

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6470347号  
(P6470347)

(45) 発行日 平成31年2月13日(2019.2.13)

(24) 登録日 平成31年1月25日(2019.1.25)

(51) Int.Cl.	F 1				
<b>C 0 7 K</b> 7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	Z N A		
<b>C 0 7 K</b> 19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00			
<b>C 1 2 N</b> 15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z		
<b>C 1 2 N</b> 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z		
<b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21			

請求項の数 24 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-97281 (P2017-97281)	(73) 特許権者	591099809
(22) 出願日	平成29年5月16日(2017.5.16)		バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド
(62) 分割の表示	特願2014-545970 (P2014-545970) の分割		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルズ, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000
原出願日	平成24年12月3日(2012.12.3)	(74) 代理人	100099759
(65) 公開番号	特開2017-160251 (P2017-160251A)		弁理士 青木 篤
(43) 公開日	平成29年9月14日(2017.9.14)	(74) 代理人	100077517
審査請求日	平成29年6月14日(2017.6.14)		弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	61/567,060	(74) 代理人	100087871
(32) 優先日	平成23年12月5日(2011.12.5)		弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え脱アミド化グリアジン抗原

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペプチドの六量体を含んで成る、組換え又は合成脱アミド化グリアジンを含んで成るセリアック病を検出するための抗原であって、各ペプチドが配列番号 1 の配列を有する、前記抗原。

【請求項 2】

前記六量体が各ペプチドを分離するスペーサーを含んで成る、請求項 1 に記載の抗原。

【請求項 3】

前記スペーサーが配列番号 2 の配列を有する、請求項 2 に記載の抗原。

【請求項 4】

前記六量体が配列番号 3 の配列を有するか、又は配列番号 3 に対して少なくとも 95% の同一性を有する、請求項 1 に記載の抗原。

【請求項 5】

前記組換え又は合成脱アミド化グリアジンは、タグに共有結合により連結されて、グリアジン融合タンパク質を形成する、請求項 1 に記載の抗原。

【請求項 6】

前記タグがグルタチオン S - トランスフェラーゼ (GST) 及び His タグから成る群から選択される、請求項 5 に記載の抗原。

【請求項 7】

前記 His タグが、配列番号 4、配列番号 5、及び配列番号 6 から成る群から選択され

る配列を有する、請求項 6 に記載の抗原。

【請求項 8】

前記組換え脱アミド化グリアジンが、配列番号 7 及び配列番号 8 から成る群から選択される配列を有する、請求項 7 に記載の抗原。

【請求項 9】

前記タグが GST である、請求項 6 に記載の抗原。

【請求項 10】

前記抗原が更に組織トランスグルタミナーゼ (tTG) を含んでなり、tTG - グリアジン融合タンパク質複合体を形成する、請求項 5 に記載の抗原。

【請求項 11】

架橋剤によって、前記 tTG と前記グリアジン融合タンパク質が共有結合により連結されている、請求項 10 に記載の抗原。

【請求項 12】

前記架橋剤がヘテロ二官能性架橋剤及びホモ二官能性架橋剤から成る群から選択されるメンバーである、請求項 11 に記載の抗原。

【請求項 13】

前記架橋剤がホモ二官能性架橋剤である、請求項 12 に記載の抗原。

【請求項 14】

前記架橋剤が、ビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS3)、エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシネート](EGS)、エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシネート](スルホ-EGS)、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ジチオビス(スクシンイミジル)プロピオネート(DSP)、3,3'-ジチオビス(スルホスクシンイミジル)プロピオネート(DTSSP)、ジスクシンイミジルスベレート(DSS)、ジスクシンイミジルグルタレート(DSG)、メチルN-スクシンイミジルアジペート(MSA)、ジスクシンイミジルタータレート(DST)、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン(DFDNB)、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド(EDC又はEDAC)、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(スルホ-NHS)、ヒドロキシルアミン及びスルホ-LC-SPDP(N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネート)、並びにスルホスクシンイミジル6-(3'-[2-ピリジルジチオ]-プロピオアミド)ヘキサノエート(スルホ-LC-SPDP)から成る群から選択されるメンバーである、請求項 13 に記載の抗原。

【請求項 15】

前記架橋剤がビス(スルホスクシンイミジル)スベレート(BS3)である、請求項 14 に記載の抗原。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の抗原をコードする、単離された核酸。

【請求項 17】

配列番号 9 の配列を含む、請求項 16 に記載の単離された核酸。

【請求項 18】

請求項 16 に記載の単離された核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の抗原；

検出試薬；並びに

任意に、バッファー、塩、安定剤及び取扱説明書から成る群から選択される少なくとも 1 つのメンバー、

10

20

30

40

50

を含んで成る、セリアック病を検出するためのキット。

【請求項 2 1】

対象のセリアック病の検査方法であって：

( a ) 前記対象からの体液のサンプルを、請求項 1 に記載の抗原と接触させ、そして  
( b ) 前記抗原に特異的に結合するようになった任意の抗体を検出し、これにより、前記対象におけるセリアック病の存在を示すことを含む、前記方法。

【請求項 2 2】

前記サンプルが血液サンプルである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記検出ステップが、E L I S A、R I A、及び免疫蛍光アッセイから成る群から選択されるアッセイを使用しておこなわれる、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗原に特異的な抗体が I g G 及び I g A から成る群から選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年12月5日に提出された米国特許仮出願第61/567,060号の優先権の利益を主張するものであり、その全部を参照により本明細書中に援用する。

「配列表」、表、又はASCIIテキストファイルとして提出したコンピュータプログラム一覧表付録の参照

【0002】

2012年11月28日に作成した、12,288バイト、IBM-PCマシンフォーマット、MS-Windows(登録商標)オペレーティングシステムのファイル939-1PC.TXTに記載した配列表を、その全体をあらゆる目的のために参照により本明細書中に援用する。

【背景技術】

【0003】

セリアック病(Celiac disease)(CD)とは、強い遺伝的要素を持った重篤な胃腸疾患である。CDは小麦、大麦、ライ麦及びオート麦からのタンパク質の永久的な不耐容性を特徴とする。CDの生理病理学は完全に理解されていないが、患者の食事に含まれる毒性タンパク質の存在が、完全又は部分的な腸粘膜の損傷を引き起こし(Brandtzaeg, P. 1997. Mechanisms of gastrointestinal reactions to food. Environmental Toxicology and Pharmacology 4;9-24)、こうして重篤な吸収不良症候群につながり、下痢、嘔吐、腹痛、食欲不振、発育遅延、栄養失調及び貧血を引き起こすことは明らかである。非診断及び未治療の患者において、CDは腸癌になる一層高いリスクと関連づけられている(Holmes GKT, 1989. Malignancy in coeliac disease-effect of a gluten-free diet, Gut 30;333-338)。CDは主に3歳未満の子供が罹患するが、大人でも一般的に見られ、時には臨床的に非定型性又は無症候性である(Ferguson A他、1992. Definitions and diagnostic criteria of latent and potential coeliac disease. Ed by Aurricchio S, Visakorpi J K, in Epidemiology of CD. Dyn Nutr Res, Basel, Karger 2; 119-127)。CDは、例えば、インスリン依存性真性糖尿病、ダウン症候群、選択的IgA欠損症及び疱疹状皮膚炎等の他の遺伝疾患又は自己免疫疾患を有する患者においてより頻繁に見られる(Sirgus N et al. 1993. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents in Sweden. Acta Paediatr 66;491-494; Zubillaga P et al. 1993. Down syndrome and coeliac disease. J Paediatr Gastroenterol Nutr 16: 168-171; Boyce N 1997)。

【0004】

C Dの臨床症状は他の胃腸疾患のものと混同する場合がある。これらの場合、C Dと誤診され、患者は特別な治療、即ち、食事に含まれるグルテンの完全除去を受けないままである。一方、非セリアック病患者がセリアック病と誤診された場合、一生に渡って不必要な無グルテン食を与え続けられる。よって、正確なC Dの診断が必要不可欠である。現在、C D診断の基準は、臨床症状の発現、数ヶ月の無グルテン食後、グルテンを試した後の繰り返し3回に渡る腸生検である。

#### 【0005】

腸生検は侵襲的方法であり、正確な血清検査が開発されたことから、上記診断基準は修正されている(Walker-Smith他、1990. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Arch Dis Child 65:909-911)。現在、臨床症状の発現時に血清検査を行うことができ、それが陽性であった場合、確認腸生検が指示される。無グルテン食による治療に対する反応後に血清検査を行うこともできる。治療の臨床反応と血清検査の結果に矛盾が生じた場合、第2の腸生検が指示される。例えば、細胞性抗原に対する抗体又はグリアジン等の食物抗原に対する抗体の検出等のいくつかの血清検査が、セリアック病のために開発されている。抗筋内膜抗体、抗レチクリン抗体、抗グリアジン抗体、及び抗組織トランスグルタミナーゼ抗体の検出のための診断キットがある。

#### 【0006】

C Dの血清学的診断のために、抗グリアジン抗体(A G A)が幅広く用いられている(Stern M他、1996. Validation and standardization of serological screening tests for coeliac disease in 1996. 第3版EMRC/ESPGAN Workshop, Dec 5-8, 1996, Molsheim, France, pp:9-24; Catassi C他、1999. Quantitative antigliadin antibody measurement in clinical practice: an Italian multicenter study. Ital J Gastroenterol Hepatol 31; 366-370)。A G Aは、I F A(間接免疫蛍光抗体測定法)より簡単で、より客観的な方法であるE L I S A(酵素免疫測定法)によって主に検出され、多数のサンプルの分析に用いることができる。しかし、A G Aは筋内膜抗体(E M A)よりC Dに対する特異性が低く、I g A又はI g Gイソタイプに対する抗体の検出には2つの独立した測定法が必要である。近年、これらの問題をいくつか解決する、A G Aの検出のための視覚免疫測定法が報告されている(Garrote J A, Sorell L, Alfonso P他、1999. A simple visual immunoassay for the screening of coeliac disease. Eur. J Clin Invest 29; 697-699; Spanish Office for Patents and Marks No.9801067)。

