の間に共有結合により埋め込まれる、請求項1に記載の単離された複合体。

**【請求項 4】**

前記GAD自己抗原性ペプチドは前記MHCクラスⅡのベータ鎖の成熟型ポリペプチドの3番目のアミノ酸と4番目のアミノ酸との間において前記ベータ鎖に共有結合により結合される、請求項1に記載の単離された複合体。

**【請求項 5】**

20

主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅡと、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）自己抗原性ペプチドとから構成される複合体と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む、単離された抗体であって、前記GAD自己抗原性ペプチドの非存在下での前記MHCクラスⅡには結合せず、かつ、前記MHCクラスⅡの非存在下での前記GAD自己抗原性ペプチドには結合しない、単離された抗体。

**【請求項 6】**

主要組織適合性複合体（MHC）クラスⅡと、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）自己抗原性ペプチドとから構成される複合体と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む、単離された高親和性実体であって、単離された抗体は前記GAD自己抗原性ペプチドの非存在下での前記MHCクラスⅡには結合せず、かつ、単離された高親和性実体は前記MHCクラスⅡの非存在下での前記GAD自己抗原性ペプチドには結合しない、単離された高親和性実体。

30

**【請求項 7】**

前記抗原結合ドメインは、前記MHCクラスⅡと、前記GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる、請求項5に記載の単離された抗体又は請求項6に記載の高親和性実体。

**【請求項 8】**

請求項1，2，3又は4に記載の複合体によって単離可能である、抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体。

**【請求項 9】**

40

請求項1，2，3又は4に記載の単離された複合体に特異的に結合することができる、抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体。

**【請求項 10】**

前記抗原結合ドメインは、前記MHCクラスⅡと、前記GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる、請求項5に記載の単離された抗体又は請求項6，8もしくは9に記載の単離された高親和性実体。

**【請求項 11】**

前記抗原結合ドメインはさらに、請求項1，2，3又は4に記載の単離された複合体に特異的に結合することができる、請求項10に記載の単離された抗体又は高親和性実体。

**【請求項 12】**

50

配列番号 43 ~ 配列番号 48 および配列番号 37 ~ 配列番号 42 によって示される相補性決定領域 (CDR) (G3H8 の重鎖および軽鎖の CDR1 ~ CDR3)、または、配列番号 55 ~ 配列番号 60 および配列番号 49 ~ 配列番号 54 によって示される相補性決定領域 (CDR) (G1H12 の重鎖および軽鎖の CDR1 ~ CDR3) を含む、単離された抗体。

【請求項 13】

配列番号 43 ~ 配列番号 48 および配列番号 37 ~ 配列番号 42 によって示される相補性決定領域 (CDR) (G3H8 の重鎖および軽鎖の CDR1 ~ CDR3)、または、配列番号 55 ~ 配列番号 60 および配列番号 49 ~ 配列番号 54 によって示される相補性決定領域 (CDR) (G1H12 の重鎖および軽鎖の CDR1 ~ CDR3) を含む、単離された高親和性実体。

10

【請求項 14】

主要組織適合性複合体 (MHC) クラス II と、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 自己抗原性ペプチドとから構成される複合体に特異的に結合する高親和性実体を単離する方法であって、

(a) 複数の高親和性実体を含むライブラリーを、請求項 1, 2, 3 又は 4 に記載の単離された複合体によりスクリーニングすること、および

(b) 請求項 1, 2, 3 又は 4 に記載の単離された複合体に特異的に結合し、かつ、前記 GAD 自己抗原性ペプチドの非存在下での前記 MHC クラス II、または、前記 MHC クラス II の非存在下での前記 GAD 自己抗原性ペプチドには結合しない少なくとも 1 つの高親和性実体を単離し、

20

それにより、前記 MHC クラス II と前記 GAD 自己抗原性ペプチドとの前記複合体に特異的に結合する前記高親和性実体を単離することを含む方法。

【請求項 15】

抗体はさらに、MHC クラス II と GAD 自己抗原性ペプチドとの複合体の天然型立体配座に特異的に結合する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 GAD 自己抗原性ペプチドはその C 末端にリンカーペプチドが配置される、請求項 1, 2, 3 又は 4 に記載の単離された複合体。

30

【請求項 17】

GAD 自己抗原性ペプチドは前記 MHC クラス II のベータ鎖の細胞外ドメインに翻訳融合される、請求項 1, 2, 3 又は 4 に記載の単離された複合体。

【請求項 18】

前記 MHC クラス II の前記ベータ鎖は、真核生物細胞における発現のとき、前記 MHC クラス II のアルファ鎖に含まれる結合対の第 2 のメンバーに結合する前記結合対の第 1 のメンバーを含み、ただし、前記ベータ鎖および前記アルファ鎖により、前記 MHC クラス II が形成される、請求項 2, 3, 4, 16 又は 17 に記載の単離された複合体。

【請求項 19】

前記 MHC クラス II と、前記 GAD 自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる、抗原結合ドメインを含む抗体の単離を可能にする構造的立体配座を有する、請求項 1, 2, 3, 4, 16 又は 17 に記載の単離された複合体。

40

【請求項 20】

前記天然型立体配座は、抗原提示細胞 (APC) 上に提示されるとき、前記 GAD 自己抗原性ペプチドと前記 MHC クラス II との前記複合体の構造的立体配座を含む、請求項 19 に記載の単離された複合体、請求項 7 もしくは 10 に記載の単離された抗体もしくは高親和性実体、又は請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

前記 GAD 自己抗原は最大でも 30 個のアミノ酸を含む、請求項 1, 2, 3, 4, 16

50

、 17又は18に記載の単離された複合体。

【請求項22】

前記GAD自己抗原は配列番号22によって示される(NFFRMVISNPAAAT、GAD<sub>555</sub>~<sub>567</sub>)、請求項1、2、3、4、16、17又は18に記載の単離された複合体。

【請求項23】

前記MHCクラスIIの前記ベータ鎖は、真核生物細胞における発現のとき、前記MHCクラスIIのアルファ鎖に含まれる結合対の第2のメンバーに結合する前記結合対の第1のメンバーを含み、ただし、前記ベータ鎖および前記アルファ鎖により、前記MHCクラスIIが形成される、請求項1、2、3、4及び18のいずれかに記載の単離された複合体。

10

【請求項24】

前記MHCクラスIIは、HLA-DM、HLA-DO、HLA-DP、HLA-DQおよびHLA-DRからなる群から選択される、請求項1~4及び16~23のいずれかに記載の単離された複合体。

【請求項25】

前記MHCクラスIIの前記ベータ鎖はDR-B1\*0401である、請求項1~4及び16~23のいずれかに記載の単離された複合体。

【請求項26】

前記MHCクラスIIの前記アルファ鎖はDR-A1\*0101である、請求項1~4及び16~23のいずれかに記載の単離された複合体。

20

【請求項27】

前記抗原結合ドメインは、配列番号43~配列番号48および配列番号37~配列番号42によって示される相補性決定領域(CDR)(G3H8の重鎖および軽鎖のCDR1~CDR3)、または、配列番号55~配列番号60および配列番号49~配列番号54によって示される相補性決定領域(CDR)(G1H12の重鎖および軽鎖のCDR1~CDR3)を含む、請求項5~7及び10~11のいずれかに記載の単離された抗体又は請求項7~9及び11のいずれかに記載の高親和性実体。

【請求項28】

請求項5~7及び10~12のいずれかに記載の単離された抗体、又は請求項7、9、11及び13のいずれかに記載の高親和性実体を含む分子であって、治療成分にコンジュゲートされる分子。

30

【請求項29】

請求項5~7及び10~12のいずれかに記載の単離された抗体、又は請求項7~9、11及び13のいずれかに記載の高親和性実体を含む分子であって、検出可能成分にコンジュゲートされる分子。

【請求項30】

請求項5~7及び10~12のいずれかに記載の抗体の多価形態または抗体フラグメントの多価形態を含む、単離された抗体。

【請求項31】

前記多価形態はIgG抗体である、請求項30に記載の単離された抗体。

40

【請求項32】

有効成分として、請求項5~7及び10~12のいずれかに記載の単離された抗体、請求項7、9、11及び13のいずれかに記載の高親和性実体、又は請求項28もしくは29に記載の分子を含み、かつ、医薬的に許容されるキャリアを含む医薬組成物。

【請求項33】

グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)自己抗原性ペプチドの細胞における提示を検出する方法であって、前記細胞を、免疫複合体の形成を許す条件のもと、請求項5~7及び10~12のいずれかに記載の抗体、請求項7~9、11及び13のいずれかに記載の高親和性実体、又は請求項28もしくは29に記載の分子と接触させることを含み、た

50

だし、前記免疫複合体の所定の閾値を超える存在またはレベルが前記 G A D 自己抗原性ペプチドの前記細胞における提示を示している方法。

【請求項 3 4】

1 型糖尿病 ( T 1 D ) を対象において診断する方法であって、前記対象の細胞を、免疫複合体の形成を許す条件のもと、請求項 5 ~ 7 及び 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の抗体、請求項 7 ~ 9 , 1 1 及び 1 3 のいずれかに記載の高親和性実体、又は請求項 2 8 もしくは 2 9 に記載の分子と接触させることを含み、ただし、前記免疫複合体の所定の閾値を超える前記細胞の内部または表面での存在またはレベルが前記対象における前記 1 型糖尿病を示している方法。

【請求項 3 5】

1 型糖尿病 ( T 1 D ) を処置する方法であって、その必要性のある対象に、治療効果的な量の請求項 5 ~ 7 及び 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の抗体、請求項 7 ~ 9 , 1 1 及び 1 3 のいずれかに記載の高親和性実体、又は請求項 2 8 もしくは 2 9 に記載の分子、又は請求項 3 2 に記載の医薬組成物を投与し、それにより、前記 1 型糖尿病を処置する方法。

【請求項 3 6】

前記抗体は、前記 M H C クラス I I と、前記 G A D 自己抗原性ペプチドとを含む複合体の抗原提示細胞における提示を阻止することができる、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記抗体は、前記 M H C クラス I I と、前記 G A D 自己抗原性ペプチドとを含む複合体を呈示する抗原提示細胞を殺傷することができる、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I I と、 G A D 自己抗原性ペプチドとを含む複合体の存在および / またはレベルを検出するためのキットであって、請求項 5 ~ 7 及び 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載の抗体、請求項 7 ~ 9 , 1 1 及び 1 3 のいずれかに記載の高親和性実体、又は請求項 2 8 もしくは 2 9 に記載の分子を含むキット。

【請求項 3 9】

1 型糖尿病を診断する際に使用される説明書をさらに含む、請求項 3 8 に記載のキット。

【請求項 4 0】

前記抗体は前記 G A D 自己抗原性ペプチドの非存在下での前記 M H C クラス I I には結合せず、かつ、前記抗体は前記 M H C クラス I I の非存在下での前記 G A D 自己抗原性ペプチドには結合しない、請求項 1 9 に記載の単離された複合体。

【請求項 4 1】

単離された複合体は、複合体に結合した異種の免疫グロブリンを含まない、請求項 1 ~ 4 , 1 6 ~ 2 3 及び 4 0 のいずれかに記載の単離された複合体。

【請求項 4 2】

M H C クラス I I のベータ鎖の細胞外ドメインをコードする第 1 の核酸配列と、グルタミン酸デカルボキシラーゼ ( G A D ) 自己抗原性ペプチドをコードする第 2 の核酸配列とを含む、単離されたポリヌクレオチドであって、前記第 2 の核酸配列が前記第 1 の核酸配列の上流に翻訳融合されるか、または、前記細胞外ドメインのアミノ酸 1 ~ 6 をコードする核酸配列の間に翻訳融合される、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4 3】

前記第 2 の核酸配列の下流に翻訳融合される、リンカーペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項 4 2 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4 4】

単離されたポリヌクレオチドはさらに、真核生物細胞における発現のとき、結合対の第 2 のメンバーに結合する前記結合対の第 1 のメンバーをコードする第 3 の核酸配列を含む、請求項 4 2 又は 4 3 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4 5】

( i ) 請求項 4 4 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む第 1 のポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

; および

( i i ) M H C クラス I I のアルファ鎖をコードする第 4 の核酸配列を含む第 2 のポリヌクレオチドを含む核酸システム。

【請求項 4 6】

前記第 2 のポリヌクレオチドはさらに、前記結合対の前記第 2 のメンバーをコードする第 5 の核酸構築物を含む、請求項 4 5 に記載の核酸システム。

【請求項 4 7】

高親和性実体は、抗体、抗体フラグメント、抗体を呈示するファージ、ペプチド体、抗体を呈示する細菌、抗体を呈示する酵母、および、抗体を呈示するリボソームからなる群から選択される、請求項 6 ~ 1 1 , 1 3 , 2 0 及び 2 7 のいずれかに記載の高親和性実体、請求項 1 4 及び 3 3 ~ 3 5 のいずれかに記載の方法、請求項 3 2 に記載の医薬組成物、請求項 2 8 もしくは 2 9 に記載の分子、又は請求項 3 8 に記載のキット。

【請求項 4 8】

高親和性実体は抗体または抗体フラグメントである、請求項 6 ~ 1 1 , 1 3 , 2 0 及び 2 7 のいずれかに記載の高親和性実体、請求項 1 4 及び 3 3 ~ 3 5 のいずれかに記載の方法、請求項 3 2 に記載の医薬組成物、請求項 2 8 もしくは 2 9 に記載の分子、又は請求項 3 8 に記載のキット。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 4 及び 1 6 ~ 2 3 のいずれかに記載の単離された複合体と、前記複合体にコンジュゲートされる機能的成分とを含む組成物。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載の組成物と、治療的に許容されるキャリアとを含む医薬組成物。

【請求項 5 1】

前記機能的成分が細胞表面マーカーに特異的な抗体またはフラグメントを含む、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、M H C クラス I I とグルタミン酸デカルボキシラーゼ ( G A D ) 自己抗原性ペプチドとの単離された複合体、この複合体に特異的に結合する単離された高親和性実体 (例えば、抗体など)、ならびに、限定ではないが、より具体的には、I 型糖尿病を診断および処置するためのそれらの使用に関連する。

【背景技術】

【0002】

様々な主要組織適合性複合体 ( M H C ) クラス I I 分子が専門の抗原提示細胞 ( A P C ) (例えば、マクロファージ、樹状細胞および B 細胞など)において発現される。それぞれの M H C クラス I I 分子が、2 つの相同的サブユニットから、すなわち、アルファ鎖 ( 1 ドメインおよび 2 ドメインを有する ) およびベータ鎖 ( 1 ドメインおよび 2 ドメインを有する ) から構成されるヘテロダイマーである。ペプチドが細胞外タンパク質に由来する場合、様々なペプチドがエンドサイトーシスを介して細胞内に入り、リソソームにおいて消化され、さらに、膜上での提示のために M H C クラス I I 分子に結合する。

【0003】

C D 4 + T 細胞の抗原特異的な活性化または調節は、T 細胞受容体 ( T C R ) が A P C の表面において M H C I I / ペプチドの複合体とともに共結合することが重要な役割を果たす多段階プロセスである。

【0004】

専門の A P C によって提示される結合した自己のペプチドを有する M H C クラス I I 分子が、自己免疫疾患 (例えば、1 型糖尿病 ( T 1 D ) など)に關与する特異的な C D 4 + T 細胞を活性化することにおいて重要な役割を果たしている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 5 】

T 1 D (これは若年性糖尿病としてもまた知られている)が、膵臓のベータ膵島細胞の自己免疫性破壊により、インスリンホルモンの産生が妨げられるときに生じる。このことは、グルコース代謝を調節することができないことを引き起こし、その結果、危険なほどに上昇した血中グルコース濃度が生じる。胸腺由来リンパ球(T細胞)が1型糖尿病の発症および進行に非常に大きく関与することが一般に受け入れられており、しかし、この破壊的プロセスを開始させ、また、促進させる抗原は依然として、特徴づけが不十分なままである。だが、いくつかの候補が検討されている(例えば、インスリン、インスリン誘導体、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連ペプチド(IGRP)、カルボキシペプチダーゼH、インスリノーマ関連抗原(IA-2)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD65)、カルボキシペプチダーゼEおよび熱ショックタンパク質60など)。

10

## 【 0 0 0 6 】

T 1 Dに対する感受性に影響する遺伝的要因には、染色体6p21上のMHCクラスII領域に位置し、かつ、膵臓のベータ細胞が不適切な抗原をT細胞に呈示する1型糖尿病に特徴的な組織適合性障害に関わっていることが考えられるインスリン依存性糖尿病1(IDDM1)遺伝子(GeneID 7924)が含まれる。連鎖分析により、96%の糖尿病患者が、非糖尿病コントロールと比較した場合、糖尿病患者におけるHLA-DR3/DR4ヘテロ接合性の過剰提示を含めて、HLA-DR3および/またはHLA-DR4を発現することが示される。これらの対立因子は、IDDMに対する感受性を与えるHLA-DQ対立因子に強く連鎖している。1型糖尿病に対する感受性に影響するかもしれない他の非遺伝的な要因には、食事が含まれる。これは、食事が、腸内細菌叢、腸管の透過性および腸における免疫機能に影響を与えるからである。

20

## 【 0 0 0 7 】

哺乳動物におけるグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)酵素は、GAD(65kDa)(GAD2; GeneID 2572)およびGAD(67kDa)(GAD1; GeneID 2571)の2つのイソ型で存在する。両方のイソ型が脳において発現するが、GAD(65kDa)はまた、膵臓において発現する。膵島自己抗原としてのGADの重要性が、この分子に対する患者血清中の自己抗体の頻度が高いために、最初に強調された。その後の研究により、データの大きな蓄積がもたらされた。これらのデータは、GAD(65kDa)に対する優勢なCD4+T細胞応答が、T1Dにおける細胞の自己免疫についての関連マーカーであるという考えを裏付けている(Nepom GT、2003、GADとの会話、J Autoimmun、20:195~8)。

30

## 【 0 0 0 8 】

HLA-DR4遺伝子のT1Dに対する大きい関係に基づいて、多くのエピトープ特定研究が行われ、DR4分子によって提示される限られた数のGADペプチドが明らかにされた(Nepom GT、他、2001)。DR4/GADペプチドに対するヒトのCD4+T細胞応答がT1D患者の間およびコントロールの間での両方で得られた(Masewicz, S. A. 他、2002; Bach, J. M. 他、1997; Ou, D. 他、1999; Roep, B. O. 他、1999; Lohmann, T. 他、1996; Harbaoui 他、1999)。このことは、自己反応性の潜在的可能性が多くの個体において存在することを示唆する。

40

## 【 0 0 0 9 】

HLA-DR4の状況におけるGAD<sub>555-567</sub>ペプチドは、1型糖尿病患者およびDR401遺伝子組換えマウスにおいて、効率的にプロセッシングされた免疫優性エピトープであることが示されている(Reijonen, H. 他、2002; Patel, S. D. 他、1997)。自己反応性CD4+T細胞のDR4/GAD<sub>555-567</sub>四量体検出がT1D被験者および危険性のある被験者の末梢血において認められたが、健康なコントロールにおいては認められなかった(Oling, V. 他、2005)。

50

## 【 0 0 1 0 】

追加の背景技術は、米国特許出願第20020114816号(ENL, JOSEF 他); 米国特許出願第20090155292号; 米国特許出願第20030166277号; およびKrogsgaard M. 他, 2000, Journal of Experimental Medicine, Pages 1395 - 1412を含む。

【発明の概要】

【0011】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、主要組織適合性複合体(MHC)クラスIIと、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)自己抗原性ペプチドとを含む、単離された複合体であって、前記GAD自己抗原性ペプチドが、配列番号14によって示されるコアミノ酸配列(GAD556~565、FFRMVISNPAA)を含み、かつ、前記GAD自己抗原性ペプチドが前記MHCクラスIIのベータ鎖に共有結合により結合させられる、単離された複合体が提供される。

10

【0012】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、主要組織適合性複合体(MHC)クラスIIと、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)自己抗原性ペプチドとから構成される複合体と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む、単離された抗体であって、前記GAD自己抗原性ペプチドの非存在下での前記MHCクラスIIには結合せず、かつ、前記MHCクラスIIの非存在下での前記GAD自己抗原性ペプチドには結合しない、単離された抗体が提供される。

20

【0013】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、配列番号37~配列番号39および配列番号43~配列番号45によって示される相補性決定領域(CDR)(G3H8の重鎖および軽鎖のCDR1~CDR3)、または、配列番号49~配列番号51および配列番号55~配列番号57によって示される相補性決定領域(CDR)(G1H12の重鎖および軽鎖のCDR1~CDR3)を含む、単離された抗体が提供される。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、主要組織適合性複合体(MHC)クラスIIと、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)自己抗原性ペプチドとから構成される複合体と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む、単離された高親和性実体が提供され、ただし、この場合、単離された高親和性実体は前記GAD自己抗原性ペプチドの非存在下での前記MHCクラスIIには結合せず、かつ、単離された高親和性実体は前記MHCクラスIIの非存在下での前記GAD自己抗原性ペプチドには結合しない。

30

【0015】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態の複合体によって単離可能である、抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体が提供される。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態の複合体によって単離可能である、抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体が提供される。

40

【0017】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体に特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む、単離された高親和性実体が提供される。配列番号37~配列番号39および配列番号43~配列番号45によって示される相補性決定領域(CDR)(G3H8の重鎖および軽鎖のCDR1~CDR3)、または、配列番号49~配列番号51および配列番号55~配列番号57によって示される相補性決定領域(CDR)(G1H12の重鎖および軽鎖のCDR1~CDR3)を含む、単離された高親和性実体が提供される。

【0018】

50



本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、主要組織適合性複合体（MHC）クラスIIと、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）自己抗原性ペプチドとから構成される複合体に特異的に結合する高親和性実体を単離する方法であって、

（a）複数の高親和性実体を含むライブラリーを単離された複合体によりスクリーニングすること、および

（b）本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体に特異的に結合し、かつ、前記GAD自己抗原性ペプチドの非存在下での前記MHCクラスII、または、前記MHCクラスIIの非存在下での前記GAD自己抗原性ペプチドには結合しない少なくとも1つの高親和性実体を単離し、

それにより、前記MHCクラスIIと前記GAD自己抗原性ペプチドとの前記複合体に特異的に結合する前記高親和性実体を単離することを含む方法が提供される。

#### 【0019】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態のいずれかの単離された抗体、または、本発明のいくつかの実施形態のいずれかの高親和性実体を含む分子であって、検出可能成分にコンジュゲートされる分子が提供される。

#### 【0020】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明のいくつかの実施形態の抗体の多価形態または抗体フラグメントの多価形態を含む、単離された抗体が提供される。

#### 【0021】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態のいずれかの単離された抗体、または、本発明のいくつかの実施形態のいずれかの高親和性実体を含む分子であって、治療成分にコンジュゲートされる分子が提供される。

#### 【0022】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、有効成分として、本発明のいくつかの実施形態の単離された抗体、本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体、または、本発明のいくつかの実施形態の分子を含み、かつ、医薬的に許容されるキャリアを含む医薬組成物が提供される。

#### 【0023】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）自己抗原性ペプチドの細胞における提示を検出する方法であって、前記細胞を、免疫複合体の形成を許す条件のもと、本発明のいくつかの実施形態のいずれかの抗体、本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体、または、本発明のいくつかの実施形態の分子と接触させることを含み、ただし、前記免疫複合体の所定の閾値を超える存在またはレベルが前記GAD自己抗原性ペプチドの前記細胞における提示を示している方法が提供される。

#### 【0024】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、1型糖尿病（T1D）を対象において診断する方法であって、前記対象の細胞を、免疫複合体の形成を許す条件のもと、本発明のいくつかの実施形態の抗体、本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体、または、本発明のいくつかの実施形態の分子と接触させることを含み、ただし、前記免疫複合体の所定の閾値を超える前記細胞の内部または表面での存在またはレベルが前記対象における前記1型糖尿病を示している方法が提供される。

#### 【0025】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、1型糖尿病（T1D）を処置する方法であって、その必要性のある対象に、治療効果的な量の本発明のいくつかの実施形態の抗体、本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体、または、本発明のいくつかの実施形態の分子、あるいは、本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物を投与し、それにより、前記1型糖尿病を処置する方法が提供される。

#### 【0026】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、主要組織適合性複合体（MHC）クラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとを含む複合体の存在および/またはレベルを検出するためのキットであって、本発明のいくつかの実施形態の抗体、本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体、または、本発明のいくつかの実施形態の分子を含むキットが提供される。

【0027】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、MHCクラスIIのベータ鎖の細胞外ドメインをコードする第1の核酸配列と、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）自己抗原性ペプチドをコードする第2の核酸配列とを含む、単離されたポリヌクレオチドであって、前記第2の核酸配列が前記第1の核酸配列の上流に翻訳融合されるか、または、前記細胞外ドメインのアミノ酸1～6をコードする核酸配列の間に翻訳融合される、単離されたポリヌクレオチドが提供される。

10

【0028】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、  
(i) 本発明のいくつかの実施形態の単離されたポリヌクレオチドを含む第1のポリヌクレオチド；および  
(ii) MHCクラスIIのアルファ鎖をコードする第4の核酸配列を含む第2のポリヌクレオチド  
を含む核酸システムが提供される。

20

【0029】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体と、前記複合体にコンジュゲートされる機能的成分とを含む組成物が提供される。

【0030】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態の組成物と、治療的に許容されるキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【0031】

本発明のいくつかの実施形態によれば、GAD自己抗原性ペプチドはそのC末端においてMHCクラスIIのベータ鎖の細胞外ドメインのN末端に共有結合により結合する。

【0032】

本発明のいくつかの実施形態によれば、GAD自己抗原性ペプチドはMHCクラスIIのベータ鎖の細胞外ドメインのアミノ酸1～6の間に共有結合により埋め込まれる。

30

【0033】

本発明のいくつかの実施形態によれば、GAD自己抗原性ペプチドはMHCクラスIIのベータ鎖の成熟型ポリペプチドの3番目のアミノ酸と4番目のアミノ酸との間においてベータ鎖に共有結合により結合させられる。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原結合ドメインは、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる。

40

【0035】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原結合ドメインは、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる。

【0036】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原結合ドメインはさらに、本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体に特異的に結合することができる。

【0037】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗体はさらに、MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの複合体の天然型立体配座に特異的に結合する。

50

## 【 0 0 3 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドはそのC末端にリンカーペプチドが配置される。

## 【 0 0 3 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドは細胞外ドメインに翻訳融合される。

## 【 0 0 4 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M H C クラス I I のベータ鎖は、真核生物細胞における発現のとき、M H C クラス I I のアルファ鎖に含まれる結合対の第2のメンバーに結合する結合対の第1のメンバーを含み、ただし、ベータ鎖およびアルファ鎖により、M H C クラス I I が形成される。

10

## 【 0 0 4 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離された複合体は、M H C クラス I I と、G A D 自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む抗体の単離を可能にする構造的立体配座を有する。

## 【 0 0 4 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、天然型立体配座は、抗原提示細胞 ( A P C ) 上に提示されるとき、G A D 自己抗原性ペプチドとM H C クラス I I との複合体の構造的立体配座を含む。

## 【 0 0 4 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原は最大でも30個のアミノ酸を含む。

20

## 【 0 0 4 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原は配列番号22によって示される ( N F F R M V I S N P A A T 、 G A D <sub>555</sub> ~ <sub>567</sub> ) 。

## 【 0 0 4 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M H C クラス I I のベータ鎖は、真核生物細胞における発現のとき、M H C クラス I I のアルファ鎖に含まれる結合対の第2のメンバーに結合する結合対の第1のメンバーを含み、ただし、ベータ鎖およびアルファ鎖により、M H C クラス I I が形成される。

30

## 【 0 0 4 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M H C クラス I I は、H L A - D M 、 H L A - D O 、 H L A - D P 、 H L A - D Q および H L A - D R からなる群から選択される。

## 【 0 0 4 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M H C クラス I I のベータ鎖は D R - B 1 \* 0 4 0 1 である。

## 【 0 0 4 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M H C クラス I I のアルファ鎖は D R - A 1 \* 0 1 0 1 である。

## 【 0 0 4 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原結合ドメインは、配列番号37 ~ 配列番号39および配列番号43 ~ 配列番号45によって示される相補性決定領域 ( C D R ) ( G 3 H 8 の重鎖および軽鎖の C D R 1 ~ C D R 3 ) 、または、配列番号49 ~ 配列番号51および配列番号55 ~ 配列番号57によって示される相補性決定領域 ( C D R ) ( G 1 H 1 2 の重鎖および軽鎖の C D R 1 ~ C D R 3 ) を含む。

