

(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2006-512893

(P2006-512893A)

(43) 公表日 平成18年4月20日(2006.4.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B O 3 O
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G O 4 5
A O 1 H 5/00 (2006.01)	A O 1 H 5/00 A	4 B O 1 8
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 3
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 128 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-511341 (P2004-511341)	(71) 出願人	500056231
(86) (22) 出願日	平成15年6月5日 (2003.6.5)		アイシス・イノベーション・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月3日 (2005.2.3)		I S I S I N N O V A T I O N L I M
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/002450		I T E D
(87) 国際公開番号	W02003/104273		イギリス国、オクスフォード、サマータ
(87) 国際公開日	平成15年12月18日 (2003.12.18)		ウン、ユワート プレース、ユワート ハ
(31) 優先権主張番号	0212885.8		ウス
(32) 優先日	平成14年6月5日 (2002.6.5)	(74) 代理人	100089705
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 社本 一夫
		(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠式
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 治療用エピトープ及びそれらの使用

(57) 【要約】

本明細書に開示された発明は、セリアック病を思案し、治療し、そして予防する方法において有用なエピトープに関連する。少なくとも一つのエピトープを含む治療用組成物が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

セリアック病を治療又は予防する方法であって、

(a) 配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46、及びそれらの均等物からなる群から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチド；及び

(b) (a) のペプチドを認識する T 細胞受容体により認識されることができ、且つ 50 アミノ酸の長さを超えない、(a) の類似体；及び

(c) 配列番号：1 及び配列番号：2 から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチドから選択される少なくとも一つの薬剤を個体に投与することを含む方法。

10

【請求項 2】

薬剤が H L A - D Q 2 - 制限される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

薬剤が H L A - D Q 8 - 制限される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

一つの薬剤が H L A - D Q 2 - 制限され、そして第 2 の薬剤が H L A - D Q 8 制限される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

薬剤がコムギのエピトープを含む、請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 6】

一つの薬剤がコムギのエピトープを含み、そして一つの薬剤がライムギのエピトープを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

一つの薬剤がコムギのエピトープを含み、そして一つの薬剤がオオムギのエピトープを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

一つの薬剤がライムギのエピトープを含み、そして一つの薬剤がオオムギのエピトープを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

一つの薬剤がコムギのエピトープを含み、一つの薬剤がオオムギのエピトープを含み、そして一つの薬剤がライムギのエピトープを含む、請求項 1 記載の方法。

30

【請求項 10】

単一の薬剤がコムギのエピトープ、オオムギのエピトープ、及びライムギのエピトープを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 記載の薬剤及び薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤を含む薬学組成物を個体に投与することを含む、セリアック病を予防又は治療する方法。

【請求項 12】

請求項 1 記載の T 細胞受容体を有する T 細胞のアンタゴニスト及び薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤を含む薬学組成物を個体に投与することを含む、セリアック病を予防又は治療する方法。

40

【請求項 13】

T 細胞の生産又は請求項 1 記載の薬剤に対する抗体応答を抑圧するために個体をグリアジン蛋白質に対して寛容にするための組成物を個体に投与することを含む、セリアック病を予防又は治療する方法。

【請求項 14】

セリアック病を予防するか又は治療する方法であって、

a) i) 配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46、及びそれらの均等物からなる群から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチド；

50

及び

i i) i) を認識する T 細胞受容体により認識されることができ、且つ 50 アミノ酸の長さを超えない、i) の類似体；及び

i i i) 任意に、i) 及び i i) から選択される薬剤に加えて、配列番号：1 及び配列番号：2 から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチドから選択される少なくとも一つの薬剤を、宿主からのサンプルに接触させ；そしてサンプル中の T 細胞が上記薬剤を認識するか否かをインビトロにて決定するが、T 細胞による認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示すか；又は

b) 請求項 1 記載の薬剤を投与し、そして個体中の T 細胞が上記薬剤を認識するか否かをインビボにて決定するが、T 細胞による認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示し、そして

セリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であると診断された個体に、セリアック病を予防又は治療するための治療用薬剤を投与することを含む、方法。

【請求項 15】

セリアック病を治療又は予防するタメノ医薬の製造のための薬剤の使用であって、薬剤は、

(a) 配列番号：18-22、31-36、39-44、及び 46、及びそれらの均等物からなる群から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチド；及び

(b) (a) のペプチドを認識する T 細胞受容体により認識されることができ、且つ 50 アミノ酸の長さを超えない、(a) の類似体；及び

(c) 任意に、(a) 及び (b) から選択される薬剤に加えて、配列番号：1 及び配列番号：2 から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチドを含む、使用。

【請求項 16】

薬剤が HLA-DQ2-制限される、請求項 15 記載の使用。

【請求項 17】

薬剤が HLA-DQ8-制限される、請求項 15 記載の使用。

【請求項 18】

一つの薬剤が HLA-DQ2-制限され、そして第 2 の薬剤が HLA-DQ8 制限される、請求項 15 記載の使用。

【請求項 19】

薬剤がコムギのエピトープを含む、請求項 15 記載の使用。

【請求項 20】

一つの薬剤がコムギのエピトープを含み、そして一つの薬剤がライムギのエピトープを含む、請求項 15 記載の使用。

【請求項 21】

一つの薬剤がコムギのエピトープを含み、そして一つの薬剤がオオムギのエピトープを含む、請求項 15 記載の使用。

【請求項 22】

一つの薬剤がライムギのエピトープを含み、そして一つの薬剤がオオムギのエピトープを含む、請求項 15 記載の使用。

【請求項 23】

一つの薬剤がコムギのエピトープを含み、一つの薬剤がオオムギのエピトープを含み、そして一つの薬剤がライムギのエピトープを含む、請求項 15 記載の使用。

【請求項 24】

単一の薬剤がコムギのエピトープ、オオムギのエピトープ、及びライムギのエピトープを含む、請求項 15 記載の使用。

【請求項 25】

薬剤が、薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤を含む薬学組成物中に存在する、請求項 15 記載の使用。

【請求項 26】

薬剤が、請求項 15 記載の T 細胞受容体を有する T 細胞のアンタゴニスト、及び薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤を含む薬学組成物中に存在する、請求項 15 記載の使用。

【請求項 27】

薬剤が、請求項 1 記載の薬剤に応答性の T 細胞又は抗体の生産を抑圧するために個体を寛容化するための組成物に含まれる、請求項 15 記載の使用。

10

【請求項 28】

任意にキャリアーと共に、薬剤を認識する T 細胞を寛容化することによりセリアック病疾患を治療又は予防する方法における使用のための、請求項 1 記載の薬剤。

【請求項 29】

任意にキャリアーを伴う、請求項 1 記載の T 細胞受容体を有する T 細胞のアンタゴニストであって、そのような T 細胞と拮抗することによりセリアック病を予防又は治療する方法における使用のためのアンタゴニスト。

【請求項 30】

個体を寛容にすることにより抗体の生産を阻害して個体においてセリアック病を治療又は予防する方法において使用するための、請求項 1 記載の薬剤又は請求項 1 記載の薬剤のエピトープに結合する抗体を結合する類似体。

20

【請求項 31】

T 細胞受容体に結合することができる配列を含む蛋白質であって、但し、T 細胞受容体は上で定義された薬剤を認識し、そして上記配列はそのような T 細胞受容体を有する T 細胞の拮抗作用を引き起こすことができる、蛋白質。

【請求項 32】

請求項 1 記載の薬剤又は請求項 12 記載のアンタゴニスト。

【請求項 33】

請求項 1 記載の薬剤又は請求項 12 記載のアンタゴニスト及び薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤を含む薬学組成物。

30

【請求項 34】

T 細胞の生産又は請求項 1 記載の薬剤に対する抗体応答を抑圧するために個体をグリアジン蛋白質に対して寛容にするための組成物であって、請求項 1 記載の薬剤を含む組成物。

【請求項 35】

請求項 1 記載の薬剤に対する T 細胞応答に拮抗するための組成物であって、請求項 12 記載のアンタゴニストを含む組成物。

【請求項 36】

その野生型配列がトランスグルタミナーゼにより請求項 1 記載の薬剤である配列に修飾され得る変異体グリアジン蛋白質であって、変異体グリアジン蛋白質はトランスグルタミナーゼによるその請求項 1 記載の薬剤である配列への修飾を阻害する変異を含み；又は、本発明は少なくとも 15 アミノ酸の長さであり、且つ上記変異を含む、そのような変異体グリアジン蛋白質の断片。

40

【請求項 37】

請求項 36 又は 31 記載の蛋白質又は断片をコードするコーディング配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 38】

コーディング配列に作動可能に連結された一つ又はそれより多い制御配列を追加して含むが、但し、制御配列は細胞中でコーディング配列の発現を保証することができる、請求項 37 記載のポリヌクレオチド。

50

【請求項 39】

制御配列が原核又は哺乳類の細胞におけるコーディング配列の発現を可能にする、請求項 38 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 40】

ベクターであるか、又はベクターの形態である、請求項 37 乃至 39 の何れか 1 項記載のポリヌクレオチド。

【請求項 41】

請求項 37 乃至 39 の何れか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含むか、又はそのようなポリヌクレオチドにより形質転換された、細胞。

【請求項 42】

原核細胞又は哺乳類細胞である、請求項 41 記載の細胞。

【請求項 43】

請求項 1 記載の T 細胞受容体を発現する哺乳類。

【請求項 44】

個体においてセリアック病を診断するか又はセリアック病に対する感受性を診断する方法であって、

(a) (i) 配列番号：18-22、31-36、39-44、及び 46、及びそれらの均等物からなる群から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチド；及び

(ii) (i) のペプチドを認識する T 細胞受容体により認識されることができ、且つ 50 アミノ酸の長さを超えない、(i) の類似体；及び

(iii) 任意に、(i) 及び (ii) から選択される薬剤に加えて、配列番号：1 及び配列番号：2 から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチドから選択される少なくとも一つの薬剤を宿主に投与し；そして

(b) サンプル中の T 細胞が薬剤を認識するか否かをインビトロにて決定して、T 細胞による認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示すこと

を含む方法。

【請求項 45】

個体においてセリアック病を診断するか又はセリアック病に対する感受性を診断する方法における使用のための診断手段の製造のための請求項 44 記載の薬剤の使用であって、上記方法は、個体の T 細胞が薬剤を認識するか否かを決定することを含み、T 細胞による認識が個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性である、使用。

【請求項 46】

薬剤が、(a) HLA 分子又は (b) (i) 又は (ii) を結合できる HLA 分子の断片に結合した (i) 又は (ii) を含む類似体 (iii) である、請求項 44 又は 45 記載の方法又は使用。

【請求項 47】

HLA 分子又は断片が、4 つの HLA 分子又は HLA 分子の断片を含む複合体中にある、請求項 46 の方法又は使用。

【請求項 48】

方法が、薬剤を個体の皮膚に投与し、そして投与の部位において炎症の存在を検出することを含み、炎症の検出が、個体の T 細胞が薬剤を認識することを示す、請求項 45、46 又は 47 記載の使用。

【請求項 49】

サンプルが血液サンプルがである、請求項 44、46 又は 47 記載の方法。

【請求項 50】

決定の前に抗原特異的様式にてインビボにおいて T 細胞が再刺激されない、請求項 44、46、47 又は 49 記載の方法。

【請求項 51】

10

20

30

40

50

T細胞による薬剤の認識がT細胞によるサイトカインの分泌を検出することにより決定される、請求項44乃至50の何れか1項記載の方法又は使用。

【請求項52】

サイトカインがIFN- γ である、請求項51記載の方法。

【請求項53】

サイトカインに特異的な固定化された抗体へのサイトカインの結合を可能にし、そして次に抗体／サイトカイン複合体の存在を検出することによりサイトカインを検出する、請求項5又は請求項52記載の方法。

【請求項54】

薬剤がT細胞受容体に結合するか否かを測定することにより上記決定を行う、請求項44乃至50の何れか1項記載の方法。 10

【請求項55】

請求項44、46又は47記載の類似体を同定する方法であって、請求項44記載の配列を含むエピトープを認識するT細胞受容体により候補物質が認識されるか否かを決定することを含み、物質の認識が、物質が類似体であることを示す、方法。

【請求項56】

個体においてセリアック病又はセリアック病に対する感受性を診断する方法であって、請求項44記載の配列を含むエピトープのエピトープに結合する抗体の、個体からのサンプル中の存在を決定することを含み、抗体の存在が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示す、方法。 20

【請求項57】

組成物がセリアック病を引き起こすか否かを決定する方法であって、請求項44記載のオリゴペプチド配列ヘトランスグルタミナーゼにより修飾され得る蛋白質が組成物中に存在するか否かを決定することを含み、蛋白質の存在が、組成物がセリアック病を引き起こすことを示す、方法。

【請求項58】

上記オリゴペプチド配列に修飾され得る配列に特異的な抗体に組成物を接触させることにより上記決定を行い、組成物中の蛋白質への抗体の結合が、組成物がセリアック病を引き起こすことを示す、請求項57記載の方法。

【請求項59】

請求項1記載の薬剤を認識するT細胞のアンタゴニストを同定する方法であって、候補物質をT細胞と接触させ、そして当該物質がT細胞が抗原特異的応答を受ける能力の低下を引き起こすか否かを決定することを含み、上記能力のそのようなあらゆる低下の検出が、上記物質がアンタゴニストであることを示す、方法。 30

【請求項60】

請求項44乃至54の何れか1項記載の方法又は使用を実施するためのキットであって、請求項44、46又は47記載の薬剤及びT細胞によるペプチドの認識を検出する手段を含む、キット。

【請求項61】

認識を検出する手段がIFN- γ に対する抗体を含む、請求項60記載のキット。 40

【請求項62】

抗体が固相支持体上に固定されており、そして任意にキットが抗体／IFN- γ 複合体を検出する手段も含む、請求項61記載のキット。

【請求項63】

薬剤、アンタゴニスト又は野生型配列に特異的な抗体を生産するための、請求項62記載の薬剤又はアンタゴニスト又は請求項36記載の野生型配列の使用。

【請求項64】

セリアック病を引き起こすグリアジン蛋白質の能力を低下させるための、請求項44記載のグリアジン蛋白質エピトープ内の変異の使用。

【請求項65】

セリアック病の治療用の生成物を同定する方法であって、セリアック病を有するか又はセリアック病に感受性の候補物質を請求項 4 3 記載の哺乳類に投与し、そして物質が哺乳類においてセリアック病を予防又は治療するか否かを決定することを含み、セリアック病の予防又は治療が、当該物質が治療用生成物であることを示す、方法。

【請求項 6 6】

セリアック病を予防又は治療するための方法において同定された治療用生成物。

【請求項 6 7】

個体においてセリアック病又はセリアック病に対する感受性を診断する方法であって、請求項 4 4 記載の薬剤を個体に投与し、そしてインビボにおいて個体中の T 細胞が薬剤を認識するか否かを決定することを含み、薬剤の認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示す、方法。 10

【請求項 6 8】

イネ科単子葉植物種の細胞である、請求項 4 1 記載の細胞。

【請求項 6 9】

コムギ、トウモロコシ、エンバク、ライムギ、イネ、オオムギ、ライコムギ、モロコシ、又はサトウキビの細胞である、請求項 6 8 記載の細胞。

【請求項 7 0】

請求項 3 7 記載のコーディング配列によりコードされる蛋白質の生産のためのプロセスであって、

(a) 上記蛋白質の発現を可能にする条件下で上記細胞を培養し；そして、 20

(b) 発現された蛋白質を回収すること

を含む方法。

【請求項 7 1】

トランスジェニック植物細胞を得るための方法であって、

(a) トランスジェニック植物細胞を供給するために上で定義されたベクターにより植物を形質転換することを含む方法。

【請求項 7 2】

初代トランスジェニック植物を得るための方法であって、

(b) トランスジェニック植物を提供するために上で定義されたベクターにより形質転換されたトランスジェニック植物細胞を再生することを含む方法。 30

【請求項 7 3】

トランスジェニック植物の種子を得るための方法であって、

(c) 請求項 7 2 記載の工程により取得可能なトランスジェニック植物からトランスジェニック種子を得ることを含む方法。

【請求項 7 4】

トランスジェニック子孫植物を得るための方法であって、請求項 7 2 記載の方法により取得可能な初代トランスジェニック植物から第 2 世代のトランスジェニック子孫植物を得て、そして任意に、そうして得られた第 2 世代の子孫から一つ又はそれ以上の世代のトランスジェニック植物を得ることを含む方法。