#### 【0007】

1997年にDietrichらが85 kDaタンパク質である組織トランスグルタミナーゼ(t T G)を抗筋内膜抗体により検出される主な自己抗原として同定した(Dietrich W他、1997. Identification of tissue transglutaminase as the auto antigen of coeliac disease. Nat Med. 3:797-801)。モルモット肝抽出物のt T G又は異なる組織からクローニングされた組換えヒトt T Gを基礎として、E L I S A又は放射性リガンド(R L A)形式での抗t T G抗体の検出が最近報告された(Sulkanen S他、1998. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting coeliac disease. Gastroenterology 115:1322-1328; Siessler J et al. 1999. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radioligand assay: Evidence for high diagnostic sensitivity for coeliac disease. Horm Metab Res 31; 375-379)。

#### 【0008】

セリアック病の検出のための先行技術方法では、測定法において特異的グリアジンエピトープ又はグリアジンタンパク質の一部が用いられ、偽陰性及び偽陽性の両方を引き起こす。セリアック病のためのより正確な測定法を提供する、エピトープのより包括的なセットを含む新規な抗原を提供する測定法が必要とされている。驚くべきことに、本発明は本ニーズ及び他のニーズを満たす。

#### 【発明の概要】

#### 【0009】

10

20

30

40

50

一実施形態において、本発明は、セリアック病を検出するための抗原を提供する。前記抗原は、それぞれ配列番号1を有するペプチドの六量体を有する組換え脱アミド化グリアジンを含むが、ここで前記組換え脱アミド化グリアジンは、タグに共有結合により連結されて、グリアジン融合タンパク質を形成し、ここで前記グリアジン融合タンパク質は、固相支持体上に固定され、且つ、ここで前記組換え脱アミド化グリアジンは、抗脱アミド化グリアジン抗体に結合することができる。

【0010】

他の実施形態において、本発明は、固体支持体にグリアジン融合タンパク質を接触させることを含む調製方法によって調製されたセリアック病を検出するための抗原を提供し、ここで前記グリアジン融合タンパク質は、それぞれ配列番号1を有するペプチドの六量体を有する組換え脱アミド化グリアジンを含み、且つ、ここで前記グリアジン融合タンパク質が固相支持体上に固定されるように、前記組換え脱アミド化グリアジンがタグに共有結合により連結される。これにより、セリアック病を検出するための抗原が調製される。

【0011】

ある他の実施形態において、本発明は、対象のセリアック病を診断する方法を提供する。前記方法は、対象からの体液のサンプルを、配列番号3の六量体を含んで成る組換え脱アミド化グリアジンを含む本発明の抗原と接触させることを含む。前記方法はまた、前記抗原に特異的に結合するようになったいずれかの抗体を検出し、これにより、対象のセリアック病の存在を示すことも含む。

【0012】

別の実施形態において、本発明は、本発明の抗原を含んで成るキットを提供し、ここで前記組換え脱アミド化グリアジンは、配列番号3の六量体、検出試薬、並びに任意にバッファー、塩、安定剤、及び取扱説明書のうち少なくとも1つを含んで成る。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】D2六量体(hexamer)の精製を示す。

【図2】DGP六量体のコーティング力価測定：キャリブレーターカットオフシグナル相対蛍光強度(RFI)を示す。

【図3】14位にグルタミン酸残基に代えてリジンを含むDGP六量体のコーティング力価測定：キャリブレーターカットオフシグナルRFIを示す。

【図4】rDGP六量体が、rDGP三量体(trimer)と比較して改善された感度を有することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

I. 定義

本明細書で用いられる時、用語「接触させる」とは、反応できるように少なくとも2つの異なる種を接触させる過程をいう。結果として生じた反応生成物は、加えた試薬間の反応から直接に又は反応混合物中で生成できる1以上の加えた試薬の中間体から生成されたものである。

【0015】

本明細書で用いられる時、用語「体液」とは哺乳類の流体を意味し、これだけに限定されるものではないが例として房水、胆汁、血液及び血漿、母乳、間質液、リンパ、粘液、胸膜液、膿、唾液、血清、汗、涙、尿、脳脊髄液、滑液又は細胞内液が挙げられる。他の体液も本発明において有用であることが、当業者に理解される。

【0016】

本明細書で用いられる時、用語「架橋剤」とは、2つの別個の成分を結合することができる二官能性又は多機能性の化学的又は生物学的成分を意味する。本発明において有用な架橋剤の例を後述する。

【0017】

本明細書で用いられる時、「抗体」には、特定の抗原と免疫学的に反応性である免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリン分子への言及が含まれ、それらとしてはポリクローナル及びモノクローナル抗体が挙げられる。

【0018】

本明細書で用いられる時、用語「対象」とは霊長類（例えば、ヒト）、乳牛、羊、ヤギ、馬、犬、猫、ウサギ、ラット、マウス等を含む哺乳類等の動物を意味する。

【0019】

本明細書で用いられる時、用語「固定」とは、共有結合形成、イオン結合形成、水素結合、双極子間相互作用又はファンデルワールス相互作用を介したtTG、グリアジン融合タンパク質又はtTG-グリアジン融合タンパク質複合体と固相支持物質との会合を意味する。固定は一時的又は永久的なものとする事ができる。

10

【0020】

本明細書で用いられる時、用語「抗原」とは、抗体産生による等の免疫応答を刺激することのできる分子を意味する。本発明の抗原には、固相支持体固定グリアジン融合タンパク質及び固相支持体固定tTG-グリアジン融合タンパク質複合体が含まれる。本発明のグリアジン融合タンパク質には、組換え脱アミド化グリアジン及びグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)タンパク質等のタグの両方を含むことができる。

【0021】

本明細書で用いられる時、用語「バッファー」とは、pHの変化に耐え、所望の度合いでpHを維持する任意の無機又は有機酸又は塩基を意味する。本発明に有用な緩衝剤として、これだけに限定されるものではないが、水酸化ナトリウム、無水リン酸水素二ナトリウム及びそれらの混合物が挙げられる。他の緩衝剤も本発明において有用であることが、当業者に理解される。

20

【0022】

本明細書で用いられる時、用語「組織トランスグルタミナーゼ(tTG)」とは、リジン残基のアミノ基及びグルタミン残基のカルボキサミド基間のタンパク質を架橋するトランスグルタミナーゼファミリーの酵素を意味する。これにより分子間又は分子内結合が生成される。セリアック病を検出するためにtTGを用いることができる。

【0023】

本明細書で用いられる時、用語「グリアジン融合タンパク質」とは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)又はHisタグ等のタグに結合されたグリアジンタンパク質を意味する。グリアジンタンパク質には、数ある中で組換えグリアジンタンパク質又は合成グリアジンタンパク質が含まれる。いくつかの実施形態において、グリアジンタンパク質は脱アミド化されている。通常、タグは、精製、可溶化、クロマトグラフィーのための親和性タグ、エピトープタグ、蛍光タグ及びその他に用いることができる他のタンパク質又は化合物である。本発明において有用なタグとして、これだけに限定されるものではないが、BCCP、c-mycタグ、カルモジュリンタグ、FLAGタグ、HAタグ、Hisタグ、マルトース結合タンパク質タグ、Nusタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)タグ、緑色蛍光タンパク質タグ、チオレドキシントグ、Sタグ、Streptag II、Softag1、Softag3、T7タグ、エラスチン様ペプチド、キチン結合ドメイン及びキシラナーゼ10Aが挙げられる。他のタンパク質も本発明の融合タンパク質において有用であることは、当業者に理解されよう。

30

40

【0024】

本明細書で用いられる時、用語「tTG-グリアジン融合タンパク質複合体」とは、tTGとグリアジン融合タンパク質と一緒に結合された時に形成される複合体を意味する。様々な反応の下、様々な方法でtTGとグリアジン融合タンパク質が結合できる。tTGはタグ及びグリアジン融合タンパク質の組換え脱アミド化グリアジンの両方又はいずれか一方に結合することができる。

【0025】

本明細書で用いられる時、用語「組換え脱アミド化グリアジン」とは、遺伝子操作を介して作製された脱アミド化グリアジンタンパク質を意味する。脱アミドタンパク質は、グ

50

ルタミンからグルタミン酸への変換等、遊離アミド基のいくつか又は全てがカルボン酸へ加水分解されたものである。いくつかの実施形態において、本発明において有用な組換え脱アミド化グリアジンは、配列番号1に対して少なくとも75%の配列同一性を有するペプチドを含んで成るか、又は配列番号3に対して少なくとも75%の配列同一性を有する六量体を含んで成る。

**【0026】**

本明細書で用いられる時、用語「架橋」とは、2つの異なる化学成分の間の1以上の結合の形成を意味する。本発明において、化学的成分は、タンパク質、酵素、抗体等の生物学的種又は固相支持体物質であることができる。架橋された各化学成分を連結する化学官能性を「架橋剤」と呼ぶ。通常、架橋剤は、1つの化学成分上で1つの反応性官能基と、他の化学成分上で1つの反応性官能基と反応し、それによって2つの化学成分を互いに結合する二官能性化合物である。架橋剤は、ホモ二官能性架橋剤又はヘテロ二官能性架橋剤とすることができる。ホモ二官能性架橋剤は、各化学成分と反応するホモ二官能性架橋剤の官能基が同じである。ヘテロ二官能性架橋剤は、各化学成分と反応するヘテロ二官能性架橋剤の官能基が異なる。本発明の好ましいホモ二官能性及びヘテロ二官能性架橋剤について、以下に詳細に説明する。

10

**【0027】**

本明細書で用いられる時、2以上の核酸又はポリペプチド配列との関係において、用語「同一」又は%「同一性」とは、比較ウィンドウ又は次の配列比較アルゴリズムの1つを用いて又は手動アラインメント及び外観検査によって測定された指定領域上で最大一致となるよう比較及び整列された場合の、同じ又は同じアミノ酸残基又はヌクレオチドの特定の%を有する2以上の配列又は部分配列を意味する（即ち60%同一性、好ましくは特定の領域において65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一性）。このような配列は「実質的に同一」であるという。この定義は試験配列の相補鎖についても用いられる。

20

**【0028】**

2つの核酸又はポリペプチドとの関係において、語句「実質的に同一」とは、参照配列に対して少なくとも40%の配列同一性を有する配列又は部分配列を意味する。あるいは、%同一性を40%から100%のうちの任意の整数とすることができる。更に好ましい実施形態において、ここで記載されるプログラムを用いて参照配列と比較して少なくとも40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%を含む。以下に記載するように標準パラメータを用いたBLASTが好ましい。

30

**【0029】**

配列比較のために、典型的には、1つの配列が試験配列と比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを用いた場合、試験及び参照配列がコンピューターに入力され、必要である場合に部分配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメータが指定される。デフォルトプログラムパラメータを用いることができ、又は他のパラメータを指定することができる。そして、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータを基にして、参照配列と比較した試験配列のパーセント配列同一性を計算する。核酸及びタンパク質の配列比較のために、以下に説明するBLAST及びBLAST2.0アルゴリズム及びデフォルトパラメータが用いられる。

