

(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2016-527509

(P2016-527509A)

(43) 公表日 平成28年9月8日(2016.9.8)

| (51) Int.Cl.           | F I                | テーマコード (参考) |
|------------------------|--------------------|-------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 Q     | 4 H 0 4 5   |
| GO 1 N 37/00 (2006.01) | GO 1 N 33/53 N     |             |
| CO 7 K 14/47 (2006.01) | GO 1 N 37/00 1 O 2 |             |
|                        | CO 7 K 14/47 Z N A |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 43 頁)

|               |                              |          |  |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2016-530559 (P2016-530559) | (71) 出願人 | 516031288  |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年8月1日 (2014.8.1)         |          | ファンデーション パラ ラ インベスト<br>イゲーショ ン バイオメディカ デル ホ<br>スピタル ウニベルシタリオ ラモン ワ<br>イ カジャル |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成28年3月25日 (2016.3.25)       |          | スペイン国 イー-28034 マドリ<br>ド, カッレテラ デ コルメナー ビエホ<br>ケーエム, 9, 100                   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/ES2014/070634            | (71) 出願人 | 516031303  |
| (87) 国際公開番号   | W02015/015043                |          | ファンデーション パラ ラ インベスト<br>イゲーショ ン バイオメディカ デル ホ<br>スピタル クリニコ サン カロス              |
| (87) 国際公開日    | 平成27年2月5日 (2015.2.5)         |          | スペイン国 イー-28040 マドリ<br>ド, エス/エヌ, シー/ プロフェッサー<br>マルティン ラゴス                     |
| (31) 優先権主張番号  | P201331200                   |          | 最終頁に続く   |
| (32) 優先日      | 平成25年8月1日 (2013.8.1)         |          |  |
| (33) 優先権主張国   | スペイン (ES)                    |          |  |

(54) 【発明の名称】 牛乳中のタンパク質に対するアレルギーの治療のための経口免疫療法の有効性の予測方法

(57) 【要約】

本発明は、ヒト対象者において牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法(OIT)中に生じる反応数および/または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および/またはOIT中の前投薬の必要性に関して予測を行うことを可能とする方法を提供することから、本発明は従来技術に記載される問題の解決策を提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト被験者において牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法（OIT）の際の反応数および／または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および／またはOIT中の前投薬の必要性の予測方法であって、以下の工程：

c．前記被験者から生体サンプルを単離する工程；

d．工程 a ) の生体サンプル中の、以下の配列：

a．配列番号 1～4 のペプチド配列および／または配列番号 18～32 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 18～32 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列；ならびに／あるいは

b．配列番号 5～8 のペプチド配列および／または配列番号 33～45 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 33～45 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列；ならびに／あるいは

c．配列番号 9～13 のペプチド配列および／または配列番号 46～63 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 46～63 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列；ならびに／あるいは

d．配列番号 14～15 のペプチド配列および／または配列番号 64～69 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 64～69 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列；ならびに／あるいは

e．配列番号 16～17 のペプチド配列および／または配列番号 70～75 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 70～75 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列

を有すると同定されたペプチドに対する、またはペプチドに対して特異性を有する、IgE 抗体の有無を判定する工程

を含んでなり、

牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法（OIT）中の反応数および／または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および／またはOIT中の前投薬の必要性の予測が、OIT処置開始前（0時点）の前記被験者由来のサンプル中のIgE抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者由来のサンプル中のIgE抗体により認識されるペプチドの数をOIT処置後の応答と関連させる基準値と関連させることにより確定される、上記方法。

## 【請求項 2】

工程 a ) の生体サンプル中の工程 b ) の IgE 抗体の有無の判定が、以下の配列：

a．配列番号 1～4 のペプチド配列および／または配列番号 18～32 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 18～32 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列；ならびに

b．配列番号 5～8 のペプチド配列および／または配列番号 33～45 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 33～45 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列；ならびに

c．配列番号 9～13 のペプチド配列および／または配列番号 46～63 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 46～63 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列；ならびに場合により

d．配列番号 14～15 のペプチド配列および／または配列番号 64～69 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 64～69 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列；ならびに場合により、

e．配列番号 16～17 のペプチド配列および／または配列番号 70～75 の配列からなるリストから選択されるその断片および／または免疫学的に活性な配列番号 70～75 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列

を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 a ) の生体サンプル中の工程 b ) の I g E 抗体の有無の判定が、以下の配列：

a . 配列番号 1 ~ 4 のペプチド配列および / または配列番号 1 8 ~ 3 2 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 1 8 ~ 3 2 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列 ; ならびに

b . 配列番号 5 ~ 8 のペプチド配列および / または配列番号 3 3 ~ 4 5 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 3 3 ~ 4 5 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列 ; ならびに

c . 配列番号 9 ~ 1 3 のペプチド配列および / または配列番号 4 6 ~ 6 3 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 4 6 ~ 6 3 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列 ; ならびに

d . 配列番号 1 4 ~ 1 5 のペプチド配列および / または配列番号 6 4 ~ 6 9 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 6 4 ~ 6 9 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列 ; ならびに

e . 配列番号 1 6 ~ 1 7 のペプチド配列および / または配列番号 7 0 ~ 7 5 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 7 0 ~ 7 5 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列

を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法が経口免疫療法 ( O I T ) 中の反応数の予測のための方法であり、工程 a ) の生体サンプル中の工程 b ) の I g E 抗体の有無の判定が、以下の配列：

a . 配列番号 1 9、2 1、2 5 および 2 7 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 1 9、2 1、2 5 および 2 7 の配列の誘導体 ; ならびに

b . 配列番号 3 6、3 7 および 3 8 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 3 6、3 7 および 3 8 の配列の誘導体 ; ならびに

c . 配列番号 5 1、5 3、5 8、5 9 および 6 2 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 5 1、5 3、5 8、5 9 および 6 2 の配列の誘導体 ; ならびに

d . 配列番号 6 9 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 6 9 の配列の誘導体 ; ならびに

e . 配列番号 7 1 および 7 2 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 7 1 および 7 2 の配列の誘導体

を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記方法が O I T 中に耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値の予測方法であり、工程 a ) の生体サンプル中の工程 b ) の I g E 抗体の有無の判定が、以下の配列：

a . 配列番号 2 8 および 3 1 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 2 8 および 3 1 の配列の誘導体 ; ならびに

b . 配列番号 3 6 ~ 4 0 および 4 4 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 3 6 ~ 4 0 および 4 4 の配列の誘導体 ; ならびに

c . 配列番号 5 3、5 5 および 5 6 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 5 3、5 5 および 5 6 の配列の誘導体 ; ならびに

d . 配列番号 6 7 および 6 8 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 6 7 およ

10

20

30

40

50

び 68 の配列の誘導体 ; ならびに

e . 配列番号 70、72 および 75 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 70、72 および 75 の配列の誘導体

を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 a ) の生体サンプル中の I g E 抗体の有無の判定が、配列番号 18 ~ 75 および / または免疫学的に活性な配列番号 18 ~ 75 の配列の誘導体を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

工程 a ) の生体サンプル中の I g E 抗体の有無の判定が、以下の配列 : 配列番号 18 ~ 75 および / または免疫学的に活性な配列番号 18 ~ 75 の配列の誘導体を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われ、

15 % 未満のペプチド認識が良好な予測の指標であり、

15 % ~ 75 % の間のペプチド認識が中等度の予測の指標であり、

75 % を超えるペプチド認識が不良な予測の指標である、

請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

工程 a ) の生体サンプル中の I g E 抗体の有無の判定が、以下の配列 : 配列番号 18 ~ 75 を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われ、

15 % 未満のペプチド認識が良好な予測の指標であり、

15 % ~ 75 % の間のペプチド認識が中等度の予測の指標であり、

75 % を超えるペプチド認識が不良な予測の指標である、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

生体サンプルが血液、血清、血漿、脳脊髄液、腹水、糞便または尿などの体液から選択される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

ペプチド認識がイムノアッセイの手段により判定される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ペプチド認識がペプチドマイクロアレイの手段により判定される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項で定義されるペプチドの組合せを含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法を行うために好適なペプチドマイクロアレイ。

40

【請求項 13】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項で定義されるペプチドの組合せを含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法を行うために好適な組成物。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項で定義されるペプチドの組合せを含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法を行うために好適なキット。

【請求項 15】

a . 請求項 1 ~ 8 のいずれか一項で定義されるペプチドの種々の組合せからなるリストから選択される I g E を認識することができる認識分子 ( 捕捉生体分子 ) と、

b . タグ分子と結合されていてもよい目的分析物または捕捉生体分子を認識することが

50

できる第2の認識分子（検出生体分子）と  
を含んでなるキット。

【請求項16】

a. 請求項1～8のいずれか一項で定義されるペプチドの種々の組合せからなるリストから選択されるIgEを認識することができる認識分子（捕捉生体分子）と、

b. 工程a)の認識生体分子が固定された支持体と、

c. タグ分子と結合されていてもよい目的分析物または捕捉生体分子を認識することができる第2の認識分子（検出生体分子）と  
を含んでなるキット

【請求項17】

牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法（OIT）中の反応数および/またはOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および/またはOIT中の前投薬の必要性の予測のための、請求項14～16のいずれか一項に記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般にアレルギーの分野に含まれ、詳しくは、牛乳に対する脱感作のための処置の有効性の予測方法に関する。

【背景技術】

【0002】

即時型過敏症を伴う食物アレルギーには、現在、確立された有効な処置がなく、患者にとっての唯一の選択肢は、その食物に対して自発的耐性獲得が達成されるまでその食物を避けることであり、多数の患者がこの状態に到達するものの総ての患者が到達するわけではない。

【0003】

乳製品を摂取した後に異常な応答（食物に対する有害な反応に含まれ得る症状を伴う）を示す場合およびその過程で立証済みの免疫機構が存在する場合には、牛乳中のタンパク質に対するアレルギー（Allergy to proteins in cow's milk）（APCW）が起きている。

【0004】

牛乳のアレルゲン性の原因となるタンパク質は、カゼイン（ $\alpha$ -カゼイン、 $\beta$ -カゼインおよび $\kappa$ -カゼイン）および $\gamma$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン、ウシ血清アルブミンおよびウシ免疫グロブリン血清タンパク質ならびに割合は低いがラクトフェリン、トランスフェリン、リパーゼといった他のタンパク質（これらは血清タンパク質であり、牛乳全体の総タンパク質に2%に相当する）である。

【0005】

カゼインは牛乳に対するアレルギーの主因である。

【0006】

最近、食物アレルギーの反応重篤度には種々の臨床像があることが実証された。これらの違いにはいくつかの因子が関連付けられているが、地理的成分が極めて重要な役割を果たす。明らかな例が果実アレルギーであり、ある特定の食物にアレルギーを示す患者は、異なるアレルゲン（タンパク質全体/ペプチド）を認識するからであって、異なる臨床重篤度を有する。従って、ヨーロッパ北部産の桃にアレルギーを示す患者はそれらを摂取した後に軽い症状しか示さないのに、ヨーロッパ南部産の桃からは重篤な反応を示す。特定の集団が持つ特定の食物のアレルゲンの認識パターンを、タンパク質全体と理想的にはそのエピトープの両方について知ることは、大きな関心事である。

【0007】

現在、牛乳に対するアレルギーを診断するための種々の方法があるが、標準としては、初回のアレルギー発作の後に牛乳中の種々のタンパク質に特異的なIgEの検出が行われ

10

20

30

40

50

る。

【0008】

食物を用いた経口免疫療法（OIT）は、その目的が特定の食品にアレルギーを示す患者において最小用量から始めて通常の量の食物に対する耐性獲得に到達するまでその食物を継続的に投与する手段によりそれに対する耐性獲得に到達することである、新規な治療方法である。

【0009】

牛乳は回避することが極めて難しく、激しい反応を生じる偏在食品である。ここ10年で、多くの研究グループが、牛乳に対する耐性獲得を達成するために牛乳の経口投与のためのプロトコルを開発してきた。現在の知見では、治療は、牛乳に対する耐性獲得を上手く誘導する場合に、良好な有効性レベルを達成する。しかしながらやはり、その最大の問題は、その手順を遂行する場合に患者が多数のアレルギー反応を示すことから、治療の安全性にある。このようなアレルギー反応はほとんどの場合で軽度で容易に治療できるが、極めて少数ながら、重篤でアドレナリンの投与を必要としさえする場合がある。従って、その手順の際の反応は、その手順を疾患の慣習的実務に組み込み、従って、その使用を多数の患者に拡大する場合に主要な障害の1つとなる。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

よって、牛乳に対する脱感作のための処置の有効性の、および従ってそれに対する患者の応答の予測方法を提供する必要がある。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の開示

