

(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2014-508517

(P2014-508517A)

(43) 公表日 平成26年4月10日(2014.4.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/415 (2006.01)	C O 7 K 14/415 Z N A	4 C O 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-553396 (P2013-553396)	(71) 出願人	500139981 ファディア・アクチボラゲット P h a d i a A B スウェーデン751 37ウブサラ、ボックス6460
(86) (22) 出願日	平成24年2月8日(2012.2.8)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成25年10月4日(2013.10.4)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(86) 国際出願番号	PCT/SE2012/050121	(74) 代理人	100156122 弁理士 佐藤 剛
(87) 国際公開番号	W02012/108827	(72) 発明者	アレクサンドラ・シュミットフーバー オーストリア、アー-2201ゲラスドルフ、ハヌシュガッセ16番
(87) 国際公開日	平成24年8月16日(2012.8.16)		
(31) 優先権主張番号	1150096-4		
(32) 優先日	平成23年2月8日(2011.2.8)		
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 小麦誘発過敏症診断用の小麦抗原およびペプチド

(57) 【要約】

本発明は、種々の小麦過敏症の分野、特に、種々の形態のこれらの疾患の識別用の抗原およびペプチドに関する。本発明は、新規な小麦アレルゲンの同定、およびセリアック病、疱疹状皮膚炎およびI g E 媒介アレルギーの治療および診断におけるその使用に関する。さらに、本発明は、治療および診断における公知のペプチドおよびタンパク質の使用を提供する。また、本発明は、セリアック病、疱疹状皮膚炎およびI g E 媒介アレルギーの診断および治療方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 26 ~ 50、62 ~ 86 および 89 ~ 110 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

小麦から単離されるか、または組換え生成される請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載のポリペプチドをコードする単離核酸分子。

【請求項 4】

配列番号 1 ~ 25 のいずれか 1 つのヌクレオチド配列を有する請求項 3 記載の単離核酸分子。 10

【請求項 5】

治療または診断に用いるための請求項 1 もしくは 2 記載のポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体。

【請求項 6】

セリアック病、疱疹状皮膚炎もしくは I g E 媒介アレルギーの治療または診断に用いるための請求項 1 もしくは 2 記載のポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体。

【請求項 7】

治療または診断に用いるための配列番号 51 ~ 61、87 および 88 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体。 20

【請求項 8】

セリアック病、疱疹状皮膚炎もしくは I g E 媒介アレルギーの治療または診断に用いるための配列番号 51 ~ 61、87 および 88 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体。

【請求項 9】

治療における使用が、寛容誘導または予防的処置を含む請求項 8 記載の単離ポリペプチド。 30

【請求項 10】

配列番号 26 ~ 110 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその T 細胞 -、I g A - または I g E - 結合応答を抑制または減弱するように改変された該ポリペプチドの低アレルギー性形態、および所望による医薬上許容される賦形剤、担体、緩衝剤および / または希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 11】

該ポリペプチドの低アレルギー性形態が、分子の断片化、トランケーションまたはタンデム化、内部セグメントの欠失、ドメイン再構成、アミノ酸残基の置換、ジスルフィド架橋の崩壊により改変される請求項 10 記載の医薬組成物。

【請求項 12】

配列番号 26 ~ 110 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有する断片もしくは変異体を、アレルゲン抽出物および / または少なくとも 1 つの精製アレルゲン成分を含む組成物に添加する工程を含むアレルゲン組成物の製造方法。 40

【請求項 13】

請求項 12 記載の方法で得られるアレルゲン組成物。

【請求項 14】

- セリアック病を有することが疑われる哺乳動物からの体液または組織試料と、配列番号 62 ~ 110 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有する少なくとも 1 つのポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体とを接触さ 50

せ；次いで

- リンパ球増殖アッセイ、細胞活性化のFACS分析の使用によって、またはサイトカイン放出を測定することによってのように試料中で活性化T細胞の存在を測定することを含み；

ここに、活性化T細胞の存在は、セリアック病を示すことを特徴とするセリアック病の*in vitro*診断方法。

【請求項15】

- 培地中で、セリアック病を有することが疑われる哺乳動物からの白血球と、配列番号62～110のいずれか1つのアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体とを接触させ；次いで

- 該哺乳動物からの細胞試料と培地とを接触させ；次いで

- 細胞試料中でインターフェロン または他の細胞傷害物質の存在を測定することを含み；

ここに、インターフェロン または他の細胞傷害物質の存在は、セリアック病を示すことを特徴とするセリアック病の*in vitro*診断方法。

【請求項16】

細胞試料が腸上皮細胞を含むことを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項17】

- セリアック病、疱疹状皮膚炎またはIgE媒介アレルギーを有することが疑われる哺乳動物からの体液または組織試料と、配列番号26～110のいずれか1つのアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体とを接触させ；次いで

- 該ポリペプチドまたはポリペプチド群に特異的に結合しているIgAまたはIgE抗体の試料中の存在を検出することを含み；

ここに、該ポリペプチドまたはポリペプチド群に特異的に結合するかかる抗体の存在は、セリアック病、疱疹状皮膚炎またはIgE媒介アレルギーを示すことを特徴とするセリアック病、疱疹状皮膚炎またはIgE媒介アレルギーの*in vitro*診断方法。

【請求項18】

IgE媒介アレルギーが小麦食物アレルギーであることを特徴とする、請求項6または8記載のポリペプチドまたは請求項17記載の方法。

【請求項19】

配列番号26～110のいずれか1つのアミノ酸配列を有するポリペプチド、または該ポリペプチドと抗体用エピトープを共有する断片もしくは変異体または請求項10もしくは11に記載の組成物を含む請求項14～18のいずれか1記載の方法を行なうための診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、種々の形態の小麦過敏症の分野、特に、種々の形態のこれらの疾患の識別用の抗原およびペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

GellおよびCoombsの分類（組織傷害の免疫機構の分類である）によれば、以下の4つの型の過敏症が存在する：I型、IgE抗体および抗原の相互作用ならびにヒスタミンおよび他のメディエーターの放出によって媒介された即時型過敏反応；II型、細胞表面上の抗体-抗原相互作用による抗体媒介過敏症反応；III型、循環免疫複合体の形成および組織中でのそれらの沈着による、免疫複合体、局所または全身の炎症反応；ならびにIV型、リンホカインの放出またはT細胞媒介細胞毒性のいずれかにより感作されたTリンパ球により惹起される細胞媒介性過敏症反応が存在する。

10

20

30

40

50

【0003】

小麦（トリーティウム・アエスティウム：Triticum aestivum）は、種々の形態の過敏症を引き起こしかねない。それは3つの区別されるIgE媒介アレルギー、小麦花粉アレルギー、パン屋喘息および小麦食物アレルギーを引き起こしかねない。小麦花粉アレルギーは、花粉アレルギーの群に属する。パン屋喘息は小麦粉により引き起こされる呼吸アレルギーであり；これは、パン類製造業者、製粉業者または糖菓製造者に発症する重要な職業病である。小麦誘発食物アレルギーは非常に一般的であり、小麦含有食物の摂取後に生じ、湿疹、蕁麻疹、胃腸症状、結膜炎および他の多数の症状を含めた多種多様な臨床症状に導く（1）。IgE媒介小麦アレルギーに加えて、小麦に対する過敏症のセリアック病が存在し、これは、小麦タンパク質に対するIgA抗体およびT細胞反応性、ならびにいくつかの腸タンパク質に対する自己反応性のIgA抗体の発生により特徴付けられる（2、3）。それは、小腸において絨毛萎縮を引き起こし、慢性下痢または便秘、栄養失調、貧血、疲労、成長遅延および片頭痛（4）のような症状に導く小麦に対する炎症性過敏症である（4）。

10

【0004】

小麦（トリーティウム・アエスティウム）および小麦製品は栄養における主要要素であるので、小麦製品の回避は、小麦誘発過敏症に苦しむ患者についての現在唯一の治療法である。抗原特異的なアプローチは、過敏症を引き起こすタンパク質の詳細な知識および有効性を必要とするであろう。現在までに、小麦に対する種々の形態の過敏症を識別する診断ツールとして用いられる、明確化されたタンパク質およびペプチドの欠如が存在する。したがって、正確な診断は、小麦粉に対する呼吸アレルギーの場合には特定の吸入負荷、食物アレルギーが疑わしい場合には二重盲検プラセボ対照食物負荷（DBPCFC）、ならびにセリアック病についての規定食（diet）に続いて再負荷および/または腸生検に依拠する。Constantinら（5）は、小麦食物アレルギー患者ではなくパン屋喘息患者によって認識される特定の組換え小麦粉アレルゲンを同定した。彼らは、天然抽出物とは対照的にマクロ配列した組換えアレルゲンの有用性を示した。しかしながら、アレルゲンのパネルは不完全であり、したがって、小麦食物アレルギーまたはセリアック病に関与する、より多くの抗原およびペプチドを同定し、かつ種々の形態の小麦過敏症に苦しむ患者を区別する方法および診断テストを確立する必要性が存在している。加えて、小麦媒介過敏症の治療のためのかかる小麦抗原およびペプチドを用いる必要性が存在する。

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、種々の形態の小麦過敏症の分野、特に、種々の形態のこれらの疾患の識別用の抗原およびペプチドに関する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の目的は、前記の先行技術に係る課題を克服することである。本発明は、種々の形態の小麦過敏症に関与し、種々の形態の小麦過敏症の治療および診断に用い得るポリペプチドおよび核酸配列を提供する。

40

【0007】

本発明の1つの態様により、配列番号26～50、62～86および89～110のいずれか1つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが提供される。

【0008】

1つの具体例において、ポリペプチドは、それが小麦から単離されるか、または組換え生成されるという点で特徴付けられる。別法として、ポリペプチドは化学合成によって生成し得る。

【0009】

本発明のさらなる具体例は、前記のポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。例えば、核酸は配列番号1～25のいずれか1つのヌクレオチド配列を有し得る

50

。

【0010】

本発明のもう一つの態様により、前記のポリペプチド、または前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体は、治療または診断における使用のためのものである。

【0011】

より詳細には、ポリペプチドまたは前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体は、セリアック病、疱疹状皮膚炎もしくはI g E 媒介アレルギーの治療または診断における使用のためのものである。疱疹状皮膚炎は、セリアック病と関係する皮膚病である。

10

【0012】

さらに、本発明は、治療または診断における使用のための、配列番号51～61、87および88のいずれか1つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、または前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体を提供する。

【0013】

より詳細には、配列番号51～61、87および88のいずれか1つのアミノ酸配列を含むかかる単離されたポリペプチド、または前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体は、セリアック病、疱疹状皮膚炎もしくはI g E 媒介アレルギーの治療または診断における使用のためのものである。さらに、一の具体例により、治療における使用は寛容誘導または予防的処置を含む。

20

【0014】

さらにもう一つの態様により、本発明は、配列番号26～110のいずれか1つのアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはそのT細胞、I g A もしくはI g E 結合反応を抑制もしくは減弱させるために改変された前記ポリペプチドの低アレルギー性形態、および所望により、医薬上許容される賦形剤、担体、緩衝剤および/または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

【0015】

1つの具体例において、医薬組成物に含まれるポリペプチドの低アレルギー性形態は、分子の断片化、トランケーションまたはタンデム化、内部セグメントの欠失、ドメイン再構成、アミノ酸残基の置換、ジスルフィド架橋の崩壊により改変される。

30

【0016】

本発明のさらなる態様は、配列番号26～110のいずれか1つのアミノ酸配列を有するポリペプチド、または前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体を、アレルゲン抽出物および/または少なくとも1つの精製アレルゲン成分を含む組成物に添加する工程を含む、アレルゲン組成物の製造方法を提供する。

【0017】

さらに、前記方法で得られるアレルゲン組成物が提供される。

【0018】

また、本発明は、セリアック病の*in vitro*診断方法であって、

- セリアック病を有することが疑われる哺乳動物からの体液または組織試料と、配列番号62～110のいずれか1つのアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチド、または前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体とを接触させ；次いで