【請求項 7 5】 40

(d) 請求項 7 3 記載の方法により取得可能な第 1 世代のトランスジェニック植物からトランスジェニック種子を得て、次に、トランスジェニック種子から第 2 世代のトランスジェニック子孫植物を得て；

及び／又は

(e) 第 2 世代の子孫植物を提供するために請求項 7 2 記載の方法により取得可能な第 1 世代のトランスジェニック植物をクローンとして増殖させ；

及び／又は

(f) 第 2 世代の子孫植物を提供するために請求項 7 2 記載の方法により取得可能な第 1 世代のトランスジェニック植物を別の植物と交配し；

及び、任意に 50

(g) そうして得られた第2世代の子孫植物から一つ又はそれより多い世代のトランスジェニック子孫植物を得ることを含む、請求項72記載の方法。

【請求項76】

請求項71乃至75の何れか1項に記載の方法により取得可能な、トランスジェニック植物細胞、植物、植物種子又は子孫植物。

【請求項77】

請求項68記載の植物細胞を含むトランスジェニック植物又は植物種子。

【請求項78】

請求項68、69、又は71乃至75の何れか1項に記載のトランスジェニック植物細胞、初代植物、植物種子又は子孫から取得可能な、請求項68又は69記載の植物細胞を含む、トランスジェニック植物細胞カルス。

【請求項79】

請求項68又は69記載の種の、請求項76乃至78の何れか1項記載の植物又はカルス。

【請求項80】

収穫生成物を得るための方法であって、請求項76にし79の何れか1項記載の方法に従い植物から収穫生成物を回収し、そして任意にさらに回収された生成物を加工することを含む方法。

【請求項81】

植物がコムギであり、そして収穫される収穫物が穀物であり；任意にさらに小麦粉又は別の穀物製品中で加工される、請求項80記載の方法。

【請求項82】

請求項80又は81記載の方法により取得可能な収穫生成物。

【請求項83】

請求項31又は36記載の蛋白質を含む食物。

【請求項84】

請求項31又は36記載の蛋白質を野生型グリアジンの代わりに使用する、請求項83記載の食物。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

本発明は、セリアック病の診断及び治療に有用なエピトープに関し、診断剤、治療剤、キット、及び前記の使用方法を含む。

ダイエット中のグリアジン（グルテンの成分）に対する免疫反応がセリアック病を引き起こす。腸組織中の免疫応答は腸のトランスグルタミナーゼにより修飾されたグリアジンに優先的に応答する。セリアック病は抗－筋内膜抗体の検出により診断されるが、これは腸の生検内のリンパ球の炎症の発見による確認を必要とする。そのような生検の取得は患者にとって快適ではない。

【0002】

研究者は、腸のT細胞応答のみがグリアジンに対する免疫応答の正確な指標を提供すると、以前に仮定した。よって、彼らは、腸の組織内のT細胞の応答の研究に集中してきた¹。トランスグルタミナーゼの修飾を必要とする（それらが免疫系により認識される前に）グリアジンエピトープは公知である²。

【0003】

本発明者らは、セリアック病において免疫系により認識される免疫上優勢なT細胞A－グリアジンエピトープを発見し、そしてこれがセリアック病の個体の末梢血内でT細胞により認識されることを示した（WO 01/25793）。そのようなT細胞は、再刺激無しに検出可能なほど十分に高い頻度で存在することを発見した（即ち、「フレッシュな応答」検出系が使用できた）。上記エピトープは非T細胞クローニングに基づく方法を用い

10

20

30

40

50

て同定され、上記エピトープのより正確な反射 (r e f l e c t i o n) が認識された。上記の免疫上優勢なエピトープは免疫系が認識する前にトランスグルタミナーゼの修飾を必要とする (特定のグルタミンのグルタミン酸への置換を引き起こす) 。

【 0 0 0 4 】

この研究に基づいて、本発明者らは、初期段階でセリアック病を診断するのに使用できる試験を開発した。当該試験は、末梢血からのサンプル上で実施してよく、よって、腸の生検は必要ない。当該試験は現在使用されている抗体試験よりも感度が高い。

【 0 0 0 5 】

発明は、即ち、個体においてセリアック病を診断するか又はセリアック病に対する感受性を診断する方法を提供し、

(a) 宿主からのサンプルを、 (i) 配列番号 : 1 (P Q P E L P Y) 又は配列番号 : 2 (Q L Q P F P Q P E L P Y P Q P Q S) である配列、又は配列番号 : 3 により表されるグリアジンの天然に生じる相同体からの均等な配列を含むエピトープ、 (i i) グリアジン蛋白質由来の単離されたオリゴペプチドである、配列番号 : 1 を含むか又は配列番号 : 3 により表されるグリアジンの天然に生じる相同体からの均等な配列 (表 1 に示される) を含むエピトープ、 (i i i) (i) 又は (i i) を認識する T 細胞受容体により認識され得る (i) 又は (i i) の類似体であって、ペプチドの場合は類似体が 5 0 アミノ酸の長さを超えない上記類似体、又は (i v) (i) , (i i) 又は (i i i) において定義された 2 つ又はそれより多い薬剤 (a g e n t) を含む生成物からなる群から選択される薬剤と接触させ、そして (b) サンプル中の T 細胞が薬剤を認識するか否かをインビトロにて決定して、T 細胞による認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示すことを含む。

【 0 0 0 6 】

コムギのグリアジン T 細胞のエピトープの包括的なマッピングを通して (実施例 1 3 参照) 、本発明者らは、類似のコア配列 (例えば、配列番号 : 1 8 - 2 2) 及び類似の完全長配列 (例えば、配列番号 : 3 1 - 3 6) を有する他のコムギグリアジン中のセリアック病の H L A - D Q 2 + 患者において、並びにライムギのセカリン及びオオムギのホールダイン (配列番号 : 3 9 - 4 1) の生物学上活性なエピトープをも発見した ; 表 2 0 及び 2 1 も参照。さらに、セリアック病において H L A - D Q 8 + 患者にて生物学上活性な幾つかのエピトープが同定された (配列番号 4 2 - 4 4 、 4 6) 。この包括的なマッピングは、即ち、セリアック病の患者において T 細胞により認識される優勢なエピトープを提供する。即ち、上記の方法及び本明細書に記載される他の方法は、これらの追加の同定されたエピトープ、それらの類似体及び均等物の何れかを使用して実施してよい ; 本明細書の (i) 及び (i i) はこれらの追加のエピトープを含む。即ち、本発明の薬剤は新規なエピトープも含む。

【 0 0 0 7 】

本発明は、個体において、セリアック病又はセリアック病に対する感受性を診断する方法における使用のための診断手段の製造のための薬剤の使用を提供し、当該方法は、当該個体の T 細胞が薬剤を認識するか否かを決定することを含み、T 細胞による認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示す。

【 0 0 0 8 】

トランスグルタミナーゼにより修飾された免疫上優勢なエピトープ (並びに本明細書において定義された追加の他のエピトープ) の発見は、このエピトープに対する他の種類の免疫応答が存在するか否かを決定することに基づいたセリアック病の診断も可能にする。即ち、本発明は、個体において、セリアック病又はセリアック病に対する感受性を診断する方法も提供し、当該個体からのサンプル中のエピトープに結合する抗体の存在を決定することを含み、抗体の存在が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示す。

【 0 0 0 9 】

10

20

30

40

50

本発明は、さらに、上記薬剤を認識するT細胞を寛容にするセリアック病を治療又は予防する方法における使用のための上記薬剤を、任意にキャリアと共に提供する。また、T細胞と拮抗することによりセリアック病を治療又は予防する方法における使用のための、(i)又は(ii)を認識するT細胞受容体を有するT細胞のアンタゴニストを、任意にキャリアと共に提供する。さらに、抗体の生産を阻害するために個体を寛容にすることにより個体においてセリアック病を治療又は予防する方法における使用のための、抗体(上記薬剤に結合する)を結合する薬剤又は類似体が提供される。

【0010】

本発明は、組成物がセリアック病を引き起こすか否かを決定する方法を提供し、トランスグルタミナーゼにより上で定義されたオリゴペプチド配列へ修飾される蛋白質が組成物中に存在するか否かを決定することを含み、蛋白質の存在が、組成物がセリアック病を引き起こし得ることを示す。 10

【0011】

本発明は、その野生型配列がトランスグルタミナーゼにより上で定義された配列を含むエピトープを含む配列に修飾され得る変異体グリアジン蛋白質も提供するが、しかし、当該変異体グリアジン蛋白質は、そのようなエピトープを含む配列を含む配列へトランスグルタミナーゼにより修飾され得る配列を含まない様式にて修飾されており；又は、本発明は、上記の様式により修飾されたそのような変異体グリアジン蛋白質の断片も提供する。

【0012】

本発明は、T細胞受容体へ結合することができる配列を含む蛋白質も提供し、但し、T細胞受容体は上記の薬剤を認識し、そして上記配列はそのようなT細胞受容体を有するT細胞の拮抗作用を引き起こすことができる。 20

【0013】

さらに、本発明は、上で定義された蛋白質を含む食品を提供する。

発明の概要

本発明はセリアック病を治療又は予防する方法を提供し、a)配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46、及びそれらの均等物からなる群から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチド；及びb) a)のペプチドを認識するT細胞受容体により認識されることができ、且つ50アミノ酸の長さを超えない、a)の類似体；及びc)配列番号：1及び配列番号：2から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチドから選択される少なくとも一つの薬剤を個体に投与することを含む。幾つかの態様において、上記薬剤は、HLA-DQ2-制限されるか、HLA-DQ8-制限されるか、又は一つの薬剤がHLA-DQ2-制限されており、そして第2の薬剤がHLA-DQ8-制限されている。幾つかの態様において、上記薬剤は、コムギのエピトープ、ライムギのエピトープ、オオムギのエピトープ又はそれらの組み合わせの何れかを、単一の薬剤として又は複数の薬剤として含む。 30

【0014】

本発明は、上記の薬剤及び薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤を含む薬学組成物を個体に投与することを含む、セリアック病を予防又は治療する方法も提供する。

本発明は、上で定義されたT細胞受容体を有するT細胞のアンタゴニスト及び薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤を含む薬学組成物を個体に投与することを含む、セリアック病を予防又は治療する方法も提供する。 40

【0015】

本発明は、T細胞の生産又は上で定義された薬剤に対する抗体応答を抑圧するために個体をグリアジン蛋白質に対して寛容にするための組成物を個体に投与することを含む、セリアック病を予防又は治療する方法も提供する。

【0016】

本発明は、1) a) i)配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46、及びそれらの均等物からなる群から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチド；及びii) i)を認識するT細胞受容体により認識されることができ、且 50

つ50アミノ酸の長さを超えない、i)の類似体；及びiii)任意に、i)及びii)から選択される薬剤に加えて、配列番号：1及び配列番号：2から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチドから選択される少なくとも一つの薬剤を、宿主からのサンプルに接触させ；そしてサンプル中のT細胞が上記薬剤を認識するか否かをインビトロにて決定するが、T細胞による認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示すか；又はb)上で定義された薬剤を投与し、そして個体中のT細胞が上記薬剤を認識するか否かをインビボにて決定するが、T細胞による認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示すかの何れかにより、個体においてセリアック病を診断し；そして2)セリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であると診断された個体に、セリアック病を予防又は治療するための治療用薬剤を投与することによりセリアック病を予防するか又は治療する方法も提供する。

【0017】

本発明は、上記薬剤を認識するT細胞を寛容にすることによりセリアック病を予防又は治療する方法における使用のための、上で定義された薬剤も、任意にキャリアと共に、提供する。

【0018】

本発明は、T細胞と拮抗することによりセリアック病気を予防又は治療する方法における使用のための、上で定義されたT細胞受容体を認識するT細胞のアンタゴニストも、任意にキャリアと共に、提供する。

【0019】

本発明は、T細胞受容体へ結合することができる配列を含む蛋白質も提供し、但し、T細胞受容体は上で定義された薬剤を認識し、そして上記配列はそのようなT細胞受容体を有するT細胞の拮抗作用を引き起こすことができる。

【0020】

本発明は、上で定義された薬剤又はアンタゴニスト及び薬学上受容可能なキャリア又は希釈剤を含む薬学組成物も提供する。

本発明は、T細胞の生産又は上で定義された薬剤に対する抗体応答を抑圧するために個体をグリアジン蛋白質に対して寛容にするための組成物も提供し、当該組成物は上で定義された薬剤を含む。

【0021】

本発明は、上で定義された薬剤に対するT細胞応答に拮抗するための組成物も提供し、当該組成物は上で定義されたアンタゴニストを含む。

本発明は、その野生型配列がトランスグルタミナーゼにより請求項1において定義された薬剤である配列に修飾され得る変異体グリアジン蛋白質も提供し、当該変異体グリアジン蛋白質は、上で定義された薬剤である配列へのトランスグルタミナーゼによるその修飾を阻害する変異を含み；又は、本発明は少なくとも15アミノ酸の長さであり、且つ上記変異を含む、そのような変異体グリアジン蛋白質の断片を提供する。

【0022】

本発明は、上で定義された蛋白質又は断片をコードするコーディング配列を含むポリヌクレオチドも提供する。

本発明は、上で定義されたポリヌクレオチドを含む細胞又はそのようなポリヌクレオチドにより形質転換された細胞も提供する。

【0023】

本発明は、上で定義されたT細胞受容体を発現する哺乳類も提供する。

本発明は、個体においてセリアック病を診断するか又はセリアック病に対する感受性を診断する方法も提供し、a) i) 配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46、及びそれらの均等物からなる群から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチド；及びii) i) のペプチドを認識するT細胞受容体により認識されることができ、且つ50アミノ酸の長さを超えない、i)の類似体；及びiii)任意に

、i) 及び ii) から選択される薬剤に加えて、配列番号：1 及び配列番号：2 から選択される配列を含む少なくとも一つのエピトープを含むペプチドから選択される少なくとも一つの薬剤を宿主に投与し；そしてb) サンプル中の T 細胞が薬剤を認識するか否かをインビトロにて決定して、T 細胞による認識が、個体がセリアック病を有するか又はセリアック病に感受性であることを示すことを含む。

【0024】

本発明は、組成物がセリアック病を引き起こすことができるか否かを決定する方法も提供し、トランスグルタミナーゼによりオリゴペプチド配列に修飾され得る蛋白質が組成物中に存在するか否かを決定することを含み、蛋白質の存在が、組成物がセリアック病を引き起こし得ることを示す。

10

【0025】

本発明は、上で定義された薬剤を認識する T 細胞のアンタゴニストを同定する方法も提供し、候補物質を T 細胞と接触させ、そして当該物質が T 細胞が抗原特異的応答を受ける能力の低下を引き起こすか否かを決定することを含み、上記能力のそのようなあらゆる低下の検出が、上記物質がアンタゴニストであることを示す。

【0026】

本発明は、上記の方法の何れかを実施するためのキットも提供し、上で定義された薬剤及び T 細胞によるペプチドの認識を検出する手段を含む。

本発明は、セリアック病の治療用の生成物を同定する方法も提供し、セリアック病を有するか又はセリアック病に感受性の候補物質を哺乳類に投与し、そして物質が哺乳類においてセリアック病を予防又は治療するか否かを決定することを含み、セリアック病の予防又は治療が、当該物質が治療用生成物であることを示す。

20

【0027】

本発明は、上で定義されたコーディング配列によりコードされる蛋白質の生産のためのプロセスも提供し、a) 上記蛋白質の発現を可能にする条件下で上記細胞を培養し；そして、b) 発現された蛋白質を回収することを含む。