本発明は、ヒト被験者において牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法（OIT）中にもたらされる反応数および/または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および/またはOIT中の前投薬の必要性の予測を可能とする方法を提供することから、本発明は当技術分野の現状に述べた問題に対する解決策を提供する。

【0012】

30

よって、本発明の第1の態様は、ヒト被験者において牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法（OIT）中の反応数および/または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および/またはOIT中の前投薬の必要性の予測方法であって、以下の工程：

a. 前記被験者から生体サンプルを単離する工程；

b. 工程a)の生体サンプル中の、以下の配列：

a. 配列番号1～4のペプチド配列および/または配列番号18～32の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号18～32の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに/あるいは

b. 配列番号5～8のペプチド配列および/または配列番号33～45の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号33～45の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに/あるいは

40

c. 配列番号9～13のペプチド配列および/または配列番号46～63の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号46～63の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに/あるいは

d. 配列番号14～15のペプチド配列および/または配列番号64～69の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号64～69の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに/あるいは

e. 配列番号16～17のペプチド配列および/または配列番号70～75の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号70～75

50

の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列を有すると同定されたペプチドに対する、またはペプチドに対して特異性を有する、I g E抗体の有無を判定する工程を含んでなり、

牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法(OIT)中の反応数および/または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および/またはOIT中の前投薬の必要性の予測が、OIT処置開始前(0時点)の前記被験者由来のサンプル中のI g E抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者由来のサンプル中のI g E抗体により認識されるペプチドの数をOIT処置後の応答と関連させる基準値と関連させることにより確定される方法に関する。

10

【0013】

本発明の第1の態様の好ましい実施形態は、ヒト被験者において牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法(OIT)中の反応数および/または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および/またはOIT中の前投薬の必要性の予測方法であって、以下の工程：

a. 前記被験者から生体サンプルを単離する工程；

b. 工程a)の生体サンプル中の、以下の配列：

a. 配列番号1~4のペプチド配列および/または配列番号18~32の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号18~32の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに

20

b. 配列番号5~8のペプチド配列および/または配列番号33~45の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号33~45の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに

c. 配列番号9~13のペプチド配列および/または配列番号46~63の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号46~63の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに場合より

d. 配列番号14~15のペプチド配列および/または配列番号64~69の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号64~69の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに場合より

30

e. 配列番号16~17のペプチド配列および/または配列番号70~75の配列からなるリストから選択されるその断片および/または免疫学的に活性な配列番号70~75の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列

を有すると同定されたペプチドに対する、またはペプチドに対して特異性を有する、I g E抗体の有無を判定する工程

を含んでなり、

牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法(OIT)中の反応数および/または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および/またはOIT中の前投薬の必要性の予測が、OIT処置開始前(0時点)の前記被験者由来のサンプル中のI g E抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者由来のサンプル中のI g E抗体により認識されるペプチドの数をOIT処置後の応答と関連させる基準値と関連させることにより確定される方法に関する。

40

【0014】

本発明の第1の態様の別の好ましい実施形態は、ヒト被験者において牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法(OIT)中の反応数および/または牛乳中のタンパク質に対するOIT中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および/またはOIT中の前投薬の必要性の予測方法であって、以下の工程：

a. 前記被験者から生体サンプルを単離する工程；

b. 工程a)の生体サンプル中の、以下の配列：

50

a . 配列番号 1 ~ 4 のペプチド配列および / または配列番号 1 8 ~ 3 2 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 1 8 ~ 3 2 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列 ; ならびに

b . 配列番号 5 ~ 8 のペプチド配列および / または配列番号 3 3 ~ 4 5 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 3 3 ~ 4 5 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列 ; ならびに

c . 配列番号 9 ~ 1 3 のペプチド配列および / または配列番号 4 6 ~ 6 3 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 4 6 ~ 6 3 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列 ; ならびに ;

d . 配列番号 1 4 ~ 1 5 のペプチド配列および / または配列番号 6 4 ~ 6 9 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 6 4 ~ 6 9 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列 ; ならびに

e . 配列番号 1 6 ~ 1 7 のペプチド配列および / または配列番号 7 0 ~ 7 5 の配列からなるリストから選択されるその断片および / または免疫学的に活性な配列番号 7 0 ~ 7 5 の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 つの配列

を有すると同定されたペプチドに対する、またはペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定する工程を含んでなり、

牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法 ( O I T ) 中の反応数および / または牛乳中のタンパク質に対する O I T 中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および / または O I T 中の前投薬の必要性の予測が、O I T 処置開始前 ( 0 時点 ) の前記被験者由来のサンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者由来のサンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチドの数を O I T 処置後の応答と相関させる基準値と相関させることにより確定される方法に関する。

#### 【 0 0 1 5 】

本発明の第 1 の態様の別の好ましい実施形態では、前記方法は経口免疫療法 ( O I T ) 中の反応数の予測のための方法であり、工程 a ) の生体サンプル中の工程 b ) の I g E 抗体の有無の判定は、以下の配列 :

a . 配列番号 1 9 、 2 1 、 2 5 および 2 7 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 1 9 、 2 1 、 2 5 および 2 7 の配列の誘導体 ; ならびに

b . 配列番号 3 6 、 3 7 および 3 8 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 3 6 、 3 7 および 3 8 の配列の誘導体 ; ならびに

c . 配列番号 5 1 、 5 3 、 5 8 、 5 9 および 6 2 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 5 1 、 5 3 、 5 8 、 5 9 および 6 2 の配列の誘導体 ; ならびに

d . 配列番号 6 9 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 6 9 の配列の誘導体 ; ならびに

e . 配列番号 7 1 および 7 2 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 7 1 および 7 2 の配列の誘導体

を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われ、

牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法 ( O I T ) 中の反応数の予測は、O I T 処置開始前 ( 0 時点 ) の前記被験者由来のサンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者由来のサンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチドの数を O I T 処置後の応答と相関させる基準値と相関させることにより確定される。混合物の基準値は図 9 で確定される。

#### 【 0 0 1 6 】

本発明の第 1 の態様の別の好ましい実施形態では、前記方法は O I T 中に耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値の予測方法であり、工程 a ) の生体サンプル中の工程 b ) の I g E 抗体の有無の判定は、以下の配列 :

- a . 配列番号 2 8 および 3 1 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 2 8 および 3 1 の配列の誘導体 ; ならびに
- b . 配列番号 3 6 ~ 4 0 および 4 4 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 3 6 ~ 4 0 および 4 4 の配列の誘導体 ; ならびに
- c . 配列番号 5 3、5 5 および 5 6 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 5 3、5 5 および 5 6 の配列の誘導体 ; ならびに
- d . 配列番号 6 7 および 6 8 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 6 7 および 6 8 の配列の誘導体 ; ならび
- e . 配列番号 7 0、7 2 および 7 5 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 7 0、7 2 および 7 5 の配列の誘導体

10

を有すると同定された少なくとも前記ペプチドに対する、または前記ペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われ、

牛乳中のタンパク質に対する O I T 中に耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値は、O I T 処置開始前 ( 0 時点 ) の前記被験者由来のサンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者由来のサンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチドの数を O I T 処置後の応答と相関させる基準値と相関させることにより確定される。好ましくは、基準値は図 1 0 で確定される。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明の第 1 の態様のさらに別の好ましい実施形態では、工程 a ) の生体サンプル中の I g E 抗体の有無の判定は、少なくとも、以下の配列 : 配列番号 1 8 ~ 7 5 および / または免疫学的に活性な配列番号 1 8 ~ 7 5 の配列の誘導体を有すると同定されたペプチドに対する、またはペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われ、牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法 ( O I T ) 中の反応数の予測は、O I T 処置開始前 ( 0 時点 ) の前記被験者由来のサンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者由来のサンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチドの数を O I T 処置後の応答と相関させる基準値と相関させることにより確定される。好ましくは、基準値は図 8 で確定される。

20

#### 【 0 0 1 8 】

本発明の第 1 の態様のさらに別の好ましい実施形態では、工程 a ) の生体サンプル中の I g E 抗体の有無の判定は、少なくとも、以下の配列 : 配列番号 1 8 ~ 7 5 および / または好ましくは免疫学的に活性な配列番号 1 8 ~ 7 5 の配列の誘導体を有すると同定されたペプチドに対する、またはペプチドに対して特異性を有する、I g E 抗体の有無を判定することによって行われ、

30

- 1 5 % 未満のペプチド認識は良好な予測の指標であり、
- 1 5 % ~ 7 5 % の間のペプチド認識は中等度の予測の指標であり、
- 7 5 % を超えるペプチド認識は不良な予測の指標である。

#### 【 0 0 1 9 】

本発明の第 1 の態様の、またはその好ましい実施形態のいずれかの好ましい実施形態では、生体サンプルは、種々のタイプの組織サンプル、ならびに血液、血清、血漿、脳脊髄液、腹水、糞便または尿などの体液を含む。このサンプルは好ましくは血液、血漿、血清または尿から選択される。

40

#### 【 0 0 2 0 】

本発明の第 1 の態様の、またはその好ましい実施形態のいずれかの好ましい実施形態では、ペプチドの存在はイムノアッセイの手段により判定される。

#### 【 0 0 2 1 】

本発明の第 1 の態様の、またはその好ましい実施形態のいずれかの好ましい実施形態では、ペプチドの存在はペプチドマイクロアレイの手段により判定される。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明の第 2 の態様は、前記方法でまたは前記実施形態で定義されるペプチド配列の組

50

合せを含んでなる、本発明の第 1 の態様の、またはその好ましい実施形態のいずれかの方法を行うために好適なペプチドマイクロアレイに関する。

【0023】

第 3 の態様は、前記方法でまたは前記実施形態で定義されるペプチドの組合せを含んでなる、本発明の第 1 の態様の、またはその好ましい実施形態のいずれかの方法を行うために好適な組成物に関する。

【0024】

第 4 の態様は、前記方法でまたは前記実施形態で定義されるペプチドの組合せを含んでなる、本発明の第 1 の態様の、またはその好ましい実施形態のいずれかの方法を行うために好適なキットに関する。

10

【0025】

本発明の第 4 の態様の好ましい実施形態では、前記キットは、

a . 本発明の第 1 の態様の、またはその好ましい実施形態のいずれかの方法で定義されるペプチド配列の種々の組合せからなるリストから選択される I g E を認識することができる認識分子（捕捉生体分子）と、

b . タグ分子と結合されていてもよい目的分析物または捕捉生体分子を認識することができる第 2 の認識分子（検出生体分子）と

を含んでなる。

【0026】

本発明の第 4 の態様の別の好ましい実施形態では、前記キットは、

a . 本発明の第 1 の態様の、またはその好ましい実施形態のいずれかの方法で定義されるペプチド配列の種々の組合せからなるリストから選択される I g E を認識することができる認識分子（捕捉生体分子）と、

b . 工程 a ) の認識生体分子が固定された支持体と、

c . タグ分子と結合されていてもよい目的分析物または捕捉生体分子を認識することができる第 2 の認識分子（検出生体分子）と

を含んでなる。

20

【0027】

本発明の第 5 の態様は、牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法（OIT）中の反応数および / または OIT 中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および / または OIT 中の前投薬の必要性の予測のための、本発明の第 4 の態様のもしくはその好ましい実施形態のいずれかのキット、または本発明の第 3 の態様の組成物、または本発明の第 2 の態様のペプチドマイクロアレイの使用に関する。

30

【0028】

本発明の第 6 の態様では、本発明は、被験者から単離されたサンプルの、配列番号 1 ~ 17 のペプチド配列および / またはその断片を有すると同定されたペプチドに対する I g E または I g G 4 抗体の存在を判定することを含んでなる、牛乳を用いた経口免疫療法による牛乳中のタンパク質に対するアレルギーの処置の予測および追跡方法に関する。

【0029】

本発明の第 6 の態様の特定の実施形態では、15%未満のペプチド認識（工程 a の生体サンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチド）は良好な予測の指標である。

40

【0030】

本発明の第 6 の態様の特定の実施形態では、15% ~ 75% の間のペプチド認識（工程 a の生体サンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチド）は中等度の予測の指標である。

【0031】

本発明の第 6 の態様の特定の実施形態では、75% を超えるペプチド認識（工程 a の生体サンプル中の I g E 抗体により認識されるペプチド）は不良な予測の指標である。

【0032】

本発明の第 6 の態様の特定の実施形態では、ペプチドの断片（工程 a の生体サンプル中

50

の I g E 抗体により認識されるもの)は配列番号 18 ~ 75 の配列を有すると同定される。

【0033】

本発明の第6の態様の特定の実施形態では、被分析サンプルは血液、血清または尿から選択される。

【0034】

本発明の第6の態様の特定の実施形態では、ペプチドおよび/またはその断片の存在はイムノアッセイの手段により判定される。

【0035】

本発明の第6の態様の特定の実施形態では、ペプチドおよび/またはその断片の存在は、ペプチドマイクロアレイの手段により判定される。

10

【0036】

本発明の第7の態様は、配列番号1~17のペプチド配列のペプチドおよび/またはその断片を含んでなる本発明の第6の態様の方法に従った牛乳を用いた経口免疫療法による牛乳中のタンパク質に対するアレルギーの処置の予測および追跡のためのマイクロアレイに関する。