40

## 【 0 0 5 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、多価形態は I g G 抗体である。

## 【 0 0 5 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗体は、M H C クラス I I と、G A D 自己抗原性ペプチドとを含む複合体の抗原提示細胞における提示を阻止することができる。

50

## 【 0 0 5 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗体は、M H C クラス I I と、G A D 自己抗原性ペプチドとを含む複合体を呈示する抗原提示細胞を殺傷することができる。

## 【 0 0 5 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、キットはさらに、1型糖尿病を診断するために使用される説明書を含む。

## 【 0 0 5 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗体はG A D 自己抗原性ペプチドの非存在下でのM H C クラス I I には結合せず、かつ、抗体はM H C クラス I I の非存在下でのG A D 自己抗原性ペプチドには結合しない。

10

## 【 0 0 5 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離された複合体は、複合体に結合した異種の免疫グロブリンを含まない。

## 【 0 0 5 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドはさらに、第2の核酸配列の下流に翻訳融合される、リンカーペプチドをコードする核酸配列を含む。

## 【 0 0 5 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドはさらに、真核生物細胞における発現のとき、結合対の第2のメンバーに結合する結合対の第1のメンバーをコードする第3の核酸配列を含む。

20

## 【 0 0 5 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、第2のポリヌクレオチドはさらに、結合対の第2のメンバーをコードする第5の核酸構築物を含む。

## 【 0 0 5 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、高親和性実体は、抗体、抗体フラグメント、抗体を呈示するファージ、ペプチドボディ（*peptibody*）、抗体を呈示する細菌、抗体を呈示する酵母、および、抗体を呈示するリボソームからなる群から選択される。

## 【 0 0 6 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、高親和性実体は抗体または抗体フラグメントである。

30

## 【 0 0 6 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、機能的成分は、細胞表面マーカーに特異的な抗体またはフラグメントを含む。

## 【 0 0 6 2 】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的用語および／または科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および／または材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

40

## 【 0 0 6 3 】

本発明の実施形態の方法および／またはシステムを実行することは、選択されたタスクを、手動操作で、自動的にまたはそれらを組み合わせて実行または完了することを含んでいる。さらに、本発明の装置、方法および／またはシステムの実施形態の実際の機器や装置によって、いくつもの選択されたステップを、ハードウェア、ソフトウェア、またはファームウェア、あるいはオペレーティングシステムを用いるそれらの組合せによって実行できる。

## 【 0 0 6 4 】

例えば、本発明の実施形態による選択されたタスクを実行するためのハードウェアは、チップまたは回路として実施されることができる。ソフトウェアとして、本発明の実施形

50

態により選択されたタスクは、コンピュータが適切なオペレーティングシステムを使って実行する複数のソフトウェアの命令のようなソフトウェアとして実施されることができる。本発明の例示的な実施形態において、本明細書に記載される方法および/またはシステムの例示的な実施形態による1つ以上のタスクは、データプロセッサ、例えば複数の命令を実行する計算プラットフォームで実行される。任意選択的に、データプロセッサは、命令および/またはデータを格納するための揮発性メモリ、および/または、命令および/またはデータを格納するための不揮発性記憶装置（例えば、磁気ハードディスク、および/または取り外し可能な記録媒体）を含む。任意選択的に、ネットワーク接続もさらに提供される。ディスプレイおよび/またはユーザ入力装置（例えば、キーボードまたはマウス）も、任意選択的にさらに提供される。

10

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0065】

本明細書では本発明のいくつかの実施形態を単に例示し添付の図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の実施形態を例示考察することだけを目的としていることを強調するものである。この点について、図面について行う説明によって、本発明の実施形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。

#### 【0066】

【図1A - 1D】図1A - 1Dは、組換えDR4 / GAD<sub>555-567</sub>複合体の産生を示す。図1A - S2細胞における産生のためのDR - A構築物およびDR - B構築物の概略図。図1B ~ 図1C - 精製されたDR4 / GAD複合体のSDS - PAGE分析。DR4複合体が高度に精製され、SDSに安定なヘテロダイマーを形成する。サンプルの煮沸により、DR - A鎖およびDR - B鎖が解離する（図1B；「B」 - 煮沸、「NB」 - 非煮沸）。高いビオチン化レベルが、精製されたDR4 - GAD複合体を、SDS - PAGE分析の前に、増大する濃度のストレプトアビジンとインキュベーションすることによって確認された（図1C）。すべての検出可能なDR - A鎖がビオチン化され、したがって、ストレプトアビジンに結合した。図1D - DR4 / GAD複合体が、正しい天然型立体配座で折り畳まれる。希釈濃度の抗DR立体配座感受性mAb（L243）および抗DR mAbのTU39を用いる固定化DR4 / GAD - 555 ~ 567複合体のELISA結合アッセイ。

20

30

#### 【0067】

【図2A - 2C】図2A - 2Cは、DR4 / GAD<sub>555-567</sub>に向けられるG3H8およびG1H12のTCRL Fabの特徴づけを示す。図2A - 固定化されたDR4 / GAD<sub>555-567</sub>、コントロールの複合体DR4 / HA<sub>307-319</sub>、GAD<sub>555-567</sub>ペプチドおよびHA<sub>307-319</sub>ペプチドを用いる精製されたTCRL FabのELISA。抗DR mAbのL243を使用して、結合アッセイ時における結合した複合体の正しい立体配座および安定性を求めた。Fab抗体のG1A1、G1A2およびG3H8（クローンG3H8）ならびにG1H12（クローンG1H12）がDR4 / GAD<sub>555-567</sub>複合体に特異的に結合することには、それ以外のコントロールペプチド複合体への結合がないことと比較した場合には留意すること。図2B - GAD<sub>555-567</sub>ペプチドまたはコントロールペプチド（InsA<sub>1-15</sub>、CII<sub>261-273</sub>、Ha<sub>307-319</sub>）によりパルス処理されたPreiss APCに対するFab G3H8結合のフローサイトメトリー分析。図2C - 天然においてプロセシングされたペプチドGAD<sub>552-572</sub>に対するFab G3H8のフローサイトメトリー分析。

40

【図2D - 2E】図2D - 2Eは、DR4 / GAD<sub>555-567</sub>に向けられるG3H8およびG1H12のTCRL Fabの特徴づけを示す。図2D - 様々な抗体濃度（20 μg / ml、50 μg / mlおよび100 μg / ml）におけるFab G3H8抗体の結合強さ。図2E - 様々な負荷されたGAD<sub>555-567</sub>ペプチド濃度（0 μg / ml、50 μg / ml、75 μg / ml、150 μg / ml、300 μg / mlおよび400

50

$\mu\text{g}/\text{ml}$ )におけるF a b G 3 H 8の結合強さ。結合強さが抗体濃度(図2 D)およびペプチド濃度(図2 E)に対して用量依存的であることに留意すること。

#### 【0068】

【図3 A - 3 F】図3 A - 3 Fは、DR 4 / G A D T C R Lの認識エピトープのマッピングを示すフローサイトメトリー分析である。下記によりパルス処理されたP r e i s s A P Cに対するF a b G 3 H 8結合のフローサイトメトリー分析：野生型(W T) G A D<sub>555-567</sub>ペプチド(図3 A)、G A Dを変化させたペプチドリガンド(A P L)のM 5 5 9 Z(図3 B)、I 5 6 1 M(図3 C)、N 5 6 3 Q(図3 D)、I 5 6 1 M + N 5 6 3 Q(図3 E)、および、コントロールのH A 3 0 7 ~ 3 1 9ペプチド(図3 F)。

10

#### 【0069】

【図4 A】図4 Aは、G 3 H 8 F a bがG A D<sub>555-567</sub>ペプチドに対するDR 4拘束のG A D特異的T細胞応答を阻害し得ることを示すグラフである。T細胞ハイブリドーマを、増大するF a b濃度の存在下、ペプチドによりパルス処理されたDR 0 4 0 1 - T g脾細胞によってA g特異的に活性化した。図4 A - DR 4 / G A D<sub>555-567</sub>エピトープに対して特異的なG 2 . 1 . 3 8 . 1ハイブリドーマが、G 3 H 8 F a bによって用量依存的様式で阻害され、コントロールの1 F 1 1 T C R L F a bによって阻害されなかった。これらの結果から、G 3 H 8はG A D<sub>555-567</sub>特異的なDR 0 4 0 1拘束のT細胞ハイブリドーマ応答を阻害し得ることが明らかにされる。

20

【図4 B】図4 Bは、G 3 H 8 F a bがG A D<sub>555-567</sub>ペプチドに対するDR 4拘束のG A D特異的T細胞応答を阻害し得ることを示すグラフである。T細胞ハイブリドーマを、増大するF a b濃度の存在下、ペプチドによりパルス処理されたDR 0 4 0 1 - T g脾細胞によってA g特異的に活性化した。図4 B - DR 4 / H a 3 0 7 ~ 3 1 9エピトープに対して特異的なH 1 . 1 3 . 2ハイブリドーマは、G 3 H 8 T C R L F a bによって阻害されなかった。これらの結果から、G 3 H 8はG A D<sub>555-567</sub>特異的なDR 0 4 0 1拘束のT細胞ハイブリドーマ応答を阻害し得ることが明らかにされる。

#### 【0070】

【図5 A - 5 E】図5 A - 5 Eは、糖尿病マウスのランゲルハンス島におけるDR 4によるG A D<sub>555-567</sub>提示を明らかにする、G 3 H 8 F a b抗体を使用する免疫蛍光分析を示す写真である。糖尿病マウスB 7 / 0 4 0 1から得られる凍結切片(図5 A ~ 図5 C)およびC 5 7 B L / 6マウスから得られる凍結切片(図5 D ~ 図5 E)を、G 3 H 8抗体を使用する免疫染色分析に供し、その後、抗ヒトI g G - A l e x a - 4 8 8による染色(緑色)および4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール(D A P I)による染色(青色)を行った。切片を、C e l l O b s e r v e r - Z e i s s蛍光顕微鏡によって可視化した。B 7 / 0 4 0 1糖尿病マウスではランゲルハンス島において緑色に標識化されること(図5 A ~ 図5 C)、および、コントロールのC 5 7 B L / 6マウスでは標識化されないこと(図5 D ~ 図5 E)に留意すること。

30

#### 【0071】

【図6 A - 6 B】図6 A - 6 Bは、G 3 H 8 F a b抗体(抗H L A - DR 4 / G A D<sub>555-567</sub> F a b)の軽鎖(図6 A ~ 図6 B)のアミノ酸配列[図6 A(配列番号1)]および核酸配列[図6 B(配列番号2)]を示す。C D R(K a b a t定義による)には下線が付される(配列番号37 ~ 配列番号39、軽鎖についてのC D R 1 ~ C D R 3; 配列番号43 ~ 配列番号45、重鎖についてのC D R 1 ~ C D R 3; 配列番号40 ~ 配列番号42、軽鎖のC D R 1 ~ C D R 3をコードする核酸配列; 配列番号46 ~ 配列番号48、重鎖のC D R 1 ~ C D R 3をコードする核酸配列)。重鎖について：黒色文字 - V H(可変ドメイン)、青色文字 - 定常ドメイン1(C H 1)、赤色文字 - コネクター、紫色文字 - H i s タグ、緑色文字 - M y c タグ。

40

【図6 C - 6 D】図6 C - 6 Dは、G 3 H 8 F a b抗体(抗H L A - DR 4 / G A D<sub>555-567</sub> F a b)の重鎖(図6 C ~ 図6 D)のアミノ酸配列[図6 C(配列番号3)]および核酸配列[図6 D(配列番号4)]を示す。C D R(K a b a t定義による)

50

には下線が付される（配列番号 37～配列番号 39、軽鎖についての CDR1～CDR3；配列番号 43～配列番号 45、重鎖についての CDR1～CDR3；配列番号 40～配列番号 42、軽鎖の CDR1～CDR3 をコードする核酸配列；配列番号 46～配列番号 48、重鎖の CDR1～CDR3 をコードする核酸配列）。重鎖について：黒色文字 - V H（可変ドメイン）、青色文字 - 定常ドメイン 1（CH1）、赤色文字 - コネクター、紫色文字 - H i s タグ、緑色文字 - M y c タグ。

#### 【0072】

【図 7 A - 7 B】図 7 A - 7 B は、G 1 H 1 2（抗 H L A - D R 4 / G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 F a b）抗体の軽鎖（図 7 A ~ 図 7 B）のアミノ酸配列 [図 7 A（配列番号 5）] および核酸配列 [図 7 B（配列番号 6）] を示す。CDR（K a b a t 定義による）には下線が付される（配列番号 49～配列番号 51、軽鎖についての CDR1～CDR3；配列番号 55～配列番号 57、重鎖についての CDR1～CDR3；配列番号 52～配列番号 54、軽鎖の CDR1～CDR3 をコードする核酸配列；配列番号 58～配列番号 60、重鎖の CDR1～CDR3 をコードする核酸配列）。重鎖について：黒色文字 - V H（可変ドメイン）、青色文字 - 定常ドメイン 1（CH1）、赤色文字 - コネクター、紫色文字 - H i s タグ、緑色文字 - M y c タグ。

【図 7 C - 7 D】図 7 C - 7 D は、G 1 H 1 2（抗 H L A - D R 4 / G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 F a b）抗体の重鎖（図 7 C ~ 図 7 D）のアミノ酸配列 [図 7 C（配列番号 7）] および核酸配列 [図 7 D（配列番号 8）] を示す。CDR（K a b a t 定義による）には下線が付される（配列番号 49～配列番号 51、軽鎖についての CDR1～CDR3；配列番号 55～配列番号 57、重鎖についての CDR1～CDR3；配列番号 52～配列番号 54、軽鎖の CDR1～CDR3 をコードする核酸配列；配列番号 58～配列番号 60、重鎖の CDR1～CDR3 をコードする核酸配列）。重鎖について：黒色文字 - V H（可変ドメイン）、青色文字 - 定常ドメイン 1（CH1）、赤色文字 - コネクター、紫色文字 - H i s タグ、緑色文字 - M y c タグ。

#### 【0073】

【図 8 A - 8 B】図 8 A - 8 B は、本発明のいくつかの実施形態による組換えベータ鎖（D R B 1 \* 0 4 0 1；配列番号 9；図 8 A）および組換えアルファ鎖（D R A \* 0 1 0 1；配列番号 10；図 8 B）のアミノ酸配列を示す。図 8 A - リーダーペプチド（黄色で強調される）、ベータ鎖（赤色）、G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ペプチド（青色）、リンカー（黒色、下線部）、J u n 二量体化ドメイン（緑色）；図 8 B - リーダーペプチド（黄色で強調される）、アルファ鎖（赤色）、G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ペプチド（青色）、リンカー（黒色、下線部）、J u n 二量体化ドメイン（緑色）、B i r A タグ（紫色）。

#### 【0074】

【図 9 A - 9 B】図 9 A - 9 B は、本発明のいくつかの実施形態による組換えベータ鎖（D R B 1 \* 0 4 0 1；配列番号 11；図 9 A）および組換えアルファ鎖（D R A 1 \* 0 1 0 1；配列番号 12；図 9 B）の核酸配列を示す。図 9 A - リーダーペプチド（黄色で強調される）、ベータ鎖（赤色）、G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ペプチド（青色）、リンカー（黒色、下線部）、J u n 二量体化ドメイン（緑色）；図 9 B - リーダーペプチド（黄色で強調される）、アルファ鎖（赤色）、G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ペプチド（青色）、リンカー（黒色、下線部）、J u n 二量体化ドメイン（緑色）、B i r A タグ（紫色）。

#### 【0075】

【図 10 A - 10 B】図 10 A - 10 B は、マウスのリンパ節細胞への G 3 H 8 の結合を示すフローサイトメトリー分析を示すヒストグラムである。G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7（図 10 A）または H A - 3 0 6 ~ 3 1 8（図 10 B）により免疫化された H L A - D R 4 遺伝子組換え（T g）マウスの鼠蹊部（流入領域）リンパ節（L N）に由来する細胞懸濁物に対する G 3 H 8 結合のフローサイトメトリー分析。Y 軸は陽性細胞の平均蛍光強度を示す。X 軸は前方散乱（F C S）カウント数を示す。G 3 H 8 抗体は、G A D - 5 5 5 5 6 7 により免疫化された H L A - D R 4 遺伝子組換えマウスに由来する H L A - D R 4 - G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7 複合体を提示する A P C を検出する（6.5%の陽性細胞）（図 1

10

20

30

40

50

0 A) が、この抗体は、H A - 3 0 6 ~ 3 1 8 により免疫化された H L A - D R 4 遺伝子組換えマウスに由来する H L A - D R 4 - H A - 3 0 6 ~ 3 1 8 を発現する細胞を検出しない ( 0 . 9 % のバックグラウンドレベル ) ( 図 1 0 B ) ことに留意すること。G A D 免疫化マウスに由来する非流入領域傍大動脈 L N および脾臓の細胞懸濁物は、H A 免疫化マウスから得られるバックグラウンドレベルを超える染色を示さなかった ( データは示されず ) 。これらの結果から、G A D により免疫化された D R 4 マウスの鼠蹊部リンパ節に由来する、G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7 を提示する A P C の特異的な検出が明らかにされる。

#### 【 0 0 7 6 】

【 図 1 1 A - 1 1 C 】 図 1 1 A - 1 1 C は、G 3 H 8 F a b の結合能および T 細胞阻止能と比較して、G 3 H 8 I g G 1 抗体の増大した結合能および T 細胞阻止能を示すヒストグラムである。図 1 1 A - G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ペプチドが負荷された D R 4 + P r i e s s 細胞に対する F a b 抗体または I g G 型 G 3 H 8 抗体の結合を示すヒストグラム。完全ヒト型の G 3 H 8 I g G 1 A b は、D R 4 / G A D に対する特異性を維持し、F a b と比較して、1 / 1 0 の濃度により、はるかにより大きい強さで細胞に結合することに留意すること。図 1 1 B - G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 特異的な、D R 4 拘束された T 細胞応答が阻止されることを示すヒストグラム。G 3 H 8 F a b と、I g G とが、G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ハイブリドームにおいて自己反応性 T C R と競合し、G A D 特異的な応答を用量依存的様式で阻害する。I g G 阻害は、F a b 阻害と比較して、1 0 倍を超えてより効率的である。図 1 1 C - H A - 3 0 6 ~ 3 1 8 特異的な、D R 4 拘束された T 細胞応答が、G 3 H 8 ではなく、H B 2 9 8 によって阻止されることを示すヒストグラム。G 3 H 8 I g G A b は、インフルエンザペプチド ( H A - 3 0 6 ~ 3 1 8 ) に対抗する他の T 細胞特異性を阻害しなかった。これは、コントロールの抗 D R m A b ( H B 2 9 8 ) によって得られる阻害と比較される。これらの結果から、無関連な複合体 ( 例えば、インフルエンザの複合体 ) に対してではなく、D R 4 / G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7 に対する G 3 H 8 抗体の特異性が明らかにされる。

#### 【 発明を実施するための形態 】

#### 【 0 0 7 7 】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、M H C クラス I I と G A D 自己抗原性ペプチドとの単離された複合体、この複合体に特異的に結合する単離された高親和性実体 ( 例えば、抗体など ) 、ならびに、限定ではないが、より具体的には、I 型糖尿病を診断および処置するためのそれらの使用に関連する。

#### 【 0 0 7 8 】

本発明の少なくとも 1 つの実施形態を詳しく説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明に示されるか、または実施例において例示される細部に必ずしも限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、または様々な方法で実施または実行されることが可能である。

#### 【 0 0 7 9 】

本発明者らは、I 型糖尿病の進行時における抗原提示を研究するために有用であり、同様にまた、I 型糖尿病の診断および処置を行うために有用である T 細胞受容体様抗体を単離するために使用された M H C クラス I I - G A D 自己抗原性ペプチド複合体を作製している。

#### 【 0 0 8 0 】

下記の実施例の節において記載されるように、本発明者らは、抗原性ペプチドが M H C クラス I I のペータ鎖の N 末端に共有結合により連結される、M H C クラス I I と G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 抗原性ペプチドとの単離された複合体を作製した ( 図 1 A 、実施例 1 ) 。この M H C クラス I I / G A D ペプチド複合体は、G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 抗原性ペプチドにインビトロで結合したとき、および、天然型立体配座で結合したとき ( 例えば、細胞表面に提示されるとき ) の両方で M H C クラス I I ( 例えば、D R 4 ) に特異的に結合し、しかし、この特異的な抗原性ペプチドの非存在下での M H C クラス I I には結合しない特異的な可溶性抗体 ( 例えば、F a b ) を単離するために使用された ( 図 2 A ~ 図 2 B ) 。



加えて、これらの抗体は、天然において T 1 D と会合する エピトープ G A D<sub>552-572</sub> (配列番号 13) が負荷された細胞に結合することができること (図 2 C、実施例 1、データは示されず)、また、T 細胞受容体様の特異性を様々な抗体濃度 (図 2 D、実施例 1) および様々な抗原性ペプチド濃度 (図 2 E、実施例 1) において示すことが、増大する抗体染色が細胞表面での総 M H C クラス I I / 抗原性ペプチド複合体における増大と相関していることとともに見出された。これらの結果は、単離された抗体が、目的とする抗原提示細胞の抗原提示を定量することにおいて使用され得ることを示す。加えて、実施例 2 に記載されるように、本発明の単離された抗体はそれらの標的化された複合体に対する細かい特異性を示し、かつ、野生型ペプチドを含めて、様々な複合体に示差的に結合し、しかし、M H C クラス I I - G A D 拘束を受ける抗原性ペプチドの P 5 位に変異アミノ酸を有する複合体には結合しない (図 3 A ~ 図 3 E)。さらには、実施例 3 において示されるように、G 3 H 8 F a b は、H L A - D R \* 0 4 0 1 によって拘束される G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7 に対して特異的な G 2 . 1 . 3 6 . 1 T 細胞ハイブリドーマの応答を約 8 0 % 阻害し (図 4 A)、H L A - D R \* 0 4 0 1 によって拘束される H A 3 0 7 ~ 3 1 9 ペプチドに対する H 1 . 1 3 . 2 ハイブリドーマ応答を阻害しないこと (図 4 B) が見出された。したがって、これらから、自己反応性 G A D - エピトープに対する自己反応性 T 細胞応答が、G 3 H 8 F a b によって抗原特異的に阻止されることが明らかにされる。加えて、実施例 4 に記載されるように、G 3 H 8 F a b は M H C クラス I I - G A D<sub>555-567</sub> 複合体に B 7 / D R 4 糖尿病マウスの脾臓において特異的に結合し (図 5 A ~ 図 5 C)、また、糖尿病発症前の B 7 / D R 4 マウスの浸潤された脾臓において特異的に結合し (データは示されず)、しかし、C 5 7 B 6 コントロールマウスの脾臓には結合しなかった (図 5 D ~ 図 5 E)。そのうえ、実施例 6 に記載されるように、完全な I g G 型の G 3 H 8 抗体が作製され、これは、エクスビオにおいて H L A - D R 4 - G A D<sub>555-567</sub> 複合体を提示する細胞に対して特異的であること (図 10 A ~ 図 10 B)、そして、G 3 H 8 F a b と比較した場合には高まった結合 (図 11 A) を有し、また、より大きい効力 (図 11 B) を有し、一方で、独特の T C R 様特異性を維持すること (図 11 C) を示した。まとめると、これらの結果は、本発明の抗体の特異性、糖尿病を早期段階で診断することにおけるそれらの使用、および、治療目的のために、すなわち、この疾患の進行に伴う特異的な M H C クラス I I / ペプチド事象を阻止するために不可欠である、脾臓浸潤性 A P C に対する抗体が入手できることを明らかにする。

#### 【0081】

したがって、本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、主要組織適合性複合体 (M H C) クラス I I と、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (G A D) 自己抗原性ペプチドとを含む、単離された複合体であって、前記 G A D 自己抗原性ペプチドが、配列番号 14 によって示されるコアアミノ酸配列 (G A D<sub>556-565</sub>、F F R M V I S N P A) を含み、かつ、前記 G A D 自己抗原性ペプチドが前記 M H C クラス I I のベータ鎖に共有結合により結合させられる、単離された複合体が提供される。本明細書中で使用される場合、用語「単離された」は、自然の環境 (例えば、ヒトの身体) から少なくとも部分的に分離されたことを示す。

#### 【0082】

いくつかの実施形態によれば、単離された複合体は可溶性である。

#### 【0083】

本明細書中で使用される場合、表現「主要組織適合性複合体 (M H C)」は、一群の連鎖した遺伝子座によってコードされる各種抗原 (これらはマウスでは H - 2 と総称され、ヒトではヒト白血球抗原 (H L A) と総称される) の複合体を示す。M H C 抗原の 2 つの主要なクラス (クラス I およびクラス I I) はそれぞれが、組織タイプおよび移植片適合性を決定することにおいて役割を果たす一組の細胞表面糖タンパク質を含む。移植反応において、細胞傷害性 T 細胞 (C T L) が異物由来のクラス I 糖タンパク質に対して主に応答し、一方で、ヘルパー T 細胞が異物由来のクラス I I 糖タンパク質に対して主に応答する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 4 】

様々なMHCクラスII分子が専門の抗原提示細胞（APC）（例えば、マクロファージ、樹状細胞およびB細胞など）において発現される。それぞれのMHCクラスII分子が、2つの相同的サブユニットから、すなわち、アルファ鎖（ 1および 2の細胞外ドメイン、膜貫通ドメインならびに短い細胞質テールを有する）およびベータ鎖（ 1および 2の細胞外ドメイン、膜貫通ドメインならびに短い細胞質テールを有する）から構成されるヘテロダイマーである。ペプチドが細胞外タンパク質に由来する場合、様々なペプチドがエンドサイトーシスを介して細胞内に入り、リソソームにおいて消化され、さらに、膜上での提示のためにMHCクラスII分子に結合する。

## 【 0 0 8 5 】

様々なMHCクラスII分子がヒトにおいて見出されている。その例は、以下のものを含むが、これらに限定されない：HLA - DM, HLA - DO, HLA - DP, HLA - DQ（例えばDQ 2, DQ 4, DQ 5, DQ 6, DQ 7, DQ 8, DQ 9）, HLA - DR（例えばDR 1, DR 2, DR 3, DR 4, DR 5, DR 7, DR 8, DR 9, DR 10, DR 11, DR 12, DR 13, DR 14, DR 15およびDR 16）。

## 【 0 0 8 6 】

DQ A 1対立因子の非限定的な例は、以下のものを含む：0501, 0201, 0302, 0301, 0401, 0101, 0102, 0104, 0102, 0103, 0104, 0103, 0102, 0303, 0505および0601。

## 【 0 0 8 7 】

DQ B 1対立因子の非限定的な例は、以下のものを含む：0201, 0202, 0402, 0501, 0502, 0503, 0504, 0601, 0602, 0603, 0604, 0609, 0301, 0304, 0302および0303。

## 【 0 0 8 8 】

DPA 1対立因子の非限定的な例は、以下のものを含む：01, 例えば0103, 0104, 0105, 0106, 0107, 0108, 0109; 02, 例えば0201, 0202, 0203; 03, 例えば0301, 0302, 0303, 0401。

## 【 0 0 8 9 】

DPB 1対立因子の非限定的な例は、以下のものを含む：01, 例えば0101, 0102; 02, 例えば0201, 0202, 0203; 03; 04, 例えば0401, 0402, 0403; 05, 例えば0501, 0502; 06; 08, 例えば0801, 0802; 09, 例えば0901, 0902; 10, 例えば1001, 1002; 11, 例えば1101, 1102; 13, 例えば1301, 1302; 14, 例えば1401, 1402; 15, 例えば1501, 1502; 16, 例えば1601, 1602; 17, 例えば1701, 1702; 18, 例えば1801, 1802; 19, 例えば1901, 1902; 20, 例えば2001, 2002; 21; 22; 23; 24; 25; 26, 例えば2601, 2602; および27。

## 【 0 0 9 0 】

DPハロタイプの非限定的な例は、以下のものを含む：HLA - DPA 1 \* 0103 / DPB 1 \* 0401 (DP401); およびHLA - DPA 1 \* 0103 / DPB 1 \* 0402 (DP402)。

## 【 0 0 9 1 】

DR B 1対立因子の非限定的な例は、以下のものを含む：0101, 0102, 0103, 0301, 0401, 0407, 0402, 0403, 0404, 0405, 0701, 0701, 0801, 0803, 0901, 1001, 1101, 1103, 1104, 1201, 1301, 1302, 1302 1303, 1401, 1501, 1502, 1601対立因子。

## 【 0 0 9 2 】

DR - DQハロタイプの非限定的な例は、以下のものを含む：DR 1 - DQ 5, DR 3 - DQ 2, DR 4 - DQ 7, DR 4 - DQ 8, DR 7 - DQ 2, DR 7 - DQ 9, DR 8