【0028】

本発明は、トランスジェニック植物細胞を得るための方法も提供し、トランスジェニック植物細胞を供給するために上で定義されたベクターにより植物を形質転換することを含む。

30

【0029】

本発明は、初代トランスジェニック植物を得るための方法も提供し、トランスジェニック植物を提供するために上で定義されたベクターにより形質転換されたトランスジェニック植物細胞を再生することを含む。

【0030】

本発明は、トランスジェニック植物の種子を得るための方法も提供し、上で定義されたとおりに取得可能なトランスジェニック植物からトランスジェニック種子を得ることを含む。

【0031】

本発明は、トランスジェニック子孫植物を得るための方法も提供し、上で定義された方法により取得可能な初代トランスジェニック植物から第 2 世代のトランスジェニック子孫植物を得て、そして任意に、そうして得られた第 2 世代の子孫から一つ又はそれ以上の世代のトランスジェニック植物を得ることを含む。

40

【0032】

本発明は、上記の方法の何れかにより取得可能な、トランスジェニック植物細胞、植物、植物種子又は子孫植物も提供する。

本発明は、上記の植物細胞を含むトランスジェニック植物又は植物種子も提供する。

【0033】

本発明は、上で定義されたトランスジェニック植物細胞、初代植物、植物種子又は子孫から取得可能な上記植物細胞を含む、トランスジェニック植物細胞カルスも提供する。

50

本発明は、収穫生成物を得るための方法も提供し、上記の方法の何れかに従い植物から収穫生成物を回収し、そして任意にさらに回収された生成物を加工することを含む。

【0034】

本発明は、上で定義された蛋白質を含む食物も提供する。

発明の詳細な説明

用語「セリアック病」は、グルテンの感度を変更することにより引き起こされる症状の範囲を包含し、小腸の粘膜により特徴付けられる重度の形態（過形成絨毛萎縮）及び温和な兆候により特徴付けされる他の形態を含む。

【0035】

上で言及された個体（individual）（診断又は治療のコンテキストにおいて）はヒトである。彼らはセリアック病を有するか（兆候があるか又は無兆候）又はそれを有する疑いがある。彼らはグルテンダイエット中であってよい。彼らは急性の相の応答にあってよい（例えば、彼らはセリアック病を有してよいが、彼らがグルテンフリーダイエットを14から28日間行って最後の24時間はグルテンのみを摂取した）。 10

【0036】

個体は、セリアック病に感受性であってよく、例えば遺伝的に感受性であってよい（例えば、セリアック病の親戚を有するか又はセリアック病に対する疾病素因を引き起こす遺伝子を所有する個体により決定される）。

薬品

薬品は、典型的にはペプチドであり、例えば7から50アミノ酸の長さ、例えば10から40、又は15から30アミノ酸の長さである。 20

【0037】

配列番号：1はPQPELPYである。配列番号：2はQLQPFPQPELPYPQSである。配列番号：3は表1に示され、そしてA-グリアジンの全配列である。配列番号：1の4位（配列番号：2の9位に均等）のグルタミン酸は、A-グリアジンのトランスグルタミナーゼ処理により生成される。

【0038】

薬品は、配列番号：1又は2により表されるペプチド又はグリアジン蛋白質由来の単離されたオリゴペプチドである配列番号：1を含む配列を含むエピトープ；又は配列番号：3の相同体である天然のグリアジン蛋白質からのこれら配列の均等物であってよい。即ち、上記エピトープは配列番号：3により表される蛋白質の誘導体であってよい。そのような誘導体は、典型的には、グリアジンの断片、又は蛋白質全体又は断片の変異誘導体である。よって、発明のエピトープは、この天然のグリアジン蛋白質全体を含まず、そして他の天然のグリアジン全体を含まない。 30

【0039】

上記エピトープは、即ち、A-グリアジンの断片（例えば、配列番号：3）であり、配列番号：1の配列を含み、トランスグルタミナーゼにより処理すること（完全又は部分的）により得られるものであって、即ち、1、2、3又はそれ以上のグルタミンがグルタミン酸に置換されている（配列番号：1内での置換を含む）。 40

【0040】

そのような断片は、表1に示す配列番号：3の55から70、58から73、61から77位により表される配列であるか又はそれらの配列を含んでよい。典型的には、そのような断片は、配列番号：1又は2により表されるペプチドがセリアック病の患者からのサンプルを用いて本明細書にて記載されたアッセイの何れかにおいて認識されるのと少なくとも同じ程度にてT細胞により認識される。

【0041】

さらに、上記薬品は、配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46の何れかにより表されるペプチド、又は配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46の何れかに相当する配列を含む蛋白質（例えば、グリアジンをトランスグルタミナーゼで処理した後に配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46の何れか 50

を含むグリアジンの断片)。そのような配列の生物学上活性な断片も発明の薬品である。配列番号：18-22、31-36、39-44、及び46又はこれらの配列の類似体の何れかの配列均等物も、発明の薬品である。

【0042】

上記エピトープが別のグリアジン（例えば、本明細書にて言及されたグリアジン蛋白質の何れか又はセリアック病を引き起こす何れかのグリアジン）由来の上記エピトープ（断片を含む）に均等な配列を含む場合、そのような均等配列は、トランスグルタミナーゼにより典型的に処理された（完全又は部分的）グリアジン蛋白質の断片に相当する。他のグリアジン蛋白質の配列を、オリジナルのエピトープが由来するグリアジン、例えば、配列番号：3と整列させる（aligning）ことにより（例えば、本明細書にて言及されたプログラムの何れかを用いて）、そのような均等ペプチドを決定することができる。トランスグルタミナーゼは市販されている（Sigma T-5398）。表4は、適当な均等配列の僅かな例を提供する。

10

【0043】

類似体である薬品は、(i)又は(ii)を認識するTCRにより認識され得る。よって、一般には、上記類似体が(i)又は(ii)の存在下、典型的には抗原提示細胞(APC)（例えば、本明細書にて言及されたAPCsの何れか）の存在下でも、T細胞に添加された場合、当該類似体は(i)又は(ii)とそのような系において競合し得る。

【0044】

上記類似体は(i)又は(ii)を認識するTCRを結合することができるものであってよい。そのような結合は、標準の技術により試験することができる。そのようなTCRsは（例えば、本発明の方法を用いて）(i)又は(ii)を認識することが示されたT細胞から単離することができる。上記類似体のTCRsへの結合の証明は、類似体に結合する物質、例えば類似体に対する抗体への類似体の結合をTCRsが阻害するか否かを決定することにより、のちに示すことができる。典型的には、上記類似体は、結合アッセイのそのような阻害においてクラスII MHC分子（例えば、HLA-DQ2）に結合する。

20

【0045】

典型的には、上記類似体は(i)又は(ii)のTCRへの結合を阻害する。この場合、類似体存在下でTCRを結合できる(i)又は(ii)の量は低下する。これは、類似体がTCRを結合し、よってTCRへの結合に関して(i)又は(ii)と競合するためである。

30

【0046】

上記の結合実験に使用するための細胞は、セリアック病の患者から、例えば本発明の方法を用いて単離することができる。

類似体の他の結合特性は(i)又は(ii)のそれと同じであってよく、即ち典型的には、類似体はペプチドが結合するのと同じMHCクラスII分子に結合する（HLA-DQ2又は-DQ8）。類似体は、典型的には(i)又は(ii)に特異的な抗体に結合し、即ち、(i)又は(ii)のそのような抗体への結合を阻害する。

【0047】

類似体は、典型的にはペプチドである。それは、(i)又は(ii)と少なくとも70%の相同性、好ましくは少なくとも80%、90%、95%、97%又は99%の相同性を、例えば少なくとも15又はそれ以上（例えば類似体及び／又は(i)又は(ii)の完全長、又はTCRに接触するか又はMHC分子を結合する領域にわたり）連続するアミノ酸の領域にわたり有してよい。蛋白質の相同性を測定する方法は当業界公知であり、当業者には本コンテキストにおいて、相同性がアミノ酸同一性に基づいて計算されることが理解される（ときに、「ハードな相同性」と呼ばれる）。

40

【0048】

例えば、UWCGGパッケージは相同性を計算するために使用できるBESTFITプログラムを提供している（例えば、そのデフォルトセッティングに使用される）（Dev

50

ereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。PILEUP及びBLASTアルゴリズムは相同性を計算するか又は配列をラインアップするのに使用することができ（典型的にはそれらのデフォルトセッティング上で）、Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S. F et al (1990) J Mol 215:403-10に記載されるとおりである

BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、例えば、「www.ncbi.nlm.nih.gov/」においてインターネットを通して全世界のウェブ上でNational Center for Biotechnology Informationを通して公的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中で同じ長さのワードと並べられたときに幾つかの正の値の閾値スコアに適合するか又は当該値を満たす質問配列中の長さWの短いワードを同定することにより、高いスコアリングの配列対(HSPs)を最初に同定することを含む。Tは隣接ワードスコア閾値を意味する(Altschul et al, 前出)。これらの最初の隣接ワードのヒットは、それらを含むHSPsを見つけるための検索を始めるための種として作用する。蓄積したアラインメントスコアがその最大に達成された値から量Xだけ低下する場合；一つ又は複数の負のスコアリング剰余アラインメントの蓄積のため、蓄積したスコアがゼロ又はそれ以下になった場合；又は何れかの配列の末端に到達した場合、各方向におけるワードヒットに関する延長が停止する。BLASTアルゴリズムのパラメーターW, T及びXは、アラインメントの感度と速度を決定する。BLASTプログラムはデフォルトとして11のワードの長さ(W)、50のBLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-1を参照)アラインメント(B)、10の期待値(E), M=5, N=4, 及び両方の鎖の比較を用いる。

【0049】

BLASTアルゴリズムは2つの配列の間の類似性の統計分析を実施する；例えば、Larlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照されたい。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の一つの測定値は、最小合計確率(P(N))であり、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間で偶然に適合する確率の指標を提供する。例えば、第1の配列の第2の配列に対する比較において最小合計確率が約1より低く、好ましくは約0.1より低く、より好ましくは約0.01より低く、そしてもっと好ましくは約0.001より低いなら、配列が他方の配列に類似であると考えられる。

【0050】

相同なペプチド類似体は、(i)又は(ii)と1、2、3、4、5、6、7、8又はそれより多い変異だけ異なるのが典型である(置換、欠失又は挿入であってよい)。これらの変異は、相同性を計算することに関して上記の領域の何れかを横切って測定されてよい。置換は、好ましくは「保存的」である。これらは以下の表により定義される。第2列の同じブロックのアミノ酸、及び好ましくは第3の列の同じラインのアミノ酸を、互いに置換してよい。

【0051】

10

20

30

40

【表 1】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性－非荷電	CSTM
		NQ
	極性－荷電	DE
		KR
芳香族		HFWY

10

【0052】

典型的には、MHC分子を結合するのに寄与するか又はTCRによる認識に必須の、(i)又は(ii)中のアミノ酸に均等な位置における類似体中のアミノ酸は同じか又は保存されている。

【0053】

典型的には、類似体ペプチドは一つ又は複数の修飾を含み、天然の翻訳後修飾又は人工修飾であってよい。修飾は科学的なモイエティ（典型的には、例えばC－H結合の水素の置換による）、例えばアミノ、アセチル、ヒドロキシ又はハロゲン（例えば、フッ素）基又は糖質基を提供してよい。典型的には、修飾はN又はC末端上に存在する。

20

【0054】

類似体は、一つ又は複数の天然アミノ酸、例えば天然アミノ酸とは側鎖が異なるアミノ酸を含んでよい。一般に、非天然アミノ酸はN末端及び／又はC末端を有する。非天然アミノ酸はL－又はD－アミノ酸であってよい。

【0055】

類似体は、典型的には、(i)又は(ii)と実質類似の形態、サイズ、柔軟性又は電子配置を有する。それは、典型的には、(i)又は(ii)の誘導体である。一つの態様において、類似体は、配列番号：1又は2の配列を含む融合蛋白質であるか又は本明細書にて言及された他のペプチドの何れか；及び非グリアジン配列である。

30

【0056】

一つの態様において、類似体は、MHCクラス分子に結合した(i)又は(ii)であるか、又は、を模倣する。2、3、4、又はそれ以上のそのような複合体を、例えば、ビオチン／ストレプトアビジンに基づく系を用いて互いに対合させるか又は結合させてよく、典型的には2、3、又は4つのビオチン標識MHC分子がストレプトアビジンモイエティに結合する。この類似体は、典型的には、(i)又は(ii)／MHCクラスII分子のTCR又は当該複合体に特異的な抗体への結合を阻害する。

【0057】

類似体は、典型的には、抗体又は抗体の断片、例えばFab又は(Fab)₂断片である。類似体は固相上に固定化され、特に、MHC分子に結合したペプチドを模倣する類似体の場合である。

40

【0058】

類似体は、典型的には、コンピューター手段によりデザインされて、当業界公知の方法を用いて合成される。或いは、類似体は、化合物のライブラリーから選択できる。ライブラリーはコンビナトリアルライブラリー、ディスプレイライブラリー、例えばファージディスプレイライブラリーであってよい。化合物のライブラリーはMHCクラスII分子に結合した形態、例えばHLA-DQ2又は-DQ8においてディスプレイライブラリー中で発現されてよい。類似体は、一般に、結合特性(i)又は(ii)を模倣するそれらの能力に基づいてライブラリーから選択される。即ち、それらはTCR又は(i)又は(ii)

50

i) を認識する抗体を結合する能力に基づいて選択してよい。

【0059】

典型的には、類似体は、薬剤 (i) 又は (ii) の何れかと少なくとも同じ程度、例えば均等なエピトープと少なくとも同じ程度まで、好ましくは配列番号：2 により表されるペプチドと同じ程度まで T 細胞により認識され、本明細書にて記載されたアッセイの何れかにおいて認識され、典型的には、セリアック病の患者由来の細胞を用いる。類似体は、インビボにおいてこれらの程度まで認識されてよく、即ち、本明細書にて言及された薬剤の何れかと少なくとも同じ程度までセリアック病の兆候を誘導することができてよい（例えば、ヒト患者又は動物モデルにおいて）。

【0060】

類似体は、発明のエピトープを認識する T 細胞受容体により候補の物質が認識されるか否かを決定することを含み、物質の認識が物質が類似体を認識することを示す方法において同定されてよい。そのような TCRs は本明細書にて言及された TCRs の何れかであってよく、T 細胞上に存在してよい。本明細書にて言及された如何なる適切なアッセイも類似体を同定するのに使用することができる。一つの態様において、この方法はインビボにおいて実施される。上記のとおり、好ましい類似体はペプチド配列番号：2 と少なくとも同じ程度まで認識され、よって、上記の方法はこの程度まで認識される類似体を同定するのに使用してよい。

【0061】

一つの態様において、上記方法は、発明のエピトープの認識を候補配列が阻害するか否かを決定することを含み、認識の阻害が、物質が類似体であることを示す。

上記薬剤は、(i), (ii) 又は (iii) により定義される少なくとも 2、5、10 又は 20 の薬剤を含む生成物であってよい。典型的には、上記組成物は、異なるグリアジン、例えば本明細書にて言及されたグリアジンの種又はバラエティ又は種類の何れかからの発明のエピトープ（又は均等な類似体）を含む。好ましい組成物は、本明細書にて言及された種又はバラエティの何れかの中に存在するグリアジンのすべて、又は 2、3、4、又はそれ以上の本明細書にて言及された種からの（コムギ、ライムギ、オオムギ、エンバク、及びライコムギからなる群から選択される種のパネルから）、発明の少なくとも一つのエピトープ、又は均等類似体を含む。即ち、薬剤は単価又は多価であってよい。

診断

上記のとおり、発明の診断方法は、薬剤を結合する T 細胞の検出又は薬剤を認識する抗体の検出に基づいてよい。

【0062】

上記の方法（上記の使用を含む）において薬剤を認識する T 細胞は、一般に、インビボにおいて予めグリアジンに対して感作された T 細胞である。上記のとおり、そのような抗原一経験 T 細胞は、末梢血中に存在することがわかった。