【0037】

本発明の第8の態様は、配列番号1~17のペプチド配列のペプチドおよび/またはその断片を含んでなる本発明の第6の態様の方法に従った牛乳を用いた経口免疫療法による牛乳中のタンパク質に対するアレルギーの処置の予測および追跡のためのキットに関する。

20

【0038】

別の態様では、本発明は、牛乳を用いた経口免疫療法による牛乳中のタンパク質に対するアレルギーの処置の予測および追跡のための本発明の第8の態様のキットの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1-1】I g E の手段により患者に認識されるペプチドの数の経時的推移を示す(0、O I T 処置開始時前の時点; D、耐性獲得/脱感作が達せられた時点; 脱感作後6、12および24か月の追跡)。高リスク患者は、O I T 処置開始前であってもI g E により多数のペプチドを認識し、これにより高リスク患者を中リスクおよび低リスク患者から区別することができる。異なる患者群により認識されるI g E ペプチドの数は追跡時間とともに低下し、これは牛乳の場合にO I T が備えていなければならない最小持続時間についての情報を提供する。a: I g E - S 1 - カゼイン; b: I g E - S 2 - カゼイン、c: I g E - b - カゼイン、d: I g E - b - ラクトグロブリン、e: I g E - k - カゼイン。

30

【図1-2】(図1-1の続き)

【図1-3】(図1-1の続き)

【図2-1】患者のI g G 4 により認識されるペプチドの数の経時的推移を示す(0、O I T 処置開始時前の時点; D、耐性獲得/脱感作が達せられた時点; 脱感作後6、12および24か月の追跡)。異なる患者群により認識されるペプチドの数は追跡時間中に増大し、これは耐性の維持、および従って牛乳を用いたO I T 処置の有効性の指標となる。a: I g G 4 - S 1 - カゼイン; b: I g G 4 - S 2 - カゼイン、c: I g G 4 - b - カゼイン、d: I g G 4 - b - ラクトグロブリン、e: I g G 4 - k - カゼイン。

40

【図2-2】(図2-1の続き)

【図2-3】(図2-1の続き)

【図3-1】階層的クラスター分析、異なる患者群(統計分析-G r 1 低リスク患者、G r 2 中リスク患者およびG r 3 高リスク患者)により認識される異なる領域の統計分析および患者分類のための重要なペプチドの選択(重要なペプチドバイオマーカー)(矢印)を示す。クラスター分析の手段により、高リスク患者に対する処置開始前(0時点)のI

50

g E 抗体による免疫認識パターンはよく似ており、それらはグラフの右側に分類される ( p 5、p 9、p 1 1、p 1 9 および p 2 5 ) ことが見て取れる。低リスクおよび中リスク患者に対して高リスク患者の認識パターンに有意な差異を有するゾーンまたはエピトープは統計分析の手段により位置決定された。O I T 処置の進行を評価するために最良のペプチドは、機械学習型のバイオインフォマティクス分析の手段により位置決定された。O I T 処置の進行を評価するために重要な - s 1 - カゼイン、 - s 2 - カゼイン、 - カゼイン、 - カゼインおよび - ラクトグロブリンタンパク質の 5 8 ペプチド ( 図 8 の配列参照 ) が前述に基づいて選択された。図 3 : - S 1 - カゼイン ( I g E ) , 非加重。

【図 3 - 2】( 図 3 - 1 の続き )

【図 4 - 1】階層的クラスタ分析、異なる患者群 ( 統計分析 - G r 1 低リスク患者、G r 2 中リスク患者および G r 3 高リスク患者 ) により認識される異なる領域の統計分析および患者分類のための重要なペプチドの選択 ( 重要なペプチドバイオマーカー ) ( 矢印 ) を示す。クラスタ分析の手段により、高リスク患者に対する処置開始前 ( 0 時点 ) の I g E 抗体による免疫認識パターンはよく似ており、それらはグラフの右側に分類される ( p 5、p 9、p 1 1、p 1 9 および p 2 5 ) ことが見て取れる。低リスクおよび中リスク患者に対して高リスク患者の認識パターンに有意な差異を有するゾーンまたはエピトープは統計分析の手段により位置決定された。O I T 処置の進行を評価するために最良のペプチドは、機械学習型のバイオインフォマティクス分析の手段により位置決定された。O I T 処置の進行を評価するために重要な - s 1 - カゼイン、 - s 2 - カゼイン、 - カゼイン、 - カゼインおよび - ラクトグロブリンタンパク質の 5 8 ペプチド ( 図 8 の配列参照 ) が前述に基づいて選択された。図 4 : - S 2 - カゼイン ( I g E ) , 非加重。

【図 4 - 2】( 図 4 - 1 の続き )

【図 5 - 1】階層的クラスタ分析、異なる患者群 ( 統計分析 - G r 1 低リスク患者、G r 2 中リスク患者および G r 3 高リスク患者 ) により認識される異なる領域の統計分析および患者分類のための重要なペプチドの選択 ( 重要なペプチドバイオマーカー ) ( 矢印 ) を示す。クラスタ分析の手段により、高リスク患者に対する処置開始前 ( 0 時点 ) の I g E 抗体による免疫認識パターンはよく似ており、それらはグラフの右側に分類される ( p 5、p 9、p 1 1、p 1 9 および p 2 5 ) ことが見て取れる。低リスクおよび中リスク患者に対して高リスク患者の認識パターンに有意な差異を有するゾーンまたはエピトープは統計分析の手段により位置決定された。O I T 処置の進行を評価するために最良のペプチドは、機械学習型のバイオインフォマティクス分析の手段により位置決定された。O I T 処置の進行を評価するために重要な - s 1 - カゼイン、 - s 2 - カゼイン、 - カゼイン、 - カゼインおよび - ラクトグロブリンタンパク質の 5 8 ペプチド ( 図 8 の配列参照 ) が前述に基づいて選択された。図 5 : b - カゼイン ( I g E ) , 非加重。

【図 5 - 2】( 図 5 - 1 の続き )

【図 6 - 1】階層的クラスタ分析、異なる患者群 ( 統計分析 - G r 1 低リスク患者、G r 2 中リスク患者および G r 3 高リスク患者 ) により認識される異なる領域の統計分析および患者分類のための重要なペプチドの選択 ( 重要なペプチドバイオマーカー ) ( 矢印 ) を示す。クラスタ分析の手段により、高リスク患者に対する処置開始前 ( 0 時点 ) の I g E 抗体による免疫認識パターンはよく似ており、それらはグラフの右側に分類される ( p 5、p 9、p 1 1、p 1 9 および p 2 5 ) ことが見て取れる。低リスクおよび中リスク患者に対して高リスク患者の認識パターンに有意な差異を有するゾーンまたはエピトープは統計分析の手段により位置決定された。O I T 処置の進行を評価するために最良のペプチドは、機械学習型のバイオインフォマティクス分析の手段により位置決定された。O I T 処置の進行を評価するために重要な - s 1 - カゼイン、 - s 2 - カゼイン、 - カゼイン、 - カゼインおよび - ラクトグロブリンタンパク質の 5 8 ペプチド ( 図 8 の配列参照 ) が前述に基づいて選択された。図 6 : k - カゼイン ( I g E ) , 非加重。

【図 6 - 2】( 図 6 - 1 の続き )

【図 7 - 1】階層的クラスタ分析、異なる患者群 ( 統計分析 - G r 1 低リスク患者、G r 2 中リスク患者および G r 3 高リスク患者 ) により認識される異なる領域の統計分析お

10

20

30

40

50

よび患者分類のための重要なペプチドの選択（重要なペプチドバイオマーカー）（矢印）を示す。クラスター分析の手段により、高リスク患者に対する処置開始前（0時点）のIgE抗体による免疫認識パターンはよく似ており、それらはグラフの右側に分類される（p5、p9、p11、p19およびp25）ことが見て取れる。低リスクおよび中リスク患者に対して高リスク患者の認識パターンに有意な差異を有するゾーンまたはエピトープは統計分析の手段により位置決定された。OIT処置の進行を評価するために最良のペプチドは、機械学習型のバイオインフォマティクス分析の手段により位置決定された。OIT処置の進行を評価するために重要な - s 1 - カゼイン、 - s 2 - カゼイン、 - カゼイン、 - カゼインおよび - ラクトグロブリンタンパク質の58ペプチド（図8の配列参照）が前述に基づいて選択された。図7：b - ラクトグロブリン（IgE），非加重

【図7 - 2】（図7 - 1の続き）

【図8 - 1】種々の患者における、表Iに示された58ペプチドから認識されるペプチドの数とOIT処置中のアレルギー反応の数との間（ $r^2 = 0.803$ ）および耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間との間（ $r^2 = 0.601$ ）の直線的相関を示す。

【図8 - 2】（図8 - 1の続き）

【図9】OIT処置開始前のIgEにより認識されるリストからのペプチド数と種々の患者の処置中のアレルギー反応の数との間の相関を示す。

【図10】種々の患者における、OIT処置開始前のIgEにより認識されるリスト（表3）からのペプチド数と耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間との間の相関を示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

発明の詳細な開示  
定義

本発明に関して、「良好な予測」は、脱感作中に有害な反応を有する確率が低く（ $< 7$ 反応）、かつ、牛乳に対する耐性獲得を達成するのに必要な時間が短く（ $< 8$ 週）、かつ、前投薬（抗ヒスタミン薬およびコルチコイドの両方）を必要としないことを意味する。

【0041】

本発明に関して、「中等度の予測」は、脱感作中のアレルギー反応数が高いか（ $> 7$ 反応）、または牛乳に対する耐性獲得を達成するのに長時間を必要とするか（ $> 8$ 週）、または前投薬として抗ヒスタミン薬を必要とすることを意味する。

【0042】

本発明に関して、「不良な予測」は、脱感作中のアレルギー反応数が高く（ $> 7$ 反応）、かつ、牛乳に対する耐性獲得を達成するのに長時間を必要とし（ $> 8$ 週）、かつ、前投薬として抗ヒスタミン薬およびコルチコイドを必要とすることを意味する。

【0043】

本発明に関して、耐性獲得/脱感作は、有害な反応なく200mlの牛乳の摂取と定義される。

【0044】

本発明に関して、前投薬は、各OIT期の前の抗ヒスタミン薬および/またはコルチコイドの投与を意味する。

【0045】

本発明に関して、「に対する、またはに対して特異性を有するIgE抗体」は、表1に示される58のエピトープ/ペプチドの配列のいずれかを、好ましくは、ScanArray Express 蛍光スキャナー（PerkinElmer、ウォルサム、MA、USA）にて、IgE - Alexa 546のシグナルを検出するための543nmレーザーを用いて読み取った場合に3以上の強度閾値（zスコア $> 3$ ）で認識するIgE抗体を意味する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 6 】

本発明に関して、免疫学的に活性な本発明の配列の誘導体は、牛乳に対してアレルギーを示す患者の、イムノアッセイの手段により判定可能なタイプE免疫グロブリン(IgE)が、好ましくは、ScanArray Express 蛍光スキャナー(Perkin Elmer、ウォルサム、MA、USA)にて、IgE-Alexa 546のシグナルを検出するための543nmレーザーを用いて読み取った場合に3以上の強度閾値(zスコア>3)で結合するエピトープまたは抗原決定基であり得る配列番号19~75の配列のいずれかの断片と理解される。

## 【 0 0 4 7 】

本発明に関して、タイプE免疫グロブリン(IgE)は、タイプE血漿抗体としても知られるタイプE免疫グロブリンのアイソタイプと理解される。IgG4は、タイプG4血漿抗体としても知られるタイプG4免疫グロブリンのアイソタイプと理解される。

10

## 【 0 0 4 8 】

発明の詳細な開示

OIT処置中のアレルギー患者における牛乳中のタンパク質(-s1-カゼイン、-s2-カゼイン、-カゼイン、-カゼインおよび-ラクトグロブリン)に対する免疫認識パターン(IgEおよびIgG4認識)をペプチドマイクロアレイの手段により分析した:

- ・処置前(0)
- ・OITの手段により耐性獲得が達成された際(D)
- ・耐性獲得達成後6、12および24か月(それぞれ6、12および24)。

20

## 【 0 0 4 9 】

毎日段階的用量を用いる4日からなる1期目と、200mlの牛乳全量に到達するまで週に2回、一回量を投与するさらに6日の、2期での牛乳投与のOITプロトコールを計画した。このガイドラインは、牛乳に対する耐性、試験とは無関係の併発病態(発熱、風邪症状、他の感染性過程、特に、消化過程など)の発生に応じて修正した。病院内および衛生施設外の両方で牛乳の投与中に見られた反応は総て記録し、定量化した。