10

20

30

40

50

- D Q 4 , D R 8 - D Q 7 , D R 9 - D Q 9 , D R 1 0 - D Q 5 , D R 1 1 - D Q 7 , D R 1 2 - D Q 7 , D R 1 3 - D Q 6 , D R 1 3 - D Q 7 , D R 1 4 - D Q 5 , D R 1 5 - D Q 6 および D R 1 6 - D Q 5 。

【 0 0 9 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M H C クラス I I 複合体のベータ鎖は D R - B 1 \* 0 4 0 1 ( 配列番号 1 5 ; 天然型 D R - B 1 \* 0 4 0 1 分子 ) である。

【 0 0 9 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M H C クラス I I のアルファ鎖は D R - A 1 \* 0 1 0 1 ( 配列番号 1 6 ; 天然型 D R - A 1 \* 0 1 0 1 分子 ) である。

【 0 0 9 5 】

本明細書中で使用される場合、表現「グルタミン酸デカルボキシラーゼ ( G A D ) 」は、L - グルタミン酸からのガンマ - アミノ酪酸の生成を触媒することに関わるタンパク質の一群を示す。2つの主要な G A D 酵素がヒトには存在する：脳および膵臓の両方において発現する G A D ( 6 5 k D a ) [ G e n e I D 2 5 7 2 ; G e n B a n k アクセション番号 N M \_ 0 0 0 8 1 8 . 2 ( 配列番号 1 7 ) 、同 N M \_ 0 0 1 1 3 4 3 6 6 . 1 ( 配列番号 1 8 ) 、同 N P \_ 0 0 0 8 0 9 . 1 ( 配列番号 1 9 ) によってコードされる ] 、および、脳において発現する G A D ( 6 7 k D a ) [ G e n e I D 2 5 7 1 ; G e n B a n k アクセション番号 N M \_ 0 0 0 8 1 7 . 2 ( 配列番号 2 0 ) 、同 N P \_ 0 0 0 8 0 8 . 2 ( 配列番号 2 1 ) によってコードされる ] 。 G A D ( 6 5 k D a ) が、インスリン依存性糖尿病における自己抗体および自己反応性 T 細胞標的として特定されている。

【 0 0 9 6 】

本明細書中で使用される場合、表現「 G A D 自己抗原性ペプチド」は、膵臓の細胞 ( 例えば、膵臓のベータ細胞など ) において発現され、かつ、それに対する炎症応答が自己免疫性炎症応答の一部として誘発される自己の G A D タンパク質 ( すなわち、内因性タンパク質 ) に由来する抗原を示す。

【 0 0 9 7 】

G A D 自己抗原性ペプチドは、抗原提示細胞 ( A P C ) において提示されるとき、特異的な T 細胞によって認識される M H C クラス I I 拘束のペプチドであることに留意しなければならない。A P C によるそのような提示は、ベータ細胞を殺傷および破壊し、したがって、低下したインスリン産生を引き起こす細胞傷害性 T 細胞および抗体の生成を含めて、ベータ細胞に対する T 細胞応答および B 細胞応答の活性化および動員をもたらす得る炎症応答を生じさせる。

【 0 0 9 8 】

本発明のいくつかの実施形態による G A D 自己抗原性ペプチドは、配列番号 1 4 によって示されるコアミノ酸配列 ( G A D 5 5 6 ~ 5 6 5 、 F F R M V I S N P A ) を含む。

【 0 0 9 9 】

自己抗原のアミノ酸配列は、長さにおいて、同じ M H C クラス I I 対立因子の間で、または、異なる M H C クラス I I 対立因子の間で変化し得るので、本発明のいくつかの実施形態による自己抗原性ペプチドの長さは、少なくとも 1 0 個のアミノ酸から、少なくとも 1 0 個、2 5 個、または、最大でも 3 0 個のアミノ酸を有する自己抗原性ペプチドにまで変化し得る。

【 0 1 0 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドは、1 0 個のコアアミノ酸を含む。

【 0 1 0 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドの長さは約 1 0 0 個のアミノ酸を超えず、例えば、約 5 0 個のアミノ酸を超えず、例えば、約 3 0 個のアミノ酸を超えない。

【 0 1 0 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドは、配列番号 6 1 、

10

20

30

40

50

配列番号 6 2 および配列番号 2 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ、長さにおいて最大でも 3 0 個のアミノ酸を含む。

【 0 1 0 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドは、配列番号 6 1、配列番号 6 2 および配列番号 2 2 からなる群から選択される。

【 0 1 0 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドは G A D<sub>5 5 5 ~ 5 6 7</sub> ( N F F R M V I S N P A A T ; 配列番号 2 2 ) である。

【 0 1 0 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドの長さは少なくとも 1 0 個のアミノ酸を含み、かつ、最大でも 3 0 個のアミノ酸を含む。

【 0 1 0 6 】

加えて、それぞれの自己抗原性ペプチドにおけるいくつかのアミノ酸は M H C クラス I I の様々な対立因子の間で保存されており、置換され得ないが、他のアミノ酸は、M H C 分子に対する結合の本質的に同等な特異性および/または親和性を有し、かつ、上記および表 3 ( 実施例の節の実施例 5 ) に記載される例示的な自己抗原において示されるアミノ酸配列と同等な T 細胞エピトープをもたらすアミノ酸により置換され得ることに留意しなければならない。したがって、コアアミノ酸は、それぞれの M H C クラス I I 分子との認識のために要求される。それぞれの自己抗原性ペプチドについてのコアアミノ酸の特定を実験により行うことができ、例えば、自己抗原性ペプチドを構成するアミノ酸の変異誘発、および、( i ) 拘束された M H C クラス I I 分子への結合、( i i ) 拘束された T 細胞応答を刺激することの検出によって行うことができる。例えば、G A D<sub>5 5 5 ~ 5 6 7</sub> については、コアアミノ酸は 5 5 6 位 ~ 5 6 5 位におけるアミノ酸である。コアアミノ酸配列は、アンカー残基と、T 細胞受容体 ( T C R ) 接触残基とからなる。配列 N F F R M V I S N P A A T ( 配列番号 2 2 ) におけるアンカー残基が、P 1 ( F 5 5 7 )、P 4 ( V 5 6 0 )、P 6 ( S 5 6 2 ) および P 9 ( A 5 6 5 ) の M H C ポケット結合残基である。配列 N F F R M V I S N P A A T ( 配列番号 2 2 ) における T C R 接触残基が、F 5 5 6、R 5 5 8、M 5 5 9、I 5 6 1、N 5 6 3 の位置である。したがって、G A D<sub>5 5 5 ~ 5 6 7</sub> 自己抗原性ペプチドのコアアミノ酸は G A D<sub>5 5 6 ~ 5 6 5</sub> ( F F R M V I S N P A、配列番号 1 4 ) である。

【 0 1 0 7 】

本発明はまた、そのいくつかの実施形態によれば、配列が上述のアミノ酸配列と完全には対応しないが、同一の「アンカー位置」または密接に関連する「アンカー位置」を単に有するペプチド変化体に関する。用語「アンカー位置」はこの関連においては、M H C クラス I I 複合体 ( 例えば、D R 1、D R 2、D R 3、D R 4 または D Q ) に結合するための不可欠なアミノ酸残基を意味する。D R B 1 \* 0 4 0 1 結合モチーフについてのアンカー位置が、例えば、H a m m e r 他、C e l l、7 4 ( 1 9 9 3 )、1 9 7 ~ 2 0 3 において述べられる。そのようなアンカー位置は G A D 自己抗原性ペプチドにおいて保存されるか、または、場合により、化学的に非常に近い関係にある側鎖を有するアミノ酸残基によって置換される ( 例えば、バリンによるアラニンの置換、イソロシンによるロイシンの置換、および、逆に、アラニンによるバリンの置換、ロイシンによるイソロシンの置換 )。本発明のいくつかの実施形態によるペプチドにおけるアンカー位置は、上述の具体的なペプチドの変化体を M H C 分子に対するそれらの結合能について試験することによる簡便な様式で決定することができる。本発明のいくつかの実施形態によるペプチドが、上述のペプチドと本質的に同等な、M H C 分子に対する結合の特異性および/または親和性を有するという点で特徴づけられる。本明細書中に記載される G A D 自己抗原性ペプチドに対する少なくとも 5 0 % の同一性 ( 例えば、少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % またはそれ以上の同一性 ) を有する相同的なペプチドもまた、本発明のいくつかの実施形態によって意図される。

【 0 1 0 8 】

10

20

30

40

50

上記の G A D 自己抗原性ペプチドのそれぞれが M H C クラス I I 対立因子と複合体形成し得ることに留意しなければならない。そのような M H C クラス I I 特異的対立因子がこの技術分野では知られている。M H C クラス I I 対立因子およびそれらの拘束された自己抗原性ペプチドの限定されない例が下記の実施例の節の実施例 5 における表 3 に例示される。

#### 【0109】

本明細書において使用される用語「ペプチド」には、天然のペプチド（分解産物または合成的に合成されたペプチドまたは組換えペプチドのいずれか）、ペプチド模倣体（典型的には合成的に合成されたペプチド）そしてペプチドアナログであるペプトイドおよびセミペプトイドが含まれ、これらは、例えば、ペプチドを体内でより安定化させる修飾、またはペプチドの細胞浸透能力を高める修飾を有し得る。そのような修飾には、N 末端修飾、C 末端修飾、ペプチド結合の修飾（ $\text{CH}_2 - \text{NH}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{S}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{S} = \text{O}$ 、 $\text{O} = \text{C} - \text{NH}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{O}$ 、 $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$ 、 $\text{S} = \text{C} - \text{NH}$ 、 $\text{CH} = \text{CH}$ または $\text{CF} = \text{CH}$ を含むが、これらに限定されない）、骨格の修飾、および残基の修飾が含まれるが、これらに限定されない。ペプチド模倣体化合物を調製するための方法はこの分野では十分に知られており、例えば、Quantitative Drug Design, C. A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992) に具体的に記載される（これは、全体が本明細書中に示されるように参考として組み込まれる）。これに関するさらなる詳細が本明細書中下記に示される。

10

20

#### 【0110】

ペプチド内のペプチド結合（ $-\text{CO} - \text{NH} -$ ）は、例えば、N - メチル化結合（ $-\text{N}(\text{CH}_3) - \text{CO} -$ ）、エステル結合（ $-\text{C}(\text{R})\text{H} - \text{C} - \text{O} - \text{O} - \text{C}(\text{R}) - \text{N} -$ ）、ケトメチレン結合（ $-\text{CO} - \text{CH}_2 -$ ）、o - アザ結合（ $-\text{NH} - \text{N}(\text{R}) - \text{CO} -$ ）（式中、R は任意のアルキル（例えば、メチル）である）、カルバ結合（ $-\text{CH}_2 - \text{NH} -$ ）、ヒドロキシエチレン結合（ $-\text{CH}(\text{OH}) - \text{CH}_2 -$ ）、チオアミド結合（ $-\text{CS} - \text{NH} -$ ）、オレフィン二重結合（ $-\text{CH} = \text{CH} -$ ）、レトロアミド結合（ $-\text{NH} - \text{CO} -$ ）、ペプチド誘導体（ $-\text{N}(\text{R}) - \text{CH}_2 - \text{CO} -$ ）（式中、R は、炭素原子において自然界で示される「通常」の側鎖である）によって置換することができる。

#### 【0111】

これらの修飾は、ペプチド鎖に沿った結合の任意のところに存在させることができ、そして同時に数カ所（2カ所～3カ所）においてさえ存在させることができる。本発明のいくつかの実施形態によれば、これらの修飾は、アンカーアミノ酸を除外すべきであるが、これはすべての場合において必須ではない。

30

#### 【0112】

天然の芳香族アミノ酸（Trp、TyrおよびPhe）は、TIC、ナフチルアラニン（Nol）、Pheの環メチル化誘導体、Pheのハロゲン化誘導体、またはo - メチル - Tyrなどの合成された非天然型の酸に置換することができる。

#### 【0113】

上述のことに加えて、本発明のペプチドは一以上の修飾されたアミノ酸または一以上の非アミノ酸モノマー（例えば脂肪酸、複合体炭水化物など）も含むことができる。

40

#### 【0114】

本明細書において使用される用語「アミノ酸」には、20個の天然に存在するアミノ酸；インビボで多くの場合には翻訳後修飾されたそのようなアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリンおよびホスホトレオニンを含む）；および他の非通常型アミノ酸（2 - アミノアジピン酸、ヒドロキシリシン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシンおよびオルニチンを含むが、これらに限定されない）が含まれることが理解される。さらに、用語「アミノ酸」には、この用語が本明細書中で定義されるように少なくとも1つの付加アミノ酸にペプチド結合またはペプチド結合アナログを介して連結されるD - アミノ酸およびL - アミノ酸の両方が含まれる。

50

## 【 0 1 1 5 】

本発明のペプチドは好ましくは、線状形態で利用される。だが、環化がペプチド特性をひどく妨害しない場合には、ペプチドの環状形態もまた利用され得ることが理解されるであろう。

## 【 0 1 1 6 】

本発明のペプチドは、ペプチドの溶解性をそれらのヒドロキシル含有側鎖のために増大させることができる1つまたは複数の非天然型または天然型の極性アミノ酸（セリンおよびトレオニンが含まれるが、これらに限定されない）を含むことができる。

## 【 0 1 1 7 】

本発明のペプチドは、ペプチド合成の分野における当業者に既知の任意の技術によって合成されることができる。固相ペプチド合成については、多くの技術の要約が、J. M. StewartおよびJ. D. Young「Solid Phase Peptide Synthesis」W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963に、および、J. Meienhofer「Hormonal Proteins and Peptides」第2巻、46頁、Academic Press (New York), 1973に見出されうる。古典的な溶液合成については、G. SchröderおよびK. Lupke「The Peptides」第1巻、Academic Press (New York), 1965を参照のこと。大規模ペプチド合成は、Andersson Biopolymers 2000; 55(3): 227 - 50によって記載されている。

10

20

## 【 0 1 1 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとを含む単離された複合体は、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む高親和性実体の単離を可能にする構造的立体配座を有する。

## 【 0 1 1 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、高親和性実体（例えば、抗体）はGAD自己抗原性ペプチドの非存在下でのMHCクラスIIには結合せず、かつ、単離された高親和性実体はMHCクラスIIの非存在下でのGAD自己抗原性ペプチドには結合しない。

## 【 0 1 2 0 】

表現「GAD自己抗原性ペプチドの非存在下でのMHCクラスII」は、本明細書中で使用される場合、空のMHCクラスII複合体（すなわち、抗原性ペプチドを何ら有しないMHCクラスII複合体）、同様にまた、本発明のいくつかの実施形態のGAD自己抗原性ペプチドでない別の抗原ペプチド（例えば、異なるMHCクラスII拘束の抗原性ペプチド）に結合するMHCクラスII複合体を包含する。

30

## 【 0 1 2 1 】

表現「MHCクラスIIの非存在下でのGAD自己抗原性ペプチド」は、本明細書中で使用される場合、MHCクラスII複合体に結合していないときの本発明のいくつかの実施形態のGAD自己抗原性ペプチド、同様にまた、別のMHCクラスII複合体（例えば、本発明のいくつかの実施形態の複合体を形成するために使用される鎖とは異なる、MHCクラスIIのベータ鎖またはアルファ鎖の対立因子）に結合したときの本発明のいくつかの実施形態のGAD自己抗原性ペプチドを包含する。

40

## 【 0 1 2 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとを含む単離された複合体は、（MHCクラスII分子への共有結合性または非共有結合性のどちらの結合であれ、例えば、MHCクラスII分子のC'末端を介して）複合体に結合した異種の免疫グロブリン（例えば、Fc抗体、Fab抗体および/または単鎖Fv抗体）を含まない。

## 【 0 1 2 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離された複合体は、MHCクラスIIと、G

50

A D 自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む高親和性実体（例えば、抗体）の単離を可能にする構造的立体配座を有する。

【0124】

天然型の構造的立体配座を有する M H C クラス I I / G A D 自己抗原性ペプチドに特異的に結合することができる高親和性実体（例えば、抗体）を単離するためには、単離された M H C / ペプチド複合体は、抗原性ペプチドを伴う M H C クラス I I のアルファ鎖およびベータ鎖の正しい折り畳みが生じるように作製されなければならない。M H C クラス I I と、拘束された抗原ペプチドとの組換え複合体を調製するためには、アルファ鎖およびベータ鎖の細胞外ドメインが要求されることに留意しなければならない。

10

【0125】

真核生物細胞において発現されるとき、M H C クラス I I 分子のシグナルペプチドが翻訳後に切断され、したがって、これにより、成熟型タンパク質が得られる。M H C クラス I I 分子内における抗原性ペプチドの正しい折り畳みを可能にするために、抗原性ペプチドは成熟型 M H C クラス I I ベータ鎖の細胞外ドメインの N 末端の近くに共有結合により結合されなければならない。

【0126】

本発明のいくつかの実施形態によれば、そのような構造的立体配座は、G A D 自己抗原性ペプチドが M H C クラス I I の成熟型ベータ鎖の細胞外ドメインに共有結合によりコンジュゲートまたは結合されるときに得ることができるか又は得られる。

20

【0127】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドはその C 末端において M H C クラス I I の細胞外ドメインの N 末端に共有結合により結合する。

【0128】

本明細書中で使用される場合、表現「共有結合により結合される（する）」（またはコンジュゲートされる）は、成熟型ベータ鎖のポリペプチド鎖の一部であることを示す。そのような共有結合性コンジュゲート化は、G A D 自己抗原性ペプチドのコード配列を M H C クラス I I 分子のベータ鎖の細胞外ドメインのコード配列に翻訳融合することによって達成することができる。

【0129】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドは M H C クラス I I のベータ鎖の細胞外ドメインのアミノ酸 1 ~ 6 の間に共有結合により埋め込まれる。

30

【0130】

本明細書中で使用される場合、表現「の間に共有結合により埋め込まれる」は、アミノ酸配列（ポリペプチド）内に共有結合により結合される（する）ことを示す。

【0131】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドは、M H C クラス I I のベータ鎖の細胞外ドメインのアミノ酸 1 ~ 2 の間、アミノ酸 2 ~ 3 の間、アミノ酸 3 ~ 4 の間、アミノ酸 4 ~ 5 の間またはアミノ酸 5 ~ 6 の間に共有結合により埋め込まれる。

40

【0132】

したがって、G A D 自己抗原性ペプチドを、M H C クラス I I のベータ鎖の成熟型細胞外ドメインの 1 番目、2 番目、3 番目、4 番目または 5 番目のアミノ酸位置の後に埋め込むことができる。

【0133】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドは、成熟型 M H C クラス I I ベータ鎖の 3 番目のアミノ酸の後（すなわち、成熟型 M H C クラス I I ベータ鎖の 3 番目のアミノ酸と 4 番目のアミノ酸との間）に共有結合により結合させられる。

【0134】

本発明のいくつかの実施形態によれば、G A D 自己抗原性ペプチドはその C 末端にリン

50

カーペプチドが配置される。

【0135】

リンカーペプチドは、組換えMHCクラスII - 抗原性ペプチドを調製するために使用される発現系に従って選択することができる。

【0136】

通常、リンカーペプチドは柔軟性を成熟型ベータ鎖に与え、また、コンジュゲートされた抗原性ペプチドのMHCクラスII分子内でのペプチド結合溝の中における折り畳みを可能にする。

【0137】

本発明のいくつかの実施形態によれば、リンカーペプチドは組換えタンパク質の酵素的切断のための部位を含む。切断を、インビボ（すなわち、生体内）、エクスピボ（生物の細胞が培養されるとき）、または、インビトロで行うことができる。

【0138】

本発明のいくつかの実施形態によれば、リンカーペプチドはトロンピン切断部位を含むことができる。例えば、リンカーペプチドは、組換えタンパク質の柔軟性を増大させる2つの配列（例えば、GGGGSなど）が配置されるトロンピン切断部位（例えば、配列LVPRGS）を含むことができる。

【0139】

下記は、GAD自己抗原性ペプチド複合体に共有結合によりコンジュゲートされ得るリンカーペプチドの限定されない例である：

（1）1回～30回の間で繰り返されるグリシン（G） - セリン（S）対のアミノ酸 [GS]<sub>n</sub>（ただし、 $n = 1 \sim 30$ ）（配列番号23）を含むリンカーペプチド。

（2）1回～6回の間で繰り返されるGGGGS配列 [GGGGS]<sub>n</sub>（ただし、 $n = 1 \sim 6$ ）（配列番号24）を含むリンカーペプチド。

（3）リンカーペプチドGGGSLVPRGSGGGGS（配列番号25）。

（4）リンカーペプチドGGGGS L V P R G S G G G G S（配列番号26）。

【0140】

リンカーペプチドは、GAD自己抗原性ペプチドに対して、また、MHCクラスIIの成熟型ベータ鎖の細胞外ドメインに対して翻訳融合することができる。例えば、GAD自己抗原性ペプチドのC末端がリンカーペプチドのN末端に直接に融合される；また、リンカーペプチドのC末端が、成熟型ベータ鎖の細胞外ドメインのN末端に、または、成熟型ベータ鎖の細胞外ドメインのN末端端部の1～6の間のアミノ酸位置に直接に融合される。

【0141】

加えて、非共有結合性の複合体をMHCクラスIIのアルファ鎖とベータ鎖との間に置いて形成するために、アルファ鎖およびベータ鎖の細胞外ドメインのそれぞれが結合対のメンバーを含み、ただし、この場合、そのようなメンバーは、他方のメンバーと相互作用したとき、結合対を形成する。

【0142】

そのような結合対の限定されない例には、Jun - Fos結合対のロイシンジッパー二量体化ドメイン、ならびに、安定なタンパク質複合体を形成する酸性（AZ）ロイシンジッパーモチーフおよび塩基性（BZ）ロイシンジッパーモチーフが含まれる。

【0143】

本発明のいくつかの実施形態によれば、MHCクラスIIのベータ鎖は、真核生物細胞における発現のとき、MHCクラスIIのアルファ鎖に含まれる結合対の第2のメンバーに結合する結合対の第1のメンバーを含み、ただし、ベータ鎖およびアルファ鎖により、MHCクラスIIが形成される。

【0144】

例えば、下記の実施例の節において記載されるように、本発明のいくつかの実施形態のMHCクラスII複合体が、MHCクラスIIのベータ鎖（例えば、DR - B1\*040

10

20

30

40

50



1 ; 配列番号 15) をコードする核酸配列に翻訳融合される、GAD 自己抗原性ペプチド (例えば、GAD ペプチド) をコードする核酸配列を含み、その結果、コードされた抗原性ペプチドがベータ鎖 (ベータ鎖の成熟型細胞外ドメイン) の 3 番目のアミノ酸位置と 4 番目のアミノ酸位置との間に融合されるようにされるポリヌクレオチドを宿主細胞 (例えば、S2 細胞) において発現させることによって作製された。図 8A ~ 図 8B においてさらに示されるように、抗原性ペプチドが、ベータ鎖の成熟型細胞外ドメインの 4 番目のアミノ酸配列 (第 4 アミノ酸) に直接に結合されるリンカーペプチドに共有結合により融合される。

#### 【0145】

表現「翻訳融合される」および表現「読み枠を合わせて」は、連結されたポリヌクレオチドのコード配列の長さに広がるただ 1 つの連続したオープンリーディングフレームを形成するように共有結合により連結されるポリヌクレオチドを示すために本明細書中では交換可能に使用される。そのようなポリヌクレオチドは直接に連結することができ、あるいは、好ましくはスパーサー領域またはリンカー領域を介して間接的に共有結合により連結することができる。

10

#### 【0146】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、MHC クラス II のベータ鎖 [例えば、DR-B1\*0401 ; (アミノ酸配列については配列番号 27) および (核酸配列については配列番号 28) ] の細胞外ドメインをコードする第 1 の核酸配列と、GAD 自己抗原性ペプチド [例えば、GAD ペプチド NFFRMVISNPAAAT (配列番号 22) 、この GAD ペプチドをコードする核酸配列については AACTTCTTTCTGATGGTTATCAGCAATCCAGCTGCGACT (配列番号 29) ] をコードする第 2 の核酸構築物とを含む単離されたポリヌクレオチドが提供され、ただし、この場合、第 2 の核酸構築物は第 1 の核酸構築物の上流に翻訳融合されるか、または、細胞外ドメインのアミノ酸 1 ~ 6 をコードする核酸配列の間に翻訳融合される。

20

#### 【0147】

本発明のいくつかの実施形態によれば、第 2 の核酸構築物は、細胞外ドメインのアミノ酸 3 および 4 をコードする核酸配列の間に翻訳融合される。

#### 【0148】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドはさらに、第 2 の核酸配列の下流に翻訳融合される、リンカーペプチドをコードする核酸配列を含む。

30

#### 【0149】

本発明のいくつかの実施形態によれば、第 1 の核酸配列および第 2 の核酸配列は、リンカーペプチド (GGGSLVPRGSGGGGS ; 配列番号 63) をコードする核酸配列を介してつながれる。

#### 【0150】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離されたポリヌクレオチドはさらに、真核生物細胞における発現のとき、結合対の第 2 のメンバーに結合する結合対の第 1 のメンバー [例えば、Jun、配列番号 64 で示されるアミノ酸配列 (RIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNH) ] をコードする第 3 の核酸配列を含む。

40

#### 【0151】

本発明のいくつかの実施形態によれば、結合対の第 1 のメンバーをコードする第 3 の核酸配列が、MHC クラス II のベータ鎖をコードする第 1 の核酸配列の下流に翻訳融合される。

#### 【0152】

本発明のいくつかの実施形態によれば、結合対の第 1 のメンバー (例えば、Jun アミノ酸配列) が、短いペプチドリンカーを介して、MHC クラス II のベータ鎖につながれる。そのようなリンカーの限定されない一例が配列番号 65 (VDGGGGG) で示される。

50

## 【 0 1 5 3 】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、下記の ( i ) および ( i i ) を含む核酸システムが提供される：

( i ) M H C クラス I I のベータ鎖をコードする第 1 の核酸配列と、G A D 自己抗原性ペプチドをコードする第 2 の核酸構築物（ただし、第 2 の核酸構築物は第 1 の核酸構築物の上流に翻訳融合される）と、真核生物細胞における発現のとき、結合対の第 2 のメンバーに結合する結合対の第 1 のメンバーをコードする第 3 の核酸配列とを含む第 1 のポリヌクレオチド；および

( i i ) M H C クラス I I のアルファ鎖 [ 例えば、D R - A 1 \* 0 1 0 1 ; ( 組換え分子の ) 配列番号 1 0 のアミノ酸 1 ~ 2 1 7 ] をコードする第 4 の核酸配列 [ 配列番号 1 2 の核酸 1 ~ 6 5 1 ] を含む第 2 のポリヌクレオチド。

10

## 【 0 1 5 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、第 2 のポリヌクレオチドはさらに、結合対の第 2 のメンバー [ 例えば、F o s 、配列番号 6 6 で示されるアミノ酸配列 ( L T D T L Q A E T D Q L E D E K S A L Q T E I A N L L K E K E K L E F I L A A H ) ] をコードする第 5 の核酸配列を含む。

## 【 0 1 5 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、結合対の第 2 のメンバーをコードする第 5 の核酸配列が、M H C クラス I I のアルファ鎖をコードする第 4 の核酸配列の下流に翻訳融合される。

20

## 【 0 1 5 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、F o s アミノ酸配列が、短いペプチドリッガーを介して、M H C クラス I I のアルファ鎖につながる。そのようなリンカーの限定されない一例が配列番号 6 5 ( V D G G G G G ) で示される。

## 【 0 1 5 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、結合対の第 2 のメンバーをコードする第 5 の核酸配列と、M H C クラス I I のアルファ鎖をコードする第 4 の核酸配列とが、リンカーペプチド ( 例えば、V D G G G G G ; 配列番号 6 5 ) をコードする核酸配列を介してつながれる。

30

## 【 0 1 5 8 】

組換えベータ鎖分子および組換えアルファ鎖分子の限定されない例が図 8 A ~ 図 8 B および図 9 A ~ 図 9 B にそれぞれ例示され、また、それらの例示的な配列が配列番号 9 ~ 配列番号 1 0 および配列番号 1 1 ~ 配列番号 1 2 においてそれぞれ提供される。