【0063】

上記の方法において、T 細胞はインビトロ又はインビボにおいて薬剤と接触させることができ、そして T 細胞が薬剤を認識するか否かを決定することをインビトロ又はインビボにて実施することができる。即ち、発明は、ヒトのからだで実施される診断方法においての使用のための薬剤を提供する。異なる薬剤が、そのような方法における、同時、別々、又は連続の使用のために提供される。

【0064】

インビトロの方法は、薬剤が添加された水性溶液内で実施されるのが典型である。当該溶液は T 細胞も含む（及び特定の態様においては、以下に論じられる APCs も）。本明細書にて使用される用語「接触させる」は、特定の物質を溶液に加えることを含む。

【0065】

T 細胞が薬剤を認識するか否かを決定することは、一般には、薬剤の存在下で T 細胞の状態の変化を検出するか、又は T 細胞が薬剤を結合するか否かを決定することにより、達成される。状態の変化は、一般に、TCR が薬剤に結合した後に、T 細胞の抗原特異的機

10

20

30

40

50

能活性により引き起こされる。状態の変化は、T細胞の内部（例えば、蛋白質の細胞内発現の変化）又は外部（例えば、分泌された配列の検出）で測定してよい。

【0066】

T細胞の状態の変化は、T細胞からの物質、例えばサイトカイン、特にIFN- γ 、IL-2又はTNF- α の分泌の開始又は増加であってよい。IFN- γ の分泌の決定が特に好ましい。当該物質は、特異的結合薬剤へのその結合を可能にさせ、次に特異的結合薬剤／物質の複合体の存在を測定することにより検出されるのが典型である。特異的結合薬剤は、典型的には、抗体、例えばモノクローナル抗体である。サイトカインに対する抗体は、市販されており、或いは標準技術を用いて作成することができる。

【0067】

典型的には、特異的結合薬剤は、固相支持体上に固定化される。物質を固相支持体上に固定化させた後に、任意に洗浄することにより、薬剤に非特異的に結合した物質を除去することができる。薬剤／物質複合体は複合体を結合する第2の結合薬剤を用いることにより検出してよい。典型的には、第2薬剤は、第1薬剤を結合する部位とは異なる部位において物質を結合する。第2薬剤は、好ましくは抗体であり、そして、検出可能な標識により直接又は間接に標識される。

【0068】

即ち、第2薬剤は、検出可能な標識により直接又は間接に典型的には標識された第3薬剤により検出してよい。例えば、第2薬剤はビオチンモイエティを含んでよく、ストربتアビジンモイエティ及び典型的にはアルカリホスファターゼを検出可能な標識として含む第3の薬剤による検出を可能にさせる。

【0069】

一つの態様において、使用される検出系は、WO 98/23960に記載されたエキスピボELISPOTアッセイである。そのアッセイにおいて、T細胞から分泌されるIFN- γ は、固相支持体に固定化された第1のIFN- γ 特異的抗体により結合される。結合されたIFN- γ は、次に、検出可能な標識により標識された第2のIFN- γ 特異的抗体を用いて検出される。そのような標識された抗体はMABTECH（ストックホルム、スウェーデン）から得ることができる。使用可能な他の検出可能な標識は以下に論じられる。

【0070】

測定され得るT細胞の状態の変化は、T細胞による物質の取り込み、例えばチミジンの取り込みの増加であってよい。状態の変化は、T細胞のサイズ、又はT細胞の増殖の増加、又はT細胞上の細胞表面マーカーの変化であってよい。

【0071】

一つの態様において、状態の変化は、蛋白質の細胞内発現の変化、例えば上記サイトカインの何れかの細胞内発現の増加を測定することにより、検出される。そのような細胞内変化は、特定の様式にて発現された蛋白質を結合するモイエティにT細胞内部を接触させることにより検出してよく、フローサイトメトリーによるT細胞の分離を可能にさせる。

【0072】

一つの態様において、TCRを結合するとき、薬剤はMHCクラスII分子（典型的にはHLA-DQ2又は-DQ8）に結合し、典型的には抗原提示細胞（APC）の表面上に存在する。しかしながら、本明細書にて言及されたとおり、他の薬剤はMHC分子にも結合する要求なしにTCRを結合することができる。

【0073】

一般に、上記の方法において接触させたT細胞は固体の血液から採取されるが、T細胞を含む他の種類のT細胞を使用することができる。サンプルは、直接アッセイに添加するか又は最初に加工してよい。典型的には、加工は、例えば、水又はバッファーによるサンプルの希釈を含んでよい。典型的には、サンプルを1.5から100倍、例えば2から50倍又は5から10倍希釈する。

【0074】

10

20

30

40

50

加工は、サンプルの成分の分離を含んでよい。典型的には、単核細胞（MCs）をサンプルから分離する。MCsはT細胞とAPCsを含むことになる。即ち、上記の方法において、分離されたMCs内に存在するAPCsは上記ペプチドをT細胞上に提示し得る。別の態様においては、T細胞のみ、例えばCD4⁺ T細胞のみがサンプルから精製され得る。PBMCs、MCs、及びT細胞は、当業界公知の技術、例えばLalvani et al (1997) J. Exp. Med. 186, p 859-865に記載された技術を用いてサンプルから分離することができる。

【0075】

一つの態様において、上記のアッセイにおいて使用されるT細胞は、未加工の形態であるか、又は希釈されたサンプルであるか、又は新たに単離されたT細胞であり（例えば、新たに単離されたMCs又はPBMCsの形態）、エキスビボにて直接使用され、即ち、それらは上記方法において使用される前に培養されない。即ち、T細胞は抗原特異的様式にてインビトロにおいて再刺激されなかった。しかしながら、T細胞は、使用の前に、例えば一つ又は複数の薬剤及び一般には外来の成長促進サイトカインの存在下で培養することができる。培養の間、薬剤は典型的にはAPCs、例えば上記方法で使用されるAPCの表面上に存在する。T細胞の前培養は上記方法の感度の増加を導くかもしれない。即ち、T細胞は、細胞系、例えば短期間の細胞系に変換することができる（例えば、Ota et al (1990) Nature 346, p 183-187に記載されたとおり）。

10

【0076】

上記の方法に典型的に存在するAPCはT細胞と同じ個体から又は別の宿主からであってよい。APCは天然のAPC又は人工のAPCであってよい。APCは上記ペプチドを細胞に提示することができる細胞である。それは典型的にはB細胞、樹状細胞又はマクロファージである。それは典型的にはT細胞と同じサンプルから分離され、典型的にはT細胞と同時に精製される。即ち、APCはMCs又はPBMCs上に存在してよい。APCは典型的には新たに単離されたエキスビボ細胞又は培養細胞である。それは細胞系の形態、例えば短期間細胞系又は不死の細胞系であってよい。APCはその表面上に空のMHCクラスII分子を発現してよい。

20

【0077】

上記の方法において、一つ又は複数の（異なる）薬剤を使用してよい。典型的には、サンプル由来のT細胞をアッセイ中において試験を意図する全ての薬剤と共に置くことができるか、又は各々が一つ又は複数の薬剤を含む別々のアッセイ中に分配して置くことができる。

30

【0078】

本発明は、同時、分離又は連続用途のための（例えばインビボ用途）本明細書にて言及された薬剤の何れか2つ又はそれ以上のような薬剤も提供する（例えば、上で論じられた組成物中に存在する薬剤の組み合わせ）。

【0079】

一つの態様においては、薬剤それ自体を直接T細胞及びAPCsを含むアッセイに加える。上で論じられたとおり、そのようなアッセイにおいてT細胞とAPCsはMCsの形態であり得る。APCsによる提示に関する要求なしにT細胞により認識され得る薬剤を用いる場合、APCsは必要ない。MHC分子に結合させたオリジナルの（i）又は（ii）を模倣した類似体がそのような薬剤の例である。

40

【0080】

一つの態様において、上記薬剤はT細胞の不在下でAPCに提供される。APCは次に、典型的には薬剤をその表面に提示させた後に、T細胞に提供される。上記ペプチドはAPCの内部に拾い上げられて提示されるか、又はAPCの内部に入り込まずに単に表面上に拾い上げられる。

【0081】

薬剤がT細胞と接触する期間は、ペプチドの認識を決定するのに使用される方法しだい

50

で変更される。典型的には 10^5 から 10^7 、好ましくは 5×10^5 から 10^6 の P B M C を各アッセイに添加する。薬剤を直接アッセイに添加する場合、その濃度は 10^{-1} から $10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは 0.5 から $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 又は 1 から $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。

【0082】

典型的には、T細胞を薬剤とインキュベートする時間の長さは、4 から 24 時間、好ましくは 6 から 16 時間である。エキスピボにて P B M C を使用する場合、 0.3×10^6 の P B M C s を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド中で 12 時間 37°C においてインキュベートできることを発見した。

【0083】

T細胞による薬剤の認識の決定は、薬剤の T細胞への結合を測定することにより行つてよい（これは本明細書にて論じられる何れかの適当な結合アッセイを用いて実施できる）。典型的には、薬剤を結合する T細胞は、例えば F A C S マシンを用いてこの結合に基づいて細胞を分離することができる。薬剤を認識する T細胞の存在は、薬剤を用いて分離される細胞の頻度が「対照」値を超える場合に生じるとみなされる。抗原を経験した T細胞の頻度は 10^6 中 1 から 10^3 中 1 であり、よって、分離された細胞が抗原経験 T細胞であるか否かを決定することができる。

【0084】

T細胞による薬剤の認識の決定はインビボにおいて測定してよい。典型的には、薬剤を宿に投与して、次に、薬剤の認識を示す応答を測定してよい。薬剤は、典型的には、皮内又は表皮投与である。薬剤は、典型的には、皮膚の外部に接触させることにより投与され、そしてプラスター又は包帯の補助により当該部位に保持されてよい。或いは、薬剤は針により、例えば注射により投与してよいが、他の方法、例えば弾道 (b a l l i s t i c s)（例えば、核酸をデリバリーするために使用される弾道技術）により投与することもできる。E P - A - 0 6 9 3 1 1 9 は、薬剤を投与するために典型的に使用できる技術を記載する。典型的には、0.001 から $1000 \mu\text{g}$ 、例えば 0.01 から $100 \mu\text{g}$ 又は 0.1 から $10 \mu\text{g}$ の薬剤を投与する。

【0085】

一つの態様において、インビボにおいて薬剤を提供することができる生成物を投与できる。即ち、薬剤を発現できるポリヌクレオチドを投与することができ、典型的には、薬剤の投与のための上で記載された様式の何れかによる。ポリヌクレオチドは、典型的には、以下に論じられる、発明により提供されるポリヌクレオチドの特性の何れかを有する。典型的には、0.001 から $1000 \mu\text{g}$ 、例えば 0.01 から $100 \mu\text{g}$ 又は 0.1 から $10 \mu\text{g}$ のポリヌクレオチドを投与する。

【0086】

皮膚に投与される薬剤の認識は、典型的には、投与部位における炎症の発症により示唆される（例えば、硬化、紅斑又は浮腫）。これは、一般に、当該部位における目視試験により判断される。

【0087】

薬剤を結合する抗体の検出に基づく診断法は、典型的には、個体からのサンプル（本明細書にて言及されたサンプルの何れかで、任意に本明細書にて言及された様式の何れかにより加工された）を薬剤と接触させ、そしてサンプル中の抗体が薬剤を結合するか否かを決定することにより実施され、そのような結合が、個体がセリアック病を有するか又は感受性であるかを示す。結合アッセイのあらゆる適当なフォーマット、例えば本明細書にて言及されたあらゆるそのようなフォーマットを使用してよい。

治療

本明細書にて記載された免疫上優勢なエピトープ及び他のエピトープの同定は、このエピトープを認識する T細胞を標的とする治療用生成物が作成されるのを可能にさせる（そのような T細胞はグリアジンに対する免疫応答に参加するものである）。これらの発見は、抗体又はエピトープに対する T細胞応答を抑圧（寛容）することによりセリアック病の

10

20

30

40

50

予防又は治療を可能にもする。

【0088】

発明の特定の薬剤は、発明のエピトープを認識するTCRを結合し（上で論じられた結合アッセイの何れかをを用いて測定されたとおり）、そしてTCRを有するT細胞の寛容を導く。そのような薬剤は、任意にキャリアと共に、従ってセリアック病を予防又は治療するのに使用することができる。

【0089】

一般に、寛容は、（TCRによりされた後に）T細胞の抗原特異的機能活性を導き得る同じペプチドにより導かれ得る（例えば、本明細書にて言及されたそのような活性、例えばサイトカインの分泌）。そのような薬剤は「寛容」コンテキストにおいて免疫系に対して提示される時に寛容を導く。 10

【0090】

寛容は免疫系によるT細胞又は抗体エピトープの認識の低下を導く。T細胞エピトープの場合、これは、エピトープを認識するT細胞の欠失又はアネルギーにより導かれ得る。即ち、エピトープに応答するT細胞活性（例えば、本明細書にて言及された適当なアッセイにおいて測定されたとおり）が低下する。抗体応答の寛容は、エピトープが投与されたときに、エピトープに対する特異的抗体の量の低下が生じることを意味する。

【0091】

そのようなコンテキストにおいて免疫系に対して抗原を提示する方法は公知であり、例えば、Yoshida et al. Clin. Immunol. Immunopathol 82, 207-215 (1997), Thuau et al. Clin Exp. Immunol. 109, 370-6 (1997)、及びWeiner et al. Res. Immunol. 148, 528-33 (1997)に記載されている。特に、特別の投与経路が寛容を導き得て、例えば、経口、鼻内又は腹膜内である。寛容は樹状細胞及びテトラマー提示ペプチドにより達成してもよい。寛容を導く特定の生成物を個体に投与してよい（例えば、薬剤も含む組成物中で）。そのような生成物は、サイトカイン、例えばTh2応答を好むサイトカインを含む（例えば、IL-4, TGF- β 又はIL-10）。生成物又は薬剤は、寛容を導く用量にて投与してよい。 20

【0092】

発明は、T細胞のアンタゴニストとして作用することができる配列を含む蛋白質を提供する（そのT細胞は薬剤を認識する）。そのような蛋白質及びそのようなアンタゴニストはセリアック病を予防又は治療するのに使用することもできる。アンタゴニストはT細胞応答の低下を導く。一つの態様において、アンタゴニストはT細胞のTCRに結合する（一般に、HLA-DQ2又は-DQ8との複合体の形態にて）が、正常な機能活性化を導く代わりに、T細胞内シグナリングカスケードを通して異常なシグナルを通過させることを導き、T細胞が低下した機能活性を持つように導く（例えば、エピトープの認識に応答して、典型的には本明細書にて言及された適当なアンタゴニストの何れかにより測定される）。 30

【0093】

一つの態様において、アンタゴニストはエピトープとMHCプロセッシング及び提示の経路の成分への結合、例えばMHC分子（典型的には、HLA-DQ2又は-DQ8）に関して競合する。即ち、アンタゴニストは、HLA-DQ2又は-DQ8（即ち、このMHC分子により提示されるペプチドである）、例えばペプチドTP（表10）又はその相同体を結合してよい。 40

【0094】

拮抗作用を導く方法は、当業界公知である。一つの態様において、アンタゴニストは上で言及されたエピトープの相同体であり、そして配列の何れか、結合又は薬剤の他の特性を有してよい（特に、類似体）。アンタゴニストは、典型的には、上記のエピトープの何れかとは（T細胞内で正常な抗原特異的機能を導くことができる）、1、2、3、4又はそれ以上の変異だけ（各々は置換、挿入又は欠失であってよい）異なる。そのようなアン 50

タゴニストは当業界において「変更されたペプチドリガンド」又は「A P L」と呼ばれる。変異は、典型的には、T C Rに接触するアミノ酸位置においてである。

【0095】

アンタゴニストはA-グリアジンのアミノ酸65から67により表される配列に均等な配列内の置換によりエピトープと異なってよい（表9に示すようなアンタゴニスト）。即ち、好ましくは、アンタゴニストは64、65又は67位の均等なものにおいて置換を有する。好ましくは、置換は、64W、67W、67M又は65Tである。