40

**【0030】**

%配列同一性及び配列同一性を決定するのに適したアルゴリズムの好ましい例として、Altschul他, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) 及びAltschul他, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) にそれぞれ記載されたBLAST及びBLAST2.0アルゴリズムが挙げられる。本発明の核酸及びタンパク質の%配列同一性を決定するために、ここで記載されたパラメータを用いたBLAST及びBLAST2.0が用いられる。全米バ

50

イオテクノロジー情報センター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて、BLAST分析を実行するソフトウェアが公的に入手可能である。このアルゴリズムは最初に、データベース中の同じ長さのワードと整列した場合にいくつかの正の値の閾値スコア (positive-valued threshold score) と一致するか又は満たす、問い合わせ配列中の長さがWの短いワードを同定することによって、高スコア配列ペア (HSPs; high scoring sequence pairs) を同定する。Tは近傍ワードスコア閾値を意味する (Altschul他、前掲)。これら最初の近傍ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つける検索を開始するためのシードとして作用する。このワードヒットは、累積アライメントスコアを増加させることができる限り、各配列に沿って両方向に伸ばされる。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメーターM (一対の一致残基に対する報酬スコア; 常に > 0) 及びN (不一致残基に対する罰則スコア; 常に < 0) を用いて計算する。アミノ酸配列については、スコア行列を用いて累積スコアを計算する。累積アライメントスコアが最高到達値から数量Xだけ低下した場合; 負のスコアを有する残基アライメントが1つ以上累積したことにより累積スコアが0以下になった場合; 又はいずれかの配列の最後に達した場合には、各方向におけるワードヒットの伸長が停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、T、及びXにより、アライメントの感度および速度が決定づけられる。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列用) は、既定値として、ワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、M = 5、N = -4、及び両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、ワード長3及び期待値 (E) 10を既定値として用い、BLOSUM62スコア行列 (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989) を参照) は、アライメント (B) 50、期待値 (E) 10、M = 5、N = -4、および両鎖の比較を既定値として用いる。

#### 【0031】

BLASTアルゴリズムは2つの配列間の類似性の統計分析も実行する (例えば、Karlin & Altschul, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993) を参照)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性に関する1つの測定値が、最小総和確率 (P(N)) であって、これは2つのヌクレオチド若しくはアミノ酸配列間のマッチが偶然生じたものである確率の指標を提供する。例えば、試験核酸と参照核酸の比較における最小総和確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、更に好ましくは約0.001未満である場合、核酸は参照配列に類似していると考えられる。

#### 【0032】

2つの核酸配列又はポリペプチドが実質的に同一であるとの指標は、以下に記載するように、第1の核酸によりコードされるポリペプチドが、第2の核酸によりコードされるポリペプチドに対して産生された抗体と免疫学的に交差反応性であることである。このため、ポリペプチドは通常、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、第2のポリペプチドと実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であるとの他の指標は、緊縮条件の下で2つの分子又はそれらの相補鎖が互いにハイブリッド形成することである。2つの核酸配列が実質的に同一であるとの更に他の指標は、配列を増幅するのに同じプライマーを用いることができることである。

#### 【0033】

本明細書で用いられる時、用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は同意語として用いられ、5'から3'末端まで読みとったデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本又は二本鎖ポリマーを意味する。例えば、ホスホルアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート又は0-メチルホスホロアミダイト結合 (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Pressを参照); 並びにペプチド核酸骨格及び連結を含む代替の骨格を有し得る核酸類似体を時には用いてもよいが、本発明の核酸は一般的にリン酸ジエステル結合を含む。他の核酸類似体には、正骨格; 非イオン性骨格及び非リボース骨格が含まれる。このため、核酸又はポリヌクレオチドはポリメラーゼによる正しい読み取りを可能とする修飾されたヌクレオチドも含んでよい。「ポリヌクレオチド配列」又は「核酸配列」には、核酸のセンス鎖とアンチセ

10

20

30

40

50

ンス鎖の両方が個々の一本鎖として又は二重鎖の中に含まれる。当業者に理解されるように、一本鎖の説明によって相補鎖の配列もが定義され、このためここで記載される配列は対応する配列も提供する。他に示されない限り、特定の核酸配列は黙示的にその変異体（例えば、縮重コドン置換）、相補配列及び明確に示された配列を包含する。核酸は、DNA、ゲノムDNAとcDNAの両方、RNA又はハイブリッドでもよく、ここで核酸はデオキシリボ及びリボヌクレオチドの組み合わせ、ウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチンヒポキサンチン、イソシトシン、イソグアニン等の塩基の組み合わせを含んでいてもよい。

#### 【0034】

本明細書で用いられる時、語句「～をコードする核酸配列」とは、rRNA、tRNA等の構造的RNAの配列情報又は特異タンパク質もしくはペプチドの一次アミノ酸配列の配列情報、並びにトランス作用調節剤の結合部位の配列情報を含む核酸を意味する。この語句は天然配列又は特定の宿主細胞におけるコドン選択と一致するように導入された配列の縮重コドン（即ち、単一のアミノ酸をコードする異なるコドン）を特に包含する。

#### 【0035】

本明細書で用いられる時、用語「特異的な結合」とは、セリアック病の存在を示す抗体による本発明の抗原の捕捉又は取り込みを意味する。これにより、指示された免疫学的アッセイ条件の下で、抗体（例えば、抗脱アミド化グリアジン抗体）は、バックグラウンドレベルを少なくとも2倍上回って、より典型的には、バックグラウンドレベルを少なくとも5、10、20、30、40、又は50倍上回って本発明の抗原に結合する。さまざまな免疫学的アッセイ形式が、抗体が本発明の抗原に特異的に結合するか否かを決定するのに使用され得る。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、抗体がタンパク質と特異的に免疫反応するか否かを決定するのに日常的に使用される（例えば、特異的な免疫反応性を決定するために使用できるイムノアッセイ形式及び条件の説明について、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998)を参照）。

#### 【0036】

##### II. 抗原

本発明はセリアック病を検出するための抗原及び方法を提供する。抗原には固相支持体物質上に固定されたグリアジン融合タンパク質が含まれる。グリアジン融合タンパク質には組換え脱アミド化グリアジン及びタグの両方が含まれる。任意に抗原は組織トランスグルタミナーゼ（tTG）を含むことができる。存在する場合、tTG-グリアジン融合タンパク質複合体を形成するために、固相支持体に固定される前に、例えばアミノ基転移を通してグリアジン融合タンパク質とtTGとを共有結合することができる。固相支持体にtTG-グリアジン融合タンパク質を固定した後に、好適な架橋剤を用いてグリアジン融合タンパク質とtTGとを架橋することができる。

#### 【0037】

いくつかの実施形態において、本発明はセリアック病を検出するための抗原を提供する。本発明の抗原には、後述する固相支持体に結合したグリアジン融合タンパク質が含まれる。

#### 【0038】

他の実施形態において、本発明は、セリアック病を検出するための抗原を提供する。前記抗原は、それぞれ配列番号1の配列を有するペプチドの六量体を有する組換え脱アミド化グリアジンを含むが、ここで前記組換え脱アミド化グリアジンは、タグに共有結合により連結されて、グリアジンが融合タンパク質を形成し、ここで前記グリアジン融合タンパク質は、固相支持体上に固定され、且つ、ここで前記組換え脱アミド化グリアジンは、抗脱アミド化グリアジン抗体に結合することができる。

#### 【0039】

##### A. グリアジン融合タンパク質

本発明において有用なグリアジン融合タンパク質は、タグ付与タンパク質として発現される組換え脱アミド化グリアジンを含む。多くの組換えグリアジンタンパク質が本発明の

10

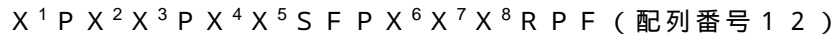
20

30

40

50

調製方法において有用であることが、当業者に認識される。いくつかの実施形態において、組換えグリアジンタンパク質はD 2 (Aleanzi et al, Clin Chem 2001, 47 (11), 20 23)、ペプチド配列: QPEQPQQSFPEQERPF (配列番号1) を含むことができる。組換えグリアジンタンパク質は、以下の式:



{式中、各Xはグルタミン(Q)又はグルタミン酸(E)のいずれかであって、少なくとも1つのXはグルタミンであり、少なくとも1つのXはグルタミン酸である}で表されるD 2の変異体をも含むことができる。本発明の組換えグリアジンタンパク質は、D 2又はその変異体の六量体とすることもできる。いくつかの実施形態において、本発明の組換えグリアジンタンパク質は、GGGGS (配列番号2)等のいずれかの好適なスペーサーで分離されているD 2又はその変異体の六量体とすることもできる。本発明において他のスペーサーも有用であることが当業者に理解される。

10

【0040】

あらゆる好適なスペーサーが本発明において有用であり、そして、リンカーと代替可能である。典型的なペプチドスペーサー配列は、Gly、Ser、Ala、及びThr残基を含んでいる。有効スペーサーとしては、例えば(GGGGS)n (配列番号13)、(GS)n、(SGGS)n (配列番号14)、及び(GGS)n (配列番号15) {式中、nは少なくとも1つの整数である}を含んで成るグリシン-セリン重合体;グリシン-アラニン重合体;アラニン-セリン重合体;他のフレキシブルリンカーが挙げられる。

【0041】

いくつかの実施形態において、前記六量体は、配列番号1の配列を有する各ペプチドを分離するスペーサーを含んでいる。他の実施形態において、前記各スペーサーは、配列番号2の配列を有することができる。

20

【0042】

いくつかの実施形態において、組換え脱アミド化グリアジンは、D 2六量体(配列番号3)である。他のいくつかの実施形態において、本発明は、配列番号1又は配列番号3の配列のポリペプチドをコードする任意のヌクレオチド配列を提供する。本発明の組換え脱アミド化グリアジンタンパク質は抗脱アミド化グリアジン抗体に結合し、このためセリアック病等のグルテンに関連する障害を患っている対象を診断することができる。本発明において他の組換え脱アミド化グリアジンタンパク質も有用であることが、当業者に理解される。