## 【 0 1 5 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、M H C クラス I I 複合体の少なくとも一方の分子 ( すなわち、アルファ鎖またはベータ鎖 ) はさらに、読み枠を合わせたタグ、すなわち、結合性実体を含むために酵素改変され得るペプチドをコードする核酸配列を含む。例えば、そのようなペプチドは、例えば、ビオチンタンパク質リガーゼ ( B i r A 酵素 ( A V I D I T Y ) ) を使用する部位特異的なビオチン化のために使用することができる。そのようなタグの限定されない例には、配列番号 6 7 によって示される B i r A 認識配列 ( L e u G l y G l y I l e P h e G l u A l a M e t L y s M e t G l u L e u A r g A s p ) が含まれる。

40

## 【 0 1 6 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ビオチン化のための B i r A 認識配列が組換えアルファ鎖のカルボキシ末端 ( C <sup>+</sup> ) に共有結合によりコンジュゲートされる。

## 【 0 1 6 1 】

読み枠を合わせたタグは、例えば、ストレプトアビジンを使用するなどして、特異的な M H C - ペプチド複合体に特異的に結合する抗体を単離するために使用され得ることに留意しなければならない。

## 【 0 1 6 2 】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、MHCクラスII - ペプチド複合体は、一般的な結合性実体によって結合させられる多量体を形成する。

【0163】

例えば、MHCクラスII - ペプチド複合体の多量体（例えば、四量体）を、ビオチン化された複合体に結合するストレプトアビジンを使用して形成することができる。

【0164】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、主要組織適合性複合体（MHC）クラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む単離された抗体が提供され、ただし、この場合、単離された抗体はGAD自己抗原性ペプチドの非存在下でのMHCクラスIIには結合せず、かつ、単離された抗体はMHCクラスIIの非存在下でのGAD自己抗原性ペプチドには結合しない。

10

【0165】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、主要組織適合性複合体（MHC）クラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体が提供され、ただし、この場合、単離された高親和性実体はGAD自己抗原性ペプチドの非存在下でのMHCクラスIIには結合せず、かつ、単離された高親和性実体はMHCクラスIIの非存在下でのGAD自己抗原性ペプチドには結合しない。

【0166】

20

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原結合ドメインは、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる。

【0167】

本明細書中で使用される場合、表現「天然型立体配座」は、細胞（例えば、哺乳動物の細胞、例えば、ヒト細胞）の表面に天然において提示されるとき複合体の立体配座を示す。

【0168】

本発明のいくつかの実施形態によれば、天然型立体配座は、抗原提示細胞（APC）の表面に提示されるとき、GAD自己抗原性ペプチドとMHCクラスIIとの複合体の構造的立体配座を含む。

30

【0169】

MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの複合体を呈示または提示する抗原提示細胞の限定されない例には、マクロファージ、樹状細胞（DC）およびB細胞が含まれる。

【0170】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体が提供され、ただし、高親和性実体は本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体によって単離可能である。

【0171】

40

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体に特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体が提供される。

【0172】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離された高親和性実体の抗原結合ドメインは、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる。

【0173】

本発明のいくつかの実施形態によれば、単離された高親和性実体の抗原結合ドメインはさらに、本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体に特異的に結合することができ

50

る。

【0174】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、下記の(i)および(ii)と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体が提供される：  
(i) 主要組織適合性複合体(MHC)クラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体(ただし、単離された高親和性実体はGAD自己抗原性ペプチドの非存在下でのMHCクラスIIには結合せず、かつ、単離された高親和性実体はMHCクラスIIの非存在下でのGAD自己抗原性ペプチドには結合しない)；および  
(ii) MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座。

10

【0175】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとを含む単離された複合体に特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む単離された高親和性実体が提供され、ただし、この場合、GAD自己抗原性ペプチドはMHCクラスIIの組換えベータ鎖のアミノ末端( $N^t$ )に共有結合によりコンジュゲートされる。

【0176】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとを含む単離された複合体(ただし、GAD自己抗原性ペプチドはMHCクラスIIの組換えベータ鎖のアミノ末端( $N^t$ )に共有結合によりコンジュゲートされる)によって単離可能である単離された高親和性実体が提供され、ただし、この場合、単離された高親和性実体の抗原結合ドメインは、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座に特異的に結合することができる。

20

【0177】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとを含む単離された複合体(ただし、GAD自己抗原性ペプチドはMHCクラスIIの組換えベータ鎖のアミノ末端( $N^t$ )に共有結合によりコンジュゲートされる)によって単離可能である単離された高親和性実体が提供され、ただし、この場合、単離された高親和性実体の抗原結合ドメインは下記の(i)および(ii)に特異的に結合することができる：

30

(i) MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとを含む単離された複合体(ただし、GAD自己抗原性ペプチドはMHCクラスIIの組換えベータ鎖のアミノ末端( $N^t$ )に共有結合によりコンジュゲートされる)；および  
(ii) MHCクラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体の天然型立体配座。

【0178】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、配列番号43～配列番号45および配列番号37～配列番号39によって示される相補性決定領域(CDR)(これらはそれぞれ、G3H8の重鎖および軽鎖のCDR1～CDR3である)を含む単離された高親和性実体が提供される。

40

【0179】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、配列番号55～配列番号57および配列番号49～配列番号51によって示される相補性決定領域(CDR)(これらはG1H12の重鎖および軽鎖のCDR1～CDR3である)を含む単離された高親和性実体が提供される。

【0180】

表現「高親和性実体」は、どのような分子、組成物または生物であれ、特異的な抗原には、非特異的な抗原よりも大きい親和性により結合する、天然に存在する分子、組成物または生物、あるいは、人工的に作製された分子、組成物または生物を示す。

【0181】

50

親和性は、知られている方法を使用して、例えば、表面プラズモン共鳴 (SPR) (これは、Scarano S、Mascini M、Turner AP、Minunni M、親和性に基づくバイオセンサーのための表面プラズモン共鳴画像化、Biosens Bioelectron、2010、25:957~66に記載される) などを使用して定量化することができ、また、例えば、より低いKdがより大きい親和性を反映するような解離定数 (Kd) を使用して計算することができる。

【0182】

記載されるように、高親和性実体は、MHCクラスIIと、MHCクラスII拘束の自己抗原 (GAD自己抗原性ペプチド) とを含む複合体に結合する。

【0183】

本発明のいくつかの実施形態によれば、高親和性実体は、ある種の特異的な複合体には、類似する複合体に対する同じ実体の親和性と比較して、より大きい親和性により結合する。ただし、この場合、類似する複合体は、複合体成分の少なくとも1つが、すなわち、MHCクラスIIのアルファ鎖、MHCクラスIIのベータ鎖および/またはMHCクラスII拘束の自己抗原が、特異的な複合体の成分に関して少なくとも1つの変異 (置換、欠失または挿入) を有する成分により置換される。

【0184】

本発明のいくつかの実施形態によれば、そのような変異は、様々なMHCクラスII対立因子の拘束された抗原の間で保存されるアミノ酸位置においてである。

【0185】

本発明のいくつかの実施形態によれば、高親和性実体は、非特異的な抗原に対する同じ実体の親和性と比較して、少なくとも約1桁ほど大きい、例えば、少なくとも約2桁大きい、少なくとも約3桁大きい、少なくとも約4桁大きい、少なくとも約5桁大きい、少なくとも約6桁大きい、少なくとも約7桁大きい、少なくとも約8桁大きい、少なくとも約9桁大きい、少なくとも約10桁大きい、特異的な抗原に対する親和性を示す。

【0186】

本発明のいくつかの実施形態によれば、特異的な抗原に対する高親和性実体の解離定数は約  $10^{-4}$  M以下であり、例えば、約  $10^{-5}$  M以下であり、例えば、約  $10^{-6}$  M以下であり、例えば、約  $10^{-7}$  M以下であり、例えば、約  $10^{-8}$  M以下であり、例えば、約  $10^{-9}$  M以下であり、例えば、約  $10^{-10}$  M以下である。

【0187】

高親和性実体の限定されない例には、抗体、抗体フラグメント、抗体を呈示するファージ、ペプチド、細胞に基づくディスプレイ実体 (例えば、抗体を呈示する細菌または酵母)、および、細胞を含まない呈示実体 (例えば、ペプチドまたは抗体を呈示するリボソーム) が含まれる。

【0188】

抗体を呈示するバクテリオファージで、本発明のいくつかの実施形態に従って使用することができるバクテリオファージには、M13およびfdの繊維状ファージ、T4ファージ、T7ファージ、ならびに、ファージが含まれる。

【0189】

抗体を呈示させるために細菌 (例えば、E. Coli) および酵母を使用する技術は周知である (例えば、Daugherty PS、他、1998、細菌表面ディスプレイを使用する抗体親和性成熟化、Protein Engineering、11:825~832; Johan Rockberg 他、細菌表面ディスプレイを使用する抗体のエピトープマッピング、Nature Methods、5、1039~1045 (2008); Sachdev S Sidhu、ディスプレイでの全長型抗体、Nature Biotechnology、25、537~538 (2007) を参照のこと。これらのそれぞれが全体において参照によって本明細書中に組み込まれる)。

【0190】

細胞を含まない呈示実体には、タンパク質を呈示するリボソームが含まれる (これは、

10

20

30

40

50

Mingyue HeおよびMichael J. Tauszig、2002、リボソームディスプレイ：無細胞タンパク質ディスプレイ技術、Briefings in functional genomics and proteomics、第1巻：204～212；Patrick Dufner他、2006、ファージディスプレイおよびリボソームディスプレイを抗体最適化のために利用する、Trends in Biotechnology、第24巻：523～529に記載される。これらのそれぞれが全体において参照によって本明細書中に組み込まれる）。

#### 【0191】

ペプチボディーは、抗体（例えば、IgG抗体、IgA抗体、IgD抗体、IgE抗体、IgM抗体）のFcドメインまたはFcドメインのフラグメントに結合させられる抗原（例えば、CDR）に結合することができる少なくとも1つのペプチドを含む単離されたポリペプチドである。ペプチボディーは、互いに同じであり得るか、または、互いに異なり得る、抗原に結合することができる2つ以上のペプチド（例えば、2つのペプチド、3つのペプチド、4つのペプチドまたは5つのペプチド）を含むことができる。

10

#### 【0192】

本明細書で使用される用語「抗体」は、完全な抗体分子、並びにその機能的なフラグメント、例えば、マクロファージに結合することができるFab、F(ab')<sub>2</sub>およびFvなどを含む。これらの機能的な抗体フラグメントは次のように定義される：（1）Fabは、抗体分子の一価の抗原結合性フラグメントを含有するフラグメントであり、完全な抗体を酵素パインで消化して、無傷の軽鎖と、一方の重鎖の一部とを生じさせることによって作製することができる；（2）Fab'は、完全な抗体をペプシンで処理し、その後、還元して、無傷の軽鎖と、重鎖の一部とを生じさせることによって得ることができる抗体分子のフラグメントである；2つのFab'フラグメントが1つの抗体分子あたり得られる；（3）(Fab')<sub>2</sub>は、その後の還元を行うことなく、完全な抗体を酵素ペプシンで処理することによって得ることができる抗体のフラグメントである；F(ab')<sub>2</sub>は、2つのジスルフィド結合によって一緒にされた2つのFab'フラグメントのダイマーである；（4）Fvは、2つの鎖として発現された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメントとして定義される；（5）単鎖抗体（「SCA」）は、遺伝子的に融合された単一鎖分子として好適なポリペプチドリンカーによって連結されて、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子である；（6）CDRペプチドは単一の相補性決定領域（CDR）をコードするペプチドである；そして（7）単ドメイン抗体（ナノボディとも称される）は、特定の抗原に選択的に結合する、遺伝子操作された単一モノマー可変抗体ドメインである。ナノボディは、12～15kDaの分子量しか有さず、普通の抗体（150～160kDa）よりずっと小さい。

20

30

#### 【0193】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗原結合ドメインは、配列番号43～配列番号45および配列番号37～配列番号39によって示されるCDR（それぞれ、G3H8の重鎖および軽鎖のCDR1～CDR3）、ならびに、配列番号55～配列番号57および配列番号49～配列番号51によって示されるCDR（それぞれ、G1H12の重鎖および軽鎖のCDR1～CDR3）の群から選択される相補性決定領域（CDR）を含む。

40

#### 【0194】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体並びにそれらのフラグメントの産生方法は、当業者には周知である（例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照されたい。この文献は、参照によって本明細書中に組み込まれる）。

#### 【0195】

本発明による抗体フラグメントは、抗体のタンパク質分解的加水分解によって、またはフラグメントをコードするDNAの大腸菌もしくは哺乳動物細胞（例えばチャイニーズハ

50

ムスター卵巣細胞培養または他のタンパク質発現系)中での発現によって調製されることができる。抗体フラグメントは、従来の方法による完全な抗体のペプシン消化またはパバイン消化によって得ることができる。例えば、抗体フラグメントを、抗体をペプシンで酵素切断して、 $F(ab')_2$ として示される5Sフラグメントを得ることによって製造することができる。このフラグメントは、3・5SのFab'一価フラグメントを製造するために、チオール還元剤、および場合により、ジスルフィド連結の切断から生じるスルフィドリル基に対する保護基を使用してさらに切断することができる。あるいは、ペプシンを使用する酵素切断により、2つの一価Fab'フラグメントおよびFcフラグメントが直接的に得られる。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4036945号および同第4331647号、ならびにそれらに含まれる参考文献に記載されている(それらの特許は本明細書によりその全体が参照により組み込まれる)。また、Porter, R. R., Biochem. J., 73: 119~126、1956も参照のこと。抗体を切断する他の方法、例えば、一価の軽鎖-重鎖フラグメントを形成させるための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、または他の酵素的、化学的もしくは遺伝学的な技術などもまた、フラグメントが、無傷の抗体によって認識される抗原に結合する限り、使用することができる。

#### 【0196】

Fvフラグメントは $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖の会合を含む。この会合は、Inbar他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、69: 2659~62、1972に記載されているように非共有結合性であり得る。あるいは、可変鎖を、分子間ジスルフィド結合によって連結することができ、または、グルタルアルデヒドなどの化学剤によって架橋することができる。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリinkerによってつながれた $V_H$ 鎖および $V_L$ 鎖を含む。これらの単鎖抗原結合タンパク質(sFv)は、オリゴヌクレオチドによりつながれた $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。この構造遺伝子は発現ベクターに導入され、続いて、発現ベクターは大腸菌などの宿主細胞に導入される。組換え宿主細胞により、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一ポリペプチド鎖が合成される。sFvを製造するための様々な方法が、例えば、WhitlowおよびFilpula、Methods、2: 97~105、1991; Bird他、Science、242: 423~426、1988; Pack他、Bio/Technology、11: 1271~77、1993; 米国特許第4946778号(これは本明細書によりその全体が参照により組み込まれる)によって記載されている。

#### 【0197】

CDRペプチド(「最小認識ユニット」)は、目的とする抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。そのような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって調製される。例えば、LarrickおよびFry、Methods、2: 106~10、1991を参照のこと。

#### 【0198】

本発明のいくつかの実施形態によれば、抗体は、多価形態、例えば、四量体Fab、IgM抗体またはIgG1抗体などであり、したがって、標的に対するより大きいアビディティを有する多価組成物を形成する。

#### 【0199】

ヒトの治療または診断のためにはヒト化された抗体を用いることが好ましいことは理解されるであろう。非ヒト(例えば、ネズミ)抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、または抗体の他の抗原結合性の部分配列など)のキメラ分子である。ヒト化抗体には、レシピエントの相補性決定領域(CDR)に由来する残基が、所望する特異性、親和性および能力を有する、マウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRに由来する残基によ

10

20

30

40

50

って置換されているヒト免疫グロブリンレシピエント抗体が含まれる。場合により、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても、あるいは取り込まれたCDR配列またはフレームワーク配列においても、そのいずれにも見出されない残基を含むことができる。一般に、ヒト化抗体は、実質的にはすべての可変ドメインまたは1つ以上の（典型的には2つ）可変ドメインを含み、この場合、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域（Fc）の一部を、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の一部を少なくとも含む [Jones 他、Nature、321:522~525 (1986); Riechmann 他、Nature、332:323~329 (1988); Presta、Curr. Op. Struct. Biol.、2:593~596 (1992)]。

10

**【0200】**

非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法がこの技術においては広く知られている。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、輸入残基と呼ばれており、この輸入残基は、典型的には、輸入可変ドメインに由来する。ヒト化は、齧歯類のCDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに使用することによって、Winterおよび共同研究者の方法に従って本質的には行うことができる [Jones 他、Nature、321:522~525 (1986); Riechmann 他、Nature、332:323~327 (1988); Verhoeyen 他、Science、239:1534~1536 (1988)]。従って、そのようなヒト化抗体は、実質的に完全でないヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体である（米国特許第4816567号）。実際、ヒト化抗体は典型的にはヒト抗体であり、この場合、一部のCDR残基およびおそらくは一部のFR残基が、齧歯類抗体における類似部位に由来する残基によって置換される。

20

**【0201】**

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー [HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol.、227:381 (1991); Marks 他、J. Mol. Biol.、222:581 (1991)] を含む、この分野で知られている様々な技術を使用して製造することができる。Cole 他およびBoerner 他は技術もまた、ヒトモノクローナル抗体を調製するために利用することができる [Cole 他、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁 (1985); Boerner 他、J. Immunol.、147(1):86~95 (1991)]。同様に、ヒト抗体を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されている遺伝子組換え動物（例えば、マウス）に導入することによって作製することができる。抗原投与したとき、ヒト抗体の産生が認められ、この場合、その産生は、遺伝子再配置、組み立ておよび抗体レパトリーを含むすべての点に関してヒトにおいて見られる産生と非常に似ている。この方法は、例えば、米国特許第5545807号、同第5545806号、同第5569825号、同第5625126号、同第5633425号、同第5661016号、および下記の科学的刊行物：Marks 他、Bio/Technology、10、779~783 (1992); Lonberg 他、Nature、368:856~859 (1994); Morrison、Nature、368:812~13 (1994); Fishwild 他、Nature Biotechnology、14:845~51 (1996); Neuberger、Nature Biotechnology、14:826 (1996); Lonberg および Huszar、Intern. Rev. Immunol.、13:65~93 (1995) に記載されている。

30

40

**【0202】**

50



(対象において、例えば、ヒトにおいて投与するための)インビボ使用のために、ヒト抗体またはヒト化抗体は一般に、非ヒト起源の抗体よりも良好に免疫学的に許容される傾向を有するであろう。これは、非ヒト抗体の非可変部分により、典型的には個体と同種であろうヒト抗体によって誘発される同種免疫応答よりも強力な異種免疫応答が誘発されやすいであろうからである。そのような免疫応答を最小限にすることが好ましいであろう。これは、このような免疫応答は、個体における抗体の半減期を短くし、したがって、その有効性を縮める傾向を有するであろうからである。さらには、そのような免疫応答は、例えば、有害な炎症反応を誘発することによって、個体にとって病原性であるかもしれない。

#### 【0203】

代替において、ヒト起源の抗体またはヒト化抗体はまた、個体において抗体の定常領域によって活性化される機能的な生理学的機能(例えば、標的細胞に対する免疫応答)が所望される様々な適用(例えば、標的化された細胞殺傷など)のために好都合であろう。これらの場合において、抗体の機能的部分(例えば、Fc領域など)と、それと相互作用する分子(例えば、Fc受容体またはFc結合性の補体成分など)とが、類似する起源(例えば、ヒト起源)であるとき、最適な機能的相互作用が生じる。

#### 【0204】

適用および目的に依存して、本発明の抗体を用いることができる。これは、本発明の抗体が様々なイソ型のいずれかの定常領域またはその一部分を含むからである。本発明のいくつかの実施形態によれば、イソ型は、所望される生理学的影響を可能にするように、または阻害するように、あるいは、定常領域またはその一部分を介した抗体の望まれない特異的結合を阻害するように選択される。例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞による抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)を誘導するためには、イソ型はIgGが可能である;マスト細胞/好塩基球によるADCCを誘導するためには、イソ型はIgEが可能である;また、好酸球によるADCCを誘導するためには、イソ型はIgEまたはIgAが可能である。補体カスケードを誘導するために、抗体は、そのカスケードを開始させることができる定常領域またはその一部分を含むことができる。例えば、抗体は、C1q媒介による補体カスケードを誘発するためにIgGのCγ2ドメインまたはIgMのCμ3ドメインを含むことが好都合であるかもしれない。

#### 【0205】

逆に、免疫応答(例えば、上述の免疫応答など)を回避するために、あるいは、定常領域またはその一部分を介した特異的結合を回避するために、本発明の抗体は、関連のあるイソ型の(補体活性化のために要求される)定常領域、その一部分または特定のグリコシル化部位を含んでいなくもよい(そのような定常領域を欠いていてもよい)。

#### 【0206】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態のMHCクラスII-GAD抗原性ペプチドの単離された複合体と特異的に結合することができる抗原結合ドメインを含む単離された抗体が提供される。単離された抗体は抗原性ペプチドの非存在下でのMHCクラスIIには結合せず、かつ、単離された抗体はMHCクラスIIの非存在下での抗原性ペプチドには結合しない。

#### 【0207】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明のいくつかの実施形態の抗体は、約100ナノモル濃度以下である解離定数、例えば、約50ナノモル濃度以下である解離定数、例えば、約20ナノモル濃度以下である解離定数、例えば、約10ナノモル濃度以下である解離定数によって特徴づけられる親和性により標的複合体(MHCクラスII-GAD自己抗原)に結合する。

#### 【0208】

抗体のCDRが特定されると、従来の遺伝子操作技術を使用して、本明細書中に記載される抗体の各種形態または各種フラグメントのいずれかをコードする発現可能なポリヌクレオチドを、様々な関連した製造物を製造するために多くの方法のいずれかで合成し、改

10

20

30

40

50

変することができる。

#### 【0209】

例えば、本発明の高親和性実体（例えば、本発明の抗体）を作製するために、本発明の抗体のアミノ酸配列〔例えば、配列番号37（G3H8 Abの軽鎖のCDR1）、配列番号38（G3H8 Abの軽鎖のCDR2）、配列番号39（G3H8 Abの軽鎖のCDR3）、配列番号43（G3H8 Abの重鎖のCDR1）、配列番号44（G3H8 Abの重鎖のCDR2）、配列番号45（G3H8 Abの重鎖のCDR3）、配列番号1（G3H8 Abの軽鎖のアミノ酸配列、図6A）または配列番号3（G3H8 Abの重鎖のアミノ酸配列、図6C）〕をコードする単離されたポリヌクレオチド配列〔例えば、配列番号40（G3H8 Abの軽鎖のCDR1）、配列番号41（G3H8 Abの軽鎖のCDR2）、配列番号42（G3H8 Abの軽鎖のCDR3）、配列番号46（G3H8 Abの重鎖のCDR1）、配列番号47（G3H8 Abの重鎖のCDR2）、配列番号48（G3H8 Abの重鎖のCDR3）、配列番号2（G3H8 Abの軽鎖をコードする核酸配列、図6B）または配列番号4（G3H8 Abの重鎖をコードする核酸配列、図6D）〕が好ましくは、宿主細胞における発現のために好適な核酸構築物（発現ベクター）に連結される。そのような核酸構築物は、細胞におけるポリヌクレオチド配列の転写を構成的または誘導可能な様式で行わせるためのプロモーター配列を含む。

10

#### 【0210】

本発明の核酸構築物はまた、エンハンサー、転写開始配列および翻訳開始配列、転写ターミネーターおよび翻訳ターミネーター、ならびに、ポリアデニル化シグナル、5'LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、第2鎖DNA合成の起点、ならびに、3'LTR、または、それらの一部；抗体ポリペプチドを宿主細胞から分泌させるためのシグナル配列；さらなるポリヌクレオチド配列、例えば、数個のタンパク質をただ1つのmRNAから翻訳することを可能にする配列（例えば、内部リボソーム進入部位（IRES））、および、プロモーターキメラなポリペプチドのゲノム組み込みのための配列；発現ペプチドの安定性、産生、精製、収率または毒性を高めるために操作される配列を含むことができる。

20

#### 【0211】

哺乳動物発現ベクターの例には、pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBb、pNMT1、pNMT41、pNMT81（これらはInvitrogenから入手可能である）、pCI（これはPromegaから入手可能である）、pMbac、pPbac、pBK-RSVおよびpBK-CMV（これらはStratageneから入手可能である）、pTRES（これはClontechから入手可能である）、ならびに、それらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0212】

真核生物ウイルス（例えば、レトロウイルスなど）に由来する調節エレメントを含有する発現ベクターもまた使用することができる。SV40ベクターには、pSVT7およびpMT2が含まれる。ウシ乳頭腫ウイルスに由来するベクターには、pBV-1MTHAが含まれ、エプスタイン・パールウイルスに由来するベクターには、pHEBOおよびp205が含まれる。他の例示的なベクターには、pMSG、pAV009/A<sup>+</sup>、pMT010/A<sup>+</sup>、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、および、SV-40初期プロモーター、SV-40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳腫瘍ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または、真核生物細胞における発現のために効果的であることが示されている他のプロモーターの命令のもとでのタンパク質の発現を可能にする任意の他のベクターが含まれる。

40

#### 【0213】

50

様々な方法を、本発明の核酸構築物を細胞に導入するために使用することができる。そのような方法が、一般には、Sambrook他、Molecular Cloning : A Laboratory Manual、Cold Springs Harbor Laboratory、New York (1989、1992) ; Ausubel他、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley and Sons、Baltimore、Md. (1989) ; Chang他、Somatic Gene Therapy、CRC Press、Ann Arbor、Mich. (1995) ; Vega他、Gene Targeting、CRC Press、Ann Arbor Mich. (1995) ; Vectors : A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses、Butterworths、Boston Mass. (1988) ; および、Gilboa他 [Biotechniques 4 (6) : 504 ~ 512、1986] に記載され、そのような方法には、例えば、組換えウイルスベクターを用いた安定的トランスフェクション、一過性トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび感染が含まれる。加えて、陽性 - 陰性の選択法については米国特許第5464764号および同第5487992号を参照のこと。

10

20

30

40

50

#### 【0214】

組換えウイルスベクターは、様々な利点（例えば、潜伏感染および標的化特異性など）を提供するため、インビボ発現のために有用である。ウイルス感染による核酸の導入は、リポフェクションやエレクトロポレーションなどの他の方法と比べていくつかの利点を提供する。なぜなら、ウイルスの感染性の性質のため、高いトランスフェクション効率を得られるからである。

#### 【0215】

現在好ましいインビボ核酸移入技術では、ウイルス構築物または非ウイルス構築物（例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルスまたはアデノ関連ウイルス（AAV）、および、脂質に基づく系など）によるトランスフェクションが含まれる。遺伝子の脂質媒介による移入のための有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPEおよびDC-Cholである [Tonkinson他、Cancer Investigation、14 (1) : 54 ~ 65 (1996)]。遺伝子治療において使用される最も好ましい構築物はウイルスであり、最も好ましくは、アデノウイルス、AAV、レンチウイルスまたはレトロウイルスである。

#### 【0216】

上述のように、様々な原核生物細胞または真核生物細胞が、本発明の抗体を発現させるための宿主発現システムとして使用され得ることが理解される。これらには、微生物（例えば、コード配列を含有する組換えられたバクテリオファージDNA発現ベクター、プラスミドDNA発現ベクターまたはコスミドDNA発現ベクターにより形質転換された細菌など）；コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターにより形質転換された酵母；コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、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）を感染させた植物細胞システム、または、コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミドなど）により形質転換された植物細胞システムが含まれるが、これらに限定されない。哺乳動物発現システムもまた、本発明のポリペプチドを発現させるために使用することができる。

#### 【0217】

組換え抗体ポリペプチドの回収が培養での適切な時間の後で行われる。表現「組換えポリペプチドを回収する」は、ポリペプチドを含有する発酵培地全体を集めることを示し、分離または精製のさらなる工程を意味する必要はない。上記にかかわらず、本発明の抗体ポリペプチドは、様々な標準的なタンパク質精製技術を使用して、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ろ過、電気泳動、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、コンカナバリンAクロマトグラフィー、クロマトフォーカシングおよび示差的可溶化などを使用

して精製することができる。

【0218】

本発明のいくつかの実施形態の一面によれば、機能的成分（例えば、検出可能成分または治療成分など）にコンジュゲートされる本発明の高親和性実体（例えば、抗体）を含む分子（これはまた、「免疫コンジュゲート」として示される）が提供される。免疫コンジュゲート分子は、単離された分子が可能であり、例えば、可溶性分子または合成分子などが可能である。

【0219】

様々なタイプの検出可能成分またはレポーター成分を本発明の高親和性実体（例えば、本発明の抗体）にコンジュゲートすることができる。これらには、放射性同位体（例えば、<sup>125</sup>Iヨウ素など）、リン光性化学物質、化学発光性化学物質、蛍光性化学物質（蛍光団）、酵素、蛍光性ポリペプチド、親和性タグ、および、陽電子放射断層撮影法（PET）または磁気共鳴画像化（MRI）によって検出可能な分子（造影剤）が含まれるが、これらに限定されない。