40

- リンパ球増殖アッセイ、細胞活性化のFACS分析の使用によって、またはサイトカイン放出の測定によってのように試料中で活性化T細胞を測定することを含み；

ここに、活性化T細胞の存在は、セリアック病を示すことを特徴とする方法を提供する。

。

【0019】

例えば、T細胞数および機能は、サイトカイン産生、増殖または細胞毒性のごとき活性によってT細胞を検出するアッセイによってモニターされ得る(9、10)。

50

【0020】

腹腔粘膜からのあるT細胞がTh1またはTh0プロフィールを持つサイトカイン、特に、インターフェロンガンマ（IFN- γ ）を生成することは従前に記載されている。このサイトカインは、特にTNFアルファと組み合わせ、腹腔病変のいくつかの病理学的特徴に關与し得た（10）。

【0021】

同様のシナリオにおいて、T細胞に由来するIFN- γ が、呼吸上皮細胞を介するアレルギー侵入を促進し、それにより、アレルギー性炎症を増大させることが示されている（11）。さらに、ある自己抗原によって刺激された末梢血単核細胞からのIFN- γ 含有培地上清は、呼吸上皮細胞層の崩壊および皮膚角化細胞のアポトーシスを引き起こすことが示されている。この損傷は、中和抗IFN- γ 抗体で抑制できた（12）。

10

【0022】

また、結果的には、本発明は、セリアック病の*in vitro*診断方法であって、

- 培地中で、セリアック病を有することが疑われる哺乳動物からの白血球と、配列番号62～110のいずれか1つのアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチド、または前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体とを接触させ；

- 前記哺乳動物からの細胞試料と培地とを接触させ；次いで

- 細胞試料中でインターフェロン または他の細胞傷害物質（群）（cell-damaging substance）の存在を測定することを含み；

20

ここに、インターフェロン または他の細胞傷害物質（群）の存在は、セリアック病を示すことを特徴とする該方法を提供する。

【0023】

ある具体例において、細胞傷害物質を産生する白血球は、種々のタイプのT細胞のごときリンパ球である。

【0024】

ある具体例において、白血球にポリペプチド（群）との接触をもたらす培地は、体液または組織試料であり、細胞試料に体液または組織試料との接触をもたらす前に、上清が、その体液または組織試料から調製され、細胞試料をその上清と接触させる。次いで、細胞試料中のインターフェロン または他の細胞傷害物質（群）の存在を測定する。

30

【0025】

この方法の好ましい具体例において、細胞試料は腸上皮細胞を含む。

【0026】

細胞傷害物質（群）の効果に起因する細胞傷害は、細胞層の崩壊およびアポトーシスを含み得る。

【0027】

さらに、本発明は、セリアック病、疱疹状皮膚炎またはIgE媒介アレルギーの*in vitro*診断方法であって、

- セリアック病またはIgE媒介アレルギーを有することが疑われる哺乳動物からの体液または組織試料と、配列番号26～110のいずれか1つのアミノ酸配列を有する少なくとも1つのポリペプチド、または前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体とを接触させ；次いで

40

- 前記ポリペプチドまたはポリペプチド群に特異的に結合するIgAまたはIgEの抗体の試料中での存在を検出することを含み；

ここに、前記ポリペプチドまたはポリペプチド群に特異的に結合するかかる抗体の存在は、セリアック病、疱疹状皮膚炎またはIgE媒介アレルギーを示すことを特徴とする該方法を提供する。

【0028】

本発明の好ましい具体例により、IgE媒介アレルギーは小麦食物アレルギーである。

【0029】

50

さらなる態様により、診断用キットは、本発明の方法を行うために提供され、配列番号 26 ~ 110 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を有するポリペプチド、または前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するその断片もしくは変異体、または前記のごとき医薬組成物を含む。

【0030】

定義

本明細書に用いた語彙および用語のすべては、関連技術分野においてそれらに通常与えられる意味を有することが意図される。しかしながら、明瞭さのために、少数の用語が特に以下に明確化される。

【0031】

「前記ポリペプチドと抗体用エピトープを共有するポリペプチドの断片もしくは変異体」なる表現は、WO 2008 / 079095 の定義に同じ意味を有する。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】LMWグルテニン GluB3 - 23 および C175 の cDNA および推定アミノ酸配列。太字体で示される C 末端部分は、クローン 175 配列である。

【図2】IgE 反応性クローン 43 のアミノ酸配列と整列させた Glu - B1 のヌクレオチド配列。

【図3】IgE 反応性クローン 82 のアミノ酸配列と整列させた Glu - B1 のヌクレオチド配列。

【図4】クローン 84 由来アレルゲンのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列。

【図5】小麦アレルゲンをコードする IgE 反応性 cDNA クローンの推定アミノ酸配列。

【図6】IgE 反応性小麦エピトープのアミノ酸配列。

【図7a】天然 GluB3 - 23、組換え GluB3 - 23 および C175 のドメイン構造。

【図7b】精製 C175 および GluB3 - 23 の質量分析 (MS)。質量 / 電荷比を X 軸に示し、強度を Y 軸に表示し、任意の単位で示す。

【図7c】精製 C175 および GluB3 - 23 の質量分析 (MS)。質量 / 電荷比を X 軸に示し、強度を Y 軸に表示し、任意の単位で示す。

【図8a】天然 Glu - B1 および組換えタンパク質のドメイン構造。

【図8b】精製 mal43 (クローン 43) の質量分析 (MS)。質量 / 電荷比を X 軸に示し、強度を Y 軸に表示し、任意の単位で示す。

【図8c】精製 mal82 (クローン 82) の質量分析 (MS)。質量 / 電荷比を X 軸に示し、強度を Y 軸に表示し、任意の単位で示す。

【図9a】C 末端の酸伸長ドメイン、およびチオニドメインの一部は、IgE エピトープ含有部分と同定される。

【図9b】組換えアレルゲン - ピューロチオニンの質量分析。質量 / 電荷比を X 軸に示し、強度を調べた質量範囲において得た最も強いシグナルのパーセンテージとして Y 軸に表す。

【図10】小麦食物アレルギーに苦しむ患者の IgE 反応性。ドットプロットした精製組換えタンパク質 (GluB3 - 23 および C175)、水性小麦種子 (WSE) 抽出物、およびヒトヒト血清アルブミン (HSA) を小麦食物アレルギーに苦しむ患者からの血清とインキュベートした。結合した IgE Ab は、¹²⁵I 標識抗ヒト IgE Ab で検出し、オートラジオグラフィにより視覚化した。

【図11】小麦食物アレルギーに苦しむ患者の IgE 反応性。ドットプロットした精製組換えタンパク質 (GluB3 - 23、C175、mal43 および mal82)、水性小麦種子 (WSE) 抽出物、およびヒト血清アルブミン (HSA) を小麦食物アレルギーに苦しむ患者からの血清とインキュベートした。結合した IgE Ab は、¹²⁵I 標識抗ヒト IgE Ab で検出し、オートラジオグラフィにより視覚化した。認識頻度を右側余

10

20

30

40

50

白に表す。

【図12】小麦食物アレルギーに苦しむ患者のIgE反応性。小麦種子抽出物、HSA、精製 - ピューロチオニン をニトロセルロース膜片上にドットし、小麦食物アレルギー患者からの血清とインキュベートした。結合したIgE抗体は、¹²⁵I 標識抗ヒトIgE抗体で検出し、オートラジオグラフィにより視覚化した。

【図13】ライ麦、大麦、オート麦、スペルト小麦およびコメ中の関連タンパク質とのGlub3-23の配列アラインメント。点は同一性を示し、ダッシュはギャップを表す。アラインメントの終わりに、Glub2-23に対する同一性をパーセンテージで示す。

【図14】他の植物における相同タンパク質とのクローン84由来アレルゲンの - ピューロチオニンの多重配列アラインメント。小麦 - ピューロチオニンのアミノ酸配列(単一文字コード)は、小麦(gi|4007850)、ライ麦(gi|4007745)、大麦(gi|246215)、オート麦(gi|21069045)、ゴートグラス(gi|1052551)、コメ(gi|215768993)、セージ(gi|77543393)、シロイヌナズナ(thale cress)(gi|21553588)、カラシ(gi|120564556)、ダイオウ(pieplant)(gi|197312881)中のピューロチオニンと整列させた。認識頻度を右側余白に表す。

【図15】精製小麦タンパク質に対するセリアック病患者のIgA反応性。ELISAプレートにコーティングした小麦タンパク質に対するセリアック病患者血清およびおよび対照患者血清のIgA反応性のELISA測定。患者血清とのインキュベーション後、結合したIgAを一次抗体としてマウス抗ヒトIgA1/A2および検出抗体としてHRP標識ヒツジ抗マウスIgGを用いて検出した。発色反応を405nmにて測定した。小麦および対照タンパク質をX軸に示し、右コーナーの説明文は患者を示す。用いた略語：HSA - ヒト血清アルブミン、GG1 - グリアジン1、GG2 - グリアジン2、P - 患者、CD - セリアック病陽性、GFD - グルテンを含まない規定食。

【図16】合成 グリアジン1ペプチドに対するセリアック病患者のIgA反応性。

【図17】合成 グリアジン1ペプチドに対するセリアック病患者のIgG反応性。

【図18】組換え グリアジンに対する疱疹状皮膚炎患者のIgA反応性。

【発明を実施するための形態】

【0033】

現在まで、種々の形態の小麦誘発過敏症を識別する診断用ツールとして用いる、限定された組の抗原およびペプチドだけが存在する。これは、よく特徴付けされた患者血清を用いて、小麦cDNAライブラリーのスクリーニング、古典的な免疫化学的アプローチおよびイオン交換クロマトグラフィ生成のグルテン画分の使用により、種々の小麦過敏症の診断に用いることができる新規で十分に規定された小麦抗原を探すように本発明者らを導いた。小麦抗原およびペプチドの同定、組換えタンパク質の生成および特徴付けは、診断(チップ開発)用、およびかかる小麦誘発過敏症の治療用のツールを創製することを可能にする。

【0034】

以下の実施例は、本発明の核酸配列およびペプチドの単離ならびに使用を含む本発明を示す。その実施例は単に例示的であり、添付された特許請求の範囲により規定される本発明の限定と考えられるべきではない。

【0035】

実施例1

小麦種子からのgt11cDNAライブラリーの構築およびスクリーニング

新しい小麦アレルゲンを見出すために、従前に記載されたごとく、小麦種子からの全RNAを抽出し、gt11cDNAライブラリーを構築した(5)。大腸菌Y1090を 7×10^5 PFUの組換えファージに感染させ、小麦食物アレルギーに苦しむ3名の患者の血清IgEで免疫スクリーニングした。gt11ファージを含有するニトロセルロースフィルターでの前吸着後に、1:10血清希釈液を既に力価測定したファージクローンから調製したフィルターに添加した。結合IgE抗体は1:10希釈した¹²⁵I標識

10

20

30

40

50

- ヒト I g E で検出し、オートラジオグラフィによって視覚化した。I g E 反応性ファージクローンは、さらなる再クローニングにつき選択し、それらの D N A は、 g t 1 1 プライマーで P l a t i n u m P C R S u p e r M i x (I n v i t r o g e n) を用いて P C R 増幅し、配列決定した (V B C - B i o t e c h) 。得られた配列は、全米バイオテクノロジー情報センター (N C B I) での G e n B a n k データベースに提出された配列と比較して、相同タンパク質を見出した。いくつかの場合には、発明者ら是对応するタンパク質を同定せずに、I g E 反応性エピトープだけを得た。すべての I g E 反応性クローンのリストを表 1 に示す。

【 0 0 3 6 】

実施例 2

発現および精製

クローン 1 7 5 および G l u b 3 - 2 3

5 3 7 個のヌクレオチドを含むクローン 1 7 5 配列 (配列番号 1) および 1 1 0 7 個のヌクレオチドを含む G l u B 3 - 2 3 (配列番号 5 1) および 6 個の H i s コドンを p E T 1 7 b 大腸菌発現ベクターにクローニングした。p E T 1 7 b - C 1 7 5 および p E T 1 7 b - G l u B 3 - 2 3 構築物は、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) に形質転換した。形質転換細胞は、3 7 ℃ にて 1 0 0 m g / l のアンピシリンを含有する 1 リットルのルリアブロス培地中で増殖させた。細胞は 0 . 4 ~ 0 . 6 の O D ₆₀₀ まで増殖させ、次いで、過剰発現を 0 . 5 m M の終末濃度までのイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) の添加によって誘導した。その後、細菌をさらに 4 時間増殖させ; 細胞を遠心分離によって収集し、- 2 0 ℃ で一晩凍結した。透明な細胞溶解物を調製し、N i N T A クロマトグラフィーを Q I A e x p r e s s i o n i s t h a n d b o o k (Q I A G E N , H i l d e n , G e r m a n y) によって行った。タンパク質含有画分をプールし、1 0 m M N a H ₂ P O ₄ で透析した。タンパク濃度は B C A A s s a y K i t (N o v a g e n) で決定した。