【0096】

個体における発明のエピトープに対するT細胞の免疫応答はポリクローナルであるから、1より多いアンタゴニストが投与されることにより、異なるT C R sを有する応答のT細胞の拮抗作用を導いてよい。よって、アンタゴニストは少なくとも2、4、6又はそれより多いアンタゴニストを含む組成物中で投与されてよく、各々が異なるT細胞と拮抗する。

【0097】

発明は、（上記薬剤を認識する）T細胞のアンタゴニストを同定する方法も提供し、候補物質をT細胞と接触させ、そしてT細胞が抗原特異的応答を経る能力の低下を当該物質が導くか否かを検出することを含み（例えば、本明細書にて言及された何れかの適当なアンタゴニストを用いて）、上記能力のあらゆるそのような低下の検出が物質がアンタゴニストであることを示す。

【0098】

一つの態様において、アンタゴニスト（特定のエピトープに対する複数のアンタゴニストの組み合わせを含む）又は寛容（T細胞及び抗体寛容）薬剤は、発明の異なるエピトープに対して、例えば1より多い物質を含む生成物である薬剤に関して上で論じられたエピトープの組み合わせに対して、拮抗するか又は寛容する少なくとも2、4、6又はそれより多いアンタゴニスト又は薬剤を含む組成物中に存在する。

組成物がセリアック病を引き起こすか否かを試験する

上で論じられたとおり、発明は、組成物がセリアック病を引き起こすことができるか否かを決定する方法を提供し、トランスグルタミナーゼにより発明の薬剤又はエピトープを含む配列に修飾され得る蛋白質配列の存在を検出することを含む（そのようなトランスグルタミナーゼ活性はヒトの腸のトランスグルタミナーゼ活性であってよい）。典型的には、これは、特定の様式にて配列に結合するモイエティを組成物に接触させる結合アッセイを用いて実施され、そして配列／モイエティ複合体の形成を検出して薬剤の存在を確認するのに使用する。そのようなモイエティは、本明細書にて言及された何れかの適当な物質（又は物質の種類）であってよく、そして典型的には特異的抗体である。結合アッセイのあらゆる適当なフォーマットを使用することができる（例えば、本明細書にて言及されたもの）。

【0099】

一つの態様において、上記組成物を、異なるグリアジン由来の発明のエピトープに特異的な少なくとも2、5、10又はそれより多い抗体、例えば、1よりも多い物質を含む生成物である発明の薬剤に関して上で論じられたエピトープの組み合わせを認識することができる抗体のパネルに接触させる。

【0100】

上記組成物は、典型的には、セリアック病を引き起こし得るグリアジンを発現する植物由来の材料を含む（例えば、本明細書にて言及されたグリアジン又は植物の何れも）。そのような材料は植物の一部、例えば収穫された作物（例えば、種子）であってよい。材料は植物材料の加工された生成物（例えば、本明細書にて言及されたあらゆるそのような生成物）、例えばグリアジンを含む穀粉又は食物であってよい。食物材料の加工及び適当な結合アッセイにおける試験は日常的であり、例えばK r i c k a L J, J. B i o l u m i n. C h e m i l u m i n. 13, 189-93 (1998)に言及されたとおりである。

10

20

30

40

50

結合アッセイ

本明細書にて言及された2つの物質間の結合の決定は、結合に際して変化する一方又は両方の物質の特性、例えば分光学的変化を測定することにより実施してよい。

【0101】

結合アッセイフォーマットは「バンドシフト」系であってよい。これは、一つの物質（例えば、候補物質）の存在がゲル電気泳動の間に他の物質の進行を進めさせるか又は遅らせるかを決定することを含む。

【0102】

上記フォーマットは、一つの物質が他の物質、例えば特異的抗体に結合することが知られている薬剤に対する他の物質の結合を阻害できるか否かを決定する、競合結合法であってよい。 10

変異体グリアジン蛋白質

発明は、本発明の配列又はそのような配列を提供するためにトランスグルタミナーゼにより修飾され得る配列が変異することによりもはやエピトープを認識するT細胞応答を導かないか又はエピトープを認識するT細胞応答により認識されないような、グリアジン蛋白質を提供する。このコンテキストにおいて、用語認識はT細胞の正常な（非拮抗）抗原－特異的機能活性が生じるような様式におけるエピトープのTCR結合を意味する。

【0103】

他のグリアジンにおいて均等なエピトープを同定する方法は、上で論じられている。変異したグリアジンの野生型は、セリアック病を引き起こすものである。そのようなグリアジンは、例えば配列番号：3の全域又は配列番号：3の15、30、60、100又は200の連続するアミノ酸にわたり上記の程度（類似体に関して）、配列番号：3に相同性を有してよい。同様に、他の非-A-グリアジンに関しては、そのグリアジンの変異体と天然形態の間に相同性が存在することになる。他の天然グリアジン蛋白質の配列は当業界公知である。 20

【0104】

変異したグリアジンはセリアック病を引き起こさないか、又はセリアック病の兆候の低下を導く。典型的には、エピトープがT細胞応答を誘導する能力を変異が低下させる。変異したエピトープはHLA-DQ2又は-DQ8に対する低下した結合、APCにより提示される能力の低下、又は薬剤を認識するT細胞に結合するか又は当該T細胞により認識される能力（即ち、抗原－特異的機能活性）の低下を有してよい。変異したグリアジン又はエピトープは、よって、発明の診断の側面に関して、本明細書にて言及されたアッセイの何れかにおいて認識を示さないか又は低下した認識を示すことになる。 30

【0105】

上記変異は、上記エピトープ中の1から3、4から6、6から10、11から15又はそれより長い長さの一つ又はそれより多い欠失、付加又は置換であってよく、例えば、配列番号：2の配列にわたるか、配列番号：18-22、31-36、39-44及び46の何れかにわたるか、又はそれらの均等物にわたる。好ましくは、上記変異グリアジンは、配列番号：1の配列内に少なくとも一つの変異を有する。好ましい変異は、A-グリアジン中の65位である（又は他のグリアジン中の均等な位置）。典型的には、この位置において天然に生じるグルタミンは、表3に示されるアミノ酸の何れか、好ましくはヒスチジン、チロシン、トリプトファン、リジン、プロリン又はアルギニンにより置換される。 40

【0106】

発明は、即ち、グリアジン蛋白質のエピトープ内の変異（本明細書にて論じられる何れかの配列中の変異のそのような変異）の用途も提供し、当該エピトープは本発明のエピトープであり、グリアジン蛋白質がセリアック病を引き起こす能力を低下させる。

【0107】

一つの態様において、変異した配列はアンタゴニストとして作用することができる。即ち、発明は、T細胞受容体に結合することができる配列を含む蛋白質を提供し、T細胞受容体は発明の薬剤を認識し、そして配列はそのようなT細胞受容体を認識するT細胞の拮 50

抗作用を導くことができる。

【0108】

発明は、上記変異グリアジン蛋白質の断片である蛋白質も提供し、それらは少なくとも15アミノ酸の長さ（例えば、少なくとも30、60、100、150、200又は250アミノ酸長）であり、そしてグリアジンが認識される能力を低下させる上で論じられた変異を含む。上で言及された変異蛋白質の何れも（断片を含む）、例えば他のグリアジン又は非グリアジン蛋白質と融合蛋白質の形態で存在してもよい。

【0109】

変異グリアジン蛋白質に対する均等な野生型蛋白質は、典型的には、イネ科の单子葉植物、例えばコムギ（*Triticum*）属の植物、例えば、コムギ、ライムギ、オオムギ、エンバク又はライコムギに由来する。蛋白質は、典型的には、 α 、 $\alpha\beta$ 、 γ 又は ω グリアジンである。グリアジンはA-グリアジンであってよい。

キット

発明は、一つ又はそれより多い薬剤、及び任意にT細胞による薬剤の検出のための手段を含む、上記方法を実施するためのキットも提供する。典型的には、異なる薬剤を、同時、別々又は連続する使用のために提供する。提供、認識を検出する手段は、上で論じられた技術に基づいて検出を可能にするか又は補助する。

【0110】

即ち、上記手段は、認識後にT細胞により分泌された物質の検出を可能にしてよい。上記キットは、即ち、物質、例えば抗体のための特異的結合モイエティをさらに含んでよい。当該モイエティは、典型的には、IFN- γ に特異的である。当該モイエティは典型的には固相支持体に固定化される。これは、モイエティを結合した後に、上記物質がそれを分泌するT細胞の付近に残ることを意味する。即ち、物質／モイエティ複合体の「スポット」が支持体上に形成され、各スポットが物質を分泌するT細胞を表す。スポットを定量し、そして典型的には対照に対して比較することにより、薬剤の認識の決定を可能にする。

【0111】

上記キットは、物質／モイエティ複合体を検出する手段も含む。検出可能な変化、例えば色の変化が、物質を結合後にモイエティ自身に生じる。或いは、第2のモイエティが直接又は間接に検出のために標識され、スポットの決定を可能にするように物質／モイエティ複合体を結合することを可能にしてよい。上で論じられたとおり、第2モイエティは物質に対して特異的であってよいが、第1モイエティとは上記物質に対して異なる部位において結合する。

【0112】

固定化された支持体はウェルを有するプレート、例えばマイクロタイタープレートであってよい。各アッセイは、よって、プレート中の別々のウェル内で実施され得る。

上記キットは、さらに、T細胞のための培地、検出モイエティ又は検出工程において使用される洗浄バッファーを含んでよい。上記キットは、さらに、サンプルからの分離に適した試薬、例えばサンプルからのPBMCs又はT細胞の分離に適した試薬を含んでよい。上記キットは、サンプルの成分の如何なる分離も無しに、サンプルからのT細胞の直接の同定を可能にするようにデザインしてよい。

【0113】

上記キットは、対照、例えば陽性対照又は陰性対照も含んでよい。陽性対照は検出系が試験されるのを可能にしてよい。即ち、陽性対照は、典型的には、上記方法の何れかにおいて薬剤の認識を模倣する。典型的には、インビトロにおいて認識を決定するためにデザインされたキットにおいては、陽性対照はサイトカインである。薬剤のインビボの認識を検出するためにデザインされたキットにおいては、陽性対照はほとんどの個体が認識すべき抗原であってよい。

【0114】

上記キットは、宿主からのT細胞を含むサンプル、例えば血液サンプルを採取するため

10

20

30

40

50

の手段も含んでよい。上記キットは、宿主からのサンプルから単核細胞又はT細胞を分離するための手段を含んでよい。

ポリヌクレオチド、細胞、トランスジェニック哺乳類及び抗体

発明は、薬剤又は変異グリアジン蛋白質を提供するための発現可能なポリヌクレオチドも提供する。典型的には、当該ポリヌクレオチドは、DNA又はRNAで、単鎖又は二重鎖である。当該ポリヌクレオチドは、好ましくは、少なくとも50塩基又は塩基対、例えば50から100、100から500、500から1000又は1000から2000又はそれより多い塩基又は塩基対を含むことになる。当該ポリヌクレオチドは、よって、配列番号：1又は2又は本明細書にて言及された他の薬剤の何れかの配列をコードする配列を含む。このコーディング配列の5'及び3'に、発明のポリヌクレオチドは対応するグリアジン遺伝子内のこれら配列に対して5'及び3'の配列又はコドンと異なる配列又はコドンを有する。

10

【0115】

上記ペプチドをコードする配列に対して5'及び／又は3'に、上記ポリヌクレオチドはコーディング配列又は非コーディング配列を有する。コーディング配列に対して5'及び／又は3'の配列は、上記薬剤をコードする配列の発現、例えば、転写及び／又は翻訳を助ける配列を含んでよい。上記ポリヌクレオチドは、原核又は真核細胞において上記薬剤を発現することができてよい。一つの態様において、上記ポリヌクレオチドは、哺乳類細胞、例えばヒト、霊長類又は齧歯類（例えば、マウス又はラット）細胞内で上記薬剤を発現することができる。

20

【0116】

発明のポリヌクレオチドは、バックグラウンドを顕著に超えるレベルで配列番号：3をコードするポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズしてよい。選択的ハイブリダイゼーションは、典型的には、中から高いストリンジェンシー（例えば、0.03M塩化ナトリウム及び0.03Mクエン酸ナトリウム、約50℃から約60℃において）の条件下で達成される。しかしながら、そのようなハイブリダイゼーションは当業界公知のあらゆる適切な条件下で実施してよい（Sambrook et al (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manualを参照）。例えば、高いストリンジェンシーが必要なら、適切な条件は0.2xSSC、60℃を含む。低いストリンジェンシーが必要なら、適切な条件は2xSSC、60℃を含む。

30

【0117】

発明の薬剤又は蛋白質は、本明細書にて記載されるポリヌクレオチドによりコードされてよい。

当該ポリヌクレオチドは、複製可能なベクターを形成するか又はベクターに取り込まれてよい。そのようなベクターは、適当な細胞中で複製することができる。当該ベクターは、発現ベクターであってよい。そのようなベクターにおいて、発明のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの発現を提供することができる制御配列に作動可能に連結される。当該ベクターは、選択可能なマーカー、例えばアンピシリン耐性遺伝子を含んでよい。

【0118】

上記ポリヌクレオチド又はベクターは細胞中に存在してよい。そのような細胞は上記ポリヌクレオチド又はベクターにより形質転換されていてよい。当該細胞は上記薬剤を発現してよい。当該細胞は上記ベクターに適合可能なように選択され、そして、例えば、原核（細菌）、酵母、昆虫又は哺乳類の細胞であってよい。当該ポリヌクレオチド又はベクターは、リン酸カルシウム沈殿法、DEAE-デキストランスフエクション、又はエレクトロポレーションを含む慣用技術を用いて宿主細胞に導入されてよい。

40

【0119】

発明は、組換え手段による発明の蛋白質の生産のためのプロセスを提供する。これは、(a)蛋白質の発現を可能にさせる条件下で上で定義された形質転換細胞を培養し；そして好ましくは(b)発現されたポリペプチドを回収することを含んでよい。任意に、上記ポリペプチドは、当業界公知の技術により単離され、及び／又は、精製されてよい。

50

【0120】

発明は、そのような認識（又は結合）が可能な薬剤又はその断片を認識する（又は結合する）TCRsも提供する。これらは、発明の蛋白質に関して本明細書にて論じられた本明細書にて言及された如何なる形態でも存在し得る（例えば、精製度）。発明は、発明の細胞に関して本明細書にて論じられた如何なる形態でも存在し得る（例えば、精製度）そのようなTCRsを発現するT細胞も提供する。

【0121】

発明は、薬剤（例えば、発明のエピトープ）を特異的に認識しそして発明の変異グリアジン蛋白質を認識する（そして典型的には均等な野生型グリアジンを認識しない）薬剤を特異的に認識するモノクローナル又はポリクローナル抗体、及びそのような抗体を作成する

10

【0122】

この発明のために、用語「抗体」は、抗体断片、例えば、Fv、F(ab)及びF(ab)₂断片、並びに一本鎖抗体を含む。

ポリクローナル抗体を生産する方法は、適当な宿主動物、例えば実験動物を免疫源で免疫し、そして血清からイムノグロブリンを単離することを含む。上記動物は、よって、免疫源を接種されてよく、次に血液を当該動物から採取し、そしてIgG分画を精製する。モノクローナル抗体を生産する方法は、所望の抗体を生産する細胞を不死にすることを含む。ハイブリドーマ細胞は、接種された実験動物からの脾臓細胞を腫瘍細胞と融合することにより生産してよい（Kohler and Milstein (1975) Nature 256, 495-497）。

20

【0123】

所望の抗体を生産する不死の細胞を慣用の手法により選択してよい。ハイブリドーマは、培養液中で培養されるか、又は腹水液の形成のために腹膜内に注射されるか、又は同種の宿主又は免疫上無防備状態の宿主の血流に注射されてよい。ヒトの抗体は、ヒトリンパ球のインビトロ免疫、続くエプスタインバーウイルスによるリンパ球の形質転換により製造してよい。