【0220】

好適な蛍光団の例には、フィコエリトリン（PE）、フルオレセインイソチオシアナート（FITC）、Cy-クロム、ローダミン、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）、テキサスレッドおよびPE-Cy5などが含まれるが、これらに限定されない。蛍光団選択、蛍光団を様々なタイプの分子に連結する方法に関するさらなる指針については、下記を参照のこと：Richard P. Haugland、“Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994”、第5版、Molecular Probes, Inc. (1994)；米国特許第6037137号（Oncoimmunin Inc.）；Hermanson、“Bioconjugate Techniques”、Academic Press New York, N.Y. (1995)；Kay M. 他、1995、Biochemistry、34:293；Stubbs 他、1996、Biochemistry、35:937；Gakamsky D. 他、「受容体の化学量論を蛍光共鳴エネルギー転移によって評価する」、「Receptors: A Practical Approach」、第2版、Stanford C. および Horton R. (編)、Oxford University Press、UK (2001)；米国特許第6350466号（Targetome, Inc.）。蛍光性の検出可能成分にコンジュゲートされたときの高親和性実体（例えば、抗体）を検出するために使用することができる蛍光検出方法には、例えば、蛍光活性化フローサイトメトリー（FACS）、免疫蛍光共焦点顕微鏡法、蛍光インシトゥーハイブリダイゼーション（FISH）および蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）が含まれる。

【0221】

数多くのタイプの酵素を本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体（例えば、抗体）に結合させてもよく [例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HPR）、ベータ-ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼ（AP）]、酵素コンジュゲート化抗体の検出を、この技術分野で知られているELISA（例えば、溶液中）、酵素結合免疫組織化学アッセイ（例えば、固定処理された組織において）、酵素結合化学発光アッセイ（例えば、電気泳動で分離されたタンパク質混合物において）または他の方法を使用して行うことができる [例えば、Khatkhatay MI. および Desai M.、1999、Immunoassay、20:151~83；Wisdom GB.、1994、Methods Mol Biol、32:433~40；Ishikawa E. 他、1983、J Immunoassay、4:209~327；Oellerich M.、1980、J Clin Chem Clin Biochem、18:197~208；Schuurs AH. および van Weemen BK.、1980、J Immunoassay、1:229~49を参照のこと]。

## 【0222】

親和性タグ（または結合対のメンバー）は、対応する抗体によって特定可能な抗原〔例えば、抗DIG抗体によって特定されるジゴキシゲニン（DIG）〕、または、タグに対する大きい親和性を有する分子〔例えば、ストレプトアビジンおよびビオチン〕が可能である。親和性タグと結合する抗体または分子は上記のように蛍光標識することができ、または、上記のような酵素にコンジュゲートすることができる。

## 【0223】

様々な方法がこの技術分野では広く実施されるが、これらを、ストレプトアビジン分子またはビオチン分子を本発明の抗体に結合させるために用いることができる。例えば、ビオチン分子を、下記の実施例の節で記載されるように、また、Denkberg G. 他、2000、Eur. J. Immunol.、30:3522~3532に記載されるように、ビオチンタンパク質リガーゼ（例えば、BirA）の認識配列を介して本発明の抗体に結合させることができる。代替において、ストレプトアビジン分子を、本質的には下記に記載されるように、抗体フラグメント（例えば、単鎖Fvなど）に結合させることができる：Cloutier SM. 他、2000、Molecular Immunology、37:1067~1077；Dubel S. 他、1995、J Immunol Methods、178:201；Huston JS. 他、1991、Methods in Enzymology、203:46；Kipriyanov SM. 他、1995、Hum Antibodies Hybridomas、6:93；Kipriyanov SM. 他、1996、Protein Engineering、9:203；Pearce LA. 他、1997、Biochem Molec Biol Intl、42:1179~1188。

10

20

## 【0224】

ストレプトアビジンにコンジュゲートされる様々な機能的成分（例えば、蛍光団など）が免疫蛍光フローサイトメトリー試薬の本質的にすべての主要な供給者から市販されている（例えば、PharmingenまたはBecton-Dickinson）。

## 【0225】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ビオチンコンジュゲート化抗体が、多価組成物（例えば、抗体の二量体形態または四量体形態）を形成するためにストレプトアビジン分子に結合させられる。

30

## 【0226】

表1には、本発明の抗体にコンジュゲートすることができる特定可能な成分の限定されない例が提供される。

表1

特定可能な成分	アミノ酸配列 (GenBank アクセション番号) / 配列番号	核酸配列 (GenBank アクセション番号) / 配列番号
緑色蛍光タンパク質	AAL33912 / 68	AF435427 / 69
アルカリホスファターゼ	AAK73766 / 70	AY042185 / 71
ペルオキシダーゼ	CAA00083 / 72	A00740 / 73
ヒスチジンタグ	GenBank アクセション番号 AAK09208 / 74 のアミノ酸 264-269	GenBank アクセション番号 AF329457 / 75 の ヌクレオチド 790-807
Mycタグ	GenBank アクセション番号 AAK09208 / 74 のアミノ酸 273-283	GenBank アクセション番号 AF329457 / 75 の ヌクレオチド 817-849
ビオチンリガーゼタグ	LHHILDAQK <u>M</u> VWNHR / 102	
オレンジ色蛍光タンパク質	AAL33917 / 78	AF435432 / 79
ペーターガラクトシダーゼ	ACH42114 / 80	EU626139 / 81
ストレプトアビジン	AAM49066 / 82	AF283893 / 83

表1

10

20

## 【 0 2 2 7 】

述べられたように、高親和性実体（例えば、抗体）は治療成分にコンジュゲートすることができる。治療成分は、例えば、細胞毒性成分、毒性成分、サイトカイン成分、および、本発明の抗体に対する異なる特異性を含む第2の抗体成分が可能である。

## 【 0 2 2 8 】

本発明の高親和性実体（例えば、抗体）にコンジュゲートすることができる治療成分の限定されない例が本明細書中下記の表2に提供される。

30

表2

治療成分	アミノ酸配列 (GenBank アクセション番号) / 配列番号	核酸配列 (GenBank アクセション番号) / 配列番号
シュードモナス外毒素	ABU63124 / 84	EU090068 / 85
ジフテリア毒素	AAV70486 / 86	AY820132.1 / 87
インターロイキン2	CAA00227 / 88	A02159 / 89
CD3	P07766 / 90	X03884 / 91
CD16	NP_000560.5 / 92	NM_000569.6 / 93
インターロイキン4	NP_000580.1 / 94	NM_000589.2 / 95
HLA-A2	P01892 / 96	K02883 / 97
インターロイキン10	P22301 / 98	M57627 / 99
リシン毒素	EEF27734 / 100	EQ975183 / 101

表2

40

## 【 0 2 2 9 】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、毒性成分は P E 3 8 K D E L である（タンパク質については配列番号 7 6、核酸については配列番号 7 7）。

【 0 2 3 0 】

機能的成分（本発明の検出可能成分または治療成分）は、状況、適用および目的に依存して、様々な方法で本発明の高親和性実体（例えば、抗体）に結合させることができ、またはコンジュゲートすることができる。

【 0 2 3 1 】

機能的成分がポリペプチドであるとき、免疫コンジュゲートは組換え手段によって製造することができる。例えば、毒素（例えば、P E 3 8 K D E L）または蛍光タンパク質 [ 10  
例えば、緑色蛍光タンパク質（G F P）、赤色蛍光タンパク質（R F P）または黄色蛍光タンパク質（Y F P）] をコードする核酸配列を、本発明の高親和性実体（例えば、抗体）をコードする核酸配列と読み枠を合わせて連結し、組換えコンジュゲート化抗体を産生させるために宿主細胞において発現させることができる。代替において、機能的成分は、例えば、定義された順序での 1 つまたは複数のアミノ酸残基の段階的付加によって、例えば、固相ペプチド合成技術などによって化学合成することができる。

【 0 2 3 2 】

機能的成分はまた、この技術分野で広く実施される標準的な化学合成技術 [ 20  
例えば、`hypertexttransferprotocol://worldwideweb(dot)chemistry(dot)org/portal/Chemistry` を参照のこと] を使用して、例えば、（機能的成分がポリペプチドであるときには）ペプチド結合を介するように、あるいは、介在するリンカー要素、例えば、リンカーペプチドまたは他の化学的成分（例えば、有機ポリマーなど）などへの共有結合による結合を介するように、直接的または間接的であれ、何らかの好適な化学的連結を使用するなどして本発明の高親和性実体（例えば、抗体）に結合させることができる。キメラなペプチドを、ペプチドのカルボキシ（C）末端またはアミノ（N）末端での結合を介して、あるいは、内部の化学基（例えば、直鎖状の側鎖、分岐した側鎖または環状の側鎖、ならびに、内部の炭素原子または窒素原子など）への結合を介して連結することができる。抗体の蛍光標識化の記載が、米国特許第 3 9 4 0 4 7 5 号、同第 4 2 8 9 7 4 7 号および同第 4 3 7 6 1 1 0 号に詳しく提供される。

【 0 2 3 3 】

ペプチド成分（治療成分または検出可能成分）を本発明の高親和性実体（例えば、抗体）にコンジュゲートするための例示的な方法が本明細書中下記に記載される。

【 0 2 3 4 】

S P D P によるコンジュゲート化 - S P D P によるコンジュゲート化方法の限定されない一例が、C u m b e r 他（1 9 8 5、Methods of Enzymology、1 1 2 : 2 0 7 ~ 2 2 4）に記載される。簡単に記載すると、ペプチド（例えば、検出可能成分または治療成分など）（例えば、1 . 7 m g / m l）を 1 0 倍過剰の S P D P（エタノールにおける 5 0 m M）と混合し、抗体を、2 0 m M リン酸ナトリウム、0 . 1 0 M N a C l（p H 7 . 2）における 2 5 倍過剰の S P D P と混合し、反応液のそれぞれを室温で約 3 時間インキュベーションする。その後、反応液を P B S に対して透析する。ペプチドを、例えば、室温で 1 時間、5 0 m M の D T T により還元する。還元されたペプチドを、5 0 m M K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>（p H 6 . 5）との G - 2 5 カラムでの平衡化によって脱塩する（カラム体積あたり 5 % までのサンプル）。還元されたペプチドを 1 : 1 0 の抗体 : ペプチドのモル比で S P D P - 抗体と一緒にし、4 で一晩インキュベーションして、ペプチド - 抗体コンジュゲートを形成させる。

【 0 2 3 5 】

グルタルアルデヒドによるコンジュゲート化 - グルタルアルデヒドによるコンジュゲート化方法の限定されない一例が、G . T . H e r m a n s o n（1 9 9 6、Antibody Modification and Conjugation in Biocconjugate Techniques、Academic Press、San Di 50

e g o ) に記載される。簡単に記載すると、抗体およびペプチド ( 1 . 1 m g / m l ) を、 0 . 1 M リン酸塩、 0 . 1 5 M N a C l ( p H 6 . 8 ) における 0 . 0 5 % グルタルアルデヒドと 1 0 倍過剰で混合し、室温で 2 時間反応させる。 0 . 0 1 M のリシンを、過剰な部位をふさぐために加えることができる。反応後、過剰なグルタルアルデヒドを、P B S により平衡化される G - 2 5 カラムを使用して除く ( カラム体積あたり 1 0 % ( v / v ) のサンプル ) 。

#### 【 0 2 3 6 】

カルボジイミドによるコンジュゲート化 - 抗体とのペプチドのコンジュゲート化を、例えば、4 - ジメチルアミノピリジンの存在下、脱水剤 ( 例えば、カルボジイミドなど ) を使用して達成することができる。カルボジイミドによるコンジュゲート化を、ペプチドのカルボキシル基と、( エステル結合の形成をもたらす ) 抗体のヒドロキシル基との間における共有結合、または、( アミド結合の形成をもたらす ) 抗体のアミノ基との間における共有結合、または、( チオエステル結合の形成をもたらす ) 抗体のスルフヒドリル基との間における共有結合を形成させるために使用することができる。同様に、カルボジイミドによるカップリングを、抗体の炭素基と、ペプチドのヒドロキシル基、アミノ基またはスルフヒドリル基との間における類似した共有結合を形成させるために使用することができる [ J . M a r c h , A d v a n c e d O r g a n i c C h e m i s t r y : R e a c t i o n ' s M e c h a n i s m , a n d S t r u c t u r e ( 3 4 9 頁 ~ 5 0 頁 & 3 7 2 頁 ~ 7 4 頁 ( 第 3 版 ) 、 1 9 8 5 ) を参照のこと ] 。例えば、ペプチドを、カルボジイミドを使用して、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどを使用して共有結合により抗体にコンジュゲートすることができる [ B . N e i s e s 他 ( 1 9 7 8 ) 、 A n g e w C h e m . , I n t . E d . E n g l . , 1 7 : 5 2 2 ; A . H a s s n e r 他 ( 1 9 7 8 ) 、 T e t r a h e d r o n L e t t . , 4 4 7 5 ; E . P . B o d e n 他 ( 1 9 8 6 ) 、 J . O r g . C h e m . , 5 0 : 2 3 9 4 ; および L . J . M a t h i a s ( 1 9 7 9 ) 、 S y n t h e s i s , 5 6 1 ] 。

#### 【 0 2 3 7 】

上述のように、また、下記の実施例の節においてさらに例示されるように、本発明のいくつかの実施形態による単離された高親和性実体 ( 例えば、抗体 ) は、M H C クラス I I と糖尿病関連自己抗原 ( 例えば、G A D 自己抗原性ペプチド ) との複合体を抗原提示細胞 ( A P C ) ( 例えば、樹状細胞、マクロファージおよび B 細胞など ) の表面において検出するために使用することができる。

#### 【 0 2 3 8 】

したがって、本発明のいくつかの実施形態の一面によれば、G A D 自己抗原性ペプチドの細胞における提示を検出する方法が提供される。この方法は、細胞を、免疫複合体の形成を許す条件のもと、本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体、本発明のいくつかの実施形態の分子、または、本発明のいくつかの実施形態の抗体と接触させることによって行われ、ただし、免疫複合体の所定の閾値を超える存在またはレベルが糖尿病関連自己抗原性ペプチドの細胞における提示を示している。

#### 【 0 2 3 9 】

G A D 自己抗原性ペプチド ( 例えば、G A D 抗原 ) を提示する細胞は、任意の有核細胞 ( 例えば、血液、脾臓およびリンパ系器官 ( 例えば、胸腺、骨髄、リンパ節およびリンパ濾胞など ) における抗原提示細胞 ( A P C ) など ) であり得る。

#### 【 0 2 4 0 】

細胞を本発明の高親和性実体 ( 例えば、抗体 ) / 分子または多価組成物と接触させることを、インビトロ ( 例えば、細胞株において ) 、エキスビボまたはインビボで行うことができる。

#### 【 0 2 4 1 】

述べられたように、本発明の方法は、免疫複合体を形成させるために十分な条件のもとで行われる ; そのような条件 ( 例えば、適切な濃度、緩衝液、温度、反応時間 ) 、同様にまた、そのような条件を最適化するための方法が当業者には知られており、また、様々な



例が本明細書中に開示される。

【0242】

本明細書中で使用される場合、表現「免疫複合体」は、本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体（例えば、抗体）と、MHCクラスII-GAD自己抗原性ペプチド（例えば、GADペプチド）とを含む複合体を示す。本発明の免疫複合体の存在またはレベルを明らかにすることが、高親和性実体（例えば、抗体）が結合させられる検出可能成分を使用して行われ、また、本発明の免疫複合体の存在またはレベルを明らかにすることを、この技術分野で知られている様々な方法および本明細書中に記載される様々な方法を使用して行うことができる。

【0243】

本発明の免疫複合体の存在またはレベルを明らかにすることが、高親和性実体（例えば、抗体）が結合させられる検出可能成分を使用して行われ、また、本発明の免疫複合体の存在またはレベルを明らかにすることを、この技術分野で知られている様々な方法および本明細書中に記載される様々な方法を使用して行うことができる。

【0244】

試験された細胞（例えば、その必要性のある対象の細胞）における免疫複合体のレベルが所定の閾値に対して比較される。閾値は、知られている参照レベルおよび/またはコントロール細胞におけるレベルに基づいて決定することができる。コントロール細胞は、コントロールの健康な対象（例えば、糖尿病と診断されない対象、または、糖尿病についての危険性がない対象）から得ることができ、あるいは、MHC-ペプチド複合体を形成する特異的なMHC分子（例えば、DR4）を有しない対象から得ることができる。本発明のいくつかの実施形態によれば、コントロールの対象は、その必要性のある対象と同じ年齢、体重、性別などにより好ましくは一致する、その必要性のある対象と同じ生物種（例えば、ヒト）である。

【0245】

したがって、本発明の教示は、GAD自己抗原性ペプチドを提示する細胞（例えば、GAD提示細胞）を対象の生物学的サンプルにおいて検出するために使用することができる。

【0246】

本明細書中で使用される場合、表現「GAD自己抗原性ペプチドを提示する細胞」は、どのような細胞またはその一部分であれ、MHCクラスIIと、MHC拘束のGAD自己抗原性ペプチドとの複合体を呈示する対象の細胞またはその一部分を示す。

【0247】

生物学的サンプルは、どのようなサンプルであれ、MHCクラスII-GAD自己抗原性ペプチド複合体を提示すると推定される細胞またはその一部分（例えば、細胞破片、膜、小胞）を含有するサンプルが可能である。

【0248】

本発明のいくつかの実施形態によれば、対象は、1型糖尿病を発症する危険性がある。1型糖尿病を発症する危険性がある対象の限定されない例には、HLA-DRB1\*03、DRB1\*04；DQB1\*0302遺伝子型、ならびに、DR3-DR2ハプロタイプおよびDR4-DR8ハプロタイプを有する対象が含まれる。

【0249】

1型糖尿病は膵臓のインスリン産生ベータ細胞の自己免疫性破壊から生じ、これにより、インスリンの不足が引き起こされ、その後、増大した血中グルコースおよび尿中グルコースが引き起こされる。古典的症状には、多尿（頻繁な排尿）、多飲（増大した渇き）、多食（増大した空腹）および体重減少が含まれる。

【0250】

今日まで、1型糖尿病の診断は、下記のうちのいずれか1つを明らかにすることによって行われている：7.0 mmol/L（126 mg/dL）以上の空腹時血漿グルコースレベル；ブドウ糖負荷試験でのような75 g経口グルコース負荷後2時間における11.

10

20

30

40

50

1 mmol / L ( 200 mg / dL ) 以上の血漿グルコース ; 11 . 1 mmol / L ( 200 mg / dL ) 以上の高血糖症および日常的血漿グルコースの症状 ; 6 . 5 以上の糖化ヘモグロビン ( ヘモグロビン A 1 C ) 。したがって、ほとんどの場合において、1 型糖尿病が診断されるときには、膵臓におけるベータ細胞のほとんどが破壊されている。

#### 【 0 2 5 1 】

1 型糖尿病の早期徴候には、膵島自己抗体の発達が含まれる。4 つの膵島抗原群に対する自己抗体が今のところ特定されている : インスリンまたはプロインスリン、G A D 6 5 または G A D 6 7、I A - 2 ( ホグリン ) および Z n T 8。膵島自己抗体の数、より大きい力価、親和性、および、エピトープ反応性の広さが、T 1 D の危険性に影響を及ぼす自己抗体の特徴である。家族歴情報、遺伝的要因、自己抗体、年齢およびベータ細胞機能マーカーの組合せは、経験的に計算することができる疾患リスク決定をもたらす。

10

#### 【 0 2 5 2 】

実施例の節の実施例 4 において示されるように、本発明のいくつかの実施形態の単離された抗体は、( M H C クラス I I - G A D 抗原性ペプチドを提示する ) A P C を糖尿病 B 7 / D R 4 マウスの浸潤された膵島において検出することができることが示された。そのうえ、本発明のいくつかの実施形態の単離された抗体は、A P C を糖尿病発症前の若い B 7 / D R 4 マウスの浸潤された膵島において検出することができること、したがって、1 型糖尿病を引き起こすベータ細胞破壊の早期徴候を診断することができることが示された。

#### 【 0 2 5 3 】

現在利用可能な診断ツールを使用した場合、I 型糖尿病の診断が対象において行われるとき、インスリン産生細胞の約 90 % が破壊されている ( G e p t s W .、若年性糖尿病における膵臓の病理解剖学、D i a b e t e s、1965、14 : 619 ~ 633 )。

20

#### 【 0 2 5 4 】

1 型糖尿病を疾患の早期段階で診断することは、膵臓におけるベータ細胞のすべてが破壊されているとは限らないので、非常に重要であることに留意しなければならない。したがって、1 型糖尿病の早期検出は、完全な診断が行われる前においては、ベータ細胞の完全な破壊を防止することになる臨床的な介入および処置を可能にするので、非常に重要である。

#### 【 0 2 5 5 】

抗原特異的な寛容取り組みは T 1 D の望ましい処置である。これらの開発中の処置戦略の中心は、病原因的な自己反応性 T 細胞を自己抗原特異的な様式で安全に不活性化し、一方で、免疫系の残りは乱されないままにしておくことである。免疫応答の抗原特異的性質を抗原特異的介入の前に特定することは、対象の目下の自己免疫応答のための好適な処置の調節を可能にするであろう。本発明のいくつかの実施形態の単離された抗体は、特異的な自己抗原の提示を検出することができること、したがって、自己免疫プロセスの特異的抗原性性質を特定することができることが示された。したがって、本発明の教示は、正確かつ最も好適な抗原特異的介入戦略を選択するために使用することができる。

30

#### 【 0 2 5 6 】

したがって、本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、1 型糖尿病 ( T 1 D ) を対象において診断する方法が提供される。この方法は、対象の細胞を、免疫複合体の形成を許す条件のもと、本発明のいくつかの実施形態の高親和性実体 ( 例えば、抗体 )、本発明のいくつかの実施形態の分子、または、本発明のいくつかの実施形態の多価抗体と接触させることによって行われ、ただし、細胞における免疫複合体の所定の閾値を超える存在またはレベルが対象における 1 型糖尿病を示している。

40

#### 【 0 2 5 7 】

本明細書中で使用される場合、用語「診断する」は、病状の有無を明らかにすること、病状または症状を分類すること、病状の重篤度を明らかにすること、病状の進行をモニターすること、病状の結果および / または回復の見込みを予測することを示す。

#### 【 0 2 5 8 】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、1型糖尿病の診断は、ベータ細胞の破壊が始まらないうちに、ベータ細胞が依然として機能的である（すなわち、インスリンをグルコースレベルにおける上昇に応答して産生する）ときにおいてさえ、疾患の早期徴候を検出することに関連する。

【0259】

診断を容易にするために、上記の教示は、この技術分野で広く知られている、1型糖尿病を診断する他の方法と組み合わせることができる。

【0260】

本発明者らによって示されるように、浸潤された膵島におけるAPC（樹状細胞、マクロファージなど）によるMHCクラスII-GAD抗原性ペプチド複合体の提示が疾患の早期段階で始まるので、MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの複合体を提示する細胞に特異的に結合する抗体は、1型糖尿病を処置するために使用することができる。

10

【0261】

したがって、本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、1型糖尿病（T1D）を処置する方法であって、その必要性のある対象に、治療効果的な量の本発明のいくつかの実施形態の単離された高親和性実体（例えば、抗体）、本発明のいくつかの実施形態の分子（例えば、治療成分（例えば、毒素など）にコンジュゲートされる高親和性実体を含む分子）、本発明のいくつかの実施形態のそれらを含む多価組成物、それらをコードする単離されたポリヌクレオチドまたは核酸構築物を投与し、それにより、1型糖尿病（T1D）を処置する方法が提供される。

20

【0262】

用語「処置する」は、疾患、障害または状態の発症を阻害または停止すること、および/あるいは、疾患、障害または状態の軽減、寛解または退行を引き起こすことを示す。当業者は、様々な方法論およびアッセイを、疾患、障害または状態の発症を評価するために使用することができ、また、同様に、様々な方法論およびアッセイを、疾患、障害または状態の軽減、寛解または退行を評価するために使用することができることを理解する。

【0263】

本発明のいくつかの実施形態によれば、1型糖尿病の処置が、APCにおけるMHCクラスII/GAD自己抗原性ペプチドの提示を阻止すること、したがって、特異的なT細胞による抗原提示細胞の認識を防止または回避することによって達成される。

30

【0264】

APCによるMHCクラスII-抗原性ペプチド複合体の提示を阻止することによって、これらのAPCによって誘導される炎症プロセスおよび炎症反応もまた阻止され、したがって、このことは、インスリンを産生する膵島におけるベータ細胞の破壊を軽減または解消することに留意しなければならない。

【0265】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明の単離された抗体による処置が、疾患の早期段階において、すなわち、糖尿病症状の発症の前に行われる。

【0266】

40

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明のいくつかの実施形態の単離された高親和性実体（例えば、抗体）による処置では、ベータ細胞自身のインスリン産生が温存されるので、グルコース血中レベル増大の症状、および、インスリン投与（例えば、注射による投与）のその後の必要性が防止される。

【0267】

本発明のいくつかの実施形態によれば、阻害取り組みのために、すなわち、APCにおけるMHCクラスII-I型糖尿病関連自己抗原提示（例えば、APCにおけるMHCクラスII-GAD抗原提示）を阻害するために、高親和性実体（例えば、抗体）のエフェクター機能が、高親和性実体（例えば、抗体）が抗体依存性細胞媒介性細胞障害（ADCC）活性を欠くように、または、補体依存性細胞障害（CDC）活性を欠くように操作さ

50

れる。例えば、本発明のいくつかの実施形態の抗体は、関連のあるイソ型の（補体活性化のために要求される）定常領域、その一部分または特定のグリコシル化成分を欠いている。

【0268】

加えて、または、代替において、本発明の高親和性実体（例えば、抗体）は、GAD自己抗原性ペプチドをMHCクラスIIとの複合体で提示するAPCを直接的に殺傷するために使用することができる。

【0269】

本発明のいくつかの実施形態によれば、殺傷取り組み（すなわち、MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの複合体を提示するAPCを殺傷すること）のために、単離された高親和性実体（例えば、抗体）は、ADCCまたはCDCを媒介することができる裸の高親和性実体である。

10

【0270】

本明細書中で使用される場合、用語「裸の」は、コンジュゲートされた成分（例えば、検出可能成分または治療成分など）を欠いていることを示す。

【0271】

本発明のいくつかの実施形態によれば、裸の抗体は、ADCCまたはCDCを媒介する定常領域、その一部分または特定のグリコシル化成分を含む。

【0272】

本発明のいくつかの実施形態によれば、殺傷取り組み（すなわち、MHCクラスII - GAD自己抗原性ペプチドを提示するAPCを殺傷すること）のために、単離された高親和性実体（例えば、抗体）は、MHCクラスII - GAD抗原性複合体を提示するAPCを殺傷するであろう治療成分（例えば、薬物、毒性成分）にコンジュゲートされる。

20

【0273】

本発明のいくつかの実施形態によれば、薬物は、膵島における局所的炎症の軽減または阻害を生じさせるであろう抗炎症性薬物またはサイトカインであり、したがって、インスリン産生ベータ細胞に対する損傷の解放および阻害を生じさせるであろう。

【0274】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明の単離された高親和性実体（例えば、抗体）、これを含む分子、多価抗体組成物、ポリヌクレオチドおよび/または核酸構築物は、MHCクラスII - GAD自己抗原性ペプチド（例えば、GAD）を提示する細胞をその必要性のある対象において殺傷することができる。

30

【0275】

本発明の高親和性実体（例えば、抗体）、本発明の分子（これは、治療成分または検出可能成分にコンジュゲートされる高親和性実体（例えば、抗体）を含む）、本発明の多価組成物、本発明の単離されたポリヌクレオチドまたは核酸構築物はそれ自体で与えることができ、または、医薬組成物として投与することができる。

【0276】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される有効成分の1つまたは複数と、他の化学的成分（例えば、生理学的に好適なキャリアおよび賦形剤など）との調製物を示す。医薬組成物の目的は、生物に対する化合物の投与を容易にすることである。

40

【0277】

本明細書中において、用語「有効成分」は、生物学的影響の根拠になり得る本発明の高親和性実体（例えば、抗体）、本発明の分子（これは、治療成分または検出可能成分にコンジュゲートされる高親和性実体（例えば、抗体）、あるいは、それをコードするポリヌクレオチドを含む）、本発明の多価組成物、本発明の単離されたポリヌクレオチドまたは核酸構築物を示す。