【 0 0 3 7 】

クローン 4 3 および 8 2

8 2 8 個のヌクレオチドを含むクローン 4 3 配列 (配列番号 2) 、および 5 8 8 個のヌクレオチドを含むクローン 8 2 配列 (配列番号 3) + 6 個の H i s コドンを p M a l - c 4 x 大腸菌発現ベクター (G e n e S c r i p t U S A I n c .) にクローニングした。p M A L - c 4 x - 4 3 および p M A L - c 4 x - 8 2 構築物を大腸菌 B L 2 1 (D E 3) に形質転換し、3 7 ℃ で 1 0 0 m g / l のアンピシリンを含む 1 リットルのルリアブロス + ブドウ糖培地中で増殖させた。細胞は 0 . 4 ~ 0 . 6 の O D ₆₀₀ まで増殖させ、次いで、過剰発現を 0 . 5 m M の終末濃度までのイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (I P T G) の添加によって誘導した。その後、細菌をさらに 4 時間増殖させ; 細胞を遠心分離によって回収し、- 2 0 ℃ にて一晩凍結した。透明な細胞溶解物を調製し、N i N T A クロマトグラフィーを Q I A e x p r e s s i o n i s t h a n d b o o k (Q I A G E N , H i l d e n , G e r m a n y) によって行った。タンパク質含有画分をプールし、1 0 m M N a H ₂ P O ₄ で透析した。そのタンパク濃度は B C A A s s a y K i t (N o v a g e n) で決定した。

【 0 0 3 8 】

- ビューロチオニン

クローン 8 4 由来アレルゲンは、大腸菌 B L 2 1 (D E 3) 細胞中の C 末端ヘキサヒスチジンタグを持つ組換えタンパク質として発現させた。p E T 1 7 b - ビューロチオニン構築物を B l 2 1 (D E 3) 細胞に形質転換した。形質転換した大腸菌細胞は、0 . 6 の光学密度 (6 0 0 n m) まで 3 7 ℃ の 2 5 0 μ l (1 0 0 m g / m l) アンピシリンを含む 2 5 0 m l L B 培地中で増殖させ、タンパク質発現を 1 2 5 μ l (1 M) イソプロピル - ベータ - D - チオガラクトシダーゼ (I P T G) の添加によって誘導した。大腸菌細胞は 4 ℃ で 1 5 分間 3 5 0 0 r p m での遠心分離によって 4 時間後に収集した。タンパク質は、ニッケル・アフィニティークロマトグラフィーによって可溶性画分から精製した (Q u i a g e n , H i l d e n , G e r m a n y) 。アレルゲンを 1 0 m M N a H ₂ P O ₄ 緩衝液 p H 4 . 0 中に溶解させ、- 2 0 ℃ にて貯蔵した。精製したアレルゲン濃度を B C A アッセイ (

10

20

30

40

50

Pierce, Rockford, IL) により決定した。

【0039】

実施例3

組換えタンパク質の特徴付け

C175およびGluB3-23

配列解析は、GluB3-23が、安定性のための分子内ジスルフィド結合、およびマクロポリマーを形成するための他のLMWおよびHMWのグルテニンサブユニットとの分子内ジスルフィド結合を構築する8個のシステイン残基を含む、s-LMWグルテニンであることを示した。天然タンパク質は、シグナルペプチド、N末端領域、反復ドメインおよび3つのC末端領域よりなる。組換えC175タンパク質は、3つのC末端領域およびヘキサ・ヒスチジntag(図1)によって構成される。組換えGluB3-23は、シグナルペプチドがない天然GluB3-23のすべての領域+ヘキサ・ヒスチジン・タグを含有する(図7a)。組換えC175タンパク質については、20.8kDaの分子量および8.81の理論的pIが計算され、組換えGluB3-23については、分子量は40.33kDaおよび8.73の理論的pIと評価された。純度および分子量はSDS-PAGEおよびCoomassie Brilliant Blue染色(Fling, Bradford)によってコントロールした。C175は約21kDa、GluB3-23は40kDaの明確なバンドを提供した。タンパク質の重合挙動についての情報を達成するために、SDS-PAGE銀染色法を還元または非還元条件下でBIO-RAD銀染色プラスハンドブックによって行った。還元条件について、β-メルカプトエタノールを含有する試料緩衝液を95℃にて5分間沸騰させ；非還元条件について、β-メルカプトエタノールを含まない試料緩衝液を用いた。非還元条件下で、C175は、約20kDa、40kDaおよび250kDaのバンドを提供し、これは、C175がジスルフィド結合によるジ-

10

20

30

【0040】

質量分析は、従前に記載したごとく行った(6)。図7bおよび図7cにおいて、精製したC175およびGluB3-23の質量分析(MS)を示す。最も高い強度を持つピークは、タンパク質サイズを示す。C175は21021.430Da、およびGluB3-23は40321.094Daのピークを示し、これは計算された質量と相関する。

【0041】

mal43およびmal82

クローン43および82に対応する組換えタンパク質は、図8aに示すN末端マルトース結合タンパク質タグ(MBPタグ)を特色とし、これはpMAL-c4xベクターに起因する。mal43については、73.3kDaの分子量および5.81の理論的pI、およびmal82については64.6kDaの分子量および5.99の理論的pIを計算した。全長HMW Glu-B1(配列番号52に対応する)の配列解析は、タンパク質がジスルフィド結合形成用の4つのシステイン残基を持つx-タイプHMWタンパク質であることを示した。天然Glu-B1はシグナルペプチド、N末端非反復ドメイン、大きな反復ドメインおよびC末端非反復ドメインを含む。組換えmal43は、MBP、反復ドメインの一部およびヘキサ・ヒスチジntagよりなる。組換えmal82は、MBP、反復領域の一部、C末端非反復領域およびヘキサ・ヒスチジntagから構成される(図8a)。図2において、Glu-B1のヌクレオチド配列は、クローン43の推定アミノ酸配列と整列させ、図3において、Glu-B1のヌクレオチド配列はクローン82の推定アミノ酸配列と整列させている。

40

【0042】

純度および分子量はSDS-PAGEおよびCoomassie Brilliant Blue染色(Fling, Bradford)によってコントロールした。Mal43は約73kDaにて、mal82は64kDaにてクリアバンドを提供した。従前に記載(6)のごとく、質量分析を行った。図8bおよび図8cにおいて、精製mal43およびmal82

50

の質量分析 (MS) を示す。73695.525 Da のピークは、mal43 のサイズを示す。図 8c において、65220.872 のピークは、mal82 の分子量を示す。これらの結果は計算された分子量と相関する。

【0043】

- ピューロチオニン

IgE 反応性ファージクローン 84 の推定アミノ酸配列と公表された配列との比較は、それが小麦 - ピューロチオニンであることを示した。 - ピューロチオニンの構造遺伝子は、典型的なシグナルペプチド、チオニンドメイン (5 kDa) および C 末端の酸伸長をコードする領域を含む。クローン 84 由来アレルゲンの単離ヌクレオチド配列 (図 4) は、IgE 反応性を示し、この IgE エピトープは、C 末端の酸伸長ドメインおよび一部のチオニンドメインと関係した (図 9a)。クローン 84 由来アレルゲンについての推定アミノ酸配列は、12.7 kDa の計算分子量および 6.27 の等電点 (pI) を有する。精製組換えタンパク質の質量分析の結果は、12742 Da の推定分子量に一致した (図 9b)。タンパク質の純度は、14% SDS-PAGE および Coomassie Blue 染色 (Fling, Bradford) によりチェックし、それらの同一性をモノクローナル抗-His タグ抗体 (Novagen) を用いるウェスタンブロットングにより確認した。Coomassie Blue 染色した 14% SDS-PAGE は、18 kDa での組換えアレルゲン - ピューロチオニンの純度および移動を示した。

10

【0044】

実施例 4

20

組換えタンパク質の IgE 反応性

Glub3-23 は、小麦依存性食物アレルギーにおける主要アレルゲンである。

Glub3-23 および C175 に対する小麦食物アレルギー患者の IgE 反応性をドットプロット分析によりテストし、図 10 および図 11 に示した。0.5 μg の精製組換えタンパク質 (Glub3-23 および C175)、2 μg の水性小麦種子 (WSE) 抽出物および 0.5 μg のヒト血清アルブミン (HSA) をニトロセルロース (Whatman Protran ニトロセルロース膜, Sigma Aldrich) 片にドットし、緩衝液 A (50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4、0.5% w/v BSA、0.5% v/v ツイーン-20、0.05% w/v NaN₃) でブロックした後、小麦食物アレルギーに苦しむ患者からの 1:10 希釈血清とインキュベートした。結合 IgE Ab は 1:10 希釈^{1 2 5} I 標識抗ヒト IgE Ab で検出し、オートラジオグラフィにより視覚化した。

30

【0045】

血清は、小麦食物アレルギーに苦しむ患者の集団から得た。患者は、小麦に対する陽性の病歴、陽性皮膚プリックテスト (SPT)、二重盲検またはオープン食物負荷または CAP テスト (Phadia, Uppsala, Sweden) により選択した。

【0046】

図 10 において、27.3% の患者が C175 に対する IgE 反応性を示し、これらの集団の 54.5% が全長タンパク質 Glub3-23 に対する IgE 反応性を示すことが示されている。図 11 において、患者のもう一つの集団の 73.1% が C175 に対して IgE 反応性を示し、80.8% が全長アレルゲン Glub3-23 に対する IgE 反応性を示すことが示されている。WHO / IUIS アレルゲン標準化委員会定義 (www.allergen.org) により、主要アレルゲンが 50% の患者により認識されなければならない。

40

【0047】

したがって、LMW Glub3-23 は、小麦食物アレルギーにおける主要アレルゲンであり、診断および恐らく治療用の有望なアレルゲンである。

【0048】

さらに、発明者らは、IgE 認識用の大部分のエピトープが Glub3-23 の N 末端部分に局在することを示した。阻害ドットプロットを患者血清で行った。血清は、10 μg の組換え Glub3-23、C175 または Bet v1 と予めインキュベートした。結合 IgE Ab は^{1 2 5} I 標識抗ヒト IgE Ab で検出し、オートラジオグラフィによ

50

り視覚化し、ドット強度はガンマ・カウンターによって測定した。表2は、パーセンテージでの計算された障害を示し、これは、G l u B 3 - 2 3のC末端部分のC 1 7 5が、G l u B 3 - 2 3結合に対するI g E結合を防止するのに低い可能性を有することを示す。

【0049】

G l u - B 1は小麦依存性食物アレルギーにおける少なくともマイナーなアレルゲンである。

G l u - B 1の部分的タンパク質を表わす組換え高分子量タンパク質m a l 4 3およびm a l 8 2は、図11に示される集団からの患者からの血清を用いてドットプロットにおいてテストした。血清は小麦食物アレルギーに苦しむ患者から得た。患者は、小麦に対する陽性の病歴、および陽性の皮膚プリックテスト(S P T)またはC A Pテスト(Phadia, Uppsala, Sweden)により選択した。0.5 μgの精製組換えタンパク質(m a l 4 3およびm a l 8 2)の、2 μgの水性小麦種子(W S E)抽出物および0.5 μgのヒト血清アルブミン(H S A)をニトロセルロース(Whatman Protran nitrocellulose membrane, Sigma Aldrich)片にドットし、緩衝液Aでブロック後に、1:10希釈の患者血清とインキュベートした。結合I g E A bは1:10希釈の¹²⁵I標識抗ヒトI g E A bで検出し、オートラジオグラフィによって視覚化した。30.8%の小麦食品アレルギー患者は、これらのアレルゲンに対するI g E反応性を示した(図11)。W H O / I U I Sアレルゲン標準化委員会定義(www.allergen.org)に基づいて、10%の患者によって認識されたアレルゲンは、マイナーなアレルゲンである。