30

【0043】

グリアジン融合タンパク質にはタグも含まれる。当該技術分野において知られているあらゆるタグが、本発明のグリアジン融合タンパク質において有用である。本発明の抗原に好適なタグとして、これらだけに限定されるものではないが、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、Hisタグ、FLAG、Streptag II、HAタグ、Softag1、Softag3、c-myc、T7タグ、Sタグ、エラスチン様ペプチド、キチン結合ドメイン、チオレドキシン、キシラーゼ10A、マルトース結合タンパク質及びNusAが挙げられる。いくつかの実施形態において、タグは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)又はHisタグである。本発明において他のタグが有用であることが、当業者に理解される。タグは、典型的には、共有結合を介して組換えグリアジンタンパク質に結合されている。

40

【0044】

本発明で有用なHisタグは、あらゆる好適なHisタグであり得る。本発明で好適なHisタグとしては、これらだけに限定されるものではないが、配列番号4、配列番号5、又は配列番号6の配列が挙げられる。いくつかの実施形態において、Hisタグは、配列番号5又は配列番号6の配列であり得る。他の実施形態において、組換え脱アミド化グリアジンは、配列番号7又は配列番号8の配列であり得る。

【0045】

他の実施形態において、タグはグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)タンバ

50

ク質である。GSTタンパク質（配列番号10）は、組換えグリアジンタンパク質の精製を可能にすることや、組換えグリアジンタンパク質にて表されるエピトープの提示等、様々な機能を果たす。

【0046】

グリアジン融合タンパク質がGSTを含み、組換え脱アミド化グリアジンがD2六量体である場合、グリアジン融合タンパク質は配列番号11の配列で表される。いくつかの実施形態において、本発明は、配列番号11の配列のポリペプチドをコードするいずれか任意のヌクレオチド配列を提供する。本発明のグリアジン融合タンパク質は、記載した方法等の組換え方法を含む様々な方法で作製することができる。

【0047】

グリアジン融合タンパク質の固相支持体上への固定は、当該技術分野で知られているいずれの方法でも達成できる。グリアジン融合タンパク質の固相支持体への固定は、共有又はイオン結合形成、水素結合、ファンデルワールス力及び抗体-抗原相互作用を通じて行うことができる。他の固定方法が本発明に有用であることが、当業者に理解される。

【0048】

いくつかの実施形態において、抗原は組織トランスグルタミナーゼ（tTG）も含む。tTGが存在する場合、tTGとグリアジン融合タンパク質はtTG-グリアジン融合タンパク質複合体を形成する。共有結合の形成、イオン結合、水素結合又はファンデルワールス相互作用等の様々な方法で、tTGとグリアジン融合タンパク質を結合することができる。tTGとグリアジン融合タンパク質が共有結合で結合された場合、アミド基転移等のさまざまな反応で共有結合を形成することができる。Ca<sup>2+</sup>の存在中等、様々な条件下でアミド基転移が起こりうる。tTGは、タグ及びグリアジン融合タンパク質の組換え脱アミド化グリアジンのいずれか一方又は両方に結合することができる。グリアジン融合タンパク質の固定と同じ条件下で同時に、tTGが固相支持体に固定される。組織トランスグルタミナーゼは当業者に知られており、以前に発表されている。NCBI RefSeq NP 004604及びNP 945189（2008年4月13日）を参照。

【0049】

他の実施形態において、tTGとグリアジン融合タンパク質は架橋剤により共有結合される。イオン結合、水素結合又はファンデルワールス力等を通して他の架橋方法も利用できることが、当業者に理解される。本発明においてあらゆる架橋剤が好適であることが、当業者に認識される。いくつかの実施形態において、架橋剤はヘテロ二官能性架橋剤及びホモ二官能性架橋剤からなる群より選ばれるメンバーである。更に他の実施形態において、架橋剤はホモ二官能性架橋剤である。更に他の実施形態において、架橋剤は、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、エチレングリコールビス[スクシンイミジルスクシネート]（EGS）、エチレングリコールビス[スルホスクシンイミジルスクシネート]（スルホ-EGS）、ビス[2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（BSOCS）、ジチオビス（スクシンイミジル）プロピオネート（DSP）、3,3'-ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート（DTSSP）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ジスクシンイミジルグルタレート（DSG）、メチルN-スクシンイミジルアジベート（MSA）、ジスクシンイミジルタータレート（DST）、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン（DFDNB）、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド（EDC又はEDAC）、スルホスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサ-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）、N-ヒドロキシルスルホスクシンイミド（スルホ-NHS）、ヒドロキシルアミン及びスルホ-LC-SPDP（N-スクシンイミジル3-（2-ピリジルジチオ）-プロピオネート）、並びにスルホスクシンイミジル6-（3'-[2-ピリジルジチオ]-プロピオアミド）ヘキサノエート（スルホ-LC-SPDP）からなる群より選ばれるメンバーである。他の実施形態において、架橋剤はビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）である。

【0050】

10

20

30

40

50

更なる実施形態において、組換え脱アミド化グリアジンは配列番号3に対して95%同一性を有する。比較ウィンドウ又は指定領域上で最大一致となるように比較及び整列された際に、特定の領域に対して60%同一性、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一性等の他のパーセント同一性が可能であることが、当業者に理解される。このような配列を「実質的に同一」であるという。配列番号3の配列に対していくつかの%同一性を有する本発明の組換え脱アミド化グリアジンは、セリアック病を検出するために、サンプル中の抗グリアジン抗体と結合することができる。いくつかの他の実施形態において、脱アミド化グリアジンは、配列番号3の配列を有する。

10

#### 【0051】

##### B. 固相支持体

本発明の使用のための固相支持体物質は、次の性質によって特徴づけられる：(1)スクリーニングに用いられる液層中での不溶性；(2)他の全ての支持体から独立した三次元の移動性；(3)グリアジン融合タンパク質又はtTG-グリアジン融合タンパク質複合体の多数のコピーを含むこと；(4)スクリーニング検定条件への適合；及び(5)検定条件への不活性。好ましい支持体は、これらだけに限定されるものではないが、ヒドロキシル、カルボキシル、アミノ、チオール、アルデヒド、ハロゲン、ニトロ、シアノ、アミド、尿素、炭酸塩、カルバミン酸塩、イソシアネート、スルホン、スルホン酸塩、スルホンアミド、スルホキシド等の反応性官能基をグリアジン融合タンパク質とtTGの結合のために有する。

20

#### 【0052】

本明細書で用いられるとき、固相支持体物質は特定のタイプの支持体に限定されない。むしろ多数の支持体が利用でき、当業者に知られている。固相支持体として、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラス、プラスチック、又は磁性ビーズ等のビーズ、コットン、アルミナゲル、セファロース等の多糖類が挙げられる。他の固相支持体はELISAマイクロタイタープレートとすることができる。好適な固相支持体は、所望の最終用途及び様々な合成プロトコールへの適合性を基に選ぶことができる。例えば、ポリアミド合成において、有用な固相支持体は、ポリスチレン(例えば、Bachem Inc., Peninsula Laboratories等から得られるPAM-樹脂)、POLYHYPE(商標)樹脂(Aminotech, Canadaから得られる)、ポリアミド樹脂(Peninsula Laboratoriesから得られる)、ポリエチレングリコールに接合されたポリスチレン樹脂(TentaGel(商標)、Rapp Polymere, Tubingen, Germany)、ポリジメチル-アクリルアミド樹脂(Milligen/Biosearch, Californiaから入手可能)又はPEG Aビーズ(Polymer Laboratoriesから得られる)等の樹脂とすることができる。特定の合成のための好ましい固相合成支持体は後述する。いくつかの実施形態において、固相支持体はビーズである。本発明において様々な種類の固相支持体が有用であることが、当業者に認識される。

30

#### 【0053】

##### C. 組換え脱アミド化グリアジン抗原の作製方法

いくつかの実施形態において、本発明は、固体支持体にグリアジン融合タンパク質を接触させることを含む方法によって調製されたセリアック病を検出するための抗原を提供し、ここで前記グリアジン融合タンパク質は、それぞれ配列番号1の配列を有するペプチドの六量体を有する組換え脱アミド化グリアジンを含み、且つ、前記グリアジン融合タンパク質が固相支持体上に固定されるように、前記組換え脱アミド化グリアジンがタグに共有結合により連結される。これにより、セリアック病を検出するための抗原が調製される。

40

#### 【0054】

組換え脱アミド化グリアジン抗原を調製する方法は、上述したあらゆる組換え脱アミド化グリアジン抗原を調製できる。

#### 【0055】

タグは、上述した通りである。いくつかの実施形態において、タグはGST又はHis

50

タグである。他の実施形態において、タグはGSTである。いくつかの実施形態において、グリアジン融合タンパク質は固相支持体上にタグを介して固定される。

【0056】

固体支持体は、上述したとおりである。いくつかの実施形態において、固体支持体は磁性ビーズ等のビーズである。いくつかの実施形態において、固体支持体には、反応性官能基がある。

【0057】

tTGが存在する場合、当該方法には、tTG - グリアジン融合タンパク質複合体を形成して、接触段階の前に、グリアジン融合タンパク質とtTGの間に共有結合を形成することも含むことができる。グリアジン融合タンパク質とtTGの間に共有結合を形成する方法は、接触段階中及び/又はその後に行うこともできる。グリアジン融合タンパク質とtTGの錯体形成は、当該技術分野で知られているいずれの方法によっても生じることができる。いくつかの実施形態において、共有結合を形成するために錯体形成はアミノ基転移によって起きる。

10

【0058】

他の実施形態において、当該方法は、固相支持体を架橋剤と接触させて、グリアジン融合タンパク質とtTGを架橋することを更に含む。他のいくつかの実施形態において、架橋剤はGSTタンパク質をtTGに架橋する。上述したものの等あらゆる架橋剤も本発明において有用であることが、当業者に理解される。架橋は、水素結合、共有結合又はイオン結合形成を通じて生じる。

20

【0059】

1. 一般的な組換え方法

組換え脱アミド化グリアジンポリペプチドを作製するために、本発明は組換え遺伝学の分野におけるルーチン技術を用いることができる。本発明の使用の一般的な方法を開示する基本的な教科書として、Sambrook & Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (第3版, 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); 及び *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994-1999) が挙げられる。

【0060】

組換え脱アミド化グリアジン又は例えば、組換え脱アミド化グリアジンと、GSTタグ又はHisタグ等のタグとを含む融合タンパク質は当該技術分野においてよく知られている技術を用いて発現することができる。動物細胞、昆虫細胞、細菌、真菌及び酵母等の真核及び原核宿主細胞を用いてもよい。単離核酸を発現させる際の宿主細胞の使用方法は当業者によく知られており、例えば前掲の一般参照文献中に見つけることができる。よって、本発明は、宿主細胞及び本願明細書に記載された核酸配列を含む発現ベクターのためにも提供する。