【0278】

本明細書中以降、表現「生理学的に許容され得るキャリア」および表現「医薬的に許容

50

され得るキャリア」は、交換可能に使用され得るが、生物に対する著しい刺激を生じさせず、かつ、投与された化合物の生物学的な活性および性質を妨げないキャリアまたは希釈剤を示す。アジュバントはこれらの表現に包含される。

【0279】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが挙げられる。

【0280】

薬物の配合および投与のための技術が「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co., Easton, PA、最新版)に見出されることができ、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

10

【0281】

好適な投与経路には、例えば、経口送達、直腸送達、経粘膜送達、特に経鼻送達、腸管送達、または非経口送達(これには、筋肉内注射、皮下注射および髄内注射、ならびに、クモ膜下注射、直接的な脳室内注射、静脈内注射、腹腔内注射、鼻内注射または眼内注射が含まれる)が含まれることができる。

【0282】

あるいは、例えば、患者の組織領域に直接的に医薬組成物の注射をすることによって、全身的な方法よりも局所的に医薬組成物を投与することができる。

20

【0283】

本発明の医薬組成物は、この分野で十分に知られているプロセスによって、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、包括化または凍結乾燥のプロセスによって製造されることができ。

【0284】

従って、本発明に従って使用される医薬組成物は、医薬品として使用されることができ、調製物への有効成分の加工を容易にする賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容され得るキャリアを使用して従来の様式で配合されることができる。適正な配合は、選ばれた投与経路に依存する。

30

【0285】

注射の場合、医薬組成物の有効成分は、水溶液において、好ましくは生理学的に適合しうる緩衝液(例えば、ハンス溶液、リンゲル溶液、または生理学的な食塩緩衝液など)において配合されることができ。経粘膜投与の場合、浸透されるバリアーに対して適切な浸透剤が配合において使用される。そのような浸透剤はこの分野では一般に知られている。

【0286】

経口投与の場合、医薬組成物は、活性化合物をこの分野でよく知られている医薬的に許容され得るキャリアと組み合わせることによって容易に配合されることができ。そのようなキャリアは、医薬組成物が、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤および懸濁物などとして配合されることを可能にする。経口使用される薬理的調製物は、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉碎し、錠剤または糖衣錠コアを得るために、望ましい好適な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して作製されることができ。好適な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；および/またはポリビニルピロリドン(PVP)などの生理学的に許容され得るポリマーである。もし望むなら、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩(例えば、アルギン酸ナト

40

50

リウムなど)などの崩壊剤が加えられることができる。

【0287】

糖衣錠コアには、好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボボールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液、および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有しうる。色素または顔料は、活性化合物の量を明らかにするために、または活性化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに加えられることができる。

【0288】

経口使用されうる医薬組成物としては、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、ならびに、ゼラチンおよび可塑剤（例えば、グリセロールまたはソルビトールなど）から作製された軟いシールされたカプセルが挙げられる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤（例えば、ラクトースなど）、結合剤（例えば、デンプンなど）、滑剤（例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなど）、および場合により安定化剤との混合で有効成分を含有することができる。軟カプセルでは、有効成分は、好適な液体（例えば、脂肪油、流動パラフィンまたは液状のポリエチレングリコールなど）に溶解または懸濁されることができる。さらに、安定化剤が加えられることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路について好適な投薬形態でなければならない。

【0289】

口内投与の場合、組成物は、従来の方法で配合された錠剤またはトローチの形態を取ることができる。

【0290】

鼻吸入による投与の場合、本発明による使用のための有効成分は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素）の使用により加圧バックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投与量は、計量された量を送達するためのバルブを備えることによって決定されることができる。ディスペンサーにおいて使用される、例えば、ゼラチン製のカプセルおよびカートリッジは、化合物および好適な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプンなど）の粉末混合物を含有して配合されることができる。

【0291】

本明細書中に記載される医薬組成物は、例えば、ボーラス注射または連続注入による非経口投与のために配合されることができる。注射用配合物は、場合により保存剤が添加された、例えば、アンプルまたは多回用量容器における単位投薬形態で提供されることができる。組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクルにおける懸濁物または溶液剤またはエマルジョンにすることができ、懸濁化剤、安定化剤および/または分散化剤などの配合剤を含有することができる。

【0292】

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態の活性調製物の水溶液が含まれる。さらに、有効成分の懸濁物は、適切な油性または水性の注射用懸濁物として調製されることができる。好適な親油性の溶媒またはビヒクルとしては、脂肪油（例えば、ゴマ油など）、または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルなど）、トリグリセリドまたはリポソームが挙げられる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランなどを含有することができる。場合により、懸濁物はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために、有効成分の溶解性を増大させる好適な安定化剤または薬剤を含有することができる。

【0293】

あるいは、有効成分は、好適なビヒクル（例えば、無菌の、パイロジェン不含水溶液）を使用前に用いて構成される粉末形態であることができる。

【0294】

本発明の医薬組成物はまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの従来の座薬基剤を使用して、座薬または停留浣腸剤などの直腸用組成物に配合されることができる。

【0295】

本発明に関連した使用のために好適な医薬組成物として、有効成分が、その意図された目的を達成するために有効な量で含有される組成物が含まれる。より具体的には、「治療有効量」は、処置されている対象の障害（1型糖尿病）の症状を予防、緩和あるいは改善するために効果的であるか、または、処置されている対象の生存を延ばすために効果的である、有効成分〔例えば、本発明の高親和性実体、例えば、本発明の抗体、本発明の分子（例えば、治療的または検出可能成分にコンジュゲートされた抗体を含む分子）、本発明の多価組成物、本発明の単離されたポリヌクレオチドまたは核酸構築物〕の量を意味する。

10

【0296】

治療有効量の決定は、特に、本明細書に与えられる詳細な開示に鑑みれば、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0297】

例えば、有効成分（例えば、高親和性実体、例えば、本発明の抗体、または、それをコードするポリヌクレオチド）の1型糖尿病処置に対する影響は、広く知られている方法を使用して、グルコースのレベルを処置された対象の血液においてモニターすること、および/または、ヘモグロビンA1cのレベルを測定することによって評価することができる。

20

【0298】

本発明の方法において使用されるいかなる調製物についても、投与量または治療有効量は、生体外アッセイおよび細胞培養アッセイから最初に推定されることができる。例えば、投与量は、所望の濃度または力価を達成するために動物モデルにおいて決定されることができ、そのような情報は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために使用されることができる。

【0299】

本明細書中に記載される有効成分の毒性および治療効力は、生体外、細胞培養物、または実験動物における標準的な薬学的手法によって決定されることができる。これらの生体外、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量範囲を定めるために使用されることができる。投与量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に依存して変化する。正確な配合、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択されることができる（例えば、Fingler、(1975)「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p. 1を参照のこと）。

30

【0300】

投与量および投与間隔を、生物学的影響を誘導または抑制するために十分である有効成分の血漿中レベルまたは脳内レベル（最小有効濃度、MEC）を提供するために個々に調節することができる。MECはそれぞれの調製物について変化するであろうが、インビトロでのデータから推測することができる。MECを達成するために必要な投与量は個々の特性および投与経路に依存するであろう。様々な検出アッセイを、血漿中濃度を求めるために使用することができる。

40

【0301】

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、投薬は、単回または複数回投与で行われることができ、この場合、処置期間は、数日から数週間まで、または治療が達成されるまで、または疾患状態の軽減が達成されるまで続く。

【0302】

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている対象、苦痛の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存するだろう。

【0303】

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明の治療剤（例えば、本発明の高親和性実体、例えば、本発明の抗体、分子および／または多価組成物）は、1型糖尿病を処置するために設計される他の薬物（1つまたは複数）との併用で対象に与えることができる（併用治療）。そのような薬物の限定されない例には、インスリン（例えば、組換えヒトインスリン、ブタ由来インスリン）および抗CD3 mAbが含まれる。インスリンを投与する方法には、注射、インスリンポンプおよび吸入インスリンが含まれ、これらの方法は様々な回数で利用可能となっている。膵臓移植もまた、1型糖尿病を処置するために使用されている。併用治療は、処置された対象における本発明の薬剤の治療効果を増大させることができる。

#### 【0304】

本発明の組成物は、所望されるならば、有効成分を含有する1つまたは複数の単位投薬形態物を含有し得るパックまたはディスペンサーデバイス（例えば、FDA（米国食品医薬品局）承認キットなど）で提供され得る。パックは、例えば、金属ホイルを含むことができる（例えば、プリスターパック）。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が付随し得る。パックまたはディスペンサーデバイスはまた、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府当局によって定められた形式で、容器に関連した通知によって適応させることがあり、この場合、そのような通知は、組成物の形態、あるいはヒトまたは動物への投与の当局による承認を反映する。そのような通知は、例えば、処方薬物について米国食品医薬品局によって承認されたラベル書きであり得るか、または、承認された製品添付文書であり得る。適合し得る医薬用キャリアに配合された本発明の調製物を含む組成物もまた、上でさらに詳述されたように、示された状態を処置するために調製され、適切な容器に入れられ、かつ標識され得る。

#### 【0305】

MHCクラスII/GAD自己抗原性ペプチド（例えば、GAD抗原性ペプチド）の複合体を（単離された形態で、または、細胞の表面に呈示される場合のどちらでも）検出するために本明細書中上記で記載される本発明のいくつかの実施形態の薬剤は、1型糖尿病を診断すること、1型糖尿病に対する素因を明らかにすること、および／または、1型糖尿病を評価することにおける使用のための適切な説明書、ならびに、それらにおける使用のためのFDA承認を示す標識と一緒にであることが好ましいが、診断キット／製造物に含めることができる。

#### 【0306】

そのようなキットは、例えば、上記診断剤のうちの少なくとも1つ（例えば、高親和性実体、例えば、抗体）を含む少なくとも1つの容器と、別の容器に包装される画像化剤（例えば、酵素、二次抗体、緩衝液、発色基質、蛍光発生物質）とを含むことができる。キットはまた、キットの貯蔵寿命を改善するための適切な緩衝液および保存剤を含んでいてもよい。

#### 【0307】

本発明のいくつかの実施形態の一面によれば、主要組織適合性複合体（MHC）クラスIIと、GAD自己抗原性ペプチドとから構成される複合体に特異的に結合する高親和性実体を単離する方法であって、

（a）複数の高親和性実体を含むライブラリーを本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体によりスクリーニングすること；および

（b）本発明のいくつかの実施形態の単離された複合体に特異的に結合し、かつ、GAD自己抗原性ペプチドの非存在下でのMHCクラスII、または、MHCクラスIIの非存在下でのGAD自己抗原性ペプチドには結合しない少なくとも1つの高親和性実体を単離し、

それにより、MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの複合体に特異的に結合する高親和性実体を単離することを含む方法が提供される。

#### 【0308】



本発明のいくつかの実施形態によれば、高親和性実体はさらに、MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの複合体の天然型立体配座に特異的に結合する。

【0309】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、本発明のいくつかの実施形態の単離された、MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの複合体と、コンジュゲートされた機能的成分とを含む組成物が提供される。

【0310】

コンジュゲートされた機能的成分は、上記で記載されるような治療成分または検出可能成分が可能である。機能的成分のコンジュゲート化を、上記および/または米国特許出願公開第20030166277号（これは全体が参照によって本明細書中に組み込まれる）に記載されるように行うことができる。

10

【0311】

本発明のいくつかの実施形態によれば、機能的成分は、細胞表面マーカーに特異的な抗体またはフラグメントを含む。細胞表面マーカーが抗原提示細胞において発現され得る。

【0312】

細胞表面マーカーの例には、腫瘍細胞、上皮細胞、線維芽細胞およびT細胞の細胞表面マーカー（例えば、CD28、CTLA-4およびCD25）が含まれるが、これらに限定されない。

【0313】

本発明のいくつかの実施形態によれば、機能的成分は治療成分を含み、例えば、サイトカインまたはリンホカインなどを含む。サイトカインまたはリンホカインは、直接的に、あるいは、例えば、多価化合物の形成（例えば、ストレプトアビジンまたはアビジンを使用する多価化合物の形成）およびビオチン化されたサイトカインまたはリンホカインを介してのどちらであっても、MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの複合体に連結することができる。

20

【0314】

サイトカインまたはリンホカインの限定されない例には、インターロイキン（例えば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-15およびIL-18）、アルファ型インターフェロン（例えば、IFN-アルファ）、ベータ型インターフェロン（例えば、IFN-ベータ）、ガンマ型インターフェロン（例えば、IFN-ガンマ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）およびトランスフォーミング増殖因子（TGF、例えば、TGF-アルファおよびTGF-ベータ）が含まれる。

30

【0315】

本発明のいくつかの実施形態の一局面によれば、上記で記載されるように、本発明のいくつかの実施形態の組成物と、治療的に許容されるキャリアとを含む医薬組成物が提供される。

【0316】

本発明のいくつかの実施形態の組成物（例えば、機能的成分にコンジュゲートされるMHCクラスII/ペプチド複合体を含む組成物）は、MHCクラスII/GAD自己抗原性ペプチド複合体を専門の抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、B細胞またはマクロファージなど）、腫瘍細胞、上皮細胞、線維芽細胞、T細胞または他の細胞に導くことによって、免疫応答を調節すること（すなわち、免疫応答を阻害すること、または刺激することのどちらでも）、望ましい免疫応答（例えば、感染性作用因子またはガンに対する免疫応答）を刺激すること、望ましくない免疫応答（例えば、アレルギー応答、同種移植片拒絶反応および自己免疫疾患など）を阻害することのために有用である。標的化された細胞タイプに依存して、このことは、抗原特異的なT細胞活性の非常に効率的な刺激または阻害のどちらでも引き起こすであろう。

40

【0317】

本明細書中で使用される用語「約」は、±10%を示す。

50

## 【0318】

用語「含む／備える (comprises、comprising、includes、including)」、「有する (having)」、およびそれらの同根語は、「含むが、それらに限定されない (including but not limited to)」ことを意味する。

## 【0319】

用語「からなる (consisting of)」は、「含み、それらに限定される (including and limited to)」ことを意味する。

## 【0320】

表現「から本質的になる (consisting essentially of)」は、さらなる成分、工程および／または部分が、主張される組成物、方法または構造の基本的かつ新規な特徴を実質的に変化させない場合にだけ、組成物、方法または構造がさらなる成分、工程および／または部分を含み得ることを意味する。

## 【0321】

本明細書中で使用される場合、単数形態（「a」、「an」および「the」）は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の参照物を包含する。例えば、用語「化合物 (a compound)」または用語「少なくとも1つの化合物」は、その混合物を含めて、複数の化合物を包含し得る。

## 【0322】

本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈すべきでないことを理解しなければならない。従って、範囲の記載は、具体的に開示された可能なすべての部分範囲、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値を有すると見なさなければならない。例えば、1～6などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲（例えば、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6など）、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値（例えば、1、2、3、4、5および6）を有すると見なさなければならない。このことは、範囲の広さにかかわらず、適用される。

## 【0323】

数値範囲が本明細書中で示される場合には常に、示された範囲に含まれる任意の言及された数字（分数または整数）を含むことが意味される。第1の示された数字および第2の示された数字「の範囲である／の間の範囲」という表現、および、第1の示された数字「から」第2の示された数「まで及ぶ／までの範囲」という表現は、交換可能に使用され、第1の示された数字と、第2の示された数字と、その間のすべての分数および整数とを含むことが意味される。

## 【0324】

本明細書中で使用される用語「方法 (method)」は、所与の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を示し、これには、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者に知られているそのような様式、手段、技術および手順、または、知られている様式、手段、技術および手順から、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者によって容易に開発されるそのような様式、手段、技術および手順が含まれるが、それらに限定されない。

## 【0325】

本明細書で使用される場合、用語「治療する／処置する」には、状態の進行を取り消すこと、実質的に阻害すること、遅くすること、または、逆向きにすること、状態の臨床的症状または審美的症状を実質的に改善すること、あるいは、状態の臨床的症状または審美的症状の出現を実質的に防止することが含まれる。

## 【0326】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴が、単一の実施形態に組み合わせて提供されることもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施形態で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコ

10

20

30

40

50

ンビネーションで、あるいは本発明の他の記載される実施形態において好適なように提供することもできる。種々の実施形態の文脈において記載される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしに動作不能である場合を除いては、それらの実施形態の不可欠な特徴であると思なされるべきではない。

【0327】

本明細書中上記に描かれるような、および、下記の請求項の節において特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、実験的裏付けが下記の実施例において見出される。

【実施例】

【0328】

次に下記の実施例が参照されるが、下記の実施例は、上記の説明と一緒に、本発明を非限定様式で例示する。

【0329】

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学および組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技術は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrookら、(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」I~III巻、Ausubel, R. M. 編(1994)；Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、米国メリーランド州バルチモア(1989)；Perbal「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons、米国ニューヨーク(1988)；Watsonら、「Recombinant DNA」Scientific American Books、米国ニューヨーク；Birrenら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国ニューヨーク(1998)；米国特許の第4666828号、同第4683202号、同第4801531号、同第5192659号および同第5272057号に記載される方法；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻、Cellis, J. E. 編(1994)；「Current Protocols in Immunology」I~III巻、Coligan, J. E. 編(1994)；Stitesら編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク(1994)；MishellとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co.、米国ニューヨーク(1980)；利用可能な免疫アッセイ法は、特許と科学文献に広範囲にわたって記載されており、例えば：米国特許の第3791932号、同第3839153号、同第3850752号、同第3850578号、同第3853987号、同第3867517号、同第3879262号、同第3901654号、同第3935074号、同第3984533号、同第3996345号、同第4034074号、同第4098876号、同第4879219号、同第5011771号および同第5281521号；「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J. 編(1984)；「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編(1985)；「Transcription and Translation」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編(1984)；「Animal Cell Culture」Freshney, R. I. 編(1986)；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press(1986)；「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B. (1984) および「Methods

10

20

30

40

50

in Enzymology」1～317巻、Academic Press；「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ(1990)；Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press(1996)；これらの文献の全ては、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その他の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。それらの文献に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。それらの文献に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

10

### 【0330】

#### 一般的な材料および実験方法

S2細胞におけるDR4分子の産生 - Schneider S2細胞における誘導性発現のためのDES-TOPO-DR-A1\*0101/DR-B1\*0401(HA-307-319)プラスミドは、以前に報告されたように(Svendensen, P. 他、2004)、DR-B1\*0401(GAD<sub>555-567</sub>)構築物のクローニング、トランスフェクション、および組換え4ドメインMHCクラスIIの発現のために使用された。簡単に述べると、これらの構築物において、DR-4およびDR-B鎖の細胞内ドメインがヘテロダイマー組立てのためにFosおよびJun転写因子のロイシンジッパー二量体化ドメインによって置き換えられた。抗原性ペプチドを、柔軟なリンカーを介してDR-B鎖のN末端に導入した。ビオチン化のためのBirA認識配列をDR-A鎖のC末端に導入した。DR-AおよびDR-Bプラスミドは、セルフェクチン試薬(Invitrogen)を使用してS2細胞中へpCoblast選択ベクターで共トランスフェクトされた。安定な単一細胞系譜クローンは、タンパク質発現のために確認された。CuSO<sub>4</sub>での誘導後、細胞上澄みは回収され、DR4複合体は、抗DR-LB3.1(ATCC番号HB-298)モノクローナル抗体(mAb)によってアフィニティ精製された。精製されたDR4複合体は、Bir-Aリガーゼ(Avidity)によってビオチン化され、SDS-PAGEによって特徴づけされた。複合体の正しい折り畳みは、ELISA結合アッセイにおける抗DR立体配座感受性mAb(L243)の認識によって確認された。

20

30

### 【0331】

ビオチン化された複合体上でのファージAbの選択 - ビオチン化された複合体上でのファージAbの選択は、記述されたようにして(Cohen CJ 他、2003, J Mol Recognit. 2003, 16:324-32)行われた。簡単に述べると、 $3.7 \times 10^{10}$ 個の異なるFabクローンからなる大きいヒトFabライブラリーが、選択のために使用された(de Haard H. J. 他、1999)。ファージは、ストレプトアビジンで被覆された常磁性体ビーズ(200  $\mu$ l; Dynal)と共にまず予めインキュベートされて、ストレプトアビジン結合剤が涵濁された。残りのファージは、減少された量のビオチン化されたMHC-ペプチド複合体と共にパンニングのために続いて使用された。ストレプトアビジンを涵濁されたライブラリーは、可溶性ビオチン化DR4/GAD(第1ラウンドについては500 nM、それ以降のラウンドについては100 nM)を有する溶液中で室温で30分間、インキュベートされた。ストレプトアビジンで被覆された磁気ビーズ(選択の第1ラウンドについては200  $\mu$ l、それ以降のラウンドについては100  $\mu$ l)が、混合物に添加され、室温で10～15分間インキュベートされた。ビーズは、PBS/0.1% Tween 20で12回徹底的に洗浄され、PBSでさらに2回洗浄された。結合されたファージは、トリエチルアミンで溶出され(100 mM、室温で5分間)、次に、Tris-HCl(1 M, pH 7.4)で中和され、37℃で30分間大腸菌TG1細胞(OD = 0.5)を感染させるために使用された。選択されたAbの多様性は、Ab-V遺伝子配列の頻繁なカッターである制限エンドヌクレアーゼ(BstNI)を使用したDNAフィンガープリンティングによって決定された。

40

50

## 【0332】

可溶性組換えFab Abの発現および精製 - TG1またはBL21細胞は、OD<sub>600</sub> = 0.8 ~ 1.0になるまで増殖され、30℃で3 ~ 4時間IPTGを添加することによって組換えFab Abを発現するように誘導された。ペリプラズム内容物は、予め洗浄されたTALONカラム (Clontech) 上に付与されたB-PER溶液 (Pierce) を使用して放出された。結合されたFabは、PBS中の100mMの0.5mlを使用して溶出された。溶出されたFabは、PBSに対して2回透析され (一晚、4℃)、残存イミダゾールを除去された。

## 【0333】

精製されたFab抗体を使用したELISA - 個々の可溶性Fabフラグメントの結合特異性は、ビオチン化されたMHC / ペプチド複合体を使用したELISAによって決定された。ELISAプレート (Falcon) は、BSA - ビオチン (1μg / ウェル) で一晚被覆された。洗浄後、プレートは、ストレプトアビジン (10μg / ml) と共にインキュベートされ (室温で1時間)、徹底的に洗浄され、5μg / mlのMHC / ペプチド複合体と共にさらにインキュベートされた (室温で1時間)。プレートは、PBS / 2% スキムミルクで室温で30分間ブロッキングされ、次に、5μg / mlの可溶性の精製されたFabと共に室温で1時間インキュベートされた。洗浄後、プレートは、西洋ワサビペルオキシダーゼ - コンジュゲート化 / 抗ヒトFab抗体と共にインキュベートされた。検出は、TMB試薬 (Sigma) を使用して行われた。

10

## 【0334】

フローサイトメトリー - DR4 - EBV - 形質転換Bリンパ芽球Preiss細胞は、70μMのGAD<sub>555-567</sub> (NFFRMVISNPAAAT; 配列番号22) またはコントロールペプチド: GAD<sub>552-572</sub> (配列番号13)、HA<sub>307-319</sub> (PKYVKQNTLKLAT; 配列番号30)、InsA<sub>1-15</sub> (GIVEQCCTSI C S L Y Q; 配列番号31)、およびCII<sub>261-273</sub> (AGFKGEQGPKEP; 配列番号: 32) を含む培地と共に一晚インキュベートされた。Preissに添加されたGAD65改変ペプチドリガンド (APL) は、M559Z (NFFRZVISNPAAAT; 配列番号33)、I561M (NFFRMVMSNPAAAT; 配列番号34)、N563Q (NFFRMVISQPAAAT; 配列番号35)、I561M - N563Q (NFFRMVMSQPAAAT; 配列番号36) であった。細胞 (10<sup>6</sup> 個) は、1 ~ 5μgの特異的Fabと共に4℃で1時間インキュベートされ、次にマウスの抗myc AbおよびFITCでラベルされた抗マウスAbと共に4℃で45分間インキュベートされた。細胞は、最終的に洗浄され、FACSCalibur フローサイトメーター (BD) によって分析された。

20

30

## 【0335】

T細胞ハイブリドーマのためのIL-2 バイオアッセイ - 50μlの10% FBS 含有培地におけるハイブリドーマ細胞 (96ウェルプレートにおいて10<sup>5</sup> 個 / ウェル) をHLA - DRB1\*0401 - Tgマウスの10<sup>5</sup> 個の放射線照射 (3000rad) された脾細胞の50μlと混合し、また、25μg / mlの個々のペプチドおよび様々なFab濃度の50μlと混合した。細胞を37℃および7% CO<sub>2</sub>で24時間インキュベーションした。上清をIL-2 捕獲ELISAのために培養物の上部から集めた。

40

## 【0336】

組織学 - 新鮮な組織を、凍結切片に対する免疫蛍光のために、Tissue - Tek OTCコンパウンド (Sakura Finetek、Torrance、CA、9050) において凍結した。凍結切片 (8μm) を乾燥し、0.1% BSA / PBSにより30分間ブロッキング処理した。G3H8を室温において50μg / mlで1時間加えた。Alexa - 488 - 抗ヒト (A11013、Molecule probes、Eugene、OR、米国) を1:200の希釈で二次Abとして使用した。蛍光像をCell Observer - Zeiss顕微鏡で撮影した。

## 【0337】

50

## 実施例 1

DR 4 / G A D<sub>555</sub> ~ 567 複合体に対して特異的な抗体の単離

天然型 MHC / ペプチド複合体に向けられた T C R L の単離のために、本発明者らは、ファージディスプレイ抗体ライブラリーのスクリーニングのために使用された組換え DR 4 / G A D<sub>555</sub> ~ 567 複合体を作製した。

## 【0338】

組換え DR 4 複合体 - 4 ドメインの DR 4 分子を昆虫細胞における発現 ( S v e n d s e n , P . 他、2004 ) のために以前に報告された DR 4 構築物から作製した。この構築物では、DR - A 1 \* 0101 鎖および DR - B 1 \* 0401 鎖の細胞内ドメインがヘテロダイマー組立てのためにロイシンジッパー二量体化ドメインによって置き換えられた ( S v e n d s e n , P . 他、2004 )。抗原性ペプチドを、柔軟なリンカーを介して DR - B 鎖の N 末端に導入した。ビオチン化のための B i r A 認識配列を DR - A 鎖の C 末端に導入した ( 図 1 A )。

10

## 【0339】

A b ファージディスプレイライブラリーのスクリーニング : DR 4 / G A D<sub>555</sub> ~ 567 複合体に向けられる F a b の選択のために、本発明者らは、 $3.7 \times 10^{10}$  個のヒト組換え F a b フラグメントのレパートリーからなる大きい A b ファージライブラリーをスクリーニングした ( d e H a a r d H . J . 他、1999 )。パンニングのために、ビオチン化された可溶性 DR 4 / G A D<sub>555</sub> ~ 567 複合体を使用した。ペプチド依存的な MHC クラス II 拘束の特異性を有する F a b クローンが目的のものであり、これらをさらなる特徴づけのために選んだ。B s t N I 制限反応による DNA フィンガープリンティングにより、G A D ペプチド依存的な DR 4 特異的 F a b の 13 の異なる制限パターンが明らかにされた。このことは、そのような特有の特異性を有する数個の異なる F a b が選択されたことを示している。