10

【0050】

- ピューロチオニン

ドットプロットされた組換え小麦 - ピューロチオニンのI g E反応性は、小麦食物アレルギーに苦しむ患者からの血清I g E抗体でテストした(表3)。- ピューロチオニンに対するI g E反応性を示すこれらの各患者は、ドットプロットされた小麦種子抽出物に対するI g E反応性を示した。1つの集団(n = 13)からの患者の23%、およびもう一つの集団(n = 24)からの患者の29%が、組換え - ピューロチオニンに反応した(図12)。

20

【0051】

実施例5

配列アラインメントおよび種々の作物抽出物

30

G l u B 3 - 2 3およびC 1 7 5

G l u B 3 - 2 3小麦アレルゲンが他の作物種に相同体を有するかどうかを見出すために、ライ麦(*Secale sylvestre*)、大麦(*Hordeum brevisubulatum*)、オート麦(*Avena sativa*)、スペルト小麦(*spelt*)(*Triticum aestivum* subsp. *Spelta*)、およびコメ(*Oryza sativa*)とのアミノ酸配列整列を行い、図13に示す。ライ麦は、小麦(*Triticum aestivum*)においてG l u B 3 - 2 3に76%の同一性、大麦は64%、オート麦は48%、スペルト小麦は46%およびコメは40%の同一性を示す。最も保存されたドメインはシグナルペプチドおよびC末端領域であった。引き続き、種々の作物の水性抽出物を調製した。15グラムの作物をホモジナイズし、32 mlのH₂Oおよび32 μlのフェニルメチルスルホニルフルオリド(P M S F)を添加し、4 で4時間攪拌した。抽出物を遠心して、未溶解粒子状物質を除去した。水性抽出物を調製用12.5% S D S P A G Eに負荷し、タンパク質分子量マーカー(PageRuler Plus; Prestained Protein Ladder, Fermentas)を標準として用い、タンパク質をニトロセルロース膜(Whatman Protran nitrocellulose membrane, Sigma Aldrich)にプロットし、膜を緩衝液A(50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.4、0.5% w/v B S A、0.5% v/v ツイーン-20、0.05% w/v N a N₃)でブロックし、その後、それらをウサギ免疫前血清または緩衝液Aで1:10000で希釈したC 1 7 5またはG l u B 3 - 2 3に対して生起されたウサギA bと一晚インキュベートした。次いで、血清を処分し、膜を緩衝液Aで3回洗浄した。結合した一次抗体を1:10000で希釈した¹²⁵I標識ウサギI g G A b(BSM diagnostic, Vienna, Austria)で検出し、増感紙(Kodak, Heidelberg, Germ

40

50

any) を含むコダック X O M A T フィルムにより視覚化した。アレルゲンの交差反応部分を同定するために、膜は、C 1 7 5 および G l u B 3 - 2 3 に対する 2 つの種々のウサギ抗体とインキュベートした。結合 C 1 7 5 A b および G l u B 3 - 2 3 A b を各々 10^{-5} I 標識抗ウサギ I g G A b により検出し、オートラジオグラフィによって視覚化した。すべての抽出物において G l u B 3 - 2 3 相同体を検出できたが、C 1 7 5 抗体は、オート麦において相同体を検出できなく、他のすべての抽出物において、その反応は G l u B 3 - 2 3 抗体を用いるものよりも弱かった。

【 0 0 5 2 】

- ピューロチオニン

クローン 8 4 由来アレルゲンの交差反応性を研究するために、他の植物における相同性タンパク質とのクローン 8 4 由来アレルゲン - ピューロチオニンの多重配列アラインメントは、タンパク質も他の植物種に非常に共通していることを示した。クローン 8 4 由来 - ピューロチオニンのアミノ酸配列 (単一文字コード) を、小麦 (g i | 4 0 0 7 8 5 0)、ライ麦 (g i | 4 0 0 7 7 4 5)、大麦 (g i | 2 4 6 2 1 5)、オート麦 (g i | 2 1 0 6 9 0 4 5)、ゴートグラス (g i | 1 0 5 2 5 5 1)、コメ (g i | 2 1 5 7 6 8 9 9 3)、セージ (g i | 7 7 5 4 3 3 9 3)、シロイヌナズナ (g i | 2 1 5 5 3 5 8 8)、カラシ (g i | 1 2 0 5 6 4 5 5 6)、ダイオウ (g i | 1 9 7 3 1 2 8 8 1) におけるピューロチオニンと整列させた (図 1 4)。クローン 8 4 由来アレルゲン - ピューロチオニンは、ライ麦 (8 5 %)、大麦 (4 9 %) からの - ピューロチオニンと最高の度合いの配列同一性を共有し、また、他のいくつかの植物源からの - ピューロチオニンと 3 0 % を超える配列同一性を示す (例えば、オート麦 4 9 %、ゴートグラス 4 4 %、コメ 4 0 %、セージ 3 7 %)。ニトロセルロースプロットした抽出物をアルファピューロチオニンに特異的なウサギ抗体で調べ、対照目的のために、対応する免疫前血清を用いた。ライ麦および大麦のような前記の他の植物種からの S D S タンパク質抽出物中のアレルゲンを検出するための - ピューロチオニン特異抗体を示した。

【 0 0 5 3 】

実施例 6

小麦種子成熟中のタンパク質発現

G l u B 3 - 2 3 および C 1 7 5

小麦 (Triticum aestivum) 種子 S D S 抽出物を受粉 7、10、15、20、25、30、35 日後に、C o n s t a n t i n ら (5) に従い成熟小麦種子から調製した。抽出物はゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜へプロットした。膜を G l u B 3 - 2 3 に対して生起したウサギ抗体とインキュベートした。結合抗 G l u B 3 - 2 3 抗体は、 10^{-5} I 標識抗ウサギ I g G 抗体で検出し、オートラジオグラフィによって視覚化した。G l u B 3 - 2 3 が成熟中に小麦種子に蓄積することが明確に示された。

【 0 0 5 4 】

実施例 7

i n v i t r o 消化アッセイ

G l u B 3 - 2 3 および C 1 7 5

消化アッセイにおけるアレルゲンの安定性は、その一部分が全く消化されず、タンパク質特異抗体によって検知できるタンパク質が食物アレルゲンに属することを示す (7)。胃および十二指腸の i n v i t r o 消化は、従前に記載された水性小麦種子抽出物で行った (7) ; 十二指腸消化については、市販酵素錠 Pankreoflat-Dragee (Solvay Pharma, Hannover, Germany) を用いる修飾を含む。消化されたタンパク質を C 1 7 5 および G l u B 3 - 2 3 に対して生起したウサギ抗体で検出した。

【 0 0 5 5 】

胃ならびに十二指腸消化アッセイにおいて、抗 G l u B 3 - 2 3 抗体のみが消化後にバンドを検出できることが示された。G l u B 3 - 2 3 の C 1 7 5 部分は 5 分後に胃消化アッセイにおいて消化されたが、G l u B 3 - 2 3 の N 末端部分は、120 分消化後に検出できた。十二指腸消化アッセイは同様のパターンを生じた。C 1 7 5 断片は、2 分間の消

化後に検出できなかったが、G l u B 3 - 2 3 部分は、4 5 分間の十二指腸消化後に検出できた。結果的に、G l u B 3 - 2 3 のN末端部分が安定な消化しにくい断片であることが示された。

【 0 0 5 6 】

実施例 8

グリアジンは、Weissらの手順後に70%エタノールで小麦粒から抽出した(8)。次いで、抽出したグリアジンは、50mMトリス緩衝液pH4.0および4M尿素を含有する緩衝液Aに対して透析することにより、可溶化した。可溶化したグリアジンを、FPLC(高速タンパク質液体クロマトグラフィー)装置に接続した、緩衝液Aで平衡したスルホプロピル(SP)セファロースを通過させた。フロースルー画分を集め、FTSPと分類した。カラムを緩衝液Aで洗浄し、SPカラム中の結合タンパク質を50mMトリスpH4.0、4M尿素を含有し、0~500mM NaClの塩勾配を持つ緩衝液Bを用いて溶出し、これらの画分をEluSPと分類した。FTSP画分の一部を50mMトリスpH10.0および4M尿素を含有する緩衝液C中で透析し、同じ緩衝液で平衡させたジエチルアミノエチル(DEAE)セファロースカラムに通過させた。フロースルー画分を集め、FTDEAEと分類した。カラムを緩衝液Cで洗浄し、結合タンパク質を0~500mM NaClの勾配を含む緩衝液Cで溶出させた。溶出画分はEluDEAEと分類した。

10

【 0 0 5 7 】

実施例 9

セリアック病特異的小麦タンパク質およびペプチド抗原の同定

全小麦抽出物、全グリアジンおよび前記の実施例8に記載のように得た4つの画分、FTSP、EluSP、FTDEAEおよびEluDEAEを、単次元低減SDS-ゲル電気泳動(single dimension reducing SDS gel electrophoresis)により分離し、ニトロセルロース膜上にプロットし、よく特徴付けられたセリアックおよび非セリアック患者からの血清IgAで調査した。非セリアック患者および小麦を含まない規定食の患者が、FTSPおよびFTDEAE画分中のタンパク質により少ない反応性を示したが、他の画分により反応性であり、一般的に、全小麦抽出物および全グリアジン抽出物に対してより反応性であるため、FTSPおよびFTDEAE画分中のタンパク質は、その疾患に高度に特異的であるようであった(データを示さず)。

20

30

【 0 0 5 8 】

実施例 10

セリアック病に対する特異性

全小麦抽出物、グリアジン、グリアジンのその4つの画分、水性可溶小麦タンパク質およびSDS可溶性グルテニンを電気泳動により分離し、ニトロセルロース膜上にプロットし、小麦アレルギーに関与すると同定されたクローンに対するウサギにおいて生成された抗体で調べた。FT画分(FTSPおよびFTDEAE)はセリアック病につきかなりより良好な特異性を有し、すなわち、この画分中の大部分のタンパク質は、CD患者の血清のみに陽性のIgA反応性を示し、グルテンを含まない規定食のCD患者および健康対照の血清では反応性を示さなかったが、Elu画分(EluSPおよびEluDEAE)は、健康対照者または規定食のセリアック患者からの血清とのIgA反応性も示す物質を含有した(データは示さず)。

40

【 0 0 5 9 】

実施例 11

質量分析によるペプチドおよびタンパク質の同定

その4つの画分を標準プロトコールに従い、ペプシン/トリプシン酵素混合物で消化し、得られたペプチドをESI-LC/MS質量分析(HCT ULTRA from Bruker Daltonics)により同定した。FTSP画分およびFTDEAE画分中でグリアジンが富化されることが判明した。得られたすべてのペプチドを表4a(配列番号:62~86および108~110)に示す。

50

【0060】

実施例12

組換え グリアジン1および グリアジン2の発現および精製

グリアジン1配列(配列番号87)および グリアジン2(配列番号88)(表4b)をそのC末端にてさらなる6×ヒスチジン残基を含む組換えタンパク質として発現されるpET27b大腸菌発現ベクターにクローニングした。pET 27b-GG1、およびpET 27b-GG2構築物を大腸菌BL21(DE3)に形質転換した。その形質転換細胞は、37℃で50mg/lのカナマイシンを含有する1リットルのルリアプロス培地中で増殖させた。細胞は0.6のOD₆₀₀まで増殖させ、タンパク質発現を0.5mMの最終濃度までのイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の添加および30℃での12時間のインキュベーションにより誘導した。細胞は遠心分離によって収集し、溶解緩衝液(50mMトリスpH8.0、500mM NaCl、10%グリセロール)中で再懸濁し、PMSF(フェニルメタンスルホニルフルオリドを溶解直前に添加した。次いで、細胞はULTRA-TURRAX(IKA)ディスペンサーを用いて溶解し、懸濁液を高速にて遠心して、封入体(inclusion body)を抽出した。封入体として組換えタンパク質を含有するペレットを8M尿素緩衝液中で可溶化し、6×ヒスチジンタグしたGG1およびGG2をQIAexpressionist handbook(QIAGEN, Hilden, Germany)に従って行うNi-Ntaクロマトグラフィーを用いて変性条件下で精製した。精製タンパク質を含む画分は、50mMトリスpH8.0、100mM NaCl、10%グリセロール緩衝液に対して段階的に透析して、尿素を除去し、-20℃でアリコートとして貯蔵した。タンパク濃度はBCA Assay Kit(Novagen)で決定した。