【0124】

モノクローナル抗体は及びポリクローナル抗体はの両方の生産のためには、実験動物は、ヤギ、ウサギ、ラット又はマウスが適している。所望なら、免疫源は、例えばアミノ酸残基の一つの側鎖を通して免疫源が適当なキャリアーにカップリングされるようにコンジュゲートとして投与してよい。得られた抗体は、単離し、そして所望なら精製してよい。

30

【0125】

発明のポリヌクレオチド、薬剤、蛋白質、又は抗体は、検出可能な標識を有してよい。分泌された物質を可視検査により、任意に光学拡大手段の補助により、分泌された物質の検出を可能にする検出可能な手段は、好ましい。そのような系は、典型的には、基質中の色の変化を導く酵素標識に基づき、例えば、基質中の色の変化を導くアルカリホスファターゼである。そのような基質は市販されており、例えば、BioRadからである。他の適当な標識は、他の酵素、例えばペルオキシダーゼ、又は蛋白質標識、例えばビオチン；又は放射性標識、例えば³²P又は³⁵Sを含む。上記の標識は、公知の技術を用いて検出してよい。

40

【0126】

発明のポリヌクレオチド、薬剤、蛋白質、又は抗体は、実質上精製形態であってよい。それらは、製造物中のポリヌクレオチド、ペプチド抗体、細胞又は乾燥塊（dry mass）の少なくとも80%、例えば少なくとも90、95、97又は99%を一般に含む、実質上の単離された形態にあってよい。ポリヌクレオチド、薬剤、蛋白質又は抗体は、典型的には、他の細胞成分を実質上含まない。当該ポリヌクレオチド、薬剤、蛋白質又は抗体は、そのような実質上単離されたか、精製されたか、又は遊離の形態にて上記方法において使用されるか、又はそのような形態で容器キット中に存在してよい。

【0127】

50

発明は、発明の T C R を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳類も提供する。これは、本明細書にて論じられた哺乳類の何れかであってよい（例えば、上記抗体の生産に関して）。好ましくは、当該哺乳類は、セリアック病を有するか又は感受性である。当該哺乳類は H L A - D Q 2 又は - D Q 8 又は H L A - D R 3 - D Q 2 を発現してもよく、及び／又は、セリアック病を引き起こすグリアジンを含むダイエツトを与えられてよい（例えば、本明細書にて言及されたグリアジン蛋白質の何れか）。即ち、上記哺乳類はセリアック病の動物モデルとして機能してよい。

【0128】

発明は、セリアック病の治療用の生成物を同定する方法も提供し、セリアック病を有するか又は感受性の発明の動物に候補物質を投与し、そして当該哺乳類において物質がセリアック病を予防するか又は治療するか否かを決定することを含み、セリアック病の予防又は治療が、上記物質が治療用生成物であることを示す。そのような生成物はセリアック病を予防又は治療するのに使用してよい。

10

【0129】

発明は、治療用（予防用を含む）薬剤又は診断用（発明の薬剤、蛋白質及びポリヌクレオチド）薬剤を提供する。これらの物質は、薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤とそれらを混合することにより臨床投与のために製剤化される。例えば、それらは、局所、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、眼球内、皮膚内、表皮内、経皮投与のために製剤化され得る。上記物質は、薬学上受容可能であって且つ所望の投与経路のために適切なあらゆる媒体と混合してよい。注射のための薬学上受容可能なキャリアー又は希釈剤は、例えば滅菌又は等張溶液、例えば注射用の水又は生理食塩水、又は弾道デリバリー用のキャリアー粒子であってよい。

20

【0130】

物質の用量は、様々なパラメーターに従い、特に使用される薬剤；処置される患者の年齢、体重及び状態；使用される投与様式；処置される症状の重度；及び要求される臨床上の養生法に従い調節してよい。規準として、注射により投与される物質の量は、0.01 mg / kg から 30 mg / kg、好ましくは 0.1 mg / kg から 10 mg / kg が適している。

【0131】

記載された投与経路及び用量は規準としてのみ意図されるが、何故ならば熟練した開業医はあらゆる特定の患者及び症状に関して投与の最適な経路及び用量を決定することができるからである。

30

【0132】

発明の物質は、即ちヒト又は動物の身体の治療方法、又はヒト身体に実施される診断法において使用してよい。特に、それらは、セリアック病を治療又は予防する方法において使用してよい。発明は、セリアック病を治療又は予防するための医薬の製造法における使用のための薬剤も提供する。即ち、発明は、その要求のあるヒトへ発明の物質を投与することを含むセリアック病の予防又は治療法を提供する（典型的には、その非毒性有効量）。

【0133】

発明の薬剤は、標準の合成価額技術、例えば自動化された合成器の使用により作成することができる。上記薬剤は、より長いポリペプチド、例えば融合蛋白質から作成してよく、そのようなポリペプチドは上記ペプチドの配列を含む。当該ペプチドは、例えばポリペプチドを加水分解することにより、例えばプロテアーゼの使用により；又は物理的にポリペプチドを破壊することにより、ポリペプチドに由来し得る。発明のポリヌクレオチドは標準の技術、例えば合成器を使用することにより、作成することができる。変異グリアジン蛋白質を発現するか又はアンタゴニストとして作用し得る配列を含む蛋白質を発現する植物細胞又は植物

40

発明の細胞は、植物細胞、例えばイネ科の単子葉植物種の細胞であってよい。当該種は、その野生型形態がグリアジン、本明細書にて言及されたグリアジン蛋白質の何れかを発

50

現する種であってよい（配列番号：3に対して何れかの程度の相同性を有するグリアジンを含む）。そのようなグリアジンはヒトにおいてセリアック病を引き起こすかもしれない。上記細胞は、コムギ、トウモロコシ、エンバク、ライムギ、イネ、オオムギ、ライコムギ、モロコシ、又はサトウキビの細胞であってよい。典型的には、上記細胞は、コムギ（*Triticum*）属、例えばパンコムギ（*aestivum*）、スペルトコムギ（*speltum*）、ポーランドコムギ（*polonicum*）又はヒトツブコムギ（*monococcum*）の細胞である。

【0134】

発明の植物細胞は、典型的には、野生型グリアジンを発現しない（例えば、セリアック病を引き起こすかもしれない本明細書にて言及された何れかのグリアジン）か、又は薬剤を認識するT細胞により認識され得る配列を含むグリアジンを発現しないものである。即ち、野生型植物細胞がそのようなグリアジンを発現するなら、そのときは、そのようなグリアジンの発現を阻害するか低下させるか又はもはやセリアック病を引き起こさないようにグリアジンのアミノ酸配列を変化させるように操作してよい（典型的には、発明のエピトープをもはや発現させないことにより）。

10

【0135】

これは、変異を、例えば1、2、3又はそれより多いか又は全てのそのようなグリアジン遺伝子へ細胞内で導入すること、例えばコーディング又は非コーディング（例えば、プロモーター）へ導入することにより実施することができる。そのような変異は、本明細書にて論じられた変異の種類又は長さの何れかであり得る（例えば、相同蛋白質に関して）。上記変異は、直接様式（例えば、部位特異的変異導入又は相同組換え技術を用いて）又はランダムな様式（例えば、変異源を用い、次に典型的にはグリアジン（又はセリアック病を引き起こすグリアジン配列）をもはや発現しない変異導入された細胞を選択することにより）にて導入することができる。

20

【0136】

アンタゴニストとして作用し得る配列を含む蛋白質を発現する植物又は植物細胞の場合、そのような植物又は植物細胞は野生型グリアジン蛋白質を発現してよい（例えば、セリアック病を引き起こすもの）。好ましくは、アンタゴニスト配列の存在は、上記植物又は植物細胞由来の蛋白質を含む食物を摂取した個体において低下した兆候（例えば兆候なし）のセリアック病を引き起こす。

30

【0137】

植物細胞内に存在する（か又はに形質転換された）ポリヌクレオチドは、一般に、植物細胞内で変異グリアジン蛋白質を発現できるプロモーターを含む。所望の発現のパターンに依存して、上記プロモーターは、構成的、組織特異的、ステージ特異的；及び／又は誘導可能性であってよい。例えば、植物における強い構成的発現は、CAMV35S、Rubisco ssu又はヒストンプロモーターにより得ることができる。また、組織特異的又はステージ特異的プロモーターは、トランスジェニック植物において特定の組織へ又はその発生において特定のステージへ、発明の蛋白質の発現を標的化するために使用してよい。即ち、例えば、種子特異的、根特異的、葉特異的、花特異的等のプロモーターを使用してよい。種子特異的プロモーターは、Dalta et al（*Biotechnology Ann. Rev.*（1997），3，pp. 269-296）に記載されたものを含む。種子特異的プロモーターの特定の例は、napinプロモーター（EP-A-0255,378）、ファセオリンプロモーター、グルテニンプロモーター、ヘリアンセニンプロモーター（WO98/45461）及びATS1及びATS3プロモーター（PCT/US98/06798）を含む。

40

【0138】

上記細胞はあらゆる形態であってよい。例えば、単離された細胞、例えばプロトプラストであってよい、又は植物組織の一部、例えばカルス又は植物から切り出された組織であってよい、又は植物全体の一部であってよい。上記細胞はあらゆる種類の細胞であってよい（例えば、植物の部分のあらゆる種類）。例えば、分化しない細胞、例えばカルス

50

細胞；又は分化した細胞、胚、花粉、根、若枝（s h o o t s）又は葉に見いだされる種類の細胞。植物の部分は、根；若枝；葉及び生殖に關与する部分、例えば、花粉、卵、おしべ、葯、花卉、萼片、及び他の花の部分を含む。

【0139】

発明は、トランスジェニック植物細胞を提供するように発明のポリヌクレオチド又はベクターにより植物細胞を形質転換することを含む、トランスジェニック植物細胞を得るための方法を提供する。あらゆる適切な形質転換方法を使用してよい（コムギの場合、V a s i l V e t a l, B i o t e c h n o l o g y 10, 667-674（1992）に開示された技術を使用してよい）。好ましい形質転換技術は、植物プロトプラストのエレクトロポレーション及び粒子の砲撃を含む。形質転換は、即ち、幾つかの細胞がトランスジェニックで幾つかはそうでないようなキメラ組織又は植物を生じてよい。

【0140】

発明の細胞又はそうして得られた細胞は、当業界公知の技術によりトランスジェニック植物へ再生されてよい。これらは、トランスジェニック細胞の生育及び／又は分割を刺激するための、オーキシン、ジベレリン及び／又はサイトキニンのような植物成長物質の使用を含んでよい。同様に、体性胚形成及び分裂組織培養のような技術を使用してよい。再生技術は当業界にて公知であり、例えば、米国特許第4, 459, 355号、米国特許第4, 536, 475号、米国特許第5, 464, 763号、米国特許第5, 177, 010号、米国特許第5, 187, 073号、欧州特許267, 159, 欧州特許604, 662, 欧州特許672, 752、米国特許第4, 945, 050号、米国特許第5, 036, 006号、米国特許第5, 100, 792号、米国特許第5, 371, 014号、米国特許第5, 478, 744号、米国特許第5, 179, 022号、米国特許第5, 565, 346号、米国特許第5, 484, 956号、米国特許第5, 508, 468号、米国特許第5, 538, 877号、米国特許第5, 554, 798号、米国特許第5, 489, 520号、米国特許第5, 510, 318号、米国特許第5, 204, 253号、米国特許第5, 405, 765号、欧州特許442, 174, 欧州特許486, 233、欧州特許486, 234、欧州特許539, 563、欧州特許674, 725、WO91／02071及びWO95／06128に見いだすことができる。

【0141】

そのような多くの技術において、一つの工程は、細胞を膨張させる及び／又は分割することを含む、カルス、即ち細胞組織の形成である。そのようなカルスは他の種類の植物細胞培養物及び植物の部分であるように、発明の別の側面である。即ち、例えば、発明は、トランスジェニック植物組織及び部分を提供するが、胚、分裂組織、種子、若枝、根、幹、葉及び花の部分を含む。これらは、それらの細胞の幾つかが発明の細胞であり幾つかはそうでない感覚において、キメラであってよい。発明のトランスジェニック植物部分及び組織、植物及び／又は種子は、本明細書にて言及された植物種の何れかのものであってよい。

【0142】

再生手法は、典型的には、マーカー遺伝子による、形質転換された細胞の選択を含む。

再生工程は、第1世代のトランスジェニック植物を生じる。発明は、この第1世代植物からのさらなる再生のトランスジェニック植物を得るための方法も提供する。これらは子孫トランスジェニック植物として知られる。第2、第3、第4、第5、第6及びさらなる世代の子孫植物は、当業界公知のあらゆる手段により第1世代のトランスジェニック植物から得てよい。

【0143】

即ち、発明は、トランスジェニック子孫植物を得る方法を提供し、発明の第1世代のトランスジェニック植物から第2世代のトランスジェニック子孫植物を得て、そして任意に第2世代のトランスジェニック子孫植物から一つ又はそれより多い世代のトランスジェニック植物を得ることを含む。

【0144】

子孫植物はあらゆる公知の技術による前の世代のそれらの先祖から生じさせてよい。特に、子孫植物は：

前の世代に属する発明のトランスジェニック植物からトランスジェニック種子を得て、次にトランスジェニック種子を成長させることにより新世代の発明のトランスジェニック子孫植物を得て；そして／又は

前の世代に属する発明のトランスジェニック植物をクローンとして増殖させることにより新世代に属する発明のトランスジェニック子孫植物を提供し；そして／又は

前の世代に属する発明の第1世代のトランスジェニック植物を別の匹敵する植物と交配することにより、新世代に属する発明のトランスジェニック子孫植物を提供し；そして／任意に

そうして得られた子孫から一つ又はそれより多いさらなる世代のトランスジェニック子孫植物を得ること

により生産してよい。

【0145】

これらの技術はあらゆる組み合わせにおいて使用してよい。例えば、クローンとしての増殖及び有性増殖を、別の点において、培養のために適したトランスジェニック植物を生じるプロセスにおいて、使用してよい。特に、農業経済学上望まれる特性を有する植物分類群との繰り返しの戻し交配を企ててよい。植物及びそれから再生した新規な植物からの細胞の取り出しの別の工程も実施してよい。

【0146】

また、細胞、植物組織、植物又は種子をあらゆる適切なステージにおいて、さらに望まれる特性を導入することにより、発明のポリヌクレオチド以外の所望のコーディング配列を導入してよい。これは、発明のポリヌクレオチドの導入のために本明細書にて記載された技術により実施してよい。

【0147】

例えば、他の除草剤耐性特性、例えばグリフォセート (G l y p h o s a t e) に対する寛容 (例えば、E P S P シンターゼ遺伝子 (例えば、E P - A - 0 2 9 3 , 3 5 8) 又はグリフォセートオキシドレダクターゼ (W O 9 2 / 0 0 0 3 7 7) 遺伝子) をコードするトランス遺伝子から；又は、フォサメチン；ジハロベンゾニトリル；グルフォシネートに対する寛容をコードするトランス遺伝子から、例えばホスフィノチリシナセチルトランスフェラーゼ (P A T) 又はグルタミンシンターゼ遺伝子 (E P - A - 0 2 4 2 , 2 3 6 参照) を用いて；アスラム、例えば、ジヒドロプテロエートシンターゼ遺伝子 (E P - A - 0 3 6 9 , 3 6 7 参照)；又はスルフォニルウレア、例えば、A L S 遺伝子を用いて；ジフェニルエーテル、例えば、アシフルオルフェン又はオキサジアゾン、例えば、プロトボルフィロジェンオキシダーゼ遺伝子；環状イミド、例えば、クロロフサリム；フェニルピラゾール、例えば、T N P、又はフェノピレート又はそのカルバメート類似体；さらなるトランス遺伝子を選択してよい。

【0148】

同様に、除草剤寛容以外の有益な特性に関する遺伝子を導入してよい。例えば、昆虫耐性遺伝子を導入してよく、注目に値するのはバチルスサリンジェネシス (B t) の毒素をコードする遺伝子である。同様に、疾患耐性遺伝子を導入してよく、例えば、W O 9 1 / 0 2 7 0 1 又は W O 9 5 / 0 6 1 2 8 におけるとおりである。