20

## 【0340】

DR 4 / G A D<sub>555</sub> ~ 567 複合体に対する T C R 様 F a b の特異性 : 本発明者らは E . c o l i 細胞を使用して、それぞれの DNA 制限パターンの代表的クローンの高可溶性 F a b 形態を産生させた。選択されたクローンの特異性を E L I S A 結合アッセイで特徴づけた ( 図 2 A )。4 つの異なる T C R L F a b A b ( G 1 A 1、G 1 H 1 2、G 3 H 8、G 1 A 2 ) を単離し、これらは、組換えの全長型 DR 4 / G A D<sub>555</sub> ~ 567 複合体にだけ結合し、コントロールペプチドを伴う DR 4 複合体 ( すなわち、G A D<sub>555</sub> ~ 567 ペプチドを有しない DR 4 分子 )、または、G A D<sub>555</sub> ~ 567 ペプチド単独には結合しないことが見出された。加えて、これらの T C R L は、E B V で形質転換された DR 4 + P r i e s s B 細胞によって提示される天然型 DR 4 / G A D<sub>555</sub> ~ 567 複合体を首尾よく検出する ( 図 2 B、代表的な G 3 H 8 F a b について )。加えて、これらの F a b は、コントロールの DR 4 会合ペプチド ( 例えば、H A<sub>307</sub> ~ 319、I n s A<sub>1</sub> ~ 15、C I I<sub>261</sub> ~ 273 ) が負荷された P r e i s s 細胞には結合しない ( 図 2 B )。G A D<sub>555</sub> ~ 567 は、DR 4 の状況における h G A D 65 の、G A D<sub>552</sub> ~ 572 が天然においてプロセシングされた T 細胞エピトープに含まれる最小刺激ペプチドである ( N e p o m G T 他、2001 )。したがって、本発明者らは、単離された T C R L により、天然において T 1 D と会合するこのエピトープが認識され得るかを調べた。図 2 C において認められるように、G 3 H 8 は、等モル量の G A D<sub>555</sub> ~ 567 ペプチドが負荷された細胞の場合と同じ強さにより、G A D<sub>552</sub> ~ 572 が負荷された P r e i s s 細胞と結合する。同じ結合パターンが、選択された DR 4 / G A D T C R L F a b のすべてについて得られた ( データは示されず )。G 3 H 8 に特徴的な T C R 様特異性についてのさらなる裏付けが、F a b 濃度の滴定 ( 図 2 D ) および負荷された G A D<sub>555</sub> ~ 567 ペプチドの濃度の滴定 ( 図 2 E ) から得られるように、A P C 上の DR 4 / G A D 複合体に対する用量依存的結合からもたらされた。A P C 上の総 DR 4 / ペプチド複合体における DR 4 / G A D 複体の百分率における増大は、増大した G 3 H 8 染色強度と相関することが見出された。加えて、G 3 H 8 および他の T C R L のこの

30

40

50

特徴づけは、それらを、目的とする A P C によって提示される特異的な M H C / ペプチド複合体の定量化研究のために好適にする。

#### 【 0 3 4 1 】

##### 実施例 2

##### G 3 H 8 抗体の細かい特異性

G 3 H 8 T C R L F a b の細かい特異性 - 単離された T C R L の G A D ペプチド内の結合性残基を突き止めるために、本発明者らは、一組の h G A D 6 5 変化型ペプチドリガンド ( A P L ) が負荷された P r e i s s 細胞の認識を調べた。T C R 接触部位での G A D 6 5 <sub>5 5 5</sub> ~ <sub>5 6 7</sub> 配列における置換を含有する一連のペプチドを使用した。アミノ酸置換を伴う G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ペプチド ( M 5 5 9 Z ( P 3 ) 、 I 5 6 1 M ( P 5 ) 、 N 5 6 3 Q ( P 7 ) 、または、 I 5 6 1 M ( P 5 ) + N 5 6 3 Q ( P 7 ) ) を提示する D R 4 複合体に対する G 3 H 8 の結合アッセイでは、P 5 が、G 3 H 8 - D R 4 / G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 相互作用のための不可欠な接触残基として示された。T c R 接触の P 5 位置は、この h G A D 6 5 エピトープとの T c R 相互作用のために重要であることが示されている ( J o h n A . 他、2 0 0 4 ) 。このことは、G 3 H 8 F a b の T C R 様性質を強調する。図 3 A ~ 図 3 F に示されるように、一アミノ酸置換を含有する G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 が負荷された P r e i s s 細胞 ( M 5 5 9 Z ( 図 3 B ) および N 5 6 3 Q ( 図 3 D ) ) では、G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ペプチドの野生型配列が負荷された P r e i s s 細胞の場合 ( 図 3 A ) と類似する、G 3 H 8 F a b の結合強さが得られた。反対に、I 5 6 1 M の一アミノ酸置換を含有する G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 が負荷された P r e i s s 細胞 ( 図 3 C ) 、および、I 5 6 1 M / N 5 6 3 Q の二重のアミノ酸置換を含有する G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 が負荷された P r e i s s 細胞 ( 図 3 E ) では、野生型ペプチドと比較した場合、F a b G 3 H 8 の結合強さにおける著しい低下が得られた。したがって、I 5 6 1 M 置換により、F a b G 3 H 8 による D R 4 / G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 複合体の認識がなくなり、P 5 位が D R 4 / G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 複合体における G 3 H 8 の不可欠な接触残基として強調された。P 5 は、D R 4 / G A D エピトープに対して特異的である多くの知られている T 細胞クローンの不可欠な T 細胞受容体接触位置であるので、G 3 H 8 は、ポリクローナルな G A D 特異的 T 細胞応答を阻害することが潜在的に可能であろう。

#### 【 0 3 4 2 】

##### 実施例 3

本発明のいくつかの実施形態の単離された抗体は G A D 特異的な M H C 拘束の T 細胞応答を阻害することができる

G A D 特異的な D R 0 4 0 1 拘束の T 細胞応答を阻止すること - 本発明者らはさらに、A P C によって提示される D R 4 / G A D 複合体との同族 T c R の相互作用と競合し、かつ、T 細胞の自己反応性をもたらすこの活性化シグナルを阻止する G 3 H 8 F a b の能力を調べた。本発明者らは、G 3 H 8 がペプチド特異的な H L A 拘束された様式で T 細胞ハイブリドーマの A g 特異的活性化を阻害し得るかを調べた。G 3 H 8 F a b は、H L A - D R \* 0 4 0 1 によって拘束される G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7 に対して特異的な G 2 . 1 . 3 6 . 1 T 細胞ハイブリドーマの応答を約 8 0 % 阻害することが見出された ( 図 4 A ) 。重要なことに、G 3 H 8 は、H L A - D R \* 0 4 0 1 によって拘束される H A 3 0 7 ~ 3 1 9 ペプチドに対する H 1 . 1 3 . 2 ハイブリドーマ応答を阻害しない ( 図 4 B ) 。したがって、自己反応性 G A D エピトープに対する抗原特異的な免疫学的寛容が、G 3 H 8 F a b によってインビトロで明らかにされた。

#### 【 0 3 4 3 】

##### 実施例 4

G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 ペプチドを糖尿病の遺伝子組換えマウスの脾臓において提示する抗原提示細胞の特定

糖尿病 B 7 / 0 4 0 1 T g マウスの脾臓における D R 4 / G A D 5 5 5 ~ 5 6 7 複合体の検出 - D R 4 サブタイプ D R A 1 \* 0 1 0 1 / B 1 \* 0 4 0 1 について遺伝子組換えの R I P - B 7 マウスは、自然発症性糖尿病を発症させることが報告された ( G e b e J

10

20

30

40

50

A他、2006)。GAD<sub>555~567</sub> エピトープ（これはすべてのマウスイソ型およびヒトイソ型において同一である）に対する細胞寛容の週齢依存的喪失がこれらのマウスにおいて確認された。このことは、このヒト疾患のMHC-抗原相互作用を模倣するヒト化マウスモデルとしてのそれらの有用性を強調する。本発明者らは、G3H8 Fabを使用して、糖尿病B7/DR0401マウスの浸潤された膵島におけるAPCがGAD<sub>555~567</sub> ペプチドをそれらのMHC分子において提示するかどうかを調べた。G3H8の陽性染色により、そのような複合体が、C57B6コントロールマウスから得られる膵島（図5D～図5E）と比較した場合、B7/DR4糖尿病マウスの膵島において特定され（図5A～図5C）、また、糖尿病発症前のB7/DR4マウスの浸潤された膵島において特定された（データは示されず）。これらの結果は、G3H8 Fabが、ベータ細胞由来のGAD<sub>555~567</sub> 自己抗原を提示する浸潤性APCを検出し、これと結合し得ることを明らかにする。G3H8 Fabは、膵臓のランゲルハンス島においてGAD自己抗原を提示するAPCとペプチド特異的な様式で結合することが見出された。膵島浸潤性APCに対するG3H8抗体の実証された入手性は、自己反応性T細胞の下流側の活性化をこれらのAPCによって阻止することによるその治療目標のために不可欠である。

10

20

30

40

50

#### 【0344】

##### 実施例 5

##### MHCクラスIIとGAD自己抗原性ペプチドとの特異的複合体の単離

本明細書中下記の表3は、MHCクラスIIとの複合体を形成することができるMHCクラスII拘束のGAD自己抗原のリストを提供する。そのような複合体は、診断目的および治療目的のために有用である特異的な抗体の単離のために使用される。

表3

配列番号	GAD自己抗原性ペプチド	MHC class II
61	VNFFRMVISNPAATHQD	DR4
62	DKVNFFRMVISNPAATHQDID	DR4
22	NFFRMVISNPAAT	DR4

表3. GAD自己抗原性ペプチド(それらの配列識別子(配列番号)とともに)、および、それに結合するMHCクラスII分子が提供される。

#### 【0345】

##### 実施例 6

##### 完全なIgG型G3H8抗体の結合および特異性

##### 実験結果

G3H8 IgG抗体の作製 - G3H8 Fabを、全体がヒト型の完全なIgG分子の中にクローン化した。H鎖およびL鎖のFab遺伝子を真核生物発現ベクターpCMV/myc/ERにヒトIgG1 Abとしての発現のためにクローン化した。H鎖については、pCMV/myc/ERの多重クローニング部位、mycエピトープタグおよび小胞体(ER)保持シグナルを、BsSHIおよびNheIのための認識部位を含有するクローニング部位、それに続く、ヒトリンパ球の総RNAからRT-PCRによって単離されるヒトIgG1の定常H鎖領域のcDNAによって置き換えた。類似する構築物をL鎖について作製した。それぞれのシャトル発現ベクターが、異なる抗生物質抵抗性遺伝子を有する。発現が、これら2つの構築物のヒト胚性腎臓HEK293細胞への共トランスフェクションを、FuGene6トランスフェクション試薬(Roche)を使用して行うことによって容易になった。共トランスフェクションの後、細胞を選択培地で成長させた。GAD-555~567ペプチドでパルス処理されたPreiss細胞と特異的に反応したクローンを0.5%血清における成長に順応させ、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを使用してさらに精製した。精製タンパク質のSDS-PAGE分析により、150kDaの予想された分子量を有する均一かつ純粋なIgGが明らかにされた。



## 【0346】

H L A - D R 4 - G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7 複合体を提示する細胞に対する G 3 H 8 抗体のエキスピボでの特異性 - G A D 抗原提示細胞 ( A P C ) に対する G 3 H 8 T C R L の特異性が、G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7 で免疫化された H L A - D R 4 遺伝子組換え ( T g ) マウスに由来する鼠蹊部 ( 流入領域 ) リンパ節 ( L N ) に対するフローサイトメトリーによってエキスピボでもまた明らかにされた。簡単に記載すると、マウスを、50% C F A / P B S の 1 0 0  $\mu$  l における 1 0 0  $\mu$  g のペプチドにより尾の基部において皮下に免疫化した。組織を5日目に集め、単一細胞懸濁物をフローサイトメトリーによって分析した。L N 細胞を洗浄し、0 . 1 2 5  $\mu$  g / m l の G 3 H 8 I g G と 4 で 1 時間インキュベーションし、その後、二次 A b としての抗ヒト P E ( 2 . 5  $\mu$  g / m l ) とインキュベーションした。

10

## 【0347】

図 1 0 A ~ 図 1 0 B に示されるように ( 示される結果は I g G 抗体により得られた。しかし、類似する結果が F a b 抗体により得られた ( 示されず ) )、G 3 H 8 T C R L A b により、G A D 免疫化マウスに由来する L N における A P C が特異的に染色され ( これには、6 . 5 % の陽性細胞 ( すなわち、H L A - D R 4 - G A D - 5 5 5 ~ 5 6 7 複合体を提示する細胞 ) が含まれた )、しかし、コントロールの H A - 3 0 7 ~ 3 1 9 ペプチドにより免疫化されたマウスに由来する H L A - D R 4 - H A - 3 0 7 ~ 3 1 9 複合体を提示する A P C は染色されなかった。

20

## 【0348】

G 3 H 8 I g G は、F a b と比較した場合、高まった結合および効力を示す - G 3 H 8 の I g G 形態は、F a b フラグメントと比較した場合、高まった結合を示すことが見出された ( 図 1 1 A )。そのうえ、この完全な I g G 型 T C R L 分子は、増大したアビディティーを有するものであり、F a b と比較して、10 倍を超えるより大きい効力により、G A D 特異的な T 細胞活性化 / 機能を阻害し ( 図 1 1 B )、一方、その特有の T C R 様特異性を維持した ( 図 1 1 C )。

## 【0349】

本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更および変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更および変形すべてを包含するものである。

30

## 【0350】

本明細書で挙げた刊行物、特許および特許出願はすべて、個々の刊行物、特許および特許出願が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用または確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。節の見出しが使用されている程度まで、それらは必ずしも限定であると解釈されるべきではない。

## 【0351】

## 参考文献

(他の参考文献は本文中に引用される)

1. Svendsen, P., C. B. Andersen, N. Willcox, A. J. Coyle, R. Holmdahl, T. Kamradt, and L. Fugger. 2004. Tracking of Proinflammatory Collagen-Specific T Cells in Early and Late Collagen Induced Arthritis in Humanized Mice. *J Immunol* 173:7037-7045;
2. de Haard H. J., van Neer N., Reurs A., Hufton S. E., Roovers R. C., Henderikx P., de Bruine A. P., Arends J. W., Hoogenboom H. R. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.*, 274: 18218-18230, 1999;
3. Cohen CJ, Denkberg G, Lev A, Epel M, Reiter Y. 2003. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity: new tools to study antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. *Journal of Molecular Recognition* 16:324-332;
4. Krogsgaard M., Wuchterpfennig KW., Cannella B., 〇. Visualization of Myelin Basic Protein (MBP) T Cell Epitopes in Multiple Sclerosis Lesions using a Monoclonal Antibody Specific for the Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 Complex. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, pages 1395-1412, 2000.
5. Nepom GT, Lippolis JD, White FM, Masewicz S, Marto JA, Herman A, Luckey CJ, Falk B, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH, Nepom BS. Identification and modulation of a naturally processed T cell epitope from the diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 13;98(4):1763-8;
6. John A. Gebe, Susan A. Masewicz, Sharon A. Kochik, Helena Reijonen and Gerald T. Nepom. Inhibition of altered peptide ligand-mediated antagonism of human GAD65-responsive CD4 T cells by non-antagonizable T cells. *Eur. J. Immunol.* 2004. 34: 3337-3345;
7. Gebe JA, Unrath KA, Falk BA, Ito K, Wen L, Daniels TL, Lernmark A, Nepom GT *Clin Immunol.* Age-dependent loss of tolerance to an immunodominant epitope of glutamic acid decarboxylase in diabetic-prone RIP-B7/DR4 mice. *Clin immunol.* 2006 Dec;121(3):294-304;

10

20

30

8. Masewicz, S. A., Papadopoulos, G. K., Swanson, E., Moriarty, L., Moustakas, A. K., and Nepom, G. T. Modulation of T cell response to hGAD65 peptide epitopes. *Tissue Antigens*, 59: 101-112, 2002.
9. Bach, J. M., Otto, H., Nepom, G. T., Jung, G., Cohen, H., Timsit, J., Boitard, C., and van Endert, P. M. High Affinity Presentation of an Autoantigenic Peptide in Type I Diabetes by an HLA Class II Protein Encoded in a Haplotype Protecting From Disease. *Journal of Autoimmunity*, 10: 375-386, 1997.
10. Ou, D., Jonsen, L. A., Metzger, D. L., and Tingle, A. J. CD4+ and CD8+ T-cell clones from congenital rubella syndrome patients with IDDM recognize overlapping GAD65 protein epitopes: Implications for HLA class I and II allelic linkage to disease susceptibility. *Human Immunology*, 60: 652-664, 1999.
11. Roep, B. O., Atkinson, M. A., van Endert, P. M., Gottlieb, P. A., Wilson, S. B., and Sachs, J. A. Autoreactive T cell Responses in Insulin-dependent (Type 1) Diabetes Mellitus. Report of the First International Workshop for Standardization of T cell assays. *Journal of Autoimmunity*, 13: 267-282, 1999.
12. Lohmann, T., Leslie, R. D., and Londei, M. T cell Clones to Epitopes of Glutamic Acid Decarboxylase 65 Raised from Normal Subjects and Patients with Insulin-dependent Diabetes. *Journal of Autoimmunity*, 9: 385-389, 1996.
13. Rharbaoui, Mayer, Granier, Bouanani, Thivolet, Pau, Orgiazzi, and Madec. T cell response pattern to glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) peptides of newly diagnosed type 1 diabetic patients sharing susceptible HLA haplotypes. *Clinical & Experimental Immunology*, 117: 30-37, 1999.
14. Reijonen, H., Novak, E. J., Kochik, S., Heninger, A., Liu, A. W., Kwok, W. W., and Nepom, G. T. Detection of GAD65-Specific T-Cells by Major Histocompatibility Complex Class II Tetramers in Type 1 Diabetic Patients and At-Risk Subjects. *Diabetes*, 51: 1375-1382, 2002.
15. Patel, S. D., Cope, A. P., Congia, M., Chen, T. T., Kim, E., Fugger, L., Wherrett, D., and Sonderstrup-McDevitt, G. Identification of immunodominant T cell epitopes of human glutamic acid decarboxylase 65 by using HLA-DR(alpha 1\*0101,beta 1\*0401) transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 8082-8087, 1997.
16. Oling, V., Marttila, J., Ilonen, J., Kwok, W. W., Nepom, G., Knip, M., Simell, O., and Reijonen, H. GAD65- and proinsulin-specific CD4+ T-cells detected by MHC class II tetramers in peripheral blood of type 1 diabetes patients and at-risk subjects. *Journal of Autoimmunity*, 25: 235-243, 2005.

## 【図 6 A - 6 B】

## G3H8 経値 [可変ドメイン (VL) + 定常ドメイン (CL)] のアミノ酸配列

LETTLTQSPATLSVSPGERVLTLSCPASQSVGSINLAWYQQFQAPRLLIYDASRATGIPAR  
FSGSGSGTEFTLTISIREEPEDFAYYYCHQVSSSPRTFGQGTGVKDIKRTVAAPSVTIFPPSDE  
QLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLTSLTLLSKAD  
YEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSRNGRC (配列番号 1)

FIG. 6A

## G3H8 経値 [可変ドメイン (VL) + 定常ドメイン (CL)] の核酸配列

CTTGAAGGACACTCAGCGAGTCTCCAGCGCCACCTGTCTGTCTCCAGGGGAAAGAGTCAG  
CCTCTCTCTCGAGGGCCAGTCAGAGTGTTCGACGCACTTAGCGTGGTACCAAGAGAAATTTG  
GCGAGGCTCCAGGCTCTCTCATCTATGATGATCCAGCAGGSCACTGTATCCGCGCAGG  
TTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTCTCACTCTCAGCATCAGCAGACTGGAGCGTGAAGA  
TTTTGCGAGTGTATTACTGTACAGCACTATGSGTAGTCACCTCGACGCTTCGGCCAAAGGACCA  
AGGTGGACATCAAAAGCACTTGGCTGGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCCATCTGATGAG  
CAGTTGAAATCTGGAAGTGGCTCTGTGTGTGGCTGTGAATAACTTCTATCCGACAGAGGC  
CAAACTACAGTGGAGAGTGGATAACGCCCTCCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGG  
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAGGCTGAGCAAAAGCAGAC  
TACGAGAAACCAAAAGTGTACGCTCGGAAATCACCCTATCAGGCGCTGAGCTCGGCCGTGAC  
AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAATAAGCGCGCCCAATTTCTATT (配列番号 2)

FIG. 6B

## 【図 6 C - 6 D】

## G3H8 重値 [可変ドメイン (VH) + 定常ドメイン 1 (CH1)] のアミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYTFTTYYGISWVRQAPQGLEWMHGIIISAYNGHTNYAQ  
MLQGRVTMTDTSTAYMELRGLRSDDTAVYCARAYASYGSGSYWTDYWGQTLVTVSSA  
AASTKGPSVFFLAPSSKTSGGTAALGLVKDYFPEPVTWSNGALTSGVHTFFAVALQSSG  
LYSLSSVTVFSSSLQCTQYICNVNHRPSNTKVDKVEPKCAAHHHHHHGAAEQKLISEE  
DLNGAA (配列番号 3)

FIG. 6C

## G3H8 重値 [可変ドメイン (VH) + 定常ドメイン 1 (CH1)] の核酸配列

CAGGTCCAGCTGGTACAGCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCCT  
CTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACACCTATGGTATCAAGCTGGGTGGCAGAGGCCCTCG  
GACAAGGCTTGAAGTGGATGGATGGATGAGCTTCAACTGGTCAACACAACTATGCAAG  
ATGGCTCAGGGGAGGTCACTGACACACAGACACATCCACGACGACGCTACATGGAGCT  
CAGGGCTGAGAGCTGACGACACAGGCCCTGTATTAAGTGTGGAGAGAGGCTATAGCTTCTT  
ATGGTTCGGGAGTATTTGAGCTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAAGCTCTCAAGC  
GCTCCACCAAGGGCCATCGTCTTCCCTCTGGCACCCTCTCTCCAGAGACACCTCTGGGG  
CAGACGGGCCCTGGCTGCTGGTCAAGACTACTTCCCGAAACGGTGACGGTGTCTGGGA  
ACTCAGGGGCCCTGACCAAGCGGCTCCAGACTCTCCCGGCTGTCTCTCACTCTCTCAGGACTC  
TACTCCCTCAGCAGGCTAGTGACCGGTGCCCTCAGCAGCTTGGGACCCAGACTACATCTG  
CAAGCTGAATCAACAAGCCAGCAACCAAGCTGGACAAAGATTTGAGCCCAAATCTTGTG  
CGCGCGCATCATCATCACATCAACGGGGCCGAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGAT  
CTGAATGGGGCCGA (配列番号 4)

FIG. 6D

## 【図 8 A - 8 B】

MVCLKFPGGSCMTALTVTIMVLSSPLALGPTNFFNMVINSFPAATGGGSLVERGGGGSRP  
RFLQKQVHKCHPENGTERVBFLEDRYFVHGVERVYFDSVGEYNAVTELRFDABEYWNQKDL  
LEQKAPADVTYCHRNYSVGSFTVQRVYFPEVTYFPAKTEQLQHINLLVCSVNGFPYPSIEV  
RWFRNQGEKTVVSTGLIQNGDWTFQTLVMLETVFVRPSGVRYTCQVEHESLTSPLTYEMRAR  
SESAQSKVDGGGGRIARLEEKVKVTLKAQNSLSTANMLREQVAQLQKRVNHH  
(配列番号 9)

FIG. 8A

MAISGVPLVGFPIIAVIMSAQESWAIKEEHVIQAEFYLNPDGSEFMFDGDEIFHVIMA  
KKEETVMRLEEGRFASFEAQGALANIADVKNLEIMTKRSHYPTITNVPPEVTVLNTPVEL  
REPHVLICFIDKFTFPVVMVWLRNGKPYTTSVGSYVLEPREDHLFRKFHYLPFLPSTEDVY  
CTRVEHGLDEFLKHHWFADSPLETTENDGGGGGDTDTLQAEITQLEDEKSALQTEIA  
NLLEKEKLEPIIAHGLNDIFBAQKIEWH (配列番号 10)

FIG. 8B

## 【図 9 A - 9 B】

ATGGTGTGTCTGAAGTTCCTTGAGGCTCCTGCATGACAGCGCTGACAGTGACACTGATGGT  
GCTGAGCTCCCACTGGCTTTGGCTGGGGACACAACTTCTTCTGTATGTTATCAGCAATC  
CAGCTGGGACTGGTGGTGGCTCACTAGTCCACAGGGGCTCTGGAGGAGTGGGTCCGACCA  
CGTTCTTGGACAGGTTAAACATGAGTGTCAATTTCTTCAACGGGACGGAGCGGTGCGGTT  
CCTGGACAGATACTCTATCACCAAGAGAGTACGTGCGCTTGACAGCAGAGCTGGGGAGT  
ACCGGGCGGTGACGGAGTCTGGGGCGGCTGATGCCAGTACTGGAACAGCCAGAAGGACTC  
CTGGAGCAGAAGCGGGCCGCGGTGGACACTACTGCAGACACAACTACGGGTTGGTGAGAG  
CTTCACAGTGACAGCGGAGTCTATCCTGAGGTGACTGTGTATCCTGCAAGACCCAGCGCC  
TGCAGACACAACTCCTGTGTGTCTGTGAATGGTTTCTATCCAGGACAGATTGAAGTC  
AGGTGTTCCGAAAGCGCAGGAAGAGACTGGGGTGTGTCTCCAGAGGCTGATCCAGAA  
TSGAGACTGGACTTCCAGACGCTGGTGAATGCTGGAACAGTCTCGAGTGGAGAGGTTT  
ACACCTGCCAAGTGGAGCACCCAAAGCTGACAGCGCTCTCACAGTGGAATGGAGAGCAGG  
TCTGAATCTGCACAGCAGAGTCCAGCGAGTGGCGCGGTGCGACTCGCGCGGCTCGAGGA  
AAAAAGTAAACCTTGAAGCTCAGAACTCGAGGCTGGCGCTCAAGGCCAAACATGCTCAGGG  
AACAGGTGGCAGAGCTTAAACAGAAAGTCATGAACCAT (配列番号 11)

FIG. 9A

ATGGCCATAAGTGGAGTCCCTGTGCTAGATTTPTCATCATAGCTGTGCTGATGAGCGCTCA  
GGAATCATGGGCTATCAAGAAGAACATGTGATCAACCGACCGGAGTCTATCTGAATCTG  
ACCAATCAGGCGAGTTTATGTTTGACTTTGATGTGATGAGATTTCATGTGGATATGGCA  
AAGAGGAGACCGCTCGGGCGCTGAAGAATTTGACAGATTTCGCGAGTCTTGAAGGCTCAAGG  
TGCATTGGCCAACTAGCTGTGGACAAAGCCAACTGGAATCATGACAAAGCGTCCAACT  
ATACTCCGATACCAATGTACCTCCAGAGGTAACTGTGCTCAAGAACCGCTCTGGAATCG  
AGAGAGCCCAAGCTCTCATCTGTTTCATCGCAAGTCAACCCACCAAGTGGTCAATGTCA  
GTGGCTTCGAATGGAAACCTGTCAACAGAGAGTGTGAGAGCACTCTTCTCGCCAGGG  
AAGACCACTTTTCGCGAAGTTCACATATCTCCCTCTCTCGGCTCAACTGAGGAGTTTAC  
GACTGCAGGTTGAGCACTGGGGCTTGATGAGGCTCTTCTCAAGCACTGGGAGTTTATGCTC  
CAAGGCTCTCTCAGAACTACAGAGAACTGACAGGAGTGGCGGGCTTAACTGATACAC  
CTCAAGCGGAGAGATCACTTGAAGAGCAGAAAGTCTGGGTGACAGCCGAGATTGCCAA  
TCTACTGAAGAGAGGAAAACTGGAGTTCACTCGGGCGGCTATGGCTGAACGACATCT  
TCGAGGCCACAGAGATCGAGTGGAC (配列番号 12)

FIG. 9B

## 【図 7 A - 7 B】

## G1H12 経値 [可変ドメイン (VL) + 定常ドメイン (CL)] のアミノ酸配列

QSVLTQPPVSAAAPGQKVTISCGSSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDR  
FSGSKSGTSATLGITGLQGTDEADYCGTWNDSLSVWVFGGTKLTVLQGPKAAPSVTLFPP  
SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTAVKADKSFVKAGVETTTPEKQSNKKYAAASYLSLTP  
EQWKSHRYSYQVTHEGSTEVEKTVAPTECS (配列番号 5)

FIG. 7A

## G1H12 経値 [可変ドメイン (VL) + 定常ドメイン (CL)] の核酸配列

CAGTCTGTGTGACGCGAGCGCGCTGAGTGTCTGGCGCCACAGACAGAAGTCAACATCTC  
CTGCTCTGAGAGCAGCTCCACAGATTGGGATTAATATGTATCTCTGGTACAGCAGCTCCAG  
GAACAGGCCCAACTCTCTCATTTATGACAATAATAGCGACCTCAGGAGTTCCTGACCGA  
TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAGCTCAGCGACGCTGGCATCAAGCGACTCGAGACTGGGA  
CGAGGCGGATTTACTTCGCGAACATGSGATAGCAGCTTGAAGTCTTGGSTGTTGGCGGAG  
GSACCAAGTGAACCTCTAGCTCAGCCAGGCTGCCCTCTGGTCACTGCTTCCCGCC  
TCCTCTGAGGAGGTTCAAGCGCAAGCGCACACTGGTGTCTCTCAAACTGACTTCTACCC  
GGAGCGCTGACAGTGGCTCGAAGCGAGATAGCAAGCCGCTCAAGGCGGAGTGGAGACA  
CCACACCTCCAAACAAAGACAAAGTACGCGGCGCAGGCTGAGCTGAGCTCAGCGCT  
GAGCAGTGGAACTCCACAGAGCTACAGCTGCCAGCTCAGCGATGAAGGGAGCACCGCTGGA  
GAAGACACTGGCCCTACAGAAATGTTCAATAATAA (配列番号 6)