10

20

【0061】

実施例13

小麦食物抗原に対するIgA反応性

100μlの小麦タンパク質GG1(グリアジン1)、GG2(グリアジン2)、5μg/mlの濃度の-ピューロチオニン、GluB3-23、C-175、Mal82およびMal43をNunc Maxisorp Elisaプレート上に4℃にて一晚コーティングした。残る自由な結合部位を室温にて2時間PBST中の1%BSAでブロックした。セリアック病患者、規定食のセリアック患者および陰性対照からの100μlの血清をPBST緩衝液の0.5%BSAに1:100希釈にて添加し、4℃にて12時間インキュベートした。プレートは、PBST緩衝液中で5回洗浄し、0.5%BSA/PBST緩衝液中に1:1000まで希釈したマウス抗ヒトIgA₁/A₂(BD Biosciences)の100μlを添加し、室温にて5時間インキュベートした。次いで、プレートは、PBSTで5回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(Amersham)で標識したヒツジ抗マウスIgG抗体の100μlを添加し、37℃にて1時間インキュベートした。プレートは、PBSTで3回洗浄し、抗体をHRP-ABTS(2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホネート)検出系を用いて検出し、発色反応はELSAプレートリーダー中で405nmにて測定した。生成した値は、グラフとしてプロットする。図15参照。組換えGG1およびGG2は、高いIgA反応性を示し、-ピューロチオニンは陰性IgA反応性を示し、LMWグルテニンGluB3-23およびC-175ならびにHMWグルテニン(Mal82およびMal43)は、中程度のIgA反応性を示す。この結果は、組換えタンパク質GG1およびGG2がIgA反応性に高度に特異的であることを示す。-ピューロチオニンに対するIgA反応性の不存在は、IgE結合アレルゲンとしてその特異性を示す。従って、それはIgE反応性につき非常に特異的な候補タンパク質である。

30

40

【0062】

実施例14

T細胞およびB細胞エピトープをマッピングするためのオーバーラップ グリアジンペプチドの合成

50

全長のGG1タンパク質にわたり、5個のアミノ酸残基により相互にオーバーラップし、各ペプチドの長さが18~26個のアミノ酸残基である19個のGG1ペプチドをFMO C技術により合成した(表5、配列番号89~107)。合成後、ペプチドは0.1% TFAを含む0~100%アセトニトリルの勾配を用いてHPLCにより精製した。精製ペプチドは、正確な分子量につきMALDIにより分析し、精製画分を凍結乾燥させ、さらなる使用まで-20にて貯蔵した。

【0063】

実施例15

合成GG1ペプチドに対するセリアック病患者のIgA反応性

ELISAプレートを100 μ lの5 μ g/mlのその19個のオーバーラップするペプチド、rGG1、アルファ-グリアジンペプチドp56~75でコーティングし、アルファ-グリアジンペプチドp56~75(Q65E)を脱アミド化し、CD患者、グルテンを含まない規定食のCD患者および健康対照からの血清IgAで調べ、マウス抗ヒトIgA1/A2およびヒツジ抗マウスIgG-HRP標識抗体を用いて検出した。ヒト血清アルブミン(HSA)を対照として用いた(n=8 CD患者、グルテンを含まない規定食の2名のCD患者および3名の健康対照)。セリアック病患者からの血清IgA反応性は、プロリンとグルタミンにおいて豊富なN末端領域が、プロリンおよびグルタミンにおいて貧弱であるそのタンパク質のC末端領域よりも高いIgA反応性を有することを示した(図16)。合成GG1ペプチド2~7、9、13および18(すなわち、各々、配列番号90~95、97、101および106)の各々は、特異的IgA反応性を示した。公知の免疫優勢エピートプのアルファグリアジンP56~75とのGG1ペプチドのIgA反応性の比較および、脱アミド化アルファグリアジンP56~75(Q65E)は、ペプチド7(配列番号95)およびペプチド9(配列番号97)と同様にペプチド4(配列番号92)およびペプチド6(配列番号94)が、より良好な感度を有することを示した。

【0064】

実施例16

合成GG1ペプチドに対するセリアック病患者のIgG(合計)反応性

ELISAプレートを100 μ lの5 μ g/mlのその19個のオーバーラップするペプチドおよびrGG1でコーティングし、CD患者、グルテンを含まない規定食のCD患者および健康対照からの血清で調べ、マウス抗ヒトIgG(合計)およびヒツジ抗マウスIgG-HRP標識抗体を用いて検出した。ヒト血清アルブミン(HSA)は、対照として用いた(n=8 CD患者、2名のグルテンを含まない規定食のCD患者および3名の健康対照)。N末端領域におけるペプチドに対する反応性はC末端領域より高かった。IgGを用いるアッセイの感度および特異性は低かった(図17)。

【0065】

上記の実施例14~16に示されたセリアック病特異的タンパク質およびペプチドは、抗体に基づいた診断、IgAおよびIgGテストの双方、好ましくは、IgAに基づくテストに有用である。

【0066】

実施例17

組換え グリアジンに対する疱疹状皮膚炎患者血清IgA反応性

ELISAプレートを100 μ lの5 μ g/mlのrガンマグリアジン1、rガンマグリアジン2、-グリアジンペプチドp56~75(-グリ(gli)ペプチド)、脱アミド化-グリアジンペプチド(D)およびヒト血清アルブミンでコーティングした。結合タンパク質は、疱疹状皮膚炎(DH)患者および健康対照からの血清で調べた。そのタンパク質に対するIgA反応性は、マウス抗ヒトIgA1/A2およびヒツジ抗マウスIgG-HRP標識抗体を用いて検出した。(n=12名のDH患者および2名の健康対照)。組換えGG1およびGG2は、健康対照に対してよりも、DH患者からの血清に対してより高いIgA反応性を示した(図18)。この結果は、組換えタンパク質GG1およ

10

20

30

40

50

び G G 2 が疱疹状皮膚炎の診断に用いることができることを示唆する。
【 0 0 6 7 】

【表1】

表1. IgE反応性クローンおよびそれらの対応するタンパク質

cDNAクローン番号	配列番号	対応するアミノ酸配列の配列番号	対応するタンパク質	対応するタンパク質の配列番号
175	1	26	>gi 169666917 gb ACA63857.1 LMW グルテニンサブユニット [Triticum aestivum]	51
43	2	27	>gi 71084277 gb AAZ23584.1 HMW グルテニン _x -タイプサブユニット Bx7 前駆体 [Triticum aestivum]	52
82	3	28	>gi 71084277 gb AAZ23584.1 HMW グルテニン _x -タイプサブユニット Bx7 前駆体 [Triticum aestivum]	52
84	4	29	>gi 4007850 emb CAA65313.1 α-ピューロチオン [Triticum aestivum]	53
50	5	30	>gi 94315063 gb ABF14401.1 1Dx 高分子量グルテニンサブユニット [Triticum aestivum]	54
118	6	31	>gi 6684164 gb AAF23507.1 AF216869_1 グルテニン, 高分子量サブユニット タイプ _y 前駆体 [Triticum aestivum]	55
34	7	32	>gi 154268818 gb ABS72146.1 アルファグリアジン [Triticum aestivum]	56
78	8	33	>gi 205363284 gb ACI04082.1 ガンマーグリアジン [Triticum aestivum]	57
85	9	34	>gi 194718421 gb ACF93462.1 ガンマーグリアジン [Triticum aestivum]	58
16	10	35	>gi 73912496 dbj BAE20328.1 オメガ-5 グリアジン [Triticum aestivum]	59
39	11	36	>gi 10953877 gb AAG25638.1 ベーター-アミラーゼ [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	60
4	12	37	>gi 89143120 emb CAJ32654.1 推定アベニン様 a 前駆体 [Triticum aestivum]	61
46	13	38	IgE 反応性エピトープ	
67	14	39	IgE 反応性エピトープ	
68	15	40	IgE 反応性エピトープ	
79	16	41	IgE 反応性エピトープ	
95	17	42	IgE 反応性エピトープ	
106	18	43	IgE 反応性エピトープ	
110	19	44	IgE 反応性エピトープ	
117	20	45	IgE 反応性エピトープ	
190	21	46	IgE 反応性エピトープ	
195	22	47	IgE 反応性エピトープ	
72	23	48	IgE 反応性エピトープ	
116	24	49	IgE 反応性エピトープ	
91	25	50	IgE 反応性エピトープ	

10

20

30

40

【表 2】

表 2. I g E 阻害

プレインキュベーション	Bet v 1		GluB3-23		C175	
	cpm	% 阻害	cpm	% 阻害	cpm	% 阻害
Pat 8	75.0	0.00	31.5	100.0	73.9	3.0
Pat 10	377.6	0.00,0	36.0	100.0	379.1	0.0
Pat 3	829.0	0.00,0	326.0	63.3	650.0	22.6
Pat 11	379.0	0.00,0	58.9	93.8	190.0	55.3
Pat 12	11.5	—	17.7	—	16.2	—

10

【 0 0 6 9 】

【表 3】

表 3. 小麦依存性食物アレルギーを持つ患者の人口統計的、臨床的および血清学的特徴付け

患者	年齢	性	症状	合計 IgE (kU/L)	小麦特異的IgE (kU/L)	陽性SPT結果
I1	12	F	A	562	68,8	w(4)
V1	41		GE, AS, D	252	>100 (6)	w, hdm, r, c
V2	19	M	GE, AS	653	>100 (6)	w, r, gp, e, b, n
G1	14	M	A, AD, AST	636	>200	w(8), ew(9), ey(8)
G2	3	M	A, AD	165	11,7	w(8)
G3	3	M	A, AD	349	8,09	w(4), ew(4.5), ey(3.5)
G4	3	F	U, AD, AST	795	165	w(7.5), ew(6.5), ey(4)
G5	5	M	A, AD, AST	2723	695	w(7)
G6	5	M	AD, AST	2724	48	
G7	12	F	U, AD, AST	4539	>100	w(11)

20

kU/L: リットル当たりのキロ単位, A: アナフィラキシー, AD: アトピー性皮膚炎, AS: 気道症状, AST: 喘息, D: 呼吸困難, GE: 胃腸症状, U: 蕁麻疹, b: カバノキ, c: ネコ, e: 卵, ew: 卵白, ey: 卵黄, gp: 花粉, hdm: チリダニ, n: ナッツ, r: ライ麦, w: 小麦