【0149】

典型的には、発明の蛋白質を発明の植物内で発現させる。使用されるプロモーターにより、この発現は構成的又は誘導可能であってよい。同様に、組織特異的か又はステージ特異的であってよく、即ち、特定の植物の組織 (例えば、本明細書にて言及された組織の何れか) 又は植物の発生におけるステージに直接向けられる。

【0150】

発明は、作物を得るための方法も提供し、発明のトランスジェニック植物を収穫し、そして任意にさらに加工することを含む。作物は、作物植物から得ることができるあらゆる

10

20

30

40

50

有用な生成物を意味する。

変異グリアジン蛋白質又はアンタゴニストとして作用することができる配列を含む蛋白質を含む生成物

発明は、変異グリアジン蛋白質又はアンタゴニストとして作用することができる配列を含む蛋白質を含む生成物を提供する。これは、典型的には、そのような蛋白質を発現する本明細書にて言及された植物に由来するか又は植物の部分を含む。そのような生成物は、発明の植物を直接収穫するか又は間接に収穫し、そしてさらに加工することにより得ることが可能であってよい。直接に得ることが可能な生成物は穀物を含む。あるいは、そのような生成物は、回収してさらに加工することにより間接に得ることが可能であってよい。さらに加工することにより得ることが可能な生成物の例は、小麦粉又は蒸留されたアルコール飲料；直接得ることができるか又はさらに加工した材料、例えば小麦粉から作られた焼いた製品（例えば、パン）から作られる食物製品である。典型的には、そのような食物製品はヒト個体により摂取可能であって消化可能である（即ち、非毒性であって栄養価値がある）。

10

【0151】

アンタゴニスト配列を含む蛋白質を含む食物製品の場合、食物製品は野生型グリアジンを含んでもよいが、好ましくは当該アンタゴニストはそのような食物を摂取した後にセリアック病の兆候の低下（又は完全に）を導くことができる。

【0152】

発明は、以下の非限定実施例により例示される。

20

実施例 1

我々は、完全に特性決定されたグリアジン、「A-グリアジン」の全配列にわたる 51 セットの合成 15 マーペプチドを使用することによりセリアック病のエピトープマッピングを実施した（表 1 参照）。A-グリアジンペプチドは tTG により個々に処理されることにより、インビボで生成したものを模倣したかもしれない生成物を生成した³。我々は、実験上の感染及び自己免疫疾患において記載されたとおり、エピトープの「拡散」又は「消費」が起きたかもしれない可能性を避けるために、疾患の消滅の開始点においてセリアック病患者を研究しようとも努めた。

3 日及び 10 日のパンチャレンジによる臨床上及び A-グリアジン特異的な T 細胞応答

パイロット研究において、セリアック病の 2 人の患者が緩解したが、血清の抗-筋内膜抗体（EMA）の不在により定義され、グルテンフリーダイエットは彼らの通常のグルテンフリーダイエットに加えて、標準のグルテン含有白パン 4 スライスを毎日給仕された。被験者 1 は 3 日後に腹痛、口の潰瘍及びゆるい下痢のためにパンを停止したが、被験者 2 は 1 週間目に軽い吐き気があっただけで 10 日間継続した。EMA は被験者 2 においてパンチャレンジの 1 週間後に陽性になったことから、使用したパンがセリアック病の再発を導いたことを示す。しかし、被験者 1 においては、EMA はパンチャレンジから 2 カ月まで陰性のままであった。両被験者において、パンチャレンジにより出現した兆候はグルテンフリーダイエットに戻って 2 日以内に解消した。

30

【0153】

IFN γ ELISPOT アッセイの A-グリアジンに対する PBMC 応答は、パンチャレンジの前と間に見いだされなかった。しかし、被験者 1 においてはパンの消費の 1 日後に（4 日目）、tTG により処理した A-グリアジン 51-85 にわたる 5 つのオーバーラップするペプチドの単一のプール（プール 3）が有力な IFN γ 応答を示した（図 1a 参照）。被験者 1 においては、A-グリアジンペプチドに対する PBMC IFN γ 応答はプール 3 単独に標的化されたままであり、8 日目に最大であった。プール 3 に対する応答の動力学及び大きさは、 α -キモトリプシン消化されたグリアジンにより導かれるのと同様であった。tTG 処理したプール 3 に対する PBMC IFN γ 応答は tTG 処理されなかったプール 3 より 5 から 12 倍の大きさに一貫し、そして α -キモトリプシン消化したグリアジンに対する応答は tTG 処理した場合の 3 から 10 倍大きかった。被験者 2 においては、tTG 処理されたプール 3 も、8 日目に A-グリアジンペプチドの免疫源セ

40

50

ットのみであったが、この応答は被験者1よりも弱く、4日目には観察されず、11日目にはプール3に対する応答は減少し、そしてA-グリアジンペプチドの他のtTG処理プールがより強いIFN γ 応答を導いた(図1b参照)。

【0154】

パイロット研究は、これらのセリアック病被験者における初期T細胞応答が5つのペプチドの単一のtTG処理A-グリアジンプールに対してであったこと、及び末梢血において容易に測定されたことを示した。抗原暴露が3日ではなく10日間続いたなら、他のA-グリアジンペプチドに対するT細胞応答が、エピトープの拡散に一致して、出現する。tTG処理されたA-グリアジンペプチドによるセリアック病特異的IFN-g誘導

グルテンフリーダイエットの別の6人のセリアック病被験者の内の5人において(表1参照)、3日間のパンチャレンジはtTG処理されたペプチドをプール3に同定し、特に、PBMCからIFN γ を導く唯一のA-グリアジン成分としての56-70(12)及び60-75(13)に相当するペプチドであった(図2参照)。IFN γ ELISPOTと平行して流したIL-10 ELISPOTは、tTG処理されたペプチド12又は13に対してIL-10の応答を示さなかった。一人の被験者においては、パンチャレンジの4日前、4日間又は4日目まで、あらゆるA-グリアジンペプチド又は α -キモトリプシン消化されたグリアジンに対してIFN γ 応答はなかった。パンチャレンジの2カ月後まで測定した場合に、これらのセリアック病被験者の誰にも基底ラインからEMA状態が変化しなかった。

【0155】

HLA-DQ対立遺伝子 $\alpha 1^* 0501$, $\beta 1^* 0201$ (28-52歳、2人は女性)を有し、3日間パンチャレンジを受けて1カ月間グルテンフリーダイエットを受けた、4人の健康なEMA陰性被験者からのPBMCは、tTG処理をしてもしなくても、何れのA-グリアジンペプチドに対しても陰性対照を超えるIFN γ 応答を示さなかった。即ち、PBMC中のIFN γ のtTG処理プール3及びA-グリアジンペプチド56-70(12)及び60-75(13)への誘導は、セリアック病特異的であった(7/8対0/4、 $p < 0.01$, カイ2乗分析による)。

最小のA-グリアジンT細胞エピトープのファインマッピング

A-グリアジン56-75の末端削除に相当するtTG処理したペプチドは、同じコアペプチド配列QPQLP(配列番号:9)が評価された5人のセリアック病被験者の全てにおいて抗原性に必須であったことを明らかにした(図3参照)。PBMC IFN γ は、7マーのPQPQLPY(配列番号:4)で始まるこのコア配列にわたり、長さを伸ばしたtTG処理ペプチドに応答することから、tTG処理された17マーのQLQPFPQPQLPYPQPQS(配列番号:19)(A-グリアジン57-73)がIFN γ ELISPOTにおいて最大の活性を所有したことを示した(図4参照)。

tTGによるQ65の脱アミド化はA-グリアジン中の免疫上優勢なT細胞エピトープを生じる

HPLC分析は、A-グリアジンのtTG処理が、親ペプチドにおいてあとで隣接して溶出した単一の生成物を生じたことを証明した。アミノ酸配列決定は、A-グリアジン56-75中に含まれる6つのグルタミン(Q)残基の中から選択的にtTGにより脱アミド化されたことを示した(図5参照)。グルタミン酸(E)置換されたQ65のコアA-グリアジン62-68からの連続伸長物(serial expansions)に相当するペプチドの生物活性は、tTG処理後のQ65を有する同じペプチドと均等であった(図4a参照)。Q57及びQ72のEによる両方又は単独の置換にE65が伴うと、調査された3人のセリアック病被験者において、上記17マーの抗原性を増強しなかった(図6参照)。グリアジンペプチドにおいてグルタミン残基にプロリンが続くと、インビトロにおいてtTGにより脱アミド化されないため、Q57及びQ72を調査した(W. Vader et al, Proceedings 8th International Symposium Coeliac Disease)。よって、免疫上優勢なT細胞エピトープをQLQPFPQPPELPYPQPQS(配列番号:2)と定義した。

免疫上優勢なT細胞エピトープ応答はDQ-2制限され且つCD4依存性である

HLA-DQ α 1*0501, β 1*0201に関して同型接合の(homozygous)2人のセリアック病被験者において、抗-DQモノクローナル抗体がtTG処理されたA-グリアジン56-75に対するELISPOT IFN γ 応答をブロックしたが、抗-DP及び-DR抗体はブロックしなかった(図7参照)。2人のセリアック病被験者からのPBMCの抗-CD4及び-CD8磁気ビーズ除去(depletion)は、tTG処理されたA-グリアジン56-75に対するIFN γ 応答がCD4 T細胞媒介性であることを示した。

考察

この研究において、我々は、配列:QLQPFPQPELPYPQPQS(配列番号:2)(残基57-73)のtTG処理されたA-グリアジン17マーに応答性のセリアック病被験者の末梢血においてCD4 T細胞の一過性集団を誘導するために、普通の白パンを用いたむしろ単純なダイエット抗原チャレンジを記載した。A-グリアジン(Q $\rightarrow$ E65)に対する免疫応答はセリアック病関連対立遺伝子DQ α 1*0501, β 1*0201に限定される。インビトロにおける組織のトランスグルタミナーゼ作用はQ65を選択的に脱アミド化する。置換Q $\rightarrow$ E65を有する合成A-グリアジンペプチドに対する誘導された末梢血IFN γ の応答は、tTG処理されたQ65 A-グリアジンペプチドに均等であり;両者は未修飾のQ65 A-グリアジンペプチドよりもIFN γ ELISPOTにおいて10倍にまで、より多くのT細胞を刺激する。

【0156】

我々は、エピトープマッピングにおけるT細胞クローンの使用により生じるかもしれない方法論上の人工物の可能性を回避するため、インビボ抗原チャレンジ及び短期間エキスピボ免疫アッセイを用いて、このセリアック病特異的T細胞エピトープを慎重に定義した。我々の発見は、グルテンの摂取に対する末梢血のT細胞応答が迅速であるが短命であり、且つエピトープマッピングに利用可能であることを示す。インビボ抗原チャレンジは、A-グリアジンペプチドに対する免疫応答の時間の経過順の階層(temporal hierarchy)が存在することを示し;tTGにより修飾されたA-グリアジン57-73はP中のもっとも強いIFN γ 応答を誘導するのみならず、第1のIFN γ 応答も出現する。

【0157】

我々はA-グリアジンにわたるペプチドしか評価しなかったもので、セリアック病の病因において等しいか又はより重要な他のグリアジン内の別のエピトープが存在するかもしれない。事実、我々が同定したPQPQLPY(配列番号:4)であるA-グリアジン内のコアエピトープにおけるペプチド配列は幾つかのべつのグリアジンに共通する(SwissProt and TrEMBL受け入れ番号:P02863, Q41528, Q41531, Q41533, Q9ZP09, P04722, P04724, P18573)。しかしながら、生検チャレンジ及びインビボ研究において生物活性を所有することが以前に示されたA-グリアジンペプチド(例えば:31-43, 44-55及び206-217)^{4, 5}は、セリアック病被験者において3日間のパンチャレンジ後にPBMCにおいてIFN γ 応答を誘導しなかった。これらのペプチドは、免疫応答の拡散を伴って現れる「二次」T細胞エピトープであるかもしれない。

【0158】

実施例2

免疫上優勢なエピトープ内の置換に対するT細胞認識の効果

57-73 A-グリアジンエピトープにおける65位のグルタミンの置換の効果を、合成ペプチドを用いてIFN γ ELISPOTアッセイにおいて置換されたエピトープに対する末梢血応答を測定することにより決定した(50 μ g/mlにおいて)。応答は3人のセリアック病患者においてグルテンチャレンジを始めて6日後に測定した(3日間4スライスのパンを毎日)。結果を表3及び図8に示す。グルタミン酸から、ヒスチジン、チロシン、トリプトファン、リジン、プロリン又はアルギニンへの置換において観察され

得るように、免疫上優勢なエピートープに対する応答の大きさの10%より低い大きさの応答を刺激した。即ち、この位置におけるA-グリアジンの変異は、免疫反応性を低下させるか又は不在にする変異グリアジンを生成するのに使用することができた。

【0159】

実施例3

他の天然に生じるグリアジンからの均等なペプチドの免疫反応性の試験

他の天然に生じるコムギのグリアジン由来の均等なペプチドの免疫反応性を、天然に生じる配列に相当する合成ペプチドをトランスグルタミナーゼにより処理して使用することにより、評価した。これらのペプチドは、ELISPOTにおいて、実施例2に記載されたのと同じ被験者からのPBMCを用いて同じ様式にて試験した。少なくとも5つのペプチドがA-グリアジン57-73 E65ペプチドに匹敵する免疫反応性を示す（トランスグルタミナーゼ処理後）ことから、コムギ中の他のグリアジン蛋白質も同ようにこのセリアック病特異的免疫応答を誘導することを示唆する（表4及び図9）。

方法

被験者：研究において使用した患者は、英国のオックスフォードにおいてセリアック病クリニックにかかっている。セリアック病は、特有の小腸の組織構造、及び兆候の標準化及びグルテンフリーダイエットの小腸組織構造に基づいて診断された。

組織型判定：組織型判定は、EDTA抗凝血末梢血から抽出されたDNAを用いて実施した。HLA-DQA及びDQB遺伝子型判定は、PCRにより配列特異的プライマーミックスを用いて実施した⁶⁻⁸。

抗筋内膜抗体アッセイ：EMAは、サル食道（oesophagus）を用いて1：5に希釈された患者の血清を用い、続いてFITCコンジュゲートヤギ抗ヒトIgAを用いた間接免疫蛍光により検出した。IgAをEMAの前に定量したが、どの被験者もIgA欠損ではなかった。

抗原チャレンジ：グルテンフリーダイエット後のセリアック病被験者に、4スライスのグルテン含有パンを毎日3又は10日間食べ尽くさせた（セインズベリーの標準の「白サンドイッチパン」）。パンチャレンジを始める前の週及び2カ月後まで、EMAを査定した。グルテンフリーダイエットを4週間経験した健康な被験者は、3日間グルテン含有パン4スライスを含む彼らの通常のダイエットを食べつくし、そして次にさらに4日間グルテンフリーダイエットに戻った。

IFN γ 及びIL-10 ELISPOT：Ficoll-Hypaque密度遠心分離により50-100mlの静脈血からPBMCを調製した。3回洗浄後に、PBMCを再度、10%熱不活性化ヒトAB血清を含む完全RPMIに懸濁した。IFN γ 及びIL-10の単一細胞の分泌に関するELISPOTアッセイを、市販のキット（Mabtech；ストックホルム、スウェーデン）を用いて96-ウェルプレート（MAIP-S-45；Millipore, ベッドフォード、MA）により、製造者の指示書（ほかで記載されたとおり⁹）に従い、2-5x10⁵（IFN γ ）又は二重のウェルにて査定し、そしてミコバクテリウムツベルクロシスの精製された蛋白質誘導体（PPD-RT49）（Serum Institute；コペンハーゲン、デンマーク）（20 μ g/ml）を全てのアッセイにおいて陽性対照として含ませた。