## 【 0 0 5 0 】

牛乳中のタンパク質に対して持続的アレルギーを持つ患者を選択した。

## 【 0 0 5 1 】

患者組み入れ基準は以下の通りであった。

自発的に耐性獲得に達しないと思われるAPCWと診断された4歳を超える小児。

30

## 【 0 0 5 2 】

試験に患者を組み入れている間にAPCWが持続していることを確認するために、皮膚試験と牛乳に対して特異的なIgEおよびその画分(-ラクトグロブリン、-ラクトアルブミンおよびカゼイン)の測定を行い、牛乳に対して二重盲検プラセボ対照誘発を行った。

## 【 0 0 5 3 】

陽性皮膚試験および牛乳に対して特異的なIgEまたはその画分のいずれかの存在および牛乳に曝された場合の陽性誘発が、即時型アレルギー症状を再発する要件であった。

40

## 【 0 0 5 4 】

皮膚試験は、ヒスタミンによって生じるもの以上のサイズを有した場合に陽性としなし、特異的IgEの測定は、CAP(Thermo Fisher Scientific)によって測定して0.35kU/Lを超えた場合に陽性としなし。

## 【 0 0 5 5 】

従前に定義した基準を満たさなかったAPCWと診断された小児およびラクトース不耐症またはIgEが介在しない反応を有する小児は除外した。

## 【 0 0 5 6 】

合計47名の患者を組み入れ、そこから12名が除外基準を示したので除外した。合計35名の小児が組み入れ基準に従い、これらの小児の総てに牛乳を用いたOIT処置を申

50

し入れた。35名の小児から、合計24名が処置を受け入れ、他の7名の小児は処置を拒否したが、対照群として試験に留まることに同意した。

【0057】

処置の有効性に関しては、有害な反応なく1日に200ml量の牛乳に到達した場合を有効と見なした。

【0058】

牛乳を用いたOITのガイドラインの安全性に関しては、手順中に各患者が呈するアレルギー反応の数、抗アレルギー投薬（コルチコイドおよび抗ヒスタミン薬）による保護の必要、およびガイドラインの期間を考慮した。

【0059】

組み入れた24名の患者は200mlの用量に達したので、この手順は総てのケースで有効であった。

【0060】

患者を、期間が8週（全患者での手順期間の中央値）より長いかわり、反応数が7（中央群の反応）より多いか、およびその用量の投与に抗アレルギー投薬（抗ヒスタミン薬および/またはコルチコイド）を必要とするかどうか（はい、いいえ）に従って分類した。

【0061】

これらの基準に従い、患者を3群に分類した。

- ・低リスク（8週未満、7反応未満、かつ、投薬を必要としない）。7名の患者がこのプロファイルを示した、
- ・中リスク（8週を超える、かつ/または7反応を超える、かつ/または抗ヒスタミン薬の前投薬）。12名の患者がこのプロファイルを示した、
- ・高リスク（8週を超える、7反応を超える、かつ、完全な前投薬（抗ヒスタミン薬およびコルチコイド）。5名の患者がこのプロファイルを示した。

【0062】

試験を実施したところで、本発明の著者らは、OIT処置開始前（0時点）の種々のタンパク質に対する、患者の血漿中のIgE抗体により認識されるペプチドの数を、前記処置後の応答と相関させた。低リスク患者は少数のペプチドを認識し、高リスク患者は多くのペプチドを認識し、中リスク患者は中間数のペプチドを認識した。APCWの一因となる5つのタンパク質の58のエピトープ/ペプチドがこの試験から同定され、牛乳に対するOITへの応答の予測のための情報を提供する（表1および図3～7）。さらに、IgE（および場合によりIgG4）によるこれら58のエピトープ/ペプチドの認識における経時的推移は、OITの期間の決定（IgG4認識の上昇およびIgE認識の低下）、ならびに患者の耐性獲得/脱感作状態（患者は、連続的な毎日のアレルギー暴露を必要とする食物に耐性を獲得する）また恒久的耐性（患者は食物およびその懸濁液に一定の期間耐性を獲得し、この耐性状態は不変である）、および従って、牛乳を用いたOITの全体的な有効性の指摘を可能とする。

【0063】

バイオインフォマティクス分析の手段により、OIT中の反応数（表3および図9）および耐性獲得の達成に必要とされる処置時間（表4および図10）の予測に関して高い予測値を有する27のエピトープ/ペプチドのサブグループを、上記の58のエピトープ/ペプチドから位置決定した。

【0064】

表3は、経口免疫療法（OIT）中の反応数を推定するための24名の患者の血清中のIgE抗体により認識される16のペプチドに基づく基準値を示す。

【0065】

表4は、OIT中の耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間を推定するための24名の患者の血清中のIgE抗体により認識される16のペプチドに基づく基準値を示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 6 】

OIT処置開始前(0時点)の被験者の血清中のIgE抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者の血清中のIgE抗体により認識されるペプチドの数をOIT処置後の応答と関連させる基準値と関連させるために、例えば、表3および4に含まれるものなどの回帰直線のようなアルゴリズムまたは数式を使用することができる。

## 【 0 0 6 7 】

従って、例として、従前に分析した24名の患者から得られた基準値を、OIT中の反応数および耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定に使用することができる。よって、反応数を推定するために、24名の各対照患者により認識される表2のペプチド数とそれらのそれぞれがOIT中に受けた反応の数の間の関係は直線の当てはめまたは線形回帰モデル(図9)の手段によってモデル化することができ、それにより、処置開始前に認識されるペプチドの数に基づき、新たな患者においてそれらがOIT中に受ける反応の数を推定することを可能とする数式を確立することができる。

10

## 【 0 0 6 8 】

さらに、OIT中に耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間を推定するために、24名の各対照患者により認識される表3のペプチド数と耐性獲得を達成するのにそれらのそれぞれにより必要とされる時間の間の関係は直線の当てはめまたは線形回帰モデル(図10)の手段によってモデル化することができ、それにより、処置開始前に認識されるペプチドの数に基づき、新たな患者においてOIT中に耐性獲得を達成するのに必要な時間を推定することを可能とする数式を確立することができる。

20

## 【 0 0 6 9 】

従って、図8~10に見て取れるように、表1に示される58のエピトープ/ペプチドの免疫学的に活性な配列の、ならびに表3に示される16のペプチドまたは表4に示される16のペプチドといった前記配列のサブセットのIgE認識パターンを分析することにより、OIT処置開始前に患者から単離されたサンプル中のIgEにより認識されるペプチドの数に依存して、有害な反応の数および脱感作を達成するのに必要な時間ならびに前投薬が必要とされるかどうかの推定を可能とする一連の基準値が確立された(図8~10参照)。さらに、OIT開始前にIgEにより認識されるペプチドの数に依存して、これにより、患者を低リスク、中リスクまたは高リスク患者に分類することができる。

30

## 【 0 0 7 0 】

【表 1】

| ID | タンパク質             | 位置 | 配列      |
|----|-------------------|----|---------|
| 1  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 6  | 配列番号 18 |
| 2  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 9  | 配列番号 19 |
| 3  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 11 | 配列番号 20 |
| 4  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 25 | 配列番号 21 |
| 5  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 28 | 配列番号 22 |
| 6  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 31 | 配列番号 23 |
| 7  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 34 | 配列番号 24 |
| 8  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 37 | 配列番号 25 |
| 9  | $\alpha$ -s1-カゼイン | 43 | 配列番号 26 |
| 10 | $\alpha$ -s1-カゼイン | 45 | 配列番号 27 |
| 11 | $\alpha$ -s1-カゼイン | 46 | 配列番号 28 |
| 12 | $\alpha$ -s1-カゼイン | 49 | 配列番号 29 |
| 13 | $\alpha$ -s1-カゼイン | 52 | 配列番号 30 |
| 14 | $\alpha$ -s1-カゼイン | 59 | 配列番号 31 |
| 15 | $\alpha$ -s1-カゼイン | 60 | 配列番号 32 |
| 16 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 7  | 配列番号 33 |
| 17 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 9  | 配列番号 34 |
| 18 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 11 | 配列番号 35 |
| 19 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 14 | 配列番号 36 |
| 20 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 21 | 配列番号 37 |
| 21 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 22 | 配列番号 38 |
| 22 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 23 | 配列番号 39 |
| 23 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 24 | 配列番号 40 |
| 24 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 28 | 配列番号 41 |
| 25 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 32 | 配列番号 42 |
| 26 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 35 | 配列番号 43 |
| 27 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 50 | 配列番号 44 |
| 28 | $\alpha$ -s2-カゼイン | 52 | 配列番号 45 |

10

20

30

40

| ID | タンパク質             | 位置 | 配列      |
|----|-------------------|----|---------|
| 29 | $\beta$ -カゼイン     | 1  | 配列番号 46 |
| 30 | $\beta$ -カゼイン     | 15 | 配列番号 47 |
| 31 | $\beta$ -カゼイン     | 25 | 配列番号 48 |
| 32 | $\beta$ -カゼイン     | 28 | 配列番号 49 |
| 33 | $\beta$ -カゼイン     | 32 | 配列番号 50 |
| 34 | $\beta$ -カゼイン     | 34 | 配列番号 51 |
| 35 | $\beta$ -カゼイン     | 36 | 配列番号 52 |
| 36 | $\beta$ -カゼイン     | 43 | 配列番号 53 |
| 37 | $\beta$ -カゼイン     | 45 | 配列番号 54 |
| 38 | $\beta$ -カゼイン     | 47 | 配列番号 55 |
| 39 | $\beta$ -カゼイン     | 48 | 配列番号 56 |
| 40 | $\beta$ -カゼイン     | 51 | 配列番号 57 |
| 41 | $\beta$ -カゼイン     | 53 | 配列番号 58 |
| 42 | $\beta$ -カゼイン     | 54 | 配列番号 59 |
| 43 | $\beta$ -カゼイン     | 56 | 配列番号 60 |
| 44 | $\beta$ -カゼイン     | 59 | 配列番号 61 |
| 45 | $\beta$ -カゼイン     | 61 | 配列番号 62 |
| 46 | $\beta$ -カゼイン     | 64 | 配列番号 63 |
| 47 | $\kappa$ -カゼイン    | 3  | 配列番号 64 |
| 48 | $\kappa$ -カゼイン    | 5  | 配列番号 65 |
| 49 | $\kappa$ -カゼイン    | 7  | 配列番号 66 |
| 50 | $\kappa$ -カゼイン    | 8  | 配列番号 67 |
| 51 | $\kappa$ -カゼイン    | 17 | 配列番号 68 |
| 52 | $\kappa$ -カゼイン    | 18 | 配列番号 69 |
| 53 | $\beta$ -ラクトグロブリン | 6  | 配列番号 70 |
| 54 | $\beta$ -ラクトグロブリン | 42 | 配列番号 71 |
| 55 | $\beta$ -ラクトグロブリン | 43 | 配列番号 72 |
| 56 | $\beta$ -ラクトグロブリン | 44 | 配列番号 73 |
| 57 | $\beta$ -ラクトグロブリン | 46 | 配列番号 74 |
| 58 | $\beta$ -ラクトグロブリン | 47 | 配列番号 75 |

表 1

10

20

30

40

50

表 1 は、A P C W の一因である 5 つのタンパク質の 5 8 のエピトープ/ペプチドを示す。

【 0 0 7 2 】

表 2 は、A P C W の一因である 5 つのタンパク質の 5 8 のエピトープ/ペプチドに含まれる 1 7 の配列を示す（図 3 ~ 7 参照）。

【 0 0 7 3 】

【表 2】

| ID | 配列   |
|----|--|
| 1  | LNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTE  |
| 2  | PNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKE<br>GIH                             |
| 3  | IHAQQKEPMIGVNVQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQ  |
| 4  | DAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMP  |
| 5  | TYKQEKMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEYSIGSSSE  |
| 6  | SAEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQFY  |
| 7  | LNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPT  |
| 8  | TKKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQK  |
| 9  | RELEELNVPGEIVESLSSSE   |
| 10 | DELQDKIHPPAQTQSLVYPF   |
| 11 | NIPPLTQTPVVPPFLQPEVMGVSKVKEA   |
| 12 | GVSKVKEAMAPKHKEMPPFKYPVEPFTESQSL   |
| 13 | LTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAV<br>PYPQRDMPPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV |
| 14 | QPIRCEKDERFFSDKIAKYIPIQYVLSRYPYGLN   |
| 15 | ALINNQFLPYPYYAKPAAVRSPA  |
| 16 | AGTWYSLAMAASDISLLDAQ   |
| 17 | RTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRLSFNPTQLEE  |