30

【 0 0 7 0 】

【表 4】

表 4 a. ペプシン-トリプシン消化後の質量分析により同定したペプチド

画分	配列番号	ペプチド配列	グリアジン群のクラス
FT SP	62	AQIPQQLQ	γ -グリアジン群
	63	PQQRPFIQPSL	γ -グリアジン群
	64	LVQGGGIIQPQQPAQLE	γ -グリアジン群
	65	APFASIVAGIGGQ	γ -グリアジン群
	69	LVPLSQQQVGGQILV	γ -グリアジン群
	70	LPLYQQQVGGQTLV	γ -グリアジン群
	71	FLPLSQQQVGGQSLV	γ -グリアジン群
	80	LQQPNIAHASSQVSQSYQLL	γ -グリアジン群
	108	LSQQQVGGQSLV	γ -グリアジン群
	109	LYQQQVGGQTLV	γ -グリアジン群
Elu SP	72	LQLQPPFPQQLP	α/β グリアジン群
	73	FFQPSQQNPQAQGSFQPQQLPQFE	α/β グリアジン群
	74	FRPSQQNPQAQGSVQPQQLPQF	α/β グリアジン群
	75	RVPVPQLQPQNPSQQQPQKQ	α/β グリアジン群
	78	LQQHNIAHGSSQVLQ	α/β グリアジン群
	76	LQQHNIAHASSQVLQSTYQLLQ	α/β グリアジン群
	79	MVRVPVPQLQ	α/β グリアジン群
	77	LQQHNIAHGSSQVLQESTYQLV	α/β グリアジン群
	85	LPQQPPFSQQQPILP	LMW グルテニンサブユニット
	84	LPQQQIPFVHPSILQ	LMW グルテニンサブユニット
	81	FLQPHQIAQLE	LMW グルテニン群
	82	LAQGTFLQPHQIAQLE	LMW グルテニン群
	83	FSQQQLFPQQPSFS	LMW グルテニン群
	86	LLQQQIPVHPSILQ	LMW グルテニンサブユニット
68	LVQGGGIIQPQQPAQLE	γ グリアジン群	
FT DEA E	65	APFASIVAGIGGQ	γ -グリアジン群
	66	NIQVDPSGQVQALQ	γ -グリアジン群
	67	NIQVDPSGQVQWLQQ	γ -グリアジン群
	68	LVQGGGIIQPQQPAQLE	γ -グリアジン群
Elu DEA E	79	MVRVPVPQLQ	α/β グリアジン群
	110	LQQHSIAYGSSQVLQ	α グリアジン群
	70	LPLYQQQVGGQTLV	γ -グリアジン群
	80	LQQPNIAHASSQVSQSYQLL	γ -グリアジン群

10

20

表 4 b. ガンマグリアジン 1 (GG1) およびガンマグリアジン 2 (GG2)

タンパク質	配列番号
ガンマ グリアジン1 (GG1)	87
ガンマ グリアジン2 (GG2)	88

30

【 0 0 7 1 】

【表 5】

表5. 合成GG1ペプチド

ペプチド番号	配列番号	rGG1ペプチド配列
1	89	MNIQVDPSPGQVQWLQQQLV
2	90	QQQLVPQLQQPLSQQPQQTF
3	91	QQPQQTFPQPQQTFPHQPQQQ
4	92	QPQQQVPQPQQPQQPFLQPQQPFPQQ
5	93	PFPQQPQQPFPQTQQPQQ
6	94	QQPQQPFPQQPQQPFPQTQQ
7	95	PFPQTQQPQQPFPQLQQPQQ
8	96	QQPQQPFPQPQQQLPQPQQ
9	97	PQPQQPQQSFPQQQRPI
10	98	QRPIQPSLQQQLNPCKNIL
11	99	CKNILLQSKPASLVSSLWS
12	100	LVSSLWSIWPQSDCQVMRQ
13	101	QVMRQQCCQQLAQIPQQQLQCA
14	102	QLQCAAHSVVHSIIMQQQQQ
15	103	QQQQQQQQQQGIDIFLPLSQ
16	104	LPLSQHEQVGQGSLSVQGQGI
17	105	QGQGI IQPQQPAQLEAIRSLV
18	106	IRSLVLQTLPSMCNVYVPPECS
19	107	PPECSIMRAPFASIVAGIGGQ

10

20

【 0 0 7 2 】

参考文献

1. Constantin, C., S. Quirce, M. Poorafshar, A. Touraev, B. Niggemann, A. Mari, C. Ebner, H. Akerstrom, E. Heberle-Bors, M. Nystrand, and R. Valenta. 2009. Micro-arrayed wheat seed and grass pollen allergens for component-resolved diagnosis. *Allergy* 64:1030-1037.
2. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1731-43.
3. Sollid LM. Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002;2(9):647-55.
4. Mitea, C., Y. Kooy-Winkelaar, P. van Veelen, A. de Ru, J. W. Drijfhout, F. Koning, and L. Dekking. 2008. Fine specificity of monoclonal antibodies against celiac disease-inducing peptides in the gluteome. *Am J Clin Nutr* 88:1057-1066.
5. Constantin, C., S. Quirce, M. Grote, A. Touraev, I. Swoboda, A. Stoecklinger, A. Mari, J. Thalhamer, E. Heberle-Bors, and R. Valenta. 2008. Molecular and immunological characterization of a wheat serine proteinase inhibitor as a novel allergen in baker's asthma. *J Immunol* 180:7451-7460.
6. Mothes-Luksch, N., S. Stumvoll, B. Linhart, M. Focke, M. T. Krauth, A. Hauswirth, P. Valent, P. Verdino, T. Pavkov, W. Keller, M. Grote, and R. Valenta. 2008. Disruption of allergenic activity of the major grass pollen allergen Phl p 2 by reassembly as a mosaic protein. *J Immunol* 181:4864-4873.
7. S. Vieths, J. R., U.Muller, A.Hoffmann, D.Haustein. 1998. Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple in vitro procedure. *Eur F*

30

40

50

【 図 6 - 2 】

```

P S G Q V Q W L Q Q Q L V P Q L Q Q P L S Q Q F P Q Q T F F Q F Q Q T F F H Q
P Q Q Q V F Q F Q Q Q Q F L Q P Q Q F F Q Q F Q Q F F P Q T Q Q F Q Q
P F F R Q L S A G R Y H Y Q L V W C Q R D P R
>クローン190
P K D S A H R P L G R E L R G G R P R H V G R T G L A N G T G P W G R K R P

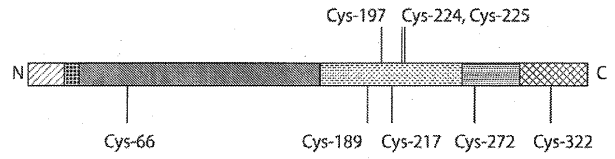
>クローン195
P F F L Q P P Q P F F P Q Q P Q Q P F P Q T Q Q P Q Q F F P Q Q F Q Q P F F P Q T
Q Q P Q Q P F F P Q Q P Q Q P F P Q T Q Q P Q Q P F F P Q L Q Q F Q Q P F F P Q R
I Q P T A R G E G S F E A A D R G T S A G E F Q L S A G R Y H Y Q L V W C Q
R D P R