30

【0061】

組換え脱アミド化グリアジンをコードする核酸又は、例えば、組換え脱アミド化グリアジンと、GSTタグ又はHisタグ等のタグとを含む、融合タンパク質をコードする核酸は、標準的な組換え又は合成技術を用いて作製することができる。核酸はRNA、DNA又はそれらのハイブリッドでもよい。当業者は、同じポリペプチドをコードする核酸等の機能的に等価な核酸を含む様々なクローンを構築することができる。これら目的を達成するクローニング方法及び核酸の配列を確認する配列決定方法は、当該技術分野においてよく知られている。

40

【0062】

いくつかの実施形態において、核酸はインビトロで合成される。デオキシヌクレオチドは、例えばNeedham-VanDevanter他, *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168 (1984)に記載された自動合成装置を用いて、Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20): 1859-1862 (1981)に記載された固相ホスホロアミダイトリエステル法に従って、化学合成することができる。他の実施形態において、例えばPCR等の増幅反応によって、所望

50

のタンパク質をコードする核酸を得てもよい。

【0063】

与えられたポリペプチド配列の改変体又は変異体を作製する他の多くの方法を、当業者は認識するだろう。通常、ポリペプチド配列は、対応する核酸配列を変化させて、ポリペプチドを発現させることにより改変される。

【0064】

当業者は、本発明の所望の核酸又はポリペプチドを、ここで参照される配列及び組換え脱アミド化グリアジン構造及び機能に関する容易に利用できる知識を基にして選ぶことができる。これらタンパク質の物理的特性及び一般的な性質は、当業者に知られている。

【0065】

組換え脱アミド化グリアジン、又は組換え脱アミド化グリアジンとG S Tタグ又はHisタグ等のタグとを含む融合タンパク質の高レベルな発現を得るために、転写を指令するプロモーター、転写/翻訳ターミネーター、翻訳開始のためのリボソーム結合部位等のような要素を含む発現ベクターが構築される。好適な細菌プロモーターは当該技術分野においてよく知られており、例えば、上記で引用された発現クローニング法及びプロトコールを提供する参考文献に記載されている。リボヌクレアーゼを発現するための細菌発現系は、例えばE. コリ (E. coli)、バチルス種 (Bacillus sp.) 及びサルモネラ (Salmonella) で利用可能である (Palva他, Gene 22:229-235 (1983); Mosbach他, Nature 302:543-545 (1983) も参照)。このような発現システムのためのキットが市販されている。哺乳動物細胞、酵母及び昆虫細胞のための真核発現系が当該技術分野において知られており、市販もされている。

【0066】

プロモーターに加えて、発現ベクターは通常、転写ユニット又は宿主細胞における核酸の発現に必要な追加の要素を全て含有する発現カセットを含む。このため、典型的な発現カセットは、組換え脱アミド化グリアジン又は融合タンパク質 (例えば組換え脱アミド化グリアジンG S T融合タンパク質) をコードする核酸配列に作用可能に結合したプロモーター、並びに転写産物の効率的ポリアダニル化、リボソーム結合部位及び翻訳終結に必要なシグナルを含む。発現系によっては、組換え脱アミド化グリアジン又は融合タンパク質 (例えば組換え脱アミド化グリアジンG S T融合タンパク質) をコードする核酸配列は、形質転換細胞によるコードされたタンパク質の分泌を促進するために、開裂可能なシグナルペプチド配列に結合されてもよい。

【0067】

上述したように、効率的な終結に備えるために、構造遺伝子の下流に転写終結も含むべきである。プロモーター配列と同じ遺伝子又は異なる遺伝子から終結領域を得てもよい。

【0068】

遺伝情報を細胞に輸送するために用いられる特定の発現ベクターは、特に重要でない。真核又は原核細胞での発現に用いられる、従来のいずれのベクターを用いてもよい。標準的な細菌発現ベクターには、p B R 3 2 2系プラスミド、p S K F、p E T 1 5 b、p E T 2 3 D、p E T - 2 2 b (+) 等のプラスミド及び、G S T及びL a c Z等の融合発現系が含まれる。例えば6 - h i s等の単離の便利な方法を提供するために、エピトープタグを組換えタンパク質に加えることもできる。コード配列を含む発現カセットに加えて、これらのベクターはT 7プロモーター、転写イニシエーター及びターミネーター、p B R 3 2 2 o r i部位、b l aコード配列及びl a c lオペレーターを含む。

【0069】

R N a s e分子又は融合タンパク質をコードする核酸配列を含むベクターは、E. コリ、他の細菌細胞、酵母、及びC O S、C H O及びH e L a細胞系及び骨髄腫細胞系等の様々なより高等な真核細胞を含む様々な宿主細胞で発現させてもよい。細胞に加えて、ベクターは、トランスジェニック動物、好ましくは、羊、ヤギ及び畜牛によって発現させてもよい。通常、この発現系では、組換えタンパク質はトランスジェニック動物の乳において発現される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 0 】

本発明の発現ベクター又はプラスミドは、E. コリ (E. coli) のための塩化カルシウム形質転換及びリン酸カルシウム処理、リポソーム融合又は哺乳動物細胞のためのエレクトロポレーション等によく知られた方法で、選ばれた細胞に運搬することができる。プラスミドによって形質転換された細胞は、amp、gpt、neo及びhyg遺伝子等のプラスミド上に含まれる遺伝子によって与えられた抗生物質に対する耐性によって選択することができる。

## 【 0 0 7 1 】

一度発現すると、硫酸アンモニウム分画、カラムクロマトグラフィー（親和性クロマトグラフィーを含む）、ゲル電気泳動等の当該技術分野の標準的な手法にしたがって、発現したタンパク質を精製することができる（R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N. Y. (1982), Deutscher, Methods in Enzymology Vol.182: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sambrook & Ausubel, 共に前掲を一般的に参照）。

10

## 【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態において、本発明は、組換えグリアジントタンパク質D2六量体配列をコードする配列番号9の配列を含む単離された核酸を提供する。他の実施形態において、単離された核酸は発現ベクター内にある。他のいくつかの実施形態において、発現ベクターは宿主細胞内にある。

## 【 0 0 7 3 】

## 2. 固相支持体上の固定

本発明のグリアジン融合タンパク質は、当該技術分野において知られている任意の有用な固定方法で、任意の有用な固相支持材に固定することができる。固相支持体へのグリアジン融合タンパク質の固定は、共有又はイオン結合形成、水素結合、ファンデルワールス力、及び抗体-抗原相互作用を介することができる。本発明において他の固定方法が有用であることが、当業者に理解される。

20

## 【 0 0 7 4 】

抗体に似た方法での固定を可能にする他の化合物が開発されている。特定のこれらの「抗体模倣体 (antibody mimics)」は、抗体の可変領域のための代替タンパク質フレームワークとして、非免疫グロブリンタンパク質の骨組を用いる。

30

## 【 0 0 7 5 】

例えば、Ladnerら（米国特許第5,260,203号）は、凝集されているが分子的に離れている抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のものと似た結合特異性を有する単一ポリペプチド鎖結合分子について記載している。単一鎖結合分子は、ペプチドリンカーによってつながれた抗体の重鎖及び軽鎖可変領域の両方の抗原結合部位を含み、2つのペプチド抗体のものと似た構造に折りたたまれる。単一鎖結合分子は、より小さな大きさ、より高い安定性、より簡単に修飾できるなど、従来の抗体を上回るいくつかの利点を有する。

## 【 0 0 7 6 】

Kuら（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(14):6552-6556 (1995)）は、シトクロムb562を基にした抗体の代替を開示する。Kuら（1995年）は、ウシ血清アルブミンに対して結合するためにシトクロムb562のループの2つが無作為化され選択されるライブラリーを構築した。各変異体が抗BSA抗体に似てBSAに選択的に結合することが分かった。

40

## 【 0 0 7 7 】

Lipovsekら（米国特許第6,818,418及び7,115,396号）は、フィブロネクチン又はフィブロネクチン様タンパク質の骨組及び少なくとも1つの可変ループを特徴とする抗体模倣体を開示する。アドネクチンとして知られているように、これらのフィブロネクチン系抗体模倣体は、標的とされるいずれかのリガンドに対する高親和性及び特異性等、天然又は改変抗体と同じ特徴の多くを呈する。新規又は向上した結合タンパク質を進化させる任意の方法を抗体模倣体と共に用いてもよい。

50

## 【 0 0 7 8 】

これらフィブロネクチン系抗体模倣体の構造は、I g G重鎖の可変領域の構造と似ている。このため、これら模倣体は天然のものと似た抗原結合性質及び自然抗体のものに対する親和性を呈する。更に、これらフィブロネクチン系抗体模倣体は、抗体及び抗体断片を上回る特定の利点を呈する。例えば、これら抗体模倣体は、生来の折りたたみ安定性のためにジスルフィド結合に依存せず、このため、抗体が通常破壊される条件下において安定である。更に、これらフィブロネクチン系抗体模倣体の構造がI g G重鎖のものと似ていることから、インピボでの抗体の親和性成熟のプロセスに似た、ループ無作為化及びシャッフリングのためのプロセスをインピトロで用いてもよい。

## 【 0 0 7 9 】

Besteら (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (5):1898-1903 (1999)) は、リポカリン骨格を基にした抗体模倣体を開示する (ANTICALIN (登録商標))。リポカリンは、タンパク質の末端で4つの超可変ループを有する - バレルからなる。Beste (1999) は、ランダム変異導入法にループをさらし、例えばフルオレセインとの結合について選択した。これらの変異体はフルオレセインとの特異的結合を呈し、1つの変異体は抗フルオレセイン抗体のものと類似した結合を示した。更なる分析によって、全てのランダム化位置は可変的であることが明らかになり、ANTICALIN (登録商標) は抗体の代替として用いるのに好適であることを示す。

## 【 0 0 8 0 】

ANTICALIN (登録商標) は、通常160から180残基の小さな単一鎖ペプチドであり、生産のコスト削減、貯蔵における安定性の増大、免疫学的反応の低下等、抗体に対していくつかの利点を提供する。