表 2

【実施例】

【 0 0 7 4 】

以下の実施例は単に本発明を説明することを意図したものであり、本発明を何ら限定しない。

【 0 0 7 5 】

実施例 1 :

Spot Array 72 マイクロアレイプリンティングロボット (PerkinElmer、ウォルサム、MA、USA) を使い、ID : 2 ( - s 1 - カゼイン p 9 )、4 ( - s 1 - カゼイン p 2 5 )、8 ( - s 1 - カゼイン p 3 7 )、10 ( - s 1 - カゼイン p 4 5 )、11 ( - s 1 - カゼイン p 4 6 )、14 ( - s 1 - カゼイン p 5 9 )、19 ( - s 2 - カゼイン p 1 4 )、20 ( - s 2 - カゼイン p 2 1 )、21 ( - s 2 - カゼイン p 2 2 )、22 ( - s 2 - カゼイン p 2 3 )、23 ( - s 2 - カゼイン p 2 4 )、27 ( - s 2 - カゼイン p 5 0 )、34 ( - カゼイン p 3 4 )、36

( - カゼイン p 4 3 )、3 8 ( - カゼイン p 4 7 )、3 9 ( - カゼイン p 4 8 )、4 1 ( - カゼイン p 5 3 )、4 2 ( - カゼイン p 5 4 )、4 5 ( - カゼイン p 6 1 )、5 0 ( - カゼイン p 8 )、5 1 ( - カゼイン p 1 7 )、5 2 ( - カゼイン p 1 8 )、5 3 ( - ラクトグロブリン p 6 )、5 4 ( - ラクトグロブリン p 4 2 )、5 5 ( - ラクトグロブリン p 4 3 )、5 6 ( - ラクトグロブリン p 4 4 ) および 5 8 ( - ラクトグロブリン p 4 7 ) を有する 2 7 のペプチドを含むマイクロアレイを、N - ヒドロキシルスクシンイミジルで官能基化した NS B 2 7 NHS ガラス ( Nano Surface Biosciences - POSTECH、ソウル、韓国 ) 上にプリントした ; 表 3 および 4 ならびに図 9 および 1 0 参照。プリントのために、これらのペプチドを 1 : 1 リン酸生理食塩水バッファー ( PBS ) 溶液およびプリンティングバッファー ( PPB ) ( タンパク質プリンティングバッファー、Arrayit Corporation、サニーヴェール、CA、USA ) に溶かした。マイクロアレイをプリントしたところで、非特異的結合を室温にて 1 時間、1 : 1 Block It ( 商標 ) ブロッキング溶液 ( Arrayit Corporation、サニーヴェール、CA、USA ) および 0 . 1 % Tween 2 0 および 2 % ウシ血清アルブミンを含有する PBS ( PBS - T - BSA ) でブロッキングした。

10

## 【 0 0 7 6 】

3 名の患者から得られた血清をマイクロアレイの表面で 4 にて 1 6 時間、連続撹拌下でインキュベートした。このサンプルをマイクロアレイから除去し、PBS - T - BSA 溶液で 2 回洗浄した。次に、それらを Alexa 5 4 6 で標識した抗ヒト Ig E 蛍光抗体 ( G 7 - 2 6、BD - Pharmingen、サンディエゴ、CA、USA ) と Alexa 6 4 7 で標識した抗ヒト Ig G 4 蛍光抗体 ( G 1 4 - 4、BD - Pharmingen、サンディエゴ、CA、USA ) を含有する、PBS - T - BSA 中に 1 / 1 0 0 0 希釈した溶液とともにインキュベートした。この抗体含有溶液を除去し、PBS - T - BSA 溶液で 2 回洗浄した。

20

## 【 0 0 7 7 】

患者の血清において、牛乳中のアレルゲンタンパク質の種々のペプチドに対する Ig E 抗体および Ig G 4 抗体の存在を検出するために、前記マイクロアレイを Scan Array Express 蛍光スキャナー ( PerkinElmer、ウォルサム、MA、USA ) にて 2 つのレーザー ( Ig E - Alexa 5 4 6 シグナルを検出するための 5 4 3 nm レーザーと Ig G 4 - Alexa 6 4 7 シグナルを検出するための 6 3 3 nm レーザー ) を用いて読み取った。結果を定量化し、蛍光シグナルを数値パラメーター ( 任意蛍光単位または z スコア ) に変換するために正規化した。3 を超える蛍光シグナル ( z スコア > 3 ) を有するペプチドの数を計算した。第 1 の患者は 2 つのペプチドを認識し、第 2 の患者は 8 つのペプチドを認識し、第 3 の患者は 1 5 のペプチドを認識した。

30

## 【 0 0 7 8 】

ペプチド認識が 2 の患者は良好な予測を示す ( 脱感作中に有害な反応を示す確率が低い、推定 3 つのアレルギー反応、表 3 および図 9 参照、かつ、牛乳に対する耐性獲得を達成するのに要する時間が短い、推定 7 週、表 4 および図 1 0 参照 )。

40

## 【 0 0 7 9 】

ペプチド認識が 8 の患者は中等度の予測を示す ( 脱感作中に有害な反応を示すリスクが中等度、推定 1 0 のアレルギー反応、表 3 および図 9 参照、かつ、牛乳に対する耐性獲得を達成するのに要する時間が中程度、推定 1 1 週、表 4 および図 1 0 参照 )。

## 【 0 0 8 0 】

ペプチド認識が 1 5 の患者は不良な予測を示す ( 脱感作中に有害な反応を示す確率が高い、推定 1 9 のアレルギー反応、表 2 および図 9、かつ、牛乳に対する耐性獲得を達成するのに要する時間が長い、推定 1 6 週。加えて、これらの患者は、各 OIT 期の前に前投薬ならびに抗ヒスタミン薬およびコルチコイドによる処置を必要とする ( 表 4 および図 1 0 参照 )。

## 【 0 0 8 1 】

50

【表 3】

| ID | タンパク質          | 配列      |
|----|----------------|---------|
| 2  | α-s1-カゼイン p9   | 配列番号 19 |
| 4  | α-s1-カゼイン p25  | 配列番号 21 |
| 8  | α-s1-カゼイン p37  | 配列番号 25 |
| 10 | α-s1-カゼイン p45  | 配列番号 27 |
| 19 | α-s2-カゼイン p14  | 配列番号 36 |
| 20 | α-s2-カゼイン p21  | 配列番号 37 |
| 21 | α-s2-カゼイン p22  | 配列番号 38 |
| 34 | β-カゼイン p34     | 配列番号 51 |
| 36 | β-カゼイン p43     | 配列番号 53 |
| 41 | β-カゼイン p53     | 配列番号 58 |
| 42 | β-カゼイン p54     | 配列番号 59 |
| 45 | β-カゼイン p61     | 配列番号 62 |
| 52 | κ-カゼイン p18     | 配列番号 69 |
| 54 | β-ラクトグロブリン p42 | 配列番号 71 |
| 55 | β-ラクトグロブリン p43 | 配列番号 72 |
| 56 | β-ラクトグロブリン p44 | 配列番号 73 |

表 3

表 3: OIT 中の反応数を最もよく推定するペプチド

式: 推定反応=1.1733 ペプチド数+1.0362

ペプチド数: 2, 推定反応: 3

ペプチド数: 8, 推定反応: 10

ペプチド数: 15, 推定反応: 19

【 0 0 8 2 】

10

20

30

【表 4】

| ID | ペプチド           | 配列      |
|----|----------------|---------|
| 11 | α-s1-カゼイン p46  | 配列番号 28 |
| 14 | α-s1-カゼイン p59  | 配列番号 31 |
| 19 | α-s2-カゼイン p14  | 配列番号 36 |
| 20 | α-s2-カゼイン p21  | 配列番号 37 |
| 21 | α-s2-カゼイン p22  | 配列番号 38 |
| 22 | α-s2-カゼイン p23  | 配列番号 39 |
| 23 | α-s2-カゼイン p24  | 配列番号 40 |
| 27 | α-s2-カゼイン p50  | 配列番号 44 |
| 36 | β-カゼイン p43     | 配列番号 53 |
| 38 | β-カゼイン p47     | 配列番号 55 |
| 39 | β-カゼイン p48     | 配列番号 56 |
| 50 | κ-カゼイン p8      | 配列番号 67 |
| 51 | κ-カゼイン p17     | 配列番号 68 |
| 53 | β-ラクトグロブリン p6  | 配列番号 70 |
| 55 | β-ラクトグロブリン p43 | 配列番号 72 |
| 58 | β-ラクトグロブリン p47 | 配列番号 75 |