```

【 図 7 a 】

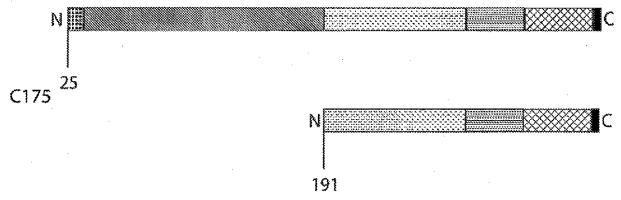
Fig. 7a

GluB3-23



組換えタンパク質

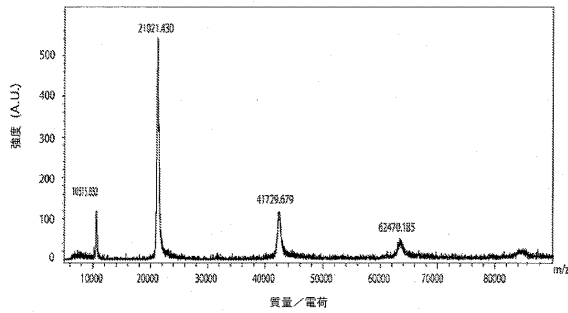
GluB3-23



- シグナルペプチド
- C-末端領域 I
- 6x HIS タグ
- N-末端領域
- C-末端領域 II
- 反復ドメイン
- C-末端領域 III

【 図 7 b 】

Fig. 7b



【 図 8 a 】

Fig. 8a

HMWグルテニン x-タイプ

Glu-B1 al



組換えタンパク質

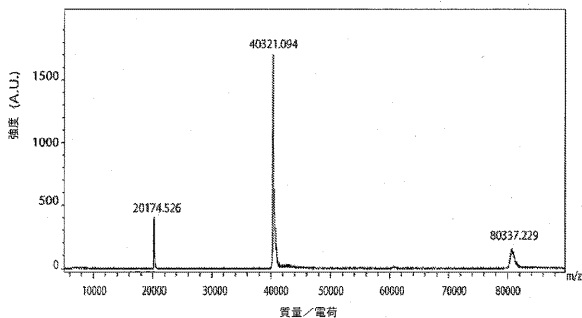
mal 43

mal 82

- シグナルペプチド
- C-末端非反復領域
- 6x-HIS タグ
- N-末端非反復領域
- マルトース結合タンパク質
- 反復領域

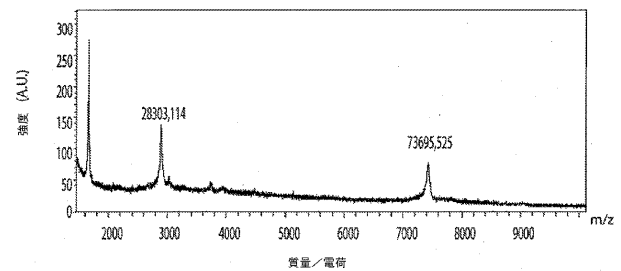
【 図 7 c 】

Fig. 7c



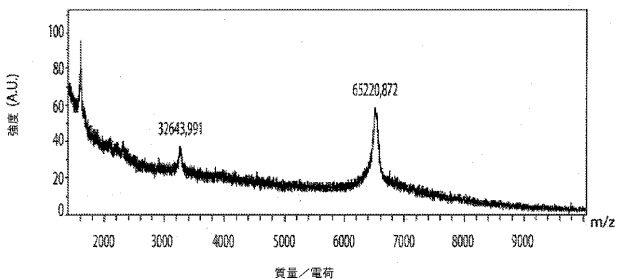
【 図 8 b 】

Fig. 8b



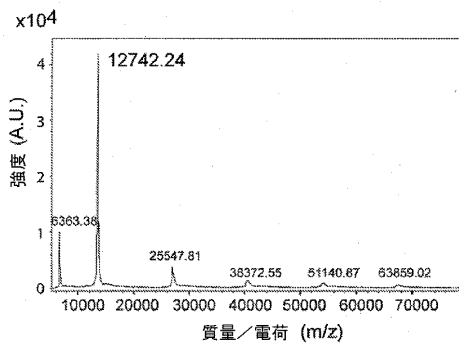
【 図 8 c 】

Fig. 8c



【 図 9 b 】

Fig. 9b



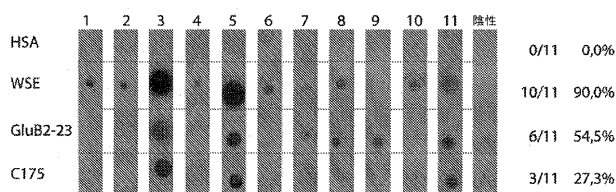
【 図 9 a 】

Fig. 9a



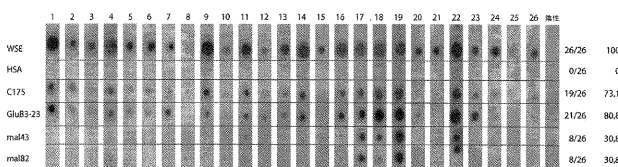
【 図 1 0 】

Fig. 10



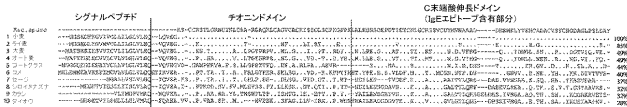
【 図 1 1 】

Fig. 11



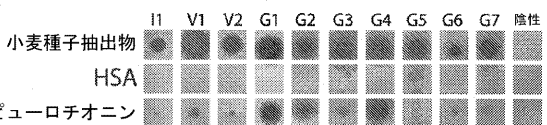
【 図 1 4 】

Fig. 14



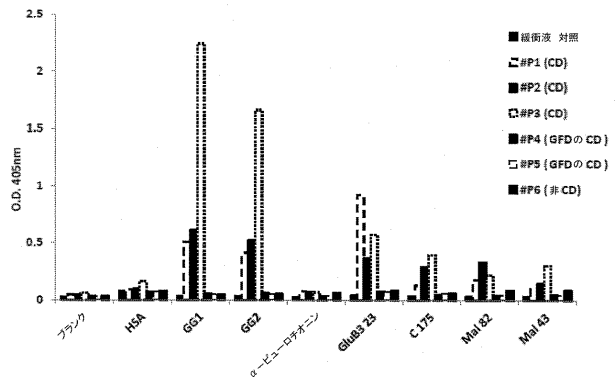
【 図 1 2 】

Fig. 12



【 図 1 5 】

Fig. 15



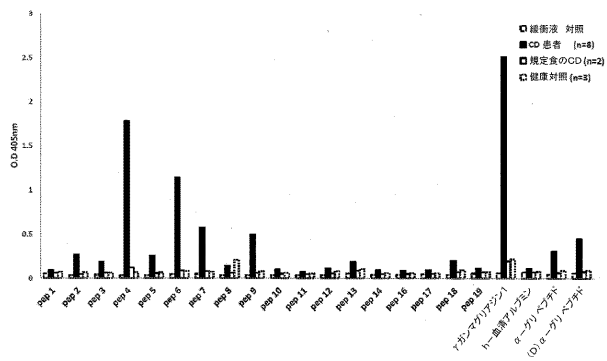
【 図 1 3 】

Fig. 13



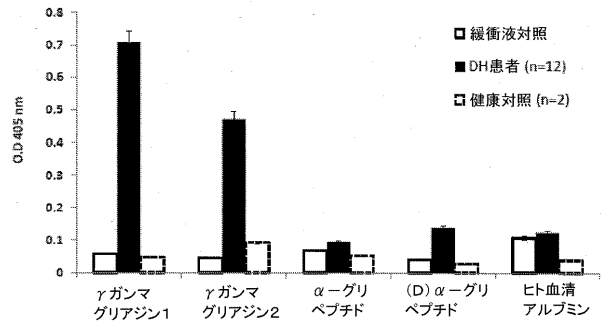
【 図 1 6 】

Fig. 16



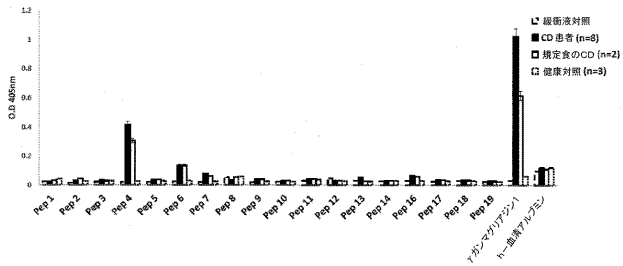
【 図 1 8 】

Fig. 18



【 図 1 7 】

Fig. 17



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成25年10月4日 (2013.10.4)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2014508517000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2012/050121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: A61K, A61P, C07K, G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE, DK, FI, NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, PAJ, WPI data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, MEDLINE, EBI;Registry		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005105129 A2 (BTG INT LTD ET AL), 10 November 2005 (2005-11-10); Comprising peptides 100% similar to parts of SEQ ID NO 26 and the whole or parts of SEQ ID NO: 90-98; see extra sheet for details	1-19
	--	
X	EP 0905518 A1 (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN ET AL), 31 March 1999 (1999-03-31); The following sequences are related to SEQ ID NO: 26: SEQ ID NO 8 (15 aa) 100.0% identity in 15 aa overlap between aa 33-47;	1-19
	--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25-07-2012		26-07-2012
Name and mailing address of the ISA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. + 46 8 666 02 86		Authorized officer Patrick Andersson Telephone No. + 46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2012/050121

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SNEGAROFF J et al., "Recombinant Proteins and Peptides as Tools for Studying IgE Reactivity with Low-Molecular-Weight Glutenin Subunits in Some Wheat Allergies", 2007, vol 55, pages 9837-9845, Journal of Agricultural Food Chemistry; whole document	1-6, 10-13, 17-19
A	--	7-9, 14-16
X	AKAGAWA et al. "Proteomic Analysis of Wheat Flour Allergens", 2007, vol 55, pages 6863-6870, Journal of Agricultural Food Chemistry; table 2 points 14-16	1-8, 12-13, 17-19
A	--	9-11, 14-16
A	UNIPROT Accession no. B2Y2Q7, 2008-07-01 [online] [2011-08-25] Retrieved from: EBI; Database UNIPROT; whole document; 100% identity in 369 aa overlap with SEQ. ID. NO. 51 and 76,6 % identity in 333 aa overlap with SEQ ID NO:26	1-6
X	--	7-19
X	WO 03104273 A2 (ISIS INNOVATION ET AL), 18 December 2003 (2003-12-18); Comprising peptides 100% similar to parts of SEQ ID NO 26 and the whole or parts of SEQ ID NO: 89-94, 96-107; see extra sheet for details	1-19
X	--	
X	JP 2006126083 A (UNIV SHIMANE), 18 May 2006 (2006-05-18); figure 3; SEQ ID NO: 3 has identity with SEQ ID NO: 26 in a 7 aa overlap & Database JPOP[online]Accession number BD937799, 26 March 2007, retrieved from EBI 58.1% identity (65.4% similar) in 356 aa overlap with SEQ ID NO: 26	1-8, 12-19
A	--	9-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2012/050121
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 0125793 A2 (ISIS INNOVATION ET AL), 12 April 2001 (2001-04-12); The following sequences are related to SEQ ID NO 26:</p> <p>SEQ ID NO 57 (15 aa) 100.0% identity in a 15 aa overlap between aa 33-47;</p> <p>SEQ ID NO 660 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 176-195;</p> <p>SEQ ID NO 667 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 224-243;</p> <p>SEQ ID NO 659 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 168-187;</p> <p>SEQ ID NO 656 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 144-163;</p> <p>SEQ ID NO 670 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 248-267;</p> <p>SEQ ID NO 669 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 240-259;</p> <p>SEQ ID NO 662 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 190-209;</p> <p>SEQ ID NO 671 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 256-275;</p> <p>SEQ ID NO 664 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 200-219;</p> <p>SEQ ID NO 100 (15 aa) 100.0% identity in 15 aa overlap between aa 33-47;</p> <p style="text-align: center;">--</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2012/050121

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROCHER A et al., "Characterization of distinct alpha- and gamma-type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as coeliac immunoreactive proteins.", 1995, vol 1247, pages 143-148, Biochim. Biophys. Acta; whole document; table 1, gamma2-40 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap with SEQ ID NO: 89	5-19
A	--	1-4
X	VACCINO, P et al. " A catalogue of Triticum monococcum genes encoding toxic and immunogenic peptides for celiac disease patients", 2009, vol 281, pages 289-300, Molecular Genetics and Genomics; STN International File Registry Retrieved on 26 august 2011 RN:s= 1144154-61-9, 1144154-59-5, 1144154-57-3, 1144154-55-1, 1144154-51-7, 1144154-47-1, 1144154-45-9	1-7, 10-19
A	--	8-9
X	BOUCHET-MAHIOUT I et al. "Low Molecular Weight Glutenins in Wheat-Dependant, Exercise-Induced Anaphylaxis:Allergenicity and Antigenic Relationships with Omega 5-Gliadins", 2010, vol 153, sida 35-45; whole document	1-6, 10-13, 17-19
A	--	7-9
X	WO 2006112925 A2 (UNIV MARYLAND ET AL), 26 October 2006 (2006-10-26); SEQ ID NO 7 is identical with present SEQ ID NO: 87	5-13, 17-19
A	--	
A	SKERRITT JH, Antigenicity of Wheat Prolanis: Detailed Epitope Analysis using a Panel of Monoclonal Antibodies", 2000, vol32, pages 259-279, Journal of Cereal Science; whole document	1-13, 17-19
	--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2012/050121
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2009139887 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR ET AL), 19 November 2009 (2009-11-19); The following sequences are related to SEQ ID NO 92:</p> <p>SEQ ID NO 10 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap</p> <p>The following sequences are related to SEQ ID NO 94:</p> <p>SEQ ID NO 19 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap</p> <p style="text-align: center;">--</p>	1-19
X	<p>US 20060286601 A1 (MARTI THOMAS ET AL), 21 December 2006 (2006-12-21); The following sequences are related to SEQ ID NO 92:SEQ ID NO 48 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap</p> <p>SEQ ID NO 49 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap</p> <p>SEQ ID NO 50 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap</p> <p>The following sequences are related to SEQ ID NO 94:</p> <p>SEQ ID NO 59 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap</p> <p style="text-align: center;">--</p>	1-19
X	<p>WO 9956698 A2 (KOEENHAVNS UNI ET AL), 11 November 1999 (1999-11-11); The following sequences are related to SEQ ID NO 97:</p> <p>AA53687 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, page 11;AA53686 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, page 76;AA53679 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, page 27</p> <p style="text-align: center;">--</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2012/050121
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02083722 A2 (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN ET AL), 24 October 2002 (2002-10-24); The following sequences are related to SEQ ID NO 105: AAE34158 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap, see fig 4; AAE34159 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap, see fig 4	1-19
A	-- -----	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2012/050121
--

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Parts of claims 1-13 and 17-19 directed to a polypeptide or an epitope related to respectively amino acid sequence of SEQ ID NO: 26, 51 and nucleic acid SEQ ID NO 1.
Inventions 2-72: Parts of claims 1-19 directed to a polypeptide or an epitope related to respectively amino acid sequence SEQ ID NO: 27-50, 62-86 and 89-110, as well as the corresponding proteins SEQ ID NO: 52-61 and corresponding nucleic acid SEQ ID NO 2-25.

Inventions 73-74: Parts of claims 7-19 directed to a polypeptide or an epitope related to SEQ ID NO:s 87 or 88 respectively.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: **parts of 1-19, see below**
Invention 1, and subject matter of claims 1-19 related to SEQ ID NO: 87, and 89-107
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2012/050121**Continuation of:** citation of documents

Indication of relevant sequences

WO 2005105129 A2 (BTG INT LTD ET AL), 10 November 2005 (2005-11-10);

The following sequences are related to SEQ ID NO 26:

SEQ ID NO 1114 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 176-195;
SEQ ID NO 1119 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 179-198;
SEQ ID NO 522 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 168-187;
SEQ ID NO 518 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 170-189;
SEQ ID NO 1116 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 183-202;
SEQ ID NO 1294 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 233-252;
SEQ ID NO 1292 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 232-251;
SEQ ID NO 1537 (20 aa) 100.0% identity in 19 aa overlap between aa 147-165;
SEQ ID NO 1298 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 229-248;
SEQ ID NO 1299 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 229-248;
SEQ ID NO 1122 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 186-205;
SEQ ID NO 515 (20 aa) 100.0% identity in 19 aa overlap between aa 167-185;
SEQ ID NO 1282 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 256-275;
SEQ ID NO 617 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 200-219;
SEQ ID NO 629 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 200-219;
SEQ ID NO 1847 (16 aa) 100.0% identity in 16 aa overlap between aa 34-49;

The following sequences are related to SEQ ID NO: 90:

SEQ ID NO 923 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap;
SEQ ID NO 924 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap
SEQ ID NO 1037 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap
SEQ ID NO 1046 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 1035 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 1042 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 91:

SEQ ID NO 1037 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap
SEQ ID NO 1046 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 1035 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 1042 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 92:

SEQ ID NO 749 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap
SEQ ID NO 747 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 93:

SEQ ID NO 672 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 1231 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 94:

SEQ ID NO 649 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 1255 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap

.../...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2012/050121**Continuation of: extra sheet**

SEQ ID NO 669 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 1726 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 634 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 1229 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 670 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 95:

SEQ ID NO 653 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap
SEQ ID NO 1749 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap
SEQ ID NO 1735 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 96:

SEQ ID NO 272 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 273 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 1492 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 489 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 1494 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 458 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 487 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap
SEQ ID NO 440 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 97:

SEQ ID NO 1741 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap
SEQ ID NO 1478 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 98

SEQ ID NO 1479 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap

WO2003104273, A2 (ISIS INNOVATION ET AL), 18 December 2003 (2003-12-18);

The following sequences are related to SEQ ID NO 26:

SEQ ID NO 57 (15 aa) 100.0% identity in a 15 aa overlap between aa 33-47;
SEQ ID NO 660 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 176-195;
SEQ ID NO 667 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 224-243;
SEQ ID NO 659 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 168-187;
SEQ ID NO 656 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 144-163;
SEQ ID NO 670 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 248-267;
SEQ ID NO 669 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 240-259;
SEQ ID NO 662 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 190-209;
SEQ ID NO 671 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 256-275;
SEQ ID NO 664 (20 aa) 100.0% identity in 20 aa overlap between aa 200-219;
SEQ ID NO 100 (15 aa) 100.0% identity in 15 aa overlap between aa 33-47

The following sequences are related to SEQ ID NO 89:

ADH15845 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, see page 110
ADH15445 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, see page 103

.../...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2012/050121**Continuation of: extra sheet**

The following sequences are related to SEQ ID NO 90:

ADH15860 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap

ADH14939 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 91:

ADH15877 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, see page 111

ADH14956 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, see page 99

ADH14751 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, see page 94

The following sequences are related to SEQ ID NO 92:

ADH15894 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap, page 111

ADH14973 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap

The following sequences are related to SEQ ID NO 93:

ADH14825 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, page 95

ADH14990 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, page 99

ADH14753 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, see page 94

ADH15911 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, see page 94

The following sequences are related to SEQ ID NO 94:

ADH15068 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 100

ADH14730 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 94

SEQ ID NO 34 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap

ADH15923 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 112

ADH15066 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 100

ADH15925 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 112

The following sequences are related to SEQ ID NO 96:

ADH15083 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 100

ADH14742 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 94

ADH15940 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 112

The following sequences are related to SEQ ID NO 97:

ADH6193 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, see example 6, fig 12 h

The following sequences are related to SEQ ID NO 98:

ADH15955 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 112

ADH15098 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 100

ADH15103 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 100

ADH15960 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 113

The following sequences are related to SEQ ID NO 99:

ADH15108 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, see page 100

ADH15965 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, see page 113

ADH15113 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap, see page 100

ADH15970 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap, see page 113

.../...