## 【 0 0 8 1 】

Hamiltonら (米国特許第5,770,380号) は、結合部位として用いられる複数の可変ペプチドループに結合した、カリックスアレーン (calixarene) の強固な非ペプチド有機骨格を用いた合成抗体模倣体を開示する。ペプチドループは全て、カリックスアレーンからお互いに対して幾何学的に同じ側面から突出している。この幾何学的な確認によって、全てのループは結合に用いることができ、リガンドに対する結合親和性が増大する。しかし、他の抗体模倣体と比較して、カリックスアレーン系抗体模倣体はペプチドのみからならず、よってプロテアーゼ酵素による攻撃に対して強い。骨格が純粋にペプチド、DNA又はRNAからならない意味とは、この抗体模倣体が極限環境条件下で比較的安定であり、長い寿命を有するということである。更に、カリックスアレーン系抗体模倣体が比較的小さいことから、免疫原性反応があまり生じない傾向にある。

## 【 0 0 8 2 】

Muraliら (Cell Mol Biol 49 (2):209-216 (2003)) は、抗体をより小さなペプチド模倣薬に縮小する方法について検討し、抗体に対する代替としても有用である「抗体様結合ペプチド模倣薬 (antibody like binding peptidomimetics)」 (A B i P) と称した。

## 【 0 0 8 3 】

非免疫グロブリンタンパク質フレームワークに加えて、抗体性質はRNA分子及び非天然オリゴマーを含む化合物にも模倣されている (例えば、プロテアーゼ阻害剤、ベンゾジアゼピン、プリン誘導体及びベータ-ターン模倣体)。また、グリアジン融合タンパク質を固相支持体に結合させるために、例えば、ストレプトアビジン及びビオチン間の既知の結合相互作用を用いることができる。

## 【 0 0 8 4 】

グリアジン融合タンパク質を固相支持体に結合させる更なる方法には、ホモ二官能性及びヘテロ二官能性リンカーの使用が含まれる。ゼロ長架橋試薬 (zero-length linking reagent) は、いずれの外部物質も導入しないで、2つのリガンドの直接結合を誘導する。ジスルフィド結合の形成を触媒する試薬はこのカテゴリーに属する。他の例は、カルボキシ及び第1級アミノ基の縮合を誘導して、アミド結合を形成する、カルボジイミド、エチルクロロホルメート、Woodward試薬K1、カルボニルジイミダゾール等の試薬であ

10

20

30

40

50

る。ホモ二官能性試薬は2つの同一の官能基を担持し、一方ヘテロ二官能性試薬は2つの似ていない官能基を含む。ヘテロ二官能性架橋剤の大多数は、第1級アミン反応基及びチオール反応基を含む。ホルミルからチオールへの結合のための新規ヘテロ二官能性リンカーは、Heindel, N. D. et al, Bioconjugate Chem. 2, 427-430 (1991)で開示された。好ましい実施形態において、共有結合性架橋剤は、ジスルフィド(-S-S-)、グリコール(-CH(OH)-CH(OH)-)、アゾ(-N=N-)、スルホン(-S(=O)<sub>2</sub>-)、又はエステル(-C(=O)-O-)ブリッジを形成することができる試薬から選ばれる。

#### 【0085】

ルミネックス (Luminex) 染料で内面的に染色された、常磁性ラテックスビーズの表面上に存在するカルボン酸基は、N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメソ-p-トルエンスルホネート(CMC)及びN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)の作用を通して、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルに変換することができる。磁気分離及び洗浄後、グリアジン融合タンパク質及びtTGの混合物を、界面活性剤及びpH7.4で10mMのCaCl<sub>2</sub>を含有する緩衝食塩水に加える。懸濁液を室温にて振盪しながら1時間インキュベートする。洗浄後、非特異的結合を減らすためビーズはブロッキングされ、そして粒子希釈剤に保存される。

#### 【0086】

##### III. セリアック病を患っている対象を診断する方法

いくつかの実施形態において、本発明は、セリアック病を患っている対象を診断する方法を提供する。前記方法には、対象からの体液のサンプルを、配列番号3の配列を有する六量体を含む組換え脱アミド化グリアジンを含む本発明の抗原と接触させることを含む。該方法には、抗原に特異的に結合するようになったあらゆる抗体を検出することをも含み、これにより対象におけるセリアック病の存在が示される。

#### 【0087】

本発明のサンプルは、任意の体液であり得る。いくつかの実施形態において、サンプルは、房水、胆汁、血液及び血漿、母乳、間質液、リンパ、粘液、胸膜液、唾液、血清、汗、涙、尿、脳脊髄液、滑液又は細胞内液とすることができる。いくつかの実施形態において、サンプルは血液サンプルである。

#### 【0088】

本発明の対象は任意の哺乳類とすることができる。いくつかの実施形態において、対象は霊長目(例えば、ヒト)、乳牛、羊、ヤギ、馬、犬、猫、ウサギ、ラット、マウス等とすることができる。他の実施形態において、対象はヒトである。

#### 【0089】

固相支持体に固定されたグリアジン融合タンパク質又はtTG-グリアジン融合タンパク質複合体に結合した抗体の存在は、当該技術分野において知られているいずれの方法でも検出することができる。いくつかの実施形態において、検出ステップは、ELISA、RIA又は免疫蛍光測定法等の測定法を用いて行うことができる。他の実施形態において、検出ステップは、酵素法を用いて行うことができる。検出ステップで用いることができる免疫測定法として、例えば、ウエスタンブロット法、放射免疫測定法、ELISA(酵素免疫測定法)、「サンドイッチ」免疫測定法、免疫沈降測定法、沈降素反応、ゲル内沈降素反応、免疫拡散測定法、凝集測定法、補体結合測定法、免疫放射定量測定法、蛍光免疫測定法、プロテインA免疫測定法等の競争的及び非競争的測定法システムが挙げられる(例えば、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1999)を参照)。

#### 【0090】

抗原に特異的な抗体は、任意の好適な抗体とすることができる。いくつかの実施形態において、抗体はIgA、IgD、IgE、IgG又はIgMとすることができる。他の実施形態において、抗体はIgG又はIgAとすることができる。本発明において他の抗体も有用であることが、当業者に理解される。

10

20

30

40

50

## 【0091】

## I V . キット

いくつかの実施形態において、本発明は、前記組換え脱アミド化グリアジンが、配列番号3の配列と実質的に同一であるか又は配列番号3の配列を有する六量体を含む、上述された抗原、検出試薬、並びに任意にバッファー、塩、安定剤及び取扱説明書のうちの少なくとも1つを含むキットを提供する。

## 【0092】

本発明において有用なバッファー、塩及び安定剤は、当業者に知られているものを含み、Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990に見ることができる。

10

## 【実施例】

## 【0093】

## 実施例1. His タグを持つ D 2 六量体の精製

His タグを持つ D 2 六量体は、非変性条件又は変性条件のいずれかを使用して精製できる。この実施例では、D 2 六量体を、8 M の尿素を用いた変性条件下で精製した。そのタンパク質が配列番号7の配列を有する、His タグを持つ「古典的な」D 2 六量体を作製した。さらに、そのタンパク質が配列番号8の配列を有する、His タグを持つ「リジン含有」D 2 六量体を作製した。

## 【0094】

## 古典的な組換え六量体の精製

六量体を過剰発現する6リットルのE. コリ培養物からの溶解細胞を、約5 ml / g の湿重量にて平衡バッファー(100 mM の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、8 M の尿素、500 mM の  $\text{NaCl}$ 、10 mM のイミダゾール、pH 8.0)中に懸濁した。室温にて30分間攪拌した後に、細胞残屑を遠心分離によって取り除いた。約200 ml の上清を、平衡バッファーで予洗した25 ml のNi-NTA樹脂に加え、室温にて60分間混合した。樹脂に結合した六量体タンパク質を、100 ml の洗浄バッファー(100 mM の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、8 M の尿素、500 mM の  $\text{NaCl}$ 、20 mM のイミダゾール、0.5%のTriton X100、pH 8.0)で4回洗浄する前に、結合していない溶解物と分離した。洗浄バッファーを樹脂から取り除いた後に、結合した六量体タンパク質を、4倍量の20 ml の溶出バッファー(100 mM の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、8 M の尿素、200 mM の  $\text{NaCl}$ 、250 mM のイミダゾール、pH 7.5)で溶出した。溶出したタンパク質画分を、貯留し、濃縮し、そして、10 mM のMOPS、150 mM の  $\text{NaCl}$  (pH 7.4)に対して透析した。得られたすべての沈殿物を、15 k x g の遠心分離によって取り除いた。230 nm のUVにて観察される、アフィニティー精製したタンパク質は、10 mM のMOPS、150 mM の  $\text{NaCl}$  (pH 7.4)を用いたサイズ排除カラムでさらに精製できる。最初の主なピークを含む画分を、貯留し、濃縮した。

20

30

## 【0095】

リジン含有D 2 六量体組換えタンパク質の精製方法は、古典的な組換え六量体のものと同じであった。

## 【0096】

## 精製した古典的な六量体タンパク質又はリジン含有六量体タンパク質の特徴づけ

アフィニティー精製したタンパク質を、SDS-PAGEゲル電気泳動によって分析した(図1)。上述したようにサイズ排除カラムでさらに精製したD 2 六量体を、SDS-PAGEによって分析した(図1)。意外なことに、両方の六量体(古典的な及びリジン含有)共に、六量体タンパク質の三量体のサイズに相当する45 kd近辺に主要なバンドを呈した。六量体のこの凝集は、SDS-PAGEで使用される変性条件の下でも分離されないほど強い。さらに、両方の六量体タンパク質が、サイズ排除クロマトグラムにおいて約45 kdの位置に移動した。特定の理論に縛られるものではないが、凝集して六量体の三量体を形成する六量体の驚くべき傾向は、D 2 六量体の改善された免疫反応性に寄与している可能性がある。

40

50

## 【 0 0 9 7 】

## 実施例 2 . 組換え脱アミド化グリアジン抗原の調製

この実施例は、「古典的な」His タグ付与した組換え脱アミド化グリアジンタンパク質（配列番号 7）の調製に使用したプロトコルを提供する。

## 【 0 0 9 8 】

## 磁性ビーズ上への組換え脱アミド化グリアジンペプチド（DGP）抗原の固定

10 mg のカルボキシル修飾磁性ビーズを、マイクロチューブに入れる。1000  $\mu$ L の 70% のエタノール（EtOH）中、50 mM 2 - （N - モルフィリノ）エタンスルホン酸（MES）pH 6 . 1 を、そのチューブに加える。該チューブを、ボルテックスにかけ、そして、ビーズを磁氣的に分離する。上清を、ピペットで取り出し、捨てる。この洗浄工程をもう 1 回繰り返す。