FIG. 7B

## 【図 7 C - 7 D】

## G1H12 重値 [可変ドメイン (VH) + 定常ドメイン 1 (CH1)] のアミノ酸配列

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPQGLEWMHGIIIFCTANYAQ  
KEQGRVTITADKSTSTAYMELSLAEDTAVYCARDPQSYYYDSGTYWGGCTLVTVSSA  
STKGPSVFFLAPSSKTSGGTAALGLVKDYFPEPVTWSNGALTSGVHTFFAVALQSSGLY  
SLSSVTVFSSSLGTGTICNVNHRPSNTKVDKVEPKCAAHHHHHHGAAEQKLISEDL  
NGAA (配列番号 7)

FIG. 7C

## G1H12 重値 [可変ドメイン (VH) + 定常ドメイン 1 (CH1)] の核酸配列

CAGGTCCAGCTGGTGCAGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTGGGGCCTCAGTGAAGGCTCTC  
CTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGGCAGAGGCCCTCG  
GACAAGGCTTGAAGTGGAGGAGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGACACG  
AAGTCCAGGGCAGAGTCAGATTACCGCGGACAAATCCAGAGCACGCTACATGGAGCT  
GAGCAGCTGAGATCTGAAGACAGCGCTGTGTATTACTGTGCGGAGAGATCCCAAGTCTATT  
ACTATGATAGTAGTGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAAGCTCTCAAGCGCC  
TCACCAAGGGCCATCGTCTTCCCTGGACCTCTCCCAAGAGCACTCTGGGGGAC  
AGCGGCTCGGCTGGTCAAGGACTACTTCCGACAGCGGTGAGGTGTCTGSACT  
CAGGGCCCTGACCAAGGGCTGCCACACTTCCCGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTAC  
TCCTCAGCAGCTAGTAGCCTGCGCTCCGACAGCTTGGGACCCAGACACTACATCTGCA  
CGTGAATCACAAGCCAGCACACCAAGGTGGACAAAGATTGAGCCAAATCTTGTGCG  
CGGACATCATCATCACCATCAGCGGGCCGACAGCAAAAACTCATCTCAGAAGAGATCTG  
AATGGGGCCGA (配列番号 8)

FIG. 7D

【図 1 A - 1 D】

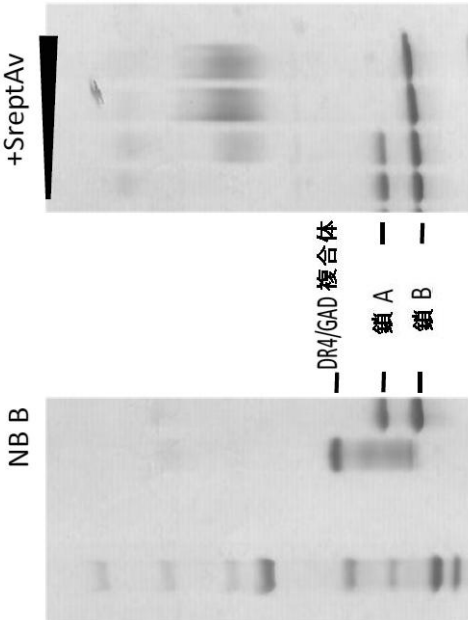


FIG. 1C

FIG. 1B

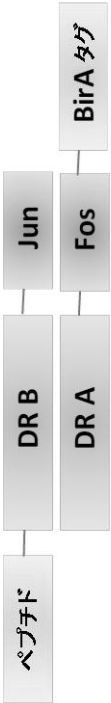


FIG. 1A

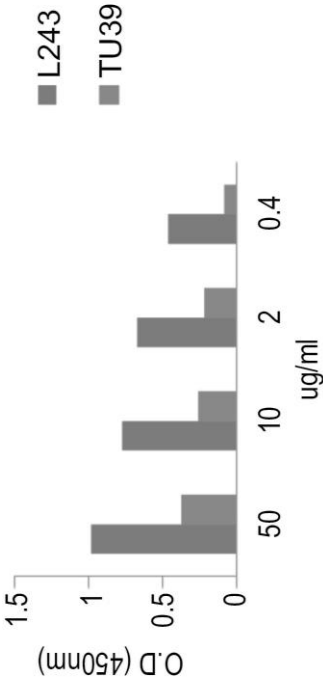


FIG. 1D

【 図 2 A - 2 C 】

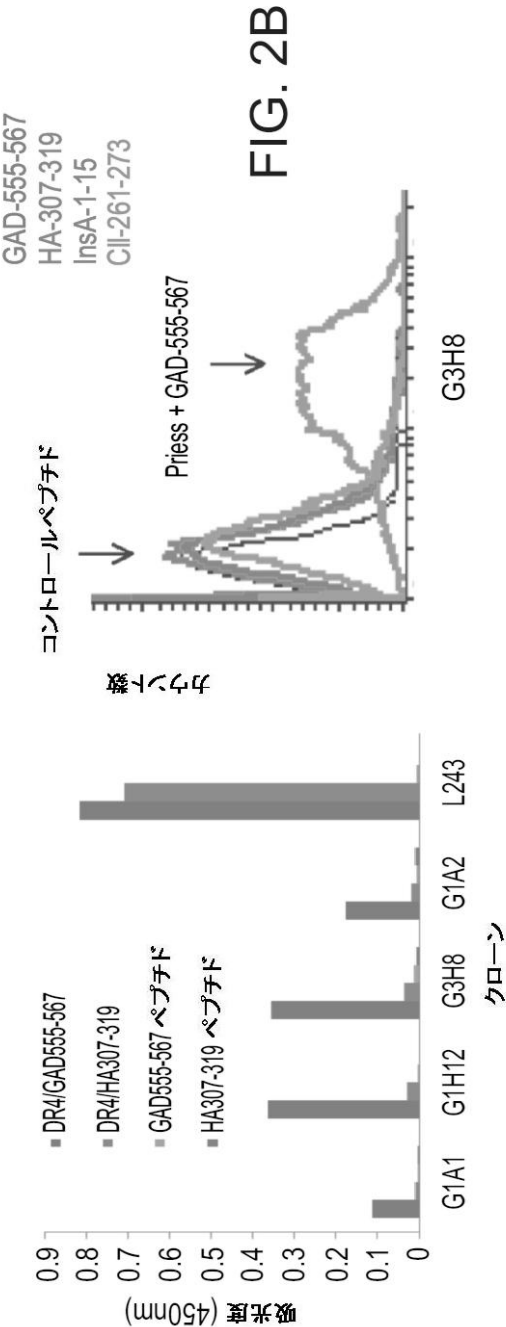
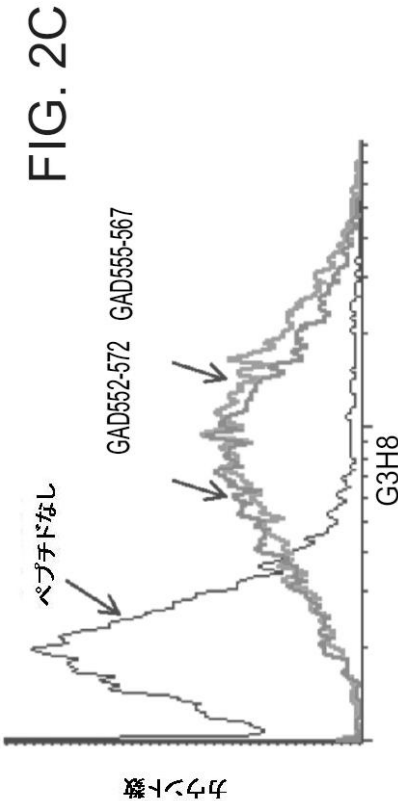


FIG. 2A



【図 2 D - 2 E】

FIG. 2D

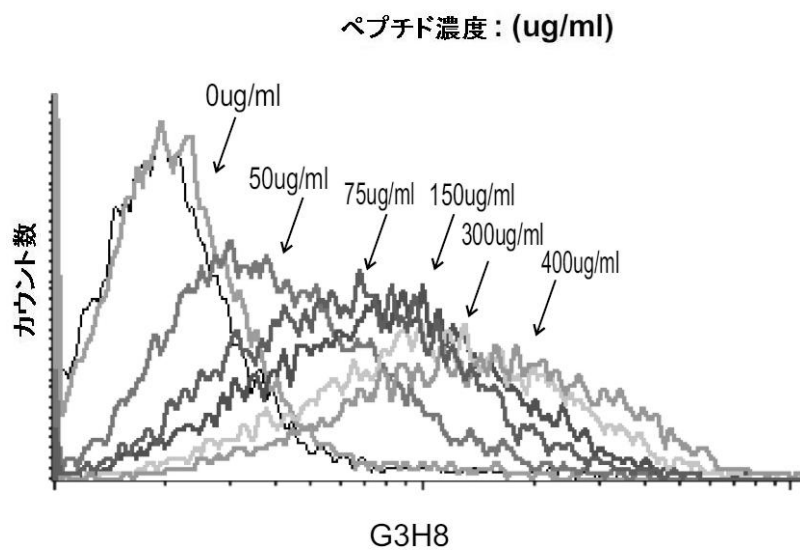
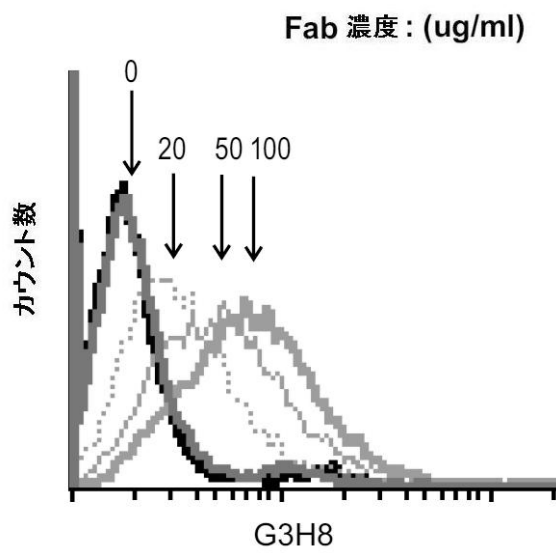
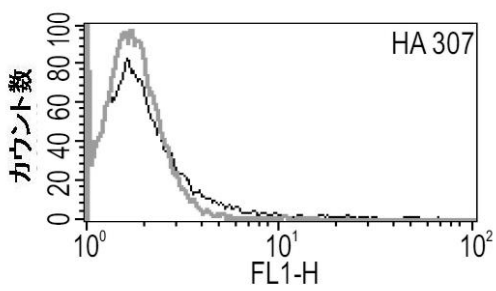
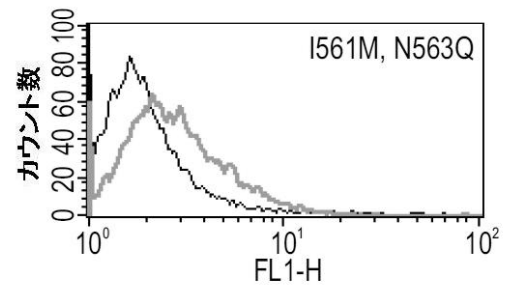
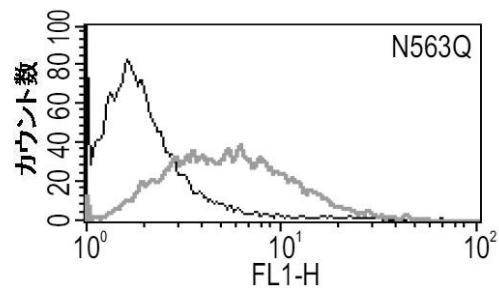
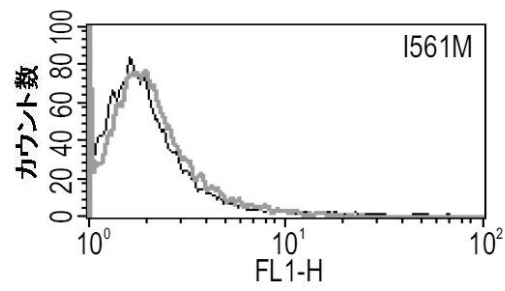
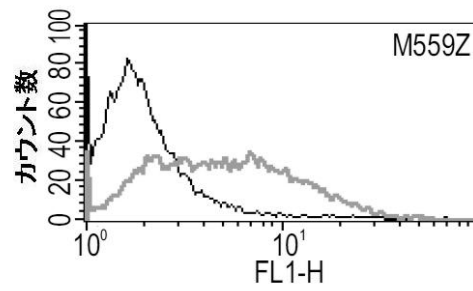
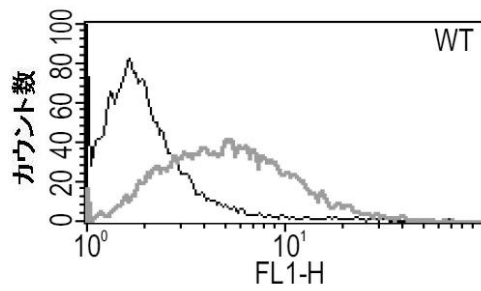


FIG. 2E

## 【図 3 A - 3 F】





【図 4 A】

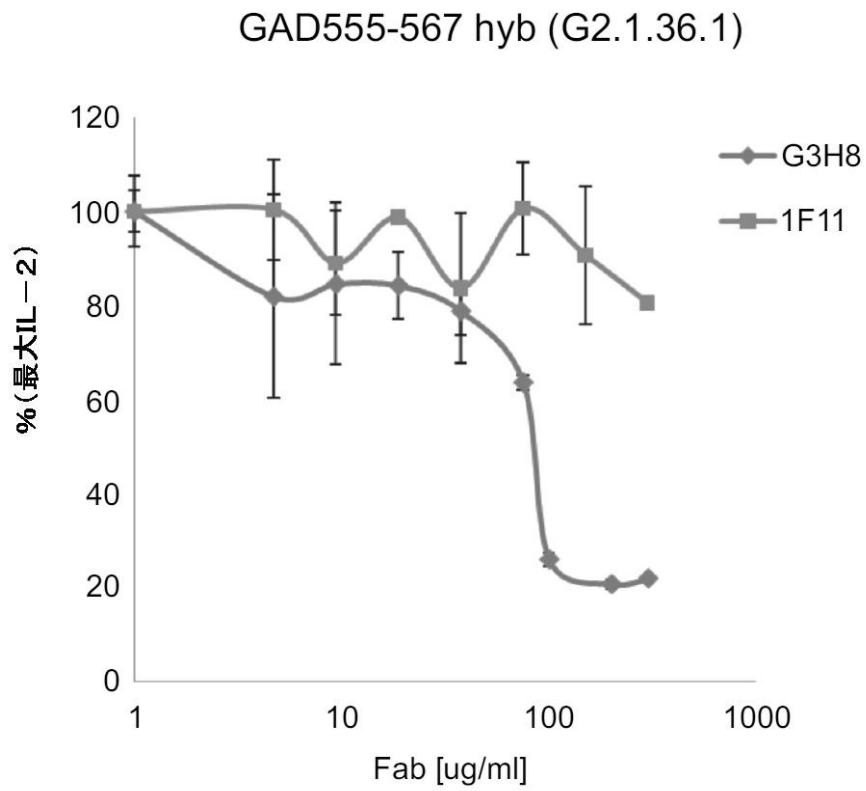


FIG. 4A

【図 4 B】

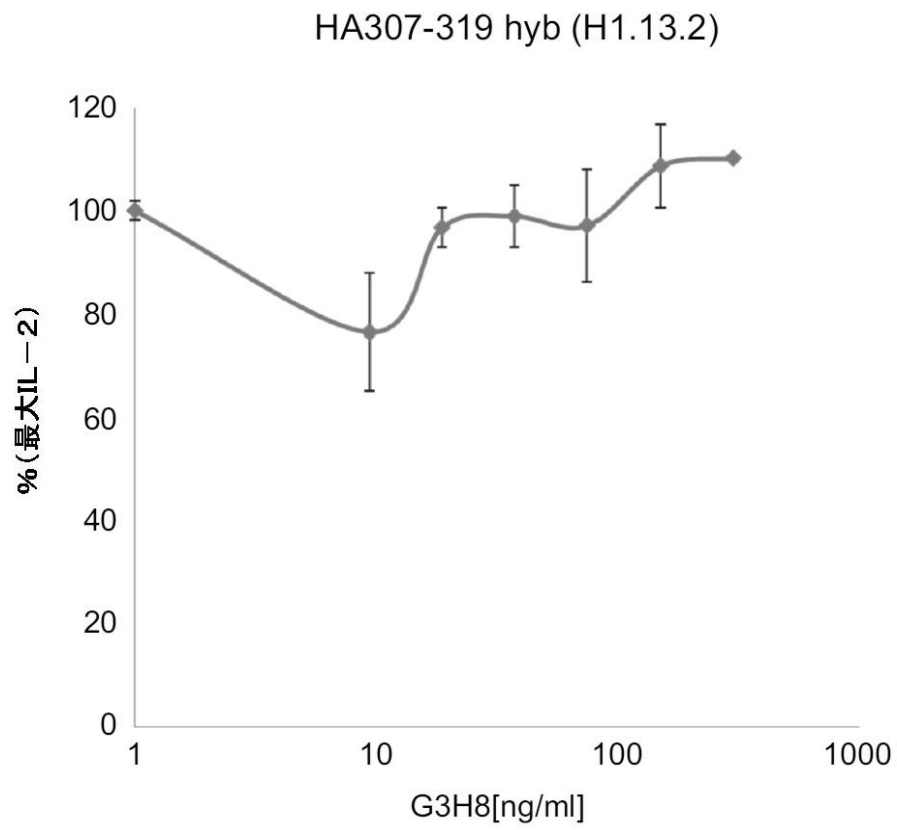


FIG. 4B

【図 5 A - 5 E】

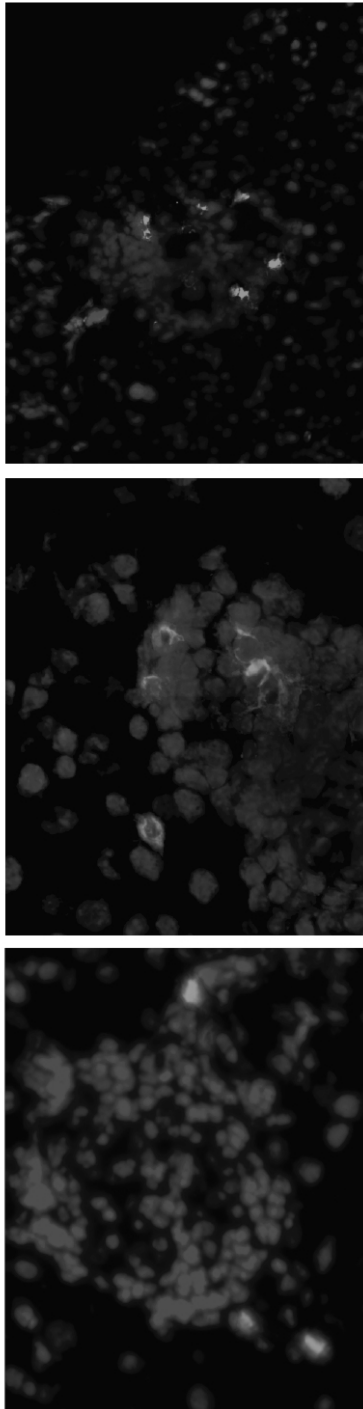


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

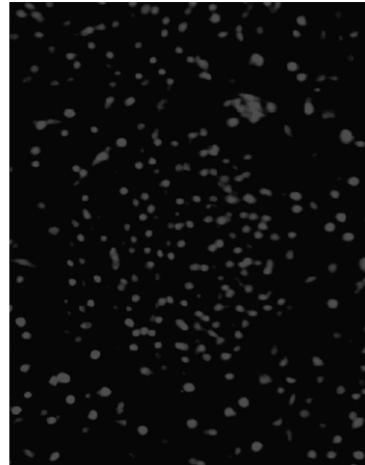


FIG. 5D

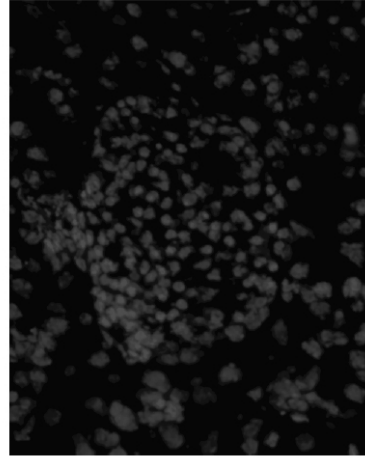
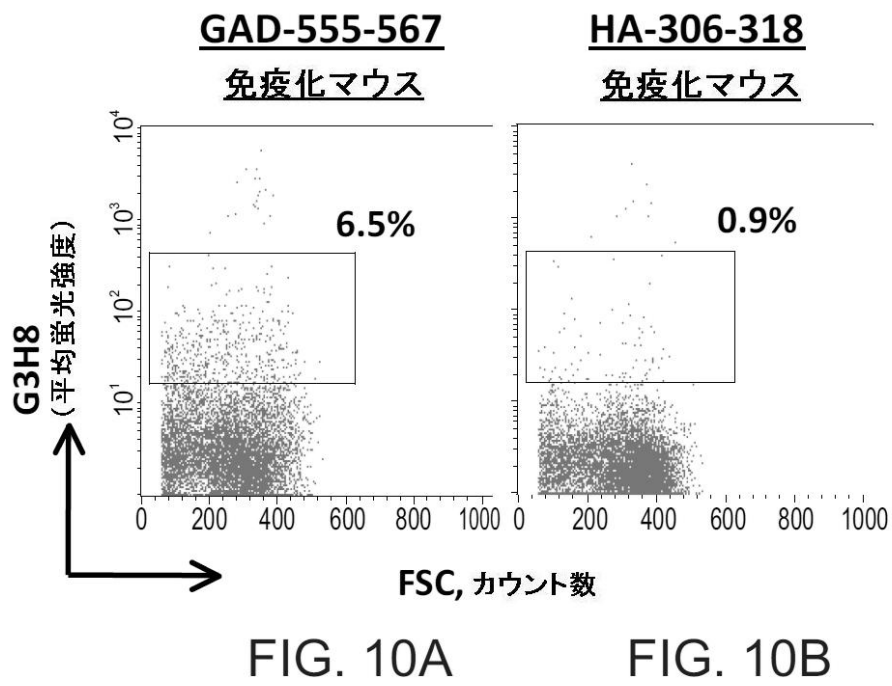


FIG. 5E

【図 10A - 10B】



【図 11A - 11C】

FIG. 11B

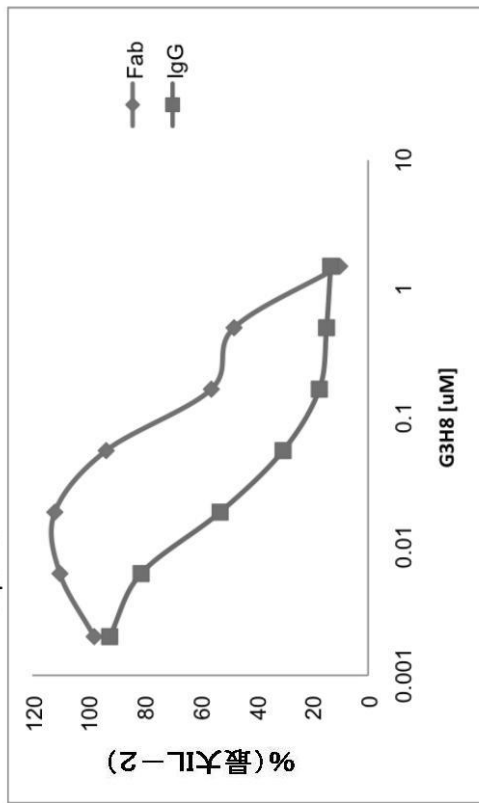


FIG. 11A

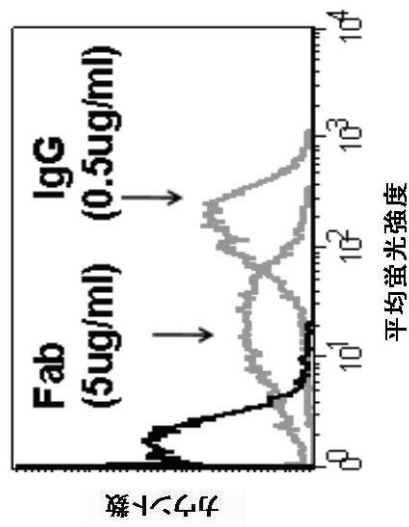
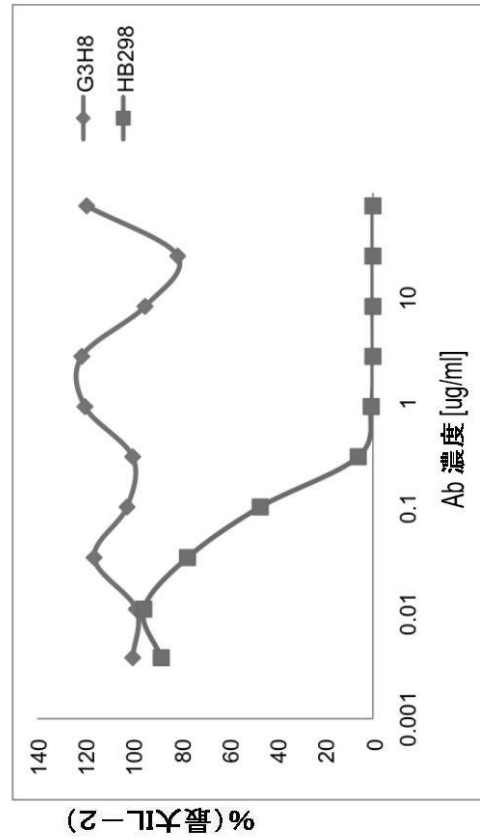


FIG. 11C



【配列表】

2013538555000001.xml

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2011/000564

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/62 C07K16/28 C07K16/40  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/007528 A2 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; WUCHERPFENNING KAI W [US]; SETH NILU) 22 January 2004 (2004-01-22) claims 1,3; example 4 -----	1-51
A	REIJONEN H ET AL: "Detection of GAD65-Specific T-Cells by Major Histocompatibility Complex Class II Tetramers in Type 1 Diabetic Patients and At-Risk Subjects", DIABETES, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, US, vol. 51, 1 May 2002 (2002-05-01), pages 1375-1382, XP003010701, ISSN: 0012-1797, DOI: 10.2337/DIABETES.51.5.1375 cited in the application ----- -/-	1-51

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 October 2011

Date of mailing of the international search report

10/11/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aslund, Fredrik

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2011/000564

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NEPOM GERALD T ET AL: "Identification and modulation of a naturally processed T cell epitope from the diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65)", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 98, no. 4, 13 February 2001 (2001-02-13), pages 1763-1768, XP055008762, ISSN: 0027-8424</p> <p>-----</p>	1-51
A	<p>SVENDSEN PIA ET AL: "Tracking of proinflammatory collagen-specific T cells in early and late collagen-induced arthritis in humanized mice", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 173, no. 11, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 7037-7045, XP002661381, ISSN: 0022-1767 cited in the application</p> <p>-----</p>	1-51

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2011/000564

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004007528	A2	22-01-2004	
		AU 2003273219 A1	02-02-2004
		CA 2492200 A1	22-01-2004
		EP 1578775 A2	28-09-2005
-----			



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/04</b>	<b>4 C 0 8 5</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>37/02</b>	<b>4 C 0 8 7</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>39/395</b>	<b>4 H 0 4 5</b>	<b>N</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>3/10</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>3/10</b>		
<b>A 6 1 K</b>	<b>36/06</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>35/72</b>		
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/74</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>35/74</b>		
<b>A 6 1 K</b>	<b>9/127</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>9/127</b>		

(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ダハン , ロニー

イスラエル , 7 6 8 0 4 マズケレット パティア , ヌファル ストリート 6

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA11 BA07 BA31 BA61 CA01 CA04 CA07 CA09 CA10  
CA11 CA20 DA02 EA03 EA04 GA11 HA01 HA09 HA11  
4B050 CC03 DD11 FF13E LL01  
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR18 QR32 QR35 QR48  
QR55 QR62 QS32 QX02  
4C076 AA19 AA95 CC21  
4C084 AA02 AA07 BA18 BA41 NA14 ZC351  
4C085 AA14 AA15 AA21 CC23 EE03  
4C087 AA01 AA02 BC11 BC30 NA13 ZC35  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA86 EA20 EA50  
FA74