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2012/050121**Continuation of: extra sheet**

The following sequences are related to SEQ ID NO 100:

ADH15975 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap, page 113
ADH15118 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap, page 100

The following sequences are related to SEQ ID NO 101:

ADH15986 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap, page 113
ADH15192 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap, page 101

The following sequences are related to SEQ ID NO 102:

ADH15205 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap, page 101
ADH15999 100.0% identity (100.0% similar) in 20 aa overlap, page 113

The following sequences are related to SEQ ID NO 103:

ADH15219 100.0% identity (100.0% similar) in 19 aa overlap, page 101
ADH16006 100.0% identity (100.0% similar) in 13 aa overlap, page 113
ADH15212 100.0% identity (100.0% similar) in 13 aa overlap, page 101

The following sequences are related to SEQ ID NO 104:

ADH15236 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, see page 101
ADH16030 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, see page 114
ADH15228 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap, see page 100
ADH16022 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap, see page 114

The following sequences are related to SEQ ID NO 105:

ADH16034 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 114
ADH15240 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 101
ADH16035 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 114
ADH15241 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 101
ADH15244 100.0% identity (100.0% similar) in 17 aa overlap, see page 101
ADH16038 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 114
AAE15242 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap, see page 101
ADH16036 100.0% identity (100.0% similar) in 16 aa overlap, see page 114

The following sequences are related to SEQ ID NO 106:

ADH16051 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, page 114
ADH15321 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, page 102

The following sequences are related to SEQ ID NO 107:

ADH15333 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, see page 102
ADH16063 100.0% identity (100.0% similar) in 18 aa overlap, see page 114
ADH15327 100.0% identity (100.0% similar) in 15 aa overlap, see page 102

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/SE2012/050121
--

Continuation of: second sheet

International Patent Classification (IPC)

C07K 14/415 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded:

- From "Cited documents" found under our online services at www.prv.se (English version)
- From "Anförda dokument" found under "e-tjänster" at www.prv.se (Swedish version)

Use the application number as username. The password is **YDSRZFZGRE**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/SE2012/050121

WO	2005105129 A2	10/11/2005	AU	2005237287 B2	11/08/2011
			BR	PI0510274 A	30/10/2007
			CA	2564521 A1	10/11/2005
			EP	2412380 A1	01/02/2012
			EP	1755639 A2	28/02/2007
			JP	2008508856 A	27/03/2008
			MX	PA06012322 A	31/01/2007
			NZ	550600 A	26/03/2010
			US	20080318852 A1	25/12/2008
EP	0905518 A1	31/03/1999	NONE		
WO	03104273 A2	18/12/2003	AU	2003244771 A1	22/12/2003
			CA	2488218 A1	18/12/2003
			EP	2292649 A2	09/03/2011
			EP	1513873 A2	16/03/2005
			JP	2010229138 A	14/10/2010
			JP	2006512893 A	20/04/2006
			MX	PA04012117 A	19/04/2005
			NZ	537226 A	30/06/2008
			US	20060178299 A1	10/08/2006
			ZA	200409740 A	27/09/2006
JP	2006126083 A	18/05/2006	JP	4157947 B2	01/10/2008
WO	0125793 A2	12/04/2001	AT	319091 T	15/03/2006
			AT	449965 T	15/12/2009
			AU	7539400 A	10/05/2001
			AU	782262 B2	14/07/2005
			CA	2386089 A1	12/04/2001
			DE	60026332 T2	10/08/2006
			DE	60043402 D1	07/01/2010
			DK	1672368 T3	04/01/2010
			DK	1218751 T3	03/07/2006
			ES	2335895 T3	06/04/2010
			ES	2256042 T3	16/07/2006
			HK	1088068 A1	09/04/2010
			JP	2003511670 A	25/03/2003
			JP	2010263898 A	25/11/2010
			JP	4932112 B2	16/05/2012
			MX	PA02003295 A	02/09/2002
			US	20080175971 A1	24/07/2008
			US	20110044912 A2	24/02/2011
			US	7888460 B2	15/02/2011
			US	7144569 B1	05/12/2006
			US	20090269285 A1	29/10/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/SE2012/050121

WO	2006112925 A2	26/10/2006	AR	052207 A1	07/03/2007
			CA	2598146 A1	26/10/2006
			EP	1856149 A2	21/11/2007
			JP	2008537096 A	11/09/2008
			US	20070048801 A1	01/03/2007
			US	7622264 B2	24/11/2009

WO	2009139887 A2	19/11/2009	AU	2009246925 A1	19/11/2009
			CA	2722996 A1	19/11/2009
			EP	2277046 A2	26/01/2011

US	20060286601 A1	21/12/2006	US	7563864 B2	21/07/2009

WO	9956698 A2	11/11/1999	AU	3596199 A	23/11/1999
			EP	1075267 A2	14/02/2001

WO	02083722 A2	24/10/2002	CA	2443886 A1	24/10/2002
			MX	PA03009313 A	12/11/2004
			NO	20034588 A	10/12/2003
			US	20040241161 A1	02/12/2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/22	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543	5 9 7
G 0 1 N 33/564 (2006.01)	G 0 1 N 33/564	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
	G 0 1 N 33/53	Q

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T, J, TM), 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, R, O, RS, 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, H, U, ID, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 ルドルフ・ヴァレンタ
オーストリア、アー - 2 6 0 4 テレジエンフェルト、ベートーヴェンシュトラッセ 1 8 番

(72) 発明者 ザンドラ・パー
オーストリア、アー - 1 1 0 0 ウィーン、ビュルガーシュトラッセ 2 1 - 2 3 / 5 / 1 4 番

(72) 発明者 パラニ・スリニヴァサン
オーストリア、アー - 1 2 0 0 ウィーン、ラツアレートガッセ 1 4 番、ハウス・ペー、ルーム・ナンバー 1 6 0 9

(72) 発明者 ズザンネ・フルタラ
オーストリア、アー - 1 2 1 0 ウィーン、シェンケンドルフガッセ 4 4 / 4 2 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA02 DA06 EA03 EA04 GA11 GA19 GA27
HA03
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA18 BA19 BA20 BA21 BA22 BA23
CA14 CA53 CA56 NA14 ZB112 ZB132 ZB332 ZC212 ZC542
4H045 AA11 BA41 CA32 DA86 EA22 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	小麦抗原和多肽用于诊断小麦诱导的超敏反应		
公开(公告)号	JP2014508517A	公开(公告)日	2014-04-10
申请号	JP2013553396	申请日	2012-02-08
申请(专利权)人(译)	Phadia激活因子宝来得到		
[标]发明人	アレクサンドラシュミットフーバー ルドルフヴァレンタ ザンドラパー バラニスリニヴァサン ズザンネフルタラ		
发明人	アレクサンドラ・シュミットフーバー ルドルフ・ヴァレンタ ザンドラ・パー バラニ・スリニヴァサン ズザンネ・フルタラ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/415 A61K38/00 A61P3/00 A61P17/00 A61P31/22 A61P37/08 G01N33/543 G01N33/564 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61P3/00 A61P17/00 C07K14/415 G01N33/6893 G01N2800/202 G01N2800/24 G01N33/5008		
FI分类号	C12N15/00.A C07K14/415.ZNA A61K37/02 A61P3/00 A61P17/00 A61P31/22 A61P37/08 G01N33/543.597 G01N33/564.Z G01N33/53.N G01N33/53.Q		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/GA27 4B024/HA03 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA20 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA14 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/NA14 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB332 4C084/ZC212 4C084/ZC542 4H045/AA11 4H045/BA41 4H045/CA32 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 佐藤 剛		
优先权	1150096 2011-02-08 SE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及不同小麦高敏感性领域，特别是涉及用于区分这些疾病的不同形式的抗原和肽。本发明涉及新型小麦过敏原的鉴定及其在乳糜泻，疱疹性皮炎和IgE介导的过敏症的治疗和诊断中的用途。此外，本发明提供了已知肽和蛋白质在治疗和诊断中的用途。本发明还涉及诊断和治疗乳糜泻，疱疹性皮炎和IgE介导的过敏的方法。

表 1. IgE 反応性クローンおよびそれらの対応するタンパク質

cDNA クローン番号	配列番号	対応するアミノ酸配列の配列番号	対応するタンパク質	対応するタンパク質の配列番号
175	1	26	>gi 16966917 gb AC7A63897.1 LMW グルテニンサブユニット [Triticum aestivum]	51
43	2	27	>gi 71084277 gb AAZ23584.1 HMW グルテニンε-タイプサブユニット Bx7 前駆体 [Triticum aestivum]	52
82	3	28	>gi 71084277 gb AAZ23584.1 HMW グルテニンε-タイプサブユニット Bx7 前駆体 [Triticum aestivum]	52
84	4	29	>gi 4007850 emb CAA65313.1 α-ピューロチオン [Triticum aestivum]	53
50	5	30	>gi 94315063 gb AF14401.1 1Dx 高分子量グルテニンサブユニット [Triticum aestivum]	54
118	6	31	>gi 6684164 gb AA123507.1 AF216869.1 グルテニン 高分子量サブユニット タイプγ 前駆体 [Triticum aestivum]	55
34	7	32	>gi 154268818 gb AB572146.1 アルファグリアジン [Triticum aestivum]	56
78	8	33	>gi 305353284 gb AC104082.1 ガンマーグリアジン [Triticum aestivum]	57
85	9	34	>gi 194718421 gb AC193462.1 ガンマーグリアジン [Triticum aestivum]	58
16	10	35	>gi 73912496 db BAE20328.1 オメガ5 グリアジン [Triticum aestivum]	59
39	11	36	>gi 10953877 gb AAC25638.1 ベータ-アミラーゼ [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	60
4	12	37	>gi 89143120 emb CAJ32854.1 推定アベニン様 a 前駆体 [Triticum aestivum]	61
46	13	38	IgE 反応性エピトープ	
67	14	39	IgE 反応性エピトープ	
68	15	40	IgE 反応性エピトープ	
79	16	41	IgE 反応性エピトープ	
95	17	42	IgE 反応性エピトープ	
106	18	43	IgE 反応性エピトープ	
110	19	44	IgE 反応性エピトープ	
117	20	45	IgE 反応性エピトープ	
190	21	46	IgE 反応性エピトープ	
195	22	47	IgE 反応性エピトープ	
72	23	48	IgE 反応性エピトープ	
116	24	49	IgE 反応性エピトープ	
91	25	50	IgE 反応性エピトープ	