10

## 【 0 0 9 9 】

500  $\mu$ L の、70% の EtOH 中、50 mM の MES 中の 120 mM N - ヒドロキシルスクシンイミド（NHS）、pH 6 . 1 を、ビーズの入ったチューブに加え、そして、混合する。500  $\mu$ L の、70% の EtOH 中、50 mM の MES 中の N - シクロヘキシル - N' - （2 - モルホリノエチル）カルボジイミドメト - p - トルエンスルホナート（CMC）、pH 6 . 1 を、ビーズの入った同じチューブに加え、そして、混合する。該チューブを、継続的に混合しながら、室温にて 30 分間インキュベートする。

## 【 0 1 0 0 】

ビーズを、上清と分離し、そして、1000  $\mu$ L の、10% の EtOH 中、5 mM の MES、pH 6 . 1 を加える。そのビーズを混合し、磁氣的に分離し、そして、上清をピペットで取り出し、捨てる。この洗浄工程をもう 1 回繰り返す。

20

## 【 0 1 0 1 】

洗浄したビーズを、250  $\mu$ L の 5 mM MES、pH 6 . 1 を加えることによって懸濁させ、そして、混合する。ビーズに加える（始めの方に詳述したように調製した）組換え DGP 抗原を、5  $\mu$ g / mg のコーティング濃度を得るようにビーズカップリングバッファー（界面活性剤含有緩衝食塩水）中に混合する。この混合物を、連続して混合しながら、室温にて 60 分間インキュベートする。

## 【 0 1 0 2 】

1000  $\mu$ L のポストコーティング洗浄バッファー（界面活性剤、塩化カルシウム及び保存料を含んで成る緩衝食塩水）をチューブに加え、混合する。ビーズを磁氣的に分離し、そして、上清をピペットで取り出し、捨てる。この洗浄工程をもう 3 回繰り返す。

30

## 【 0 1 0 3 】

## ビーズブロッキング

1000  $\mu$ L のブロッキングバッファー（界面活性剤、塩化カルシウム、保存料及びブロッカーを含んで成る緩衝食塩水）をチューブに加えた。そのチューブを、混合しながら 2 ~ 8 分間インキュベートする。インキュベーション終了時点で、ビーズを磁氣的に分離し、そして、上清をピペットで取り出し、捨てた。

## 【 0 1 0 4 】

1000  $\mu$ L の粒子希釈剤（界面活性剤、塩化カルシウム、保存料及びブロッカーを含んで成る緩衝食塩水）をチューブに加えることによって、ビーズを粒子希釈剤で洗浄する。チューブを混合し、ビーズを磁氣的に分離し、そして、上清をピペットで取り出し、捨てた。この洗浄工程をもう 3 回繰り返す。

40

## 【 0 1 0 5 】

1000  $\mu$ L の粒子希釈剤（100  $\mu$ L / mg 粒子）をチューブに加え、このバッファー中で 2 ~ 8 分間保存する。

## 【 0 1 0 6 】

## 実施例 3 . 組換え DGP 抗原を使用したセリアック病の検出

この実施例は、抗原として His タグ付与した古典的な組換え脱アミド化グリアジンタンパク質（配列番号 7）を使用したセリアック病の検出のために使用した方法を提供する

50

。

【0107】

セリアックIgA及びIgGイムノアッセイプロトコールの概要：

機器（Bio-Rad Laboratoriesが製造した）BioPlex2200は、サンプルチューブから5µLのサンプルを吸引し、45µLの洗浄バッファー（界面活性剤と保存料を含んで成るリン酸緩衝生理食塩水）によって追い出される該サンプルを反応器（RV）に分注する。

【0108】

100µLのサンプル希釈剤（界面活性剤、保存料及びブロッカーを含んで成る緩衝食塩水）をRVに加え、続いて、150µLの洗浄バッファーをRVに加える。

【0109】

RVを37℃にて130秒間インキュベートする。

【0110】

100µLの粒子試薬（粒子希釈剤中の組換え脱アミド化グリジンコーティングビーズの溶液）をRVに加える。最終サンプル希釈率は1/80である。

【0111】

時々混合しながら、混合物を37℃にて1180秒間インキュベートする。

【0112】

ビーズを、各洗浄後の磁力的分離を伴って、600µL、次いで300µL、次いで600µLの洗浄バッファーで3回洗浄する。

【0113】

50µLの結合試薬（結合希釈剤（界面活性剤、保存料及びブロッカーを含んで成る緩衝食塩水）中の抗ヒトIgA/IgG-フィコエリトリンの混合物）をRVに加える。

【0114】

時々混合しながら、混合物を37℃にて600秒間インキュベートする。

【0115】

ビーズを、各洗浄後の磁力的分離を伴って、600µL、次いで300µL、次いで600µLの洗浄バッファーで3回洗浄する。

【0116】

50µLの洗浄バッファーをRVに加えて、ビーズを再懸濁する。

【0117】

Luminex Detectorモジュール（LDM）にビーズ懸濁液を吸引し、それぞれの特定されたビーズ領域内の粒子のメジアン蛍光を計測する。図2は、DGPの古典的な六量体のコーティング力価測定を示す。

【0118】

セリアック病試験における感度

表1は、異なった濃度のDGP六量体における正常サンプルとセリアック病陽性サンプルについて検出されたシグナルの量（相対蛍光強度、RFI）を示す。

10

20

30

## 【表 1】

表 1. 「古典的な」DGPに関するRFIとDGPのコーティング濃度

DGPの コーティング 濃度, $\mu\text{g}/\text{mg}$	健常サンプル のRFI		カットオフにおける セリアック病陽性 サンプルのRFI	
	IgA	IgG	IgA	IgG
0.0	21	14	20	15
2.0	46	71	750	1152
5.0	47	76	808	1235
10.0	49	81	831	1262
25.0	51	81	844	1273
40.0	50	80	842	1275

10

## 【0119】

セリアック病サンプルの分析

以下の一致試験は62個のセリアック病サンプルから成る。表2はDGP六量体と述語メソッド (predicate method) との比較の結果を示す。

20

## 【表 2】

表 2. 「古典的な」DGPを使用した62個のセリアック病サンプルの一致試験

検体	述語メソッドとの一致 (INOVA)		
	陽性 の一致	陰性 の一致	合計 の一致
IgA	97%	91%	95%
IgG	100%	94%	97%

30

## 【0120】

相対蛍光強度 (RFI) を、DGP六量体 (表3) を使用して正常サンプルとセリアック病患者サンプルについて計測した。患者の免疫反応性を、陽性の反応性が $> 1.0$ である抗体指数 (AI) によって評価した。

## 【表 3】

表 3. 「古典的な」 D G P を使用した正常サンプルとセリアック病患者サンプルに関する R F I 及び A I データ

IgA		
サンプル	RFI	AI
2320644	170	0.2
2324881	49	0.0
GA61882J	956.0	2.1
GA61882R	903.0	1.5
GA64089B	809.0	1.6
GA64089G	1111.0	2.3
GA640890	1753.5	3.6
A-9355	42.0	0.0
15902.0	2030	4.5
16313	14928.0	20.1
13424	5724.0	8.1
13425	5816.0	8.2

IgG		
サンプル	RFI	AI
2320644	37.0	0
2324881	75.0	0
GG61791B	1287.0	1.2
GG61791J	1319.0	1.3
GG66322P	204.0	0.2
GG66322R	3764.0	3.7
GG66322T	4847.0	4.2
A-9355	105.0	0.1
15902	5360.0	4.5
16313	10454.0	8.5
13424	4436.0	3.3
13425	2171.5	1.9

10

20

## 【 0 1 2 1 】

実施例 4 . 追加リジンを含む組換え D G P 抗原を使用したセリアック病の検出

この実施例では、「リジン含有」D 2 六量体タンパク質（N 末端領域付近の 1 4 位にてグルタミン酸残基と置換したリジンを有する、H i s タグ付与した組換え脱アミド化グリアジンペプチド）（配列番号 8 ）を、セリアック病に対する感度について試験した。

## 【 0 1 2 2 】

磁性ビーズ上へのこの抗原の固定を、実施例 2 に記載したのと同じ様式でおこなった。図 3 はリジン含有 D G P 六量体のコーティング力価測定を示す。

30

## 【 0 1 2 3 】

イムノアッセイにおけるこの抗原を使用したセリアック病の検出を、実施例 3 で「古典的な」六量体タンパク質に関して記載したのと同じ様式でおこなった。

## 【 0 1 2 4 】

セリアック病試験における感度

表 4 は、異なった濃度の D G P 六量体における正常サンプルとセリアック病陽性サンプルについての R F I を示す。

## 【表4】

表4. 「リジン含有」DGPに関するRFIとDGPのコーティング濃度

DGPの コーティング 濃度, $\mu\text{g}/\text{mg}$	健全サンプル のRFI		カットオフにおける セリアック病陽性 サンプルのRFI	
	IgA	IgG	IgA	IgG
0.0	21	22	25	27
0.5	45	60	623	1003
2.0	49	61	762	1170
5.0	61	89	814	1279
15.0	65	98	850	1336
45.0	64	95	875	1355

10

## 【0125】

セリアック病サンプルの分析

表5は、DGP六量体によって計測される正常サンプルとセリアック病患者サンプルに関する相対蛍光強度(RFI)を示す。患者の免疫反応性を、陽性の反応性が $>1.0$ である抗体指数(AI)によって評価した。

20

## 【表5】

表5. 「リジン含有」DGPを使用した正常サンプルとセリアック病患者サンプルに関するRFI及びAIデータ

IgA		
サンプル	RFI	AI
2320644	165	0.2
2324881	55	0
GA61882J	942.0	2.1
GA61882R	814.0	1.5
GA64089B	749.5	1.6
GA64089G	1042.0	2.2
GA640890	1647.0	3.5
A-9355	45.0	0
15902.0	1920	4.5
16313	15549.0	23
13424	5407.0	8.2
13425	5587.5	8.4

IgG		
サンプル	RFI	AI
2320644	47.0	0
2324881	70.0	0
GG61791B	1216.5	1.2
GG61791J	1120.0	1.1
GG66322P	194.0	0.2
GG66322R	3476.0	3.6
GG66322T	4607.0	4.2
A-9355	153.5	0.1
15902	5541.0	4.6
16313	10723	8.7
13424	3993.0	3.2
13425	1990.0	1.8