表 4

表 4: OIT 中に耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間を最もよく推定するペプチド

式: 推定処置時間 (週) = (0.7318 \* ペプチド数) + 5.1419

ペプチド数: 2, 推定処置時間 (週): 7

ペプチド数: 8, 推定処置時間 (週): 11

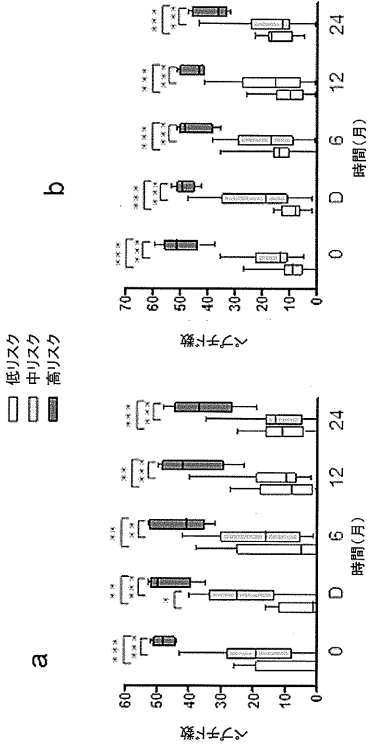
ペプチド数: 15, 推定処置時間 (週): 16

10

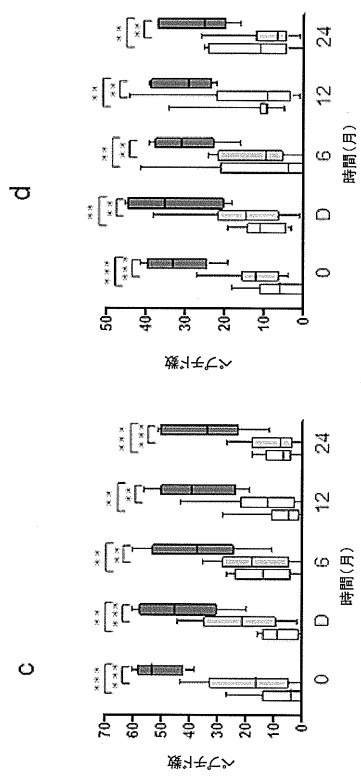
20

30

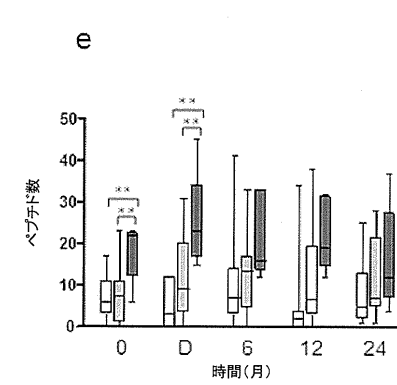
【図 1 - 1】



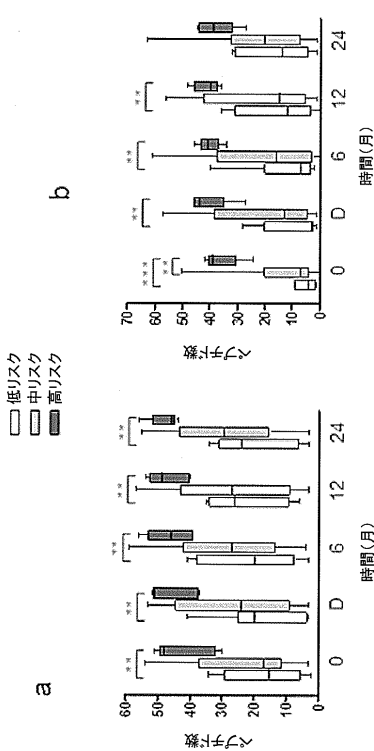
【図 1 - 2】



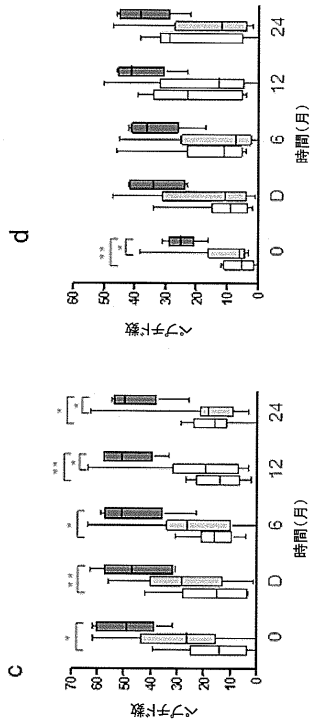
【図 1 - 3】



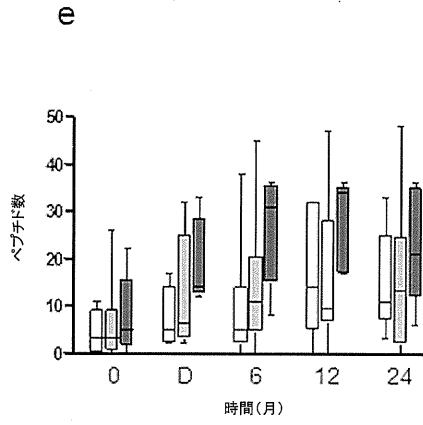
【図 2 - 1】



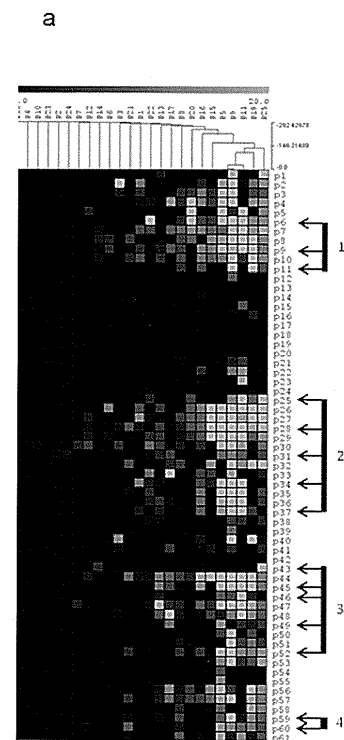
【図 2 - 2】



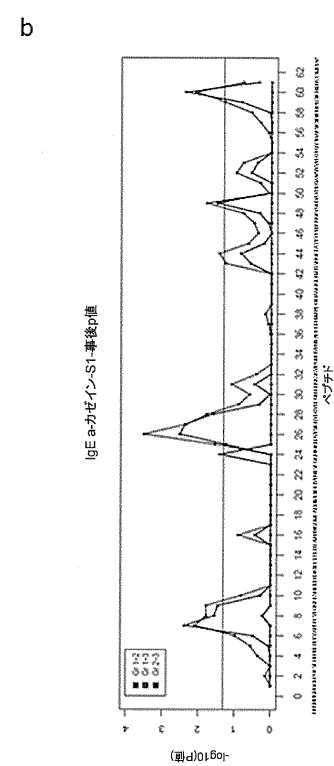
【図 2 - 3】



【図 3 - 1】

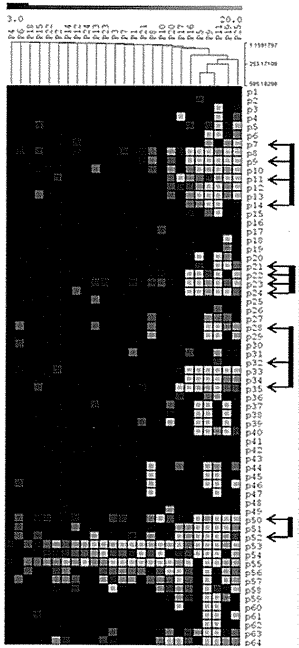


【図 3 - 2】



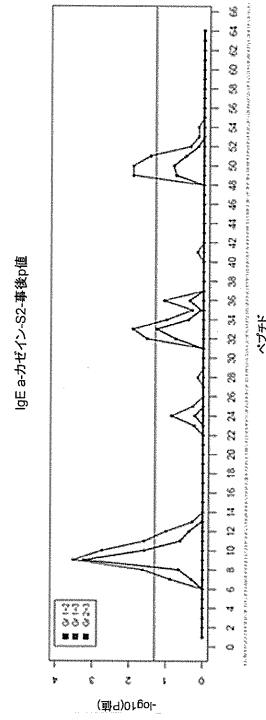
【 図 4 - 1 】

a



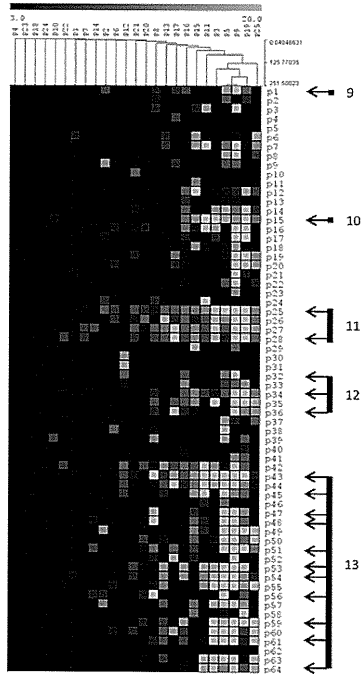
【 図 4 - 2 】

b



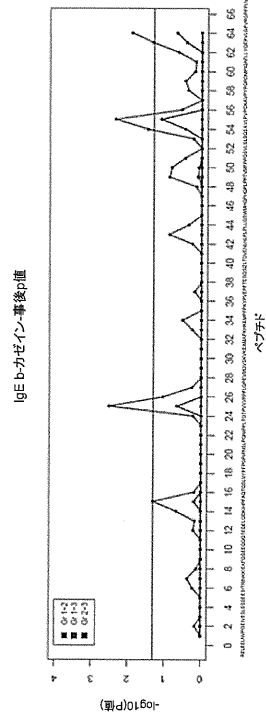
【 図 5 - 1 】

a

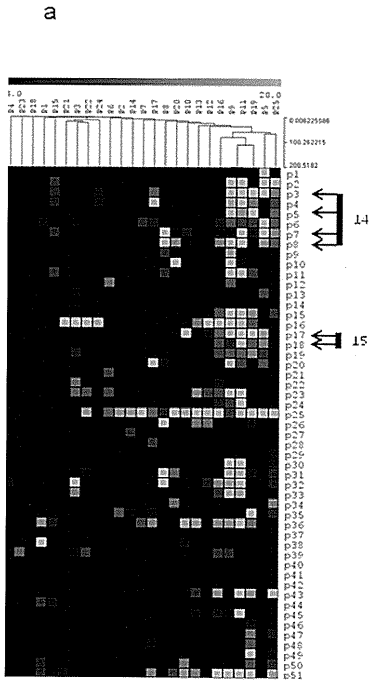


【 図 5 - 2 】

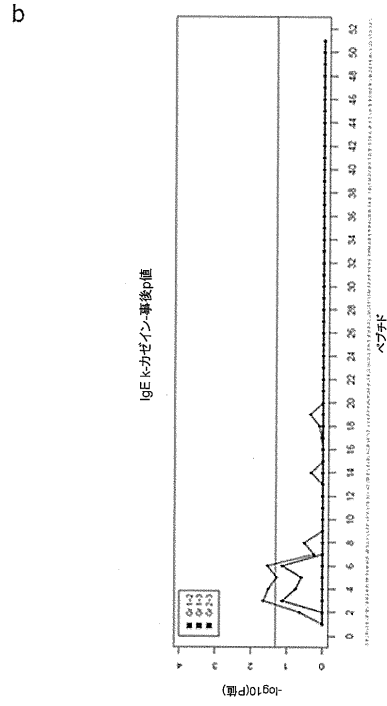
b



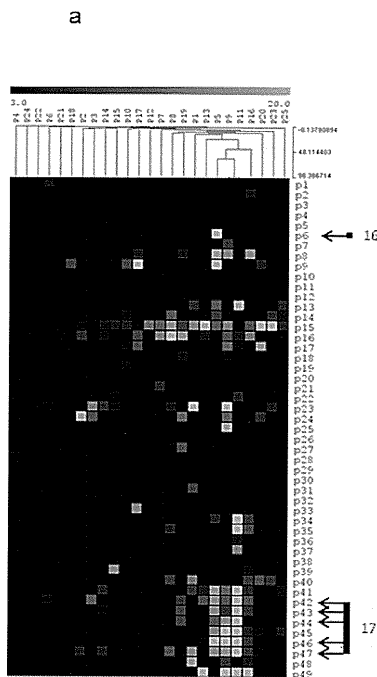
【 図 6 - 1 】



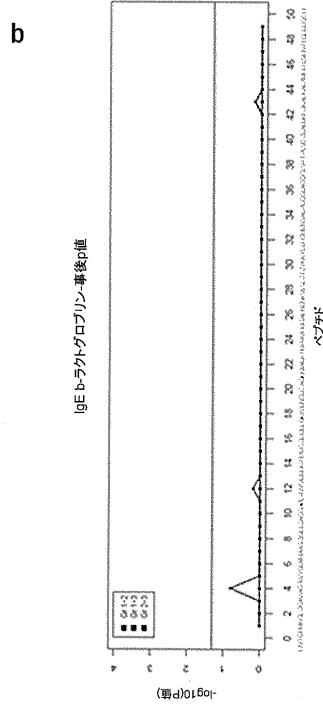
【 図 6 - 2 】



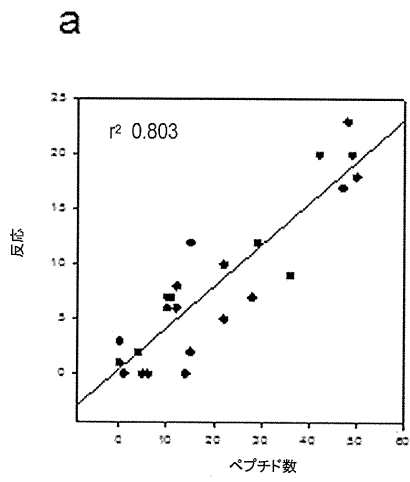
【 図 7 - 1 】



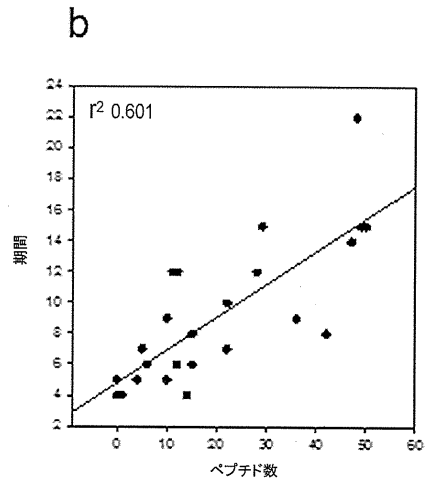
【 図 7 - 2 】



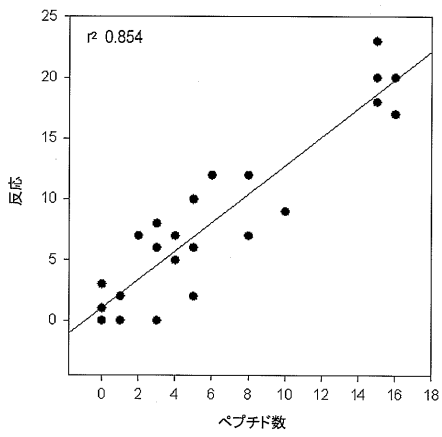
【 図 8 - 1 】



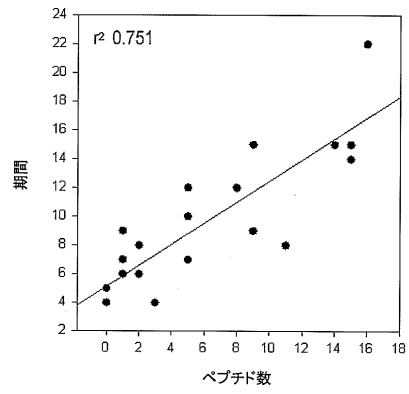
【 図 8 - 2 】



【 図 9 】



【 図 10 】



## 【配列表】

2016527509000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成28年3月30日(2016.3.30)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

牛乳に耐性を有さないヒト被験者における牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法(OIT)の予測方法であって、OIT処置開始前(0時点)に該被験者より単離された、血液、血清、血漿、脳脊髄液、腹水、糞便または尿などの生体サンプル中の、以下の配列

- ：
- a. 配列番号18～32の配列および/または免疫学的に活性な配列番号18～32の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに/あるいは
  - b. 配列番号33～45の配列および/または免疫学的に活性な配列番号33～45の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに/あるいは
  - c. 配列番号46～63の配列および/または免疫学的に活性な配列番号46～63の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに/あるいは；
  - d. 配列番号64～69の配列および/または免疫学的に活性な配列番号64～69の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに/あるいは
  - e. 配列番号70～75の配列および/または免疫学的に活性な配列番号70～75の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列
- のいずれかを有すると同定されたペプチドを認識することができるIgE抗体の有無を判定する工程を含んでなり、

牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法(OIT)の予測が、OIT処置開始前(0時点)の前記被験者由来のサンプル中のIgE抗体により認識されるペプチド配列の数を、同じペプチド配列に基づいて確立された、患者由来のサンプル中のIgE抗体により認識されるペプチドの数をOIT処置後の応答と相関させる基準値と相関させることにより確定される、上記方法。

【請求項2】

生体サンプル中のIgE抗体の有無の判定が、以下の配列：

- a. 配列番号18～32の配列および/または免疫学的に活性な配列番号18～32の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに
  - b. 配列番号33～45の配列および/または免疫学的に活性な配列番号33～45の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに
  - c. 配列番号46～63の配列および/または免疫学的に活性な配列番号46～63の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに場合により
  - d. 配列番号64～69の配列および/または免疫学的に活性な配列番号64～69の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列；ならびに場合により、
  - e. 配列番号70～75の配列および/または免疫学的に活性な配列番号70～75の配列の誘導体からなる群から選択される少なくとも1つの配列
- のいずれかを有すると同定されたペプチドを認識することができるIgE抗体の有無を判定することによって行われる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記方法が経口免疫療法(OIT)中の反応数の予測のための方法であり、生体サンプル中のIgE抗体の有無の判定が、以下の配列：

- a. 配列番号19、21、25および27の配列および/または免疫学的に活性な配列

番号 19、21、25 および 27 の配列の誘導体；ならびに

b．配列番号 36、37 および 38 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 36、37 および 38 の配列の誘導体；ならびに

c．配列番号 51、53、58、59 および 62 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 51、53、58、59 および 62 の配列の誘導体；ならびに

d．配列番号 69 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 69 の配列の誘導体；ならびに

e．配列番号 71 および 72 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 71 および 72 の配列の誘導体

のいずれかを有すると同定されたペプチドを認識することができる I g E 抗体の有無を判定することによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法が O I T 中に耐性獲得または脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値の予測方法であり、生体サンプル中の I g E 抗体の有無の判定が、以下の配列：

a．配列番号 28 および 31 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 28 および 31 の配列の誘導体；ならびに

b．配列番号 36 ~ 40 および 44 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 36 ~ 40 および 44 の配列の誘導体；ならびに

c．配列番号 53、55 および 56 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 53、55 および 56 の配列の誘導体；ならびに

d．配列番号 67 および 68 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 67 および 68 の配列の誘導体；ならびに

e．配列番号 70、72 および 75 の配列および / または免疫学的に活性な配列番号 70、72 および 75 の配列の誘導体

のいずれかを有すると同定されたペプチドを認識することができる I g E 抗体の有無を判定することによって行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

生体サンプル中の I g E 抗体の有無の判定が、以下の配列：配列番号 18 ~ 75 および / または免疫学的に活性な配列番号 18 ~ 75 の配列の誘導体を有すると同定されたペプチドを認識することができる I g E 抗体の有無を判定することによって行われ、

該配列の 15 % 未満のペプチド認識が良好な予測の指標であり、該良好な予測が、脱感作中に有害な反応を有する確率が低く (< 7 反応)、かつ、牛乳に対する耐性獲得を達成するのに必要な時間が短く (< 8 週)、かつ、前投薬を必要としないことであり、

該配列の 15 % ~ 75 % の間のペプチド認識が中等度の予測の指標であり、該中等度の予測が、脱感作中のアレルギー反応数が高いか (> 7 反応)、または牛乳に対する耐性獲得を達成するのに長時間を必要とするか (> 8 週)、または前投薬として抗ヒスタミン薬を必要とすることであり、

該配列の 75 % を超えるペプチド認識が不良な予測の指標であり、該不良な予測が、脱感作中のアレルギー反応数が高く (> 7 反応)、かつ、牛乳に対する耐性獲得を達成するのに長時間を必要とし (> 8 週)、かつ、前投薬として抗ヒスタミン薬およびコルチコイドを必要とすることである、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

ペプチド認識がイムノアッセイの手段により判定される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ペプチド認識がペプチドマイクロアレイの手段により判定される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

ヒト被験者における牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法 (O I T) の予測のため

の、請求項 1 ~ 5 のいずれかで定義されるペプチドの組合せを含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法を行うために好適なペプチドマイクロアレイの使用。

【請求項 9】

捕捉生体分子としてペプチドを含んでなる、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法を行うために好適なキットであって、該ペプチドが配列番号 18 ~ 75 の配列および / または免疫学的に活性な該配列の誘導体からなる群から選択される、上記キット。

【請求項 10】

a . 配列番号 18 ~ 75 からなるリストか、請求項 3 もしくは 4 に定義されるペプチドのサブセット、および / または免疫学的に活性な該配列の誘導体からなるリストから選択される I g E を認識することができる捕捉生体分子と、

b . タグ分子と結合されていてもよい目的分析物または捕捉生体分子を認識することができる第 2 の認識分子 ( 検出生体分子 ) と  
を含んでなるキット。

【請求項 11】

a . 配列番号 18 ~ 75 からなるリストか、請求項 3 もしくは 4 に定義されるペプチドのサブセット、および / または免疫学的に活性な該配列の誘導体からなるリストから選択される I g E を認識することができる捕捉生体分子と、

b . 工程 a ) の捕捉生体分子が固定された支持体と、

c . タグ分子と結合されていてもよい目的分析物または捕捉生体分子を認識することができる第 2 の認識分子 ( 検出生体分子 ) と  
を含んでなるキット

【請求項 12】

牛乳中のタンパク質に対する経口免疫療法 ( O I T ) 中の反応数および / または O I T 中に耐性獲得もしくは脱感作を達成するのに必要な処置時間の推定値および / または O I T 中の前投薬の必要性の予測のための、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載のキットの使用。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2014/070634

| C (continuation). |  | DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |
|-------------------|--|-------------------------------------|
| Category *        | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.               |
| X                 | CERECEDO I et al. "Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20080901 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/09/2008 VOL: 122 No: 3 Pags: 589 - 594 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2008.06.040; the whole document.                       | 4-17                                |
| X                 | WO 2011032097 A1 (SINAI SCHOOL MEDICINE ET AL.) 17/03/2011, the whole document.  | 4-17                                |
| A                 | SAVILAHTI E M et al. "Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/06/2010 VOL: 125 No: 6 Pags: 1315 - 1321.e9 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2010.03.025; the whole document. | 4-17                                |
| A                 | MATSUMOTO N et al. "Peptide array-based analysis of the specific IgE and IgG4 in cow's milk allergens and its use in allergy evaluation" Peptides, 20091001 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/10/2009 VOL: 30 No: 10 Pags: 1840 - 1847 ISSN 0196-9781 Doi: doi:10.1016/j.peptides.2009.07.005 Nachman Ronald J; the whole document.                           | 4-17                                |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

ES2014/070634

Continuation of Box II, point 1.

The first step of the claimed method consists in "extracting a biological sample from the patient". This step involves an invasive interaction with the human body, and for this reason this Office considers that the claimed method is a surgical method, since it comprises a step that involves a physical intervention on the human or animal body, which is per se a surgical method. There might be cases in which this step can be eliminated or omitted, whenever said step is not an essential part of the claimed method. This is the case, for example, when a step that consists in a surgical method is a preliminary step carried out before the method according to the invention. This could be the case when a step for extracting samples from the patient is required but this step is not part of the diagnostic method itself performed on the sample.

Continuation of Box II, point 2.

The description (page 18, line 23 - page 19, line 4) indicates that, on the basis of an assay carried out by the authors of the invention, "58 epitopes/peptides of the five proteins involved in cow's milk protein allergy (CMPA) were found which are useful for the prognosis of the response to oral immunotherapy for cow's milk allergy (table 1 and figures 3-7). Moreover, the evolution in time of IgE recognition (and optionally IgG4 recognition) of these 58 epitopes/peptides makes it possible to determine the duration of oral immunotherapy (increase in IgG4 recognition and decrease of IgE recognition), and to indicate the immunological state of the patient, which can be a state of tolerance/desensitisation (the patient tolerates the food substance, requiring daily and uninterrupted exposure to the allergen) or a state of permanent tolerance (the patient tolerates the food substance, and abstention from the food substance for a period of time does not change the state of tolerance), and hence the global effectiveness of oral immunotherapy with cow's milk. Bioinformatics studies located a subgroup of 27 epitopes/peptides among the 58 above-mentioned epitopes/peptides which exhibit a high prognostic value for the number of reactions during oral immunotherapy (table 3 and figure 9) and for the duration of treatment required to achieve tolerance (table 4 and figure 10)".

Moreover, on page 20, lines 11-21, it is indicated that "through the analysis of the IgE recognition pattern of the immunologically active sequences of the 58 epitopes/peptides shown in table 1, and of subsets of said sequences, such as the 16 peptides shown in table 3 or the 16 peptides shown in table 4, a series of reference values (see figures 8-10) has been determined which, according to the number of IgE-recognised peptides in a sample extracted from a patient before the start of oral immunotherapy, allows the number of adverse reactions and the time required to achieve desensitisation to be estimated, as well as the need or not for pre-medication. Moreover, it allows patients to be classified as low-risk, moderate risk or high-risk patients, according to the number of IgE-recognised peptides, before oral immunotherapy is started".

It is concluded from these indications in the description that the method consists in determining the effectiveness of oral immunotherapy with cow's milk by analysing the IgE recognition pattern of ALL 58 epitopes/peptides, or at least of 27 of these epitopes/peptides, grouped into two groups of 16 epitopes/peptides.

In order to establish the present international search report, the search was carried out in respect of claims 4-11 (in full) and claims 12-17 (in part).

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

ES2014/070634

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A sequence listing was available to the International Searching Authority (ISA/ES) at the time the international search was carried out, in an acceptable format, and this sequence listing was used for carrying out the international search.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

ES2014/070634

**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.: 11.1  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1-11 relate to subject matter which this Authority considers falls under the provisions of PCT Rule 67.1(iv) relating to methods for the treatment of the human or animal body by surgery or therapy, and to diagnostic means. Nevertheless, a search in respect of claims 4-11 has been carried out on the basis of the use of the claimed peptides (see Supplemental Box, point 1).
2.  Claims Nos.: 1-3  
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:  
  
Claims 1-3 are not properly supported by the description (see Supplemental Box, point 2).
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:

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.:
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/ES2014/070634

Information on patent family members

| Patent document cited<br>in the search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                      | Publication<br>date                    |
|---|---------------------|---|--|
| WO2011032097 A1                               | 17.03.2011          | US2011071043 A1<br>US8802375 B2<br>EP2478373 A1 | 24.03.2011<br>12.08.2014<br>25.07.2012 |
| -----   | -----               | -----   | -----                                  |

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070634

| A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD<br><i>G01N33/68</i> (2006.01)  |  |  |
|--|--|--|
| De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.   |  |  |
| B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA   |  |  |
| Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)<br>G01N   |  |  |
| Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda   |  |  |
| Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)<br>EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE/ELSEVIER, MEDLINE/NLM, XPESP, EMBL-EBI y bases de datos de texto completo TXT |  |  |
| C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES  |  |  |
| Categoría*   | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes   | Relevante para las reivindicaciones nº   |
| X  | WANG J et al. "Correlation of IgE/IgG4 milk epitopes and affinity of milk-specific IgE antibodies with different phenotypes of clinical milk allergy" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100301 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/03/2010 VOL: 125 No: 3 Pags: 695 - 702.e6 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2009.12.017; todo el documento.   | 4-17   |
| X  | CERECEDO INMACULADA "Aplicación de la tecnología microarray al manejo diagnóstico de la alergia a proteínas de la leche de vaca" Tesis Doctoral (mayo 2009) [recuperado el 23-09-2014]; Recuperado de Internet:<br>URL:<"http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/6422/Versi%c3%b3n%20final%20200905024.pdf?sequence=1"><br>todo el documento. | 4-17   |
| <input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo   |  |  |
| * Categorías especiales de documentos citados:   | "T"  | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.  | "X"  | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.  |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.   | "Y"  | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).   | "&"  | documento que forma parte de la misma familia de patentes.   |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.   |  |  |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.   |  |  |
| Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.<br>01/10/2014  | Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.<br><b>09 de octubre de 2014 (09/10/2014)</b>  |  |
| Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional<br>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS<br>Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)<br>Nº de fax: 91 349 53 04  | Funcionario autorizado<br>M. García Coca<br><br>Nº de teléfono 91 3493411  |  |

### INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070634

| C (Continuación). |  | DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES     |
|-------------------|--|--|
| Categoría *       | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes   | Relevante para las reivindicaciones nº |
| X                 | <p>CERECEDO I et al. "Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20080901 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/09/2008 VOL: 122 No: 3 Pags: 589 - 594 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2008.06.040; todo el documento.</p>                       | 4-17                                   |
| X                 | <p>WO 2011032097 A1 (SINAI SCHOOL MEDICINE ET AL.) 17/03/2011, todo el documento.</p>  | 4-17                                   |
| A                 | <p>SAVILAHTI E M et al. "Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes" Journal of Allergy and Clinical Immunology, 20100601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/06/2010 VOL: 125 No: 6 Pags: 1315 - 1321.e9 ISSN 0091-6749 Doi: doi:10.1016/j.jaci.2010.03.025; todo el documento.</p> | 4-17                                   |
| A                 | <p>MATSUMOTO N et al. "Peptide array-based analysis of the specific IgE and IgG4 in cow's milk allergens and its use in allergy evaluation" Peptides, 20091001 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/10/2009 VOL: 30 No: 10 Pags: 1840 - 1847 ISSN 0196-9781 Doi: doi:10.1016/j.peptides.2009.07.005 Nachman Ronald J; todo el documento.</p>                           | 4-17                                   |

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional n°

PCT/ES2014/070634

**Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)**

1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

## a. Medios

- en papel  
 en formato electrónico

## b. Cuando

- en la solicitud internacional tal y como se presentó  
 junto con la solicitud internacional en formato electrónico  
 posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2.  Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

**A la hora de realizar la búsqueda internacional la Administración encargada de la Búsqueda Internacional (ISA/ES) estaba en posesión del listado de secuencias en un formato aceptado por ésta y tal listado se ha utilizado para la realización de la búsqueda internacional.**

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional n°  
PCT/ES2014/070634

| <b>Recuadro II</b>  | <b>Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)</b>   |
|---------------------|---|
|                     | <p>Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°s: <b>1-11</b><br/>se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:</p> <p><b>Las reivindicaciones N° 1-11 se refieren a una materia que esta Administración considera que están afectadas por las disposiciones de la Regla 67. 1 (iv) PCT, relativas a métodos de tratamiento quirúrgico o terapéutico del cuerpo humano o animal, así como medios de diagnóstico. A pesar de ello, se ha efectuado una búsqueda para las reivindicaciones 4-11 basada en el uso de los péptidos reivindicados (ver Recuadro suplementario 1).</b></p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°s: <b>1-3</b><br/>se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:</p> <p><b>Las reivindicaciones 1-3 no están adecuadamente fundadas en la descripción (Ver Recuadro suplementario 2).</b></p> <p>3. <input type="checkbox"/> Las reivindicaciones n°s:<br/>son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).</p>  |
| <b>Recuadro III</b> | <b>Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)</b>   |
|                     | <p>La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:</p> <p><b>Indicación en cuanto a la protesta</b></p> <p><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.</p> <p><input type="checkbox"/> Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.</p> <p><input type="checkbox"/> El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.</p> |

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2014/070634

### Continuación del Recuadro II punto 1.

La primera etapa del método reivindicado es “aislar una muestra biológica del sujeto”. Esta etapa implica una interacción invasiva con el cuerpo humano, por lo que esta oficina considera que el método reivindicado es un método quirúrgico ya que comprende una etapa que implica una intervención física sobre el cuerpo humano o animal que constituye por sí misma un método quirúrgico.

Habrán casos en que dicha etapa pueda eliminarse u omitirse siempre que dicha etapa no forme parte esencial del método reivindicado. Por ejemplo, cuando la etapa que constituye un método quirúrgico sea una etapa previa al método de la invención. Este puede ser el caso de que sea necesaria una etapa de extracción de muestras del paciente pero dicha etapa no forma parte del propio método de diagnóstico, que se realiza sobre la muestra.

### Continuación del Recuadro II punto 2.

En la descripción (página 18 línea 23 - página 19 línea 4) se indica que a partir del ensayo hecho por los autores de la invención, “*se encontraron 58 epítomos/péptidos de las cinco proteínas responsables de la APLV que son informativos para el pronóstico de la respuesta a la ITO frente a leche de vaca (tabla 1 y figuras 3 a 7). Además, la evolución temporal en el reconocimiento por IgE (y opcionalmente IgG4) de estos 58 epítomos/péptidos permite determinar el tiempo de duración de la ITO (aumento de reconocimiento IgG4 y disminución de IgE), y señalar el estado inmunológico del paciente de tolerancia/desensibilización (tolera el alimento requiriendo exposición al alérgeno a diario y sin interrupción) o tolerancia permanente (tolera el alimento y la suspensión del mismo durante un periodo de tiempo no cambia el estado de tolerancia), y por tanto la eficacia global de la ITO con leche de vaca. Mediante el análisis bioinformático, de entre los 58 epítomos/péptidos descritos anteriormente, se localizó un subgrupo de 27 epítomos/péptidos que presentan un elevado valor pronóstico del número de reacciones durante la ITO (tabla 3 y figura 9) y del tiempo de tratamiento requerido para alcanzar la tolerancia (tabla 4 y figura 10)*”.

Además, en la página 20 líneas 11-21, se indica que “*analizando el patrón de reconocimiento IgE de las secuencias inmunológicamente activas de los 58 epítomos/péptidos mostrados en la tabla 1, así como de subconjuntos de dichas secuencias como lo son los 16 péptidos mostrados en la tabla 3 o los 16 péptidos mostrados en la tabla 4, se han establecido una serie de valores de referencia (ver figuras 8-10) que permiten, en función del número de péptidos reconocidos por IgE en una muestra aislada de un paciente antes de empezar el tratamiento ITO, estimar el número de reacciones adversas y el tiempo requerido para alcanzar la desensibilización así como la necesidad o no de pre-medicación. Además, nos permite clasificar a los pacientes en función del número de péptidos reconocidos por IgE antes de empezar la ITO como de bajo riesgo, riesgo moderado o riesgo alto*”.

De lo indicado en la descripción se deduce que el método se basa en determinar la eficacia de la ITO con leche de vaca, mediante el análisis del patrón de reconocimiento IgE de TODOS los 58 epítomos/péptidos, o al menos de 27 de los mismos, agrupados en 2 grupos de 16 epítomos/péptidos.

Para la realización del presente Informe de Búsqueda Internacional, se ha realizado la búsqueda de las reivindicaciones 4-11 y parcialmente de las reivindicaciones 12-17.

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2014/070634

| Documento de patente citado<br>en el informe de búsqueda | Fecha de<br>Publicación | Miembro(s) de la<br>familia de patentes         | Fecha de<br>Publicación                |
|--|-------------------------|---|--|
| WO2011032097 A1  | 17.03.2011              | US2011071043 A1<br>US8802375 B2<br>EP2478373 A1 | 24.03.2011<br>12.08.2014<br>25.07.2012 |
| -----  | -----                   | -----   | -----                                  |

## フロントページの続き

(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, RU, TJ, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100091096  
弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100118773  
弁理士 藤田 節

(74)代理人 100122389  
弁理士 新井 栄一

(74)代理人 100111741  
弁理士 田中 夏夫

(74)代理人 100169971  
弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100144794  
弁理士 大木 信人

(72)発明者 デラホスカバラー, マリアベレン  
スペイン国 イー-28034 マドリード, カッレテラデコルメナーピエホ, ケーエム.  
9, 100, ファンデーションパララインベスティゲーションバイオメディカデルホ  
スピタルユニベルシタリオラモンワイカジャル

(72)発明者 マルティネスボタス, ハビエル  
スペイン国 イー-28034 マドリード, カッレテラデコルメナーピエホ, ケーエム.  
9, 100, ファンデーションパララインベスティゲーションバイオメディカデルホ  
スピタルユニベルシタリオラモンワイカジャル

(72)発明者 セレセドカルバッコ, インマクラダ  
スペイン国 イー-28034 マドリード, カッレテラデコルメナーピエホ, ケーエム.  
9, 100, ファンデーションパララインベスティゲーションバイオメディカデルホ  
スピタルユニベルシタリオラモンワイカジャル

(72)発明者 フェルナンデスリバス, モントセラット  
スペイン国 イー-28040 マドリード, エス/エヌ, シー/ プロフェッサー マルティン  
ラゴス, ファンデーションパララインベスティゲーションバイオメディカデルホ  
スピタルクリニコサンカルロス

(72)発明者 ロドリゲスアルバレス, モニカ  
スペイン国 イー-28040 マドリード, エス/エヌ, シー/ プロフェッサー マルティン  
ラゴス, ファンデーションパララインベスティゲーションバイオメディカデルホ  
スピタルクリニコサンカルロス

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA10 CA43 DA86 EA50

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 预测用于治疗乳中蛋白质过敏的口服免疫疗法的有效性的方法   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2016527509A</a>   | 公开(公告)日 | 2016-09-08 |
| 申请号            | JP2016530559  | 申请日     | 2014-08-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 粉底数值线ゲーシヨン生物医药デルホスピタルウニベルシタリオラモンワイカジャルベ斯蒂基金会対线贝丝三通审讯生物本草德尔医院Kuriniko圣卡洛斯                      |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 基金会对拉库存宪法审讯生物药物德尔医院宇宙报拉蒙·怀Kajaru<br>基金会对拉库存宪法审讯生物药物德尔医院Kuriniko圣卡洛斯                           |         |            |
| [标]发明人         | デラホスカバラーマリアベレン<br>マルティネスポタスハビエル<br>セレセドカルバッコインマクラダ<br>フェルナンデスリバスモントセラット<br>ロドリゲスアルバレスモニカ      |         |            |
| 发明人            | デラホスカバラー,マリアベレン<br>マルティネスポタス,ハビエル<br>セレセドカルバッコ,インマクラダ<br>フェルナンデスリバス,モントセラット<br>ロドリゲスアルバレス,モニカ |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N37/00 C07K14/47   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/6854 G01N33/6893 G01N2800/24 G01N2800/52 G01N2800/56                                   |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.Q G01N33/53.N G01N37/00.102 C07K14/47.ZNA   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA43 4H045/DA86 4H045/EA50  |         |            |
| 代理人(译)         | 荒井英一<br>Nobuto滤纸冲   |         |            |
| 优先权            | 2013031200 2013-08-01 ES  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

本发明提供了在针对乳中蛋白质的口服免疫疗法(OIT)期间发生的反应的数量和/或在OIT期间对人受试者中乳中的蛋白质实现抗性增加或脱敏所需的治疗时间。本发明通过提供一种方法来提供对现有技术中描述的问题的解决方案,该方法允许对OIT期间预用药的估计和/或对用药的需求进行预测。[选择图]无

| ID | タンパク質     | 位置 | 配列      |
|----|-----------|----|---------|
| 1  | α-s1-カゼイン | 6  | 配列番号 18 |
| 2  | α-s1-カゼイン | 9  | 配列番号 19 |
| 3  | α-s1-カゼイン | 11 | 配列番号 20 |
| 4  | α-s1-カゼイン | 25 | 配列番号 21 |
| 5  | α-s1-カゼイン | 28 | 配列番号 22 |
| 6  | α-s1-カゼイン | 31 | 配列番号 23 |
| 7  | α-s1-カゼイン | 34 | 配列番号 24 |
| 8  | α-s1-カゼイン | 37 | 配列番号 25 |
| 9  | α-s1-カゼイン | 43 | 配列番号 26 |
| 10 | α-s1-カゼイン | 45 | 配列番号 27 |
| 11 | α-s1-カゼイン | 46 | 配列番号 28 |
| 12 | α-s1-カゼイン | 49 | 配列番号 29 |
| 13 | α-s1-カゼイン | 52 | 配列番号 30 |
| 14 | α-s1-カゼイン | 59 | 配列番号 31 |
| 15 | α-s1-カゼイン | 60 | 配列番号 32 |
| 16 | α-s2-カゼイン | 7  | 配列番号 33 |
| 17 | α-s2-カゼイン | 9  | 配列番号 34 |
| 18 | α-s2-カゼイン | 11 | 配列番号 35 |
| 19 | α-s2-カゼイン | 14 | 配列番号 36 |
| 20 | α-s2-カゼイン | 21 | 配列番号 37 |
| 21 | α-s2-カゼイン | 22 | 配列番号 38 |
| 22 | α-s2-カゼイン | 23 | 配列番号 39 |
| 23 | α-s2-カゼイン | 24 | 配列番号 40 |
| 24 | α-s2-カゼイン | 28 | 配列番号 41 |
| 25 | α-s2-カゼイン | 32 | 配列番号 42 |
| 26 | α-s2-カゼイン | 35 | 配列番号 43 |
| 27 | α-s2-カゼイン | 50 | 配列番号 44 |
| 28 | α-s2-カゼイン | 52 | 配列番号 45 |