30

40

## 【0126】

実施例5. DGP三量体対DGP六量体の比較研究

62個のセリアック病サンプルから成る以下の一致試験は、DGP六量体対以前に記載したグリアジン抗原であるD2三量体組換え融合タンパク質(参照により本明細書中に援用されるUS2009/0311727ですでに記載した)の予測値を比較した。DGP六量体は、DGP三量体に対して改善された陽性の一致及び合計の一致を示した(表6)。これらの結果は、DGP三量体と比較して、DGP六量体の改善された感度を実証する

50

。【表 6】

表 6. 比較一致試験

検体	述語メソッドとの一致 (INOVA)		
	陽性 の一致	陰性 の一致	合計 の一致
IgG-DGP三量体	84%	94%	89%
IgG-DGP六量体	100%	94%	97%

10

【 0 1 2 7】

D G P 六量体はまた、(多くの偽陽性の結果をもたらした) D G P 三量体と比較して、驚いたことに改善された特異性も示した。この問題は、D G P 六量体を使用することによって解決した。

以下の表 7 は、407 個の正常サンプルのスクリーニングからのデータを示す。D G P 三量体は 25% の偽陽性を生じたが、それに対して、D G P 六量体は 0.5% の偽陽性しか生じなかった。偽陽性検出の特異性は 1% である。

20

【表 7】

表 7. 正常サンプルのスクリーニング

	DGP三量体	DGP六量体
全サンプル	407	407
偽陽性	102	2

【 0 1 2 8】

図の 4 a 及び 4 b は、D G P 三量体と比較して、D G P 六量体の改善された性能を示す。これらの試験では、D G P 六量体のビーズコーティング濃度は、D G P 三量体のものの 5 分の一であったが、カットオフ R F I シグナルは同じであった。組換え D G P 六量体は、I g A アッセイ (図 4 a) 及び I g G アッセイ (図 4 b) の両方で、組換え D G P 三量体と比較して改善された感度を有した。

30

【 0 1 2 9】

明確に理解する目的のために、説明及び実施例を用いて上述した本発明を幾分詳しく説明したが、本請求項の範囲内において特定の変化及び修正が行われてもよいことが当業者に理解される。更に、各参照文献があたかも各々参照により援用されたのと同じように、本願明細書で提供された各参照文献はその全体を参照により援用されたものとする。

40

【 図 1 】

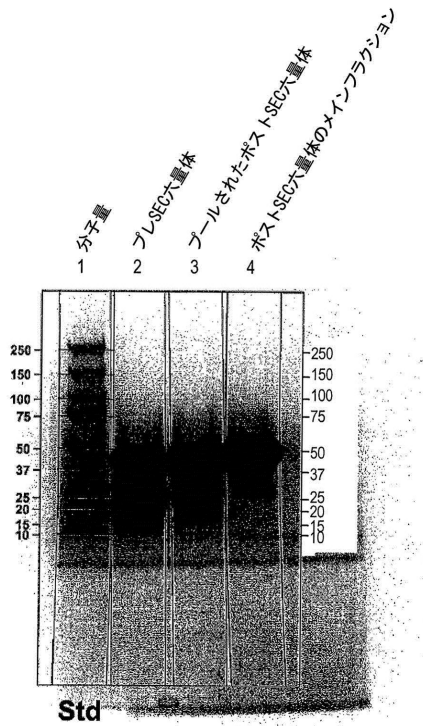


FIG. 1

【 図 2 】

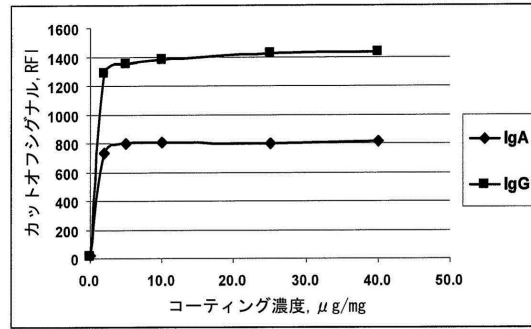


FIG. 2

【 図 3 】

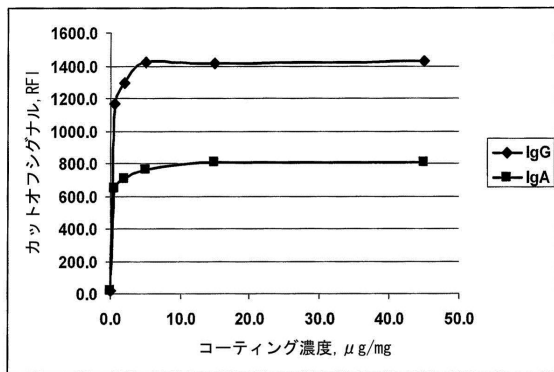


FIG. 3

【 図 4 】

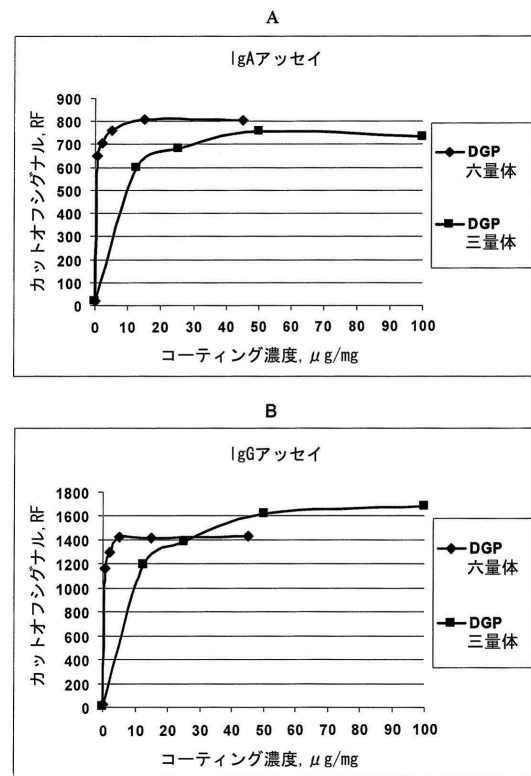


FIG. 4

【配列表】

0006470347000001.app

## フロントページの続き

- (51) Int.Cl. F I  
**G 0 1 N 33/53 (2006.01)** G 0 1 N 33/53 D
- (74)代理人 100117019  
 弁理士 渡辺 陽一
- (74)代理人 100150810  
 弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100164563  
 弁理士 佐々木 貴英
- (72)発明者 ロジャー ウォーカー  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 1 0 , ベニシア, カーニー ストリート 6 8 8
- (72)発明者 ヤビン ルー  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ディアピラ アベニュー 4 3 6 1
- (72)発明者 アービー ディサイ  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 2 , サン ラモン, シダーウッド ループ 1 4 4 8
- (72)発明者 ダミン シャン  
 アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 3 3 , ショアライン, メリディアン アベニュー ノース 1  
 8 3 1 2

審査官 田ノ上 拓自

- (56)参考文献 特表2011-521898(JP, A)  
 国際公開第2004/045392(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
  - C 1 2 N 1 / 2 1
  - C 1 2 N 1 5 / 6 2
  - C 1 2 N 1 5 / 6 3
  - G 0 1 N 3 3 / 5 3
  - C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )
  - W P I D S / W P I X ( S T N )
  - P u b M e d

专利名称(译)	重组脱酰胺醇麦醇溶蛋白抗原		
公开(公告)号	<a href="#">JP6470347B2</a>	公开(公告)日	2019-02-13
申请号	JP2017097281	申请日	2017-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室 , Incorporated的雷开球德		
当前申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室 , Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ロジャーウォーカー ヤビンルー アービーディサイ ダミンシャン		
发明人	ロジャー ウォーカー ヤビン ルー アービー ディサイ ダミン シャン		
IPC分类号	C07K7/08 C07K19/00 C12N15/62 C12N15/63 C12N1/21 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/415 C07K2319/21 C07K2319/23 C12N9/1044 C12Y203/02013 G01N33/564 G01N2800/06 G01N33/531 G01N33/6893		
FI分类号	C07K7/08.ZNA C07K19/00 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N1/21 G01N33/53.D C07K7/08 C12N15/00 C12N15/00.A C12N15/00.ZNA G01N33/53.N G01N33/53.Q G01N33/543.501.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA60 4H045/CA32 4H045/DA86 4H045 /EA50 4H045/FA81 4H045/GA26		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 武井良太郎 隆英佐佐木		
优先权	61/567060 2011-12-05 US		
其他公开文献	JP2017160251A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：通过将来自受试者的体液样品与固定在固体支持物上的麦醇溶蛋白融合蛋白的六聚体形成的抗原接触来确定受试者是否患有乳糜泻。如何提供。 解决方案：用于检测乳糜泻的抗原，其包含包含肽六聚体的重组脱酰胺醇麦醇溶蛋白，使用所述抗原测试受试者的乳糜泻的方法，以及用于筛选包含所述抗原的乳糜泻的方法成为一个成套工具。 【选择图】无

(51) Int. Cl.	F 1	
<b>C 0 7 K</b>	<b>7/08</b>	<b>(2006. 01)</b>
<b>C 0 7 K</b>	<b>19/00</b>	<b>(2006. 01)</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/62</b>	<b>(2006. 01)</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/63</b>	<b>(2006. 01)</b>
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006. 01)</b>
	C 0 7 K	7/08
	C 0 7 K	19/00
	C 1 2 N	15/62
	C 1 2 N	15/63
	C 1 2 N	1/21
	Z N A	
	Z	
	Z	

請求項の数 24 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-97281(P2017-97281)	(73) 特許権者	591098809
(22) 出願日	平成29年5月16日(2017. 5. 16)		
(62) 分割の表示	特願2014-545970(P2014-545970) の分割	(73) 特許権者	バイオラッド ラボラトリーズ、インコ ーポレイティド アメリカ合衆国、カリフォルニア 945 47、ハーキュルス、アルフレッド ノー ベル ドライブ 1000
原出願日	平成24年12月3日(2012. 12. 3)		
(65) 公開番号	特開2017-160251(P2017-160251A)	(74) 代理人	100099759
(43) 公開日	平成29年9月14日(2017. 9. 14)		
審査請求日	平成29年6月14日(2017. 6. 14)	(74) 代理人	弁理士 青木 篤 100077517
(31) 優先権主張番号	61/567,060	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 100087871
(32) 優先日	平成23年12月5日(2011. 12. 5)	(74) 代理人	弁理士 福本 慎 100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	弁理士 古賀 晋次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え脱アミド化グリアジン抗原