ペプチド：合成ペプチドはResearch Genetics（ハンツビル、アラバマ）から購入し、質量分光分析及びHPLCにより確認されたペプチドの真正度は70%>精製度であった。グリアジン（Sigma；G-3375）（100mg/ml）の α -キモトリプシン（Sigma；C-3142）200：1（w/w）による消化は、0.1M NH₄HCO₃中で2M尿素と共に室温において実施し、98℃において10分間加熱することにより24時間後に中止した。遠心分離（13,000g, 10分間）後に、グリアジン消化上清をフィルター滅菌した（0.2 μ m）。グルテンの消化をSDS-PAGEにより確認して、蛋白質濃度を査定した。 α -キモトリプシン消化されたグリアジン（640 μ g/ml）及び合成グリアジンペプチド（15マー：160 μ g/ml, 他のペプチド：0.1mM）を個別にTTG（Sigma；T-5398）（50 μ g

／m l) により P B S 中にて C a C l₂ を 1 m M 加えて、2 時間 3 7 °C において処理した。ペプチド及びペプチドプールを滅菌 9 6 - ウエルプレートに分配して、使用まで - 2 0 °C に凍結保存した。

ペプチドのアミノ酸配列決定：逆相 H P L C を使用して、A - グリアジン 5 6 - 7 5 の t T G 処理によるペプチドを精製した。単一生成物を同定して、アミノ酸配列決定（自動化配列決定機モデル 4 9 4 A, A p p l i e d B i o s y s t e m s, フォスターシティー、カリフォルニア）に供した。未修飾の G 5 6 - 7 5 の配列は L Q L Q P F P Q P Q L P Y P Q P Q S F P（配列番号：5）と確認され、そして t T G 処理された G 5 6 - 7 5 は L Q L Q P F P Q P E L P Y P Q P Q S F P（配列番号：11）と確認された。グルタミン残基の脱アミド化は、アミノ酸配列決定のサイクル 2、4、8、10、15 及び 17 において回収されたグルタミン及びグルタミン酸の合わせた量のパーセントとして表された、回収されたグルタミン酸の量（p m o l）として定義された。t T G に帰する脱アミド化は、（t T G 処理されたペプチド中のグルタミンの脱アミド化の％ - 未処理のペプチド中の脱アミド化の％）／（100 - 未処理のペプチド中の脱アミド化の％）として定義された。

C D 4 / C D 8 及び H L A クラス I I 制限：抗 - C D 4 又は抗 - C D 8 コートされた磁気ビーズ（D y n a l, オスロ、ノルウェー）を R P M I により 4 回洗浄し、次に 1 0 % 熱不活性化ヒト A B 血清を含む完全 R P M I 中の P B M C と共に、3 0 分間氷の上でインキュベートした。ビーズを磁石により取り出して、残る細胞を計数した。t T G 処理された A - グリアジン 5 6 - 7 5 に対する免疫応答のインビボの H L A - クラス I I 制限は、P B M C（5 x 1 0⁶ 細胞／m l）を抗 - H L A - D R（L 2 4 3）、- D R（L 2）、及び - D P（B 7. 2 1）モノクローナル抗体（1 0 μ g / m l）と、室温において、ペプチドの添加前に 1 時間インキュベートすることにより、確立した。

【0160】

実施例 4

グリアジン - 特異的末梢血リンパ球による粘膜インテグリンの発現

内皮とリンパ球のアドレシンの間の相互作用は、器官特異的なリンパ球のホーミングを促進させる。多数のアドレシンが公知である。ヘテロダイマー α₄ β₇ は粘膜固有層消化管及び他の粘膜リンパ球に特異的であり、そして α^E β₇ は消化管及び皮膚において内皮リンパ球内に特異的である。末梢血 C D 4 T 細胞の約 3 0 % が α₄ β₇ を発現し、そして粘膜部位へ移動中であると推定され、末梢血 C D 4 T 細胞の 5 % が α^E β₇ を発現する。α^E 又は β₇ 特異的な抗体をコートされた免疫磁気ビーズは、それぞれ、α^E β₇ 又は α^E β₇ 及び α₄ β₇ を発現する細胞の P B M C を除去する。E L I S p o t アッセイとの組み合わせにより、免疫磁気ビーズの除去は、これらの細胞を粘膜表面へのホーミングとして同定するかもしれないグリアジン特異的 T 細胞のアドレシン発現の決定を可能にする。おもしろいことに、インビボのグルテンチャレンジは小腸の粘膜固有層への C D 4 T 細胞の迅速な流入に関連しており（内皮部位内ではなく）、9 0 % を超えるリンパ球が α₄ β₇ を発現する。

【0161】

免疫磁気ビーズを製造して、3 日間のグルテンチャレンジの後で 6 日目又は 7 日目にセリアック病被験者からの P B M C を除去するのに使用した。F A C S 分析は、α^E ビーズが約 5 0 % の陽性 C D 4 T 細胞を除去し、一方 β₇ ビーズは全ての β₇ 陽性 C D 4 T 細胞を除去した。C D 4 - 又は β₇ - ビーズを用いたが C D 8 - 又は α^E ビーズを用いない P B M C 除去はインターフェロンガンマ E L I S p o t において応答を完全に破壊した。t T G グリアジン及び P P D 応答は C D 4 除去により完全に破壊されたが、インテグリン特異的ビーズ除去により一貫して影響された。

【0162】

即ち、セリアック病においてグルテンチャレンジ後に誘導された A - グリアジン 5 7 - 7 3 Q E 6 5 特異的 T 細胞は、小腸中の粘膜固有層 C D 4 T 細胞上に存在するインテグリン α₄ β₇ を発現する。

10

20

30

40

50

【0163】

実施例 5

最適な T 細胞エピトープの長さ

A-グリアジン中の優勢な T 細胞エピトープのコアにわたる 7 から 17 の長さのアミノ酸からのペプチドを試験する以前のデータは、3 日間のグルテンチャレンジ開始から 6 日後にセリアック病のボランティアからの末梢血単核細胞 (PBMC) を用いたインターフェロンガンマ ELISPOT において 17 マーの A-グリアジン 57-73 QE65 (配列番号: 2) が最大の応答を誘導したことを示した。

【0164】

A-グリアジン中の優勢な T 細胞エピトープのコア配列からの伸長を示すペプチドを、3 日間のグルテンチャレンジ開始から 6 日後にセリアック病のボランティアからの末梢血単核細胞 (PBMC) を用いた IFN ガンマ ELISPOT において査定した (n = 4)。ペプチド 13: A-グリアジン 59-71 QE65 (13 マー)、ペプチド 15: 58-72 QE65 (15 マー)、...、ペプチド 27: 52-78 SE65 (27 マー)。

【0165】

図 11 に示すとおり、A-グリアジン 57-73 QE65 の伸長は IFN ガンマ ELISPOT において応答を実質上は増強しない。次の実施例は、17 マーペプチドを用いた A-グリアジン 57-73 QE65 のアゴニスト及びアンタゴニスト活性を特性決定する。

【0166】

実施例 6

A-グリアジン 57-73 QE65 とセリアック病における他の DQ2-制限される T 細胞エピトープの比較

セリアック病の腸の生検からのグルテン特異的 T 細胞クローン及び系列の T 細胞エピトープに相当する未修飾及びトランスグルタミナーゼ処理ペプチドに相当するペプチドを用いて、用量応答研究を実施した。ペプチドに対する応答は A-グリアジン 57-73 QE65 に対する応答のパーセントとして表現した。全ての被験者は HLA-DQ2+ であった (誰も DQ8+ でなかった)。

【0167】

上記の研究は、A-グリアジン 57-73 QE65 が、グルテンチャレンジ後にセリアック病の PBMC を用いた ELISPOT アッセイにおいてインターフェロンガンマの誘導に関してもっとも有効性のあるグリアジンペプチドであることを示す (図 12 a-h, 及び表 5 及び 6 を参照)。第 2 及び第 3 のエピトープは、より大きなペプチド、即ち A-グリアジン 57-73 QE65 及び GDA4 WHEAT P04724-84-100 QE92 の準最適断片である。上記エピトープは適度に生物活性であるにすぎない (ブランクを差し引いた後では A-グリアジン 57-73 QE65 より約 1/20 活性)。

【0168】

A-グリアジン 57-73 QE65 はセリアック病において他の公知の T 細胞エピトープよりも有効性がある。配列決定されたグリアジン遺伝子の間で A-グリアジン 57-73 (配列 PQLPY (配列番号: 12) を含む) の 16 の多型が存在し、それらの生物活性を次で査定する。

【0169】

実施例 7

末梢血中でのグリアジン-及び A-グリアジン 57-73 QE65 の比較

セリアック病におけるグリアジンに対する全 T 細胞応答に対しての、優勢なエピトープ A-グリアジン 57-73 QE65 の相対的な寄与は重大な問題である。ペプシントリプシン及びキモトリプシンにより消化されたグリアジンが、セリアック病における T 細胞系列及びクローンの分化のための抗原として伝統的に使用されてきた。しかしながら、

10

20

30

40

50

これらのプロテアーゼは特定のペプチドエピトープを分断するかもしれないと言える。事実、組換えα 9-グリアジンのキモトリプシン消化はペプチド Q L Q P F P Q P E L P Y (配列番号: 13) を生じるが、最適エピトープ配列 Q L Q P F P Q P E L P Y P Q P Q S (配列番号: 2) の末端削除体である(上を参照)。トランスグルタミナーゼ処理は、実質上、グリアジン特異的 T 細胞クローン及び系列の増殖アッセイにおいて、キモトリプシン消化されたグリアジンの能力を増加させる。よって、トランスグルタミナーゼ処理されたキモトリプシンで消化されたグリアジン (t T G グリアジン) は理想的な抗原ではないかもしれないが、この混合物に対する応答はグリアジンに特異的な末梢血リンパ球の「全」数に近似するかもしれない。E L I S p o t アッセイにおける A-グリアジン 57-73 Q E 65 及び t T G グリアジンに対する応答の比較は、セリアック病におけるグリアジンに対する全免疫応答へのこの優勢なエピトープの寄与の指標を提供し、またエピトープ拡散の基準でもある。

【0170】

4 人のセリアック病被験者においてグルテンチャレンジを開始して 6 日目又は 7 日目に回収された P B M C を、キモトリプシン消化されたグリアジン+/- t T G 処理を用いた用量応答研究において査定し、そして最適濃度の A-グリアジン 57-73 Q E 65 (25 mcg/ml) に対する E L I S p o t 応答と比較した。グリアジンの t T G 処理は E L I S p o t において約 10 倍 P B M C 応答を増強した(単独で査定した場合に t T G はブランクと同等であった)(図 13 a-c 参照)。研究した 4 人のセリアック病被験者において、A-グリアジン 57-73 Q E 65 (25 mcg/ml) は t T G グリアジン (500 mcg/ml) の 14 から 115 % の間の応答を誘導し、そして A-グリアジン 57-73 Q E 65 に対する応答が大きければ大きいほど、t T G グリアジン応答を表した比率が大きくなった。

【0171】

相対的に限られたデータから、A-グリアジン 57-73 Q E 65 応答が幾つかの被験者において t T G グリアジンと同等であることが示唆される。より進化した抗-グリアジン T 細胞応答に関連したエピトープ拡散は、幾つかの個体において末梢血の「全」応答への A-グリアジン 57-73 Q E 65 の僅かな寄与の説明となるかもしれない。エピトープ拡散はさほど厳しくないグルテンフリーダイエットを受けた個体において保持されるかもしれない。

【0172】

実施例 8

セリアック病において生物活性なグリアジンペプチドの定義: A-グリアジン 57-73 の多型

A-グリアジンの全配列にわたるオーバーラップする 15 マーのペプチドを査定することにより、セリアック病の免疫上優勢な配列を同定した。A-グリアジンは最初に全配列を決定されたアルファグリアジン蛋白質及び遺伝子であったが、コムギにおいて約 30-50 の関連するアルファグリアジン蛋白質のひとつである。蛋白質データベース S w i s s - P r o t 及び T R E M B L を検索することにより、25 の別々のアルファグリアジン遺伝子が同定され、さらに 8 つのアルファグリアジンを記述した。これら 25 のアルファグリアジンに含まれたのは、A-グリアジン 57-73 に相当する 16 の異なる多型である(表 7 参照)。

【0173】

トランスグルタミナーゼによるインビトロにおける処理、並びに 10 位において置換されたグルタミン酸による処理後、未修飾形態でのこれらの 16 の多型に相当する合成ペプチドを、通常のグルテンフリーダイエット後の、インターフェロンガンマ E L I S p o t アッセイにおけるグルテンチャレンジの 6 日又は 7 日後に、セリアック病の被験者からの P B M C を用いて査定した。グルタミン酸置換したペプチドを 3 つの濃度において (2.5、25 及び 250 mcg/ml) 査定し、未修飾のペプチド及びトランスグルタミナーゼ処理されたペプチドを 25 mcg/ml の濃度のみにて査定した。生物活性は、個々の

被験者においてA-グリアジン57-73 QE65 25mcg/mlに付随した応答の%として表現した(n=4)(図14参照)。

「野生型」ペプチドの生物活性はトランスグルタミナーゼ処理により実質増加した(>5倍)。野生型ペプチドのトランスグルタミナーゼ処理は10位においてグルタミン酸により置換された同じペプチドの生物活性と同ような生物活性をもたらした。5つのグルタミン酸置換ペプチド(B, C, K, L, M)の生物活性はA-グリアジン57-73 QE65の>70%であったが、A-グリアジン57-73 QE65よりも顕著に高い生物活性のものはなかった。2.5及び250mcg/mlの濃度においてグルタミン酸置換されたペプチドに対するPBMC応答は25mcg/mlにおけるのと同様であった。6つのグルタミン酸置換グリアジンペプチド(H, I, J, N, O, P)は、A-グリアジン57-73 QE65の生物活性の<15%であった。他のペプチドは生物活性において中間であった。

10

【0174】

少なくとも6つのグリアジン由来のペプチドがトランスグルタミナーゼによる修飾語にA-グリアジン57-73 QE65に対する有効性が均等である。相対的に非生物活性のA-グリアジン57-73 QE65の多型も存在する。これらのデータは、トリチカムエステビウム、トリチカムウアルツ、トリチカムスペルタの幾つかのグリアジン由来のペプチドのトランスグルタミナーゼ修飾がセリアック病において免疫上優勢なT細胞エピトープを生成できるかもしれないことを示す。

【0175】

非-セリアック病-毒性コムギを生成するコムギの遺伝子修飾は、複数のグリアジン遺伝子の除去又は修飾を必要とするかもしれない。A-グリアジン57-73の変更されたペプチドリガンドアンタゴニストを定義する配列を取り込んだグリアジン又は他の蛋白質又はペプチドを含むコムギの生産は、セリアック病において「非毒性」よりむしろ治療用である遺伝学上修飾されたコムギを生成するための別の戦略である。

20

【0176】

実施例9

コアエピトープ配列の定義：

N-末端又はC-末端からのA-グリアジン56-75の末端削除に相当するペプチドの比較は、T細胞エピトープのコア配列がPELPY(A-グリアジン64-68)であることを示した。非アゴニスト及びアンタゴニストを定義する試みは、その生物活性に実質貢献する残基において置換されたA-グリアジンのバリエーションに焦点を注ぐことになる。

30

【0177】

残基57から73を置換したアラニン(図15)又はリジン(図16)を有するA-グリアジン57-73 QE65に相当するペプチドを、3日間のグルテンチャレンジ開始から6日後にセリアック病のボランティアからの末梢血単核細胞(PBMC)を用いたIFNガンマELISPO Tにおいて比較した(n=8)。(BLはブランク、EはA-グリアジン57-73 QE65:QLQPFPQPELPYPQPQS(配列番号:2))。

40

【0178】

A-グリアジン60-70 QE65(PFPQPELPYPQ(配列番号:14))に相当する残基はA-グリアジン57-73 QE65のにおいて生物活性に実質貢献することを見いだした。60-70位において置換されたA-グリアジン57-73 QE65のバリエーションは2段階の手法により査定する。最初に、対照的な特性を有する、10の異なるアミノ酸を用いて60-70位において置換されたA-グリアジン57-73 QE65を査定した。A-グリアジン57-73 QE65のバリエーションの第2群(全ての他の天然に生じるアミノ酸により置換されているが、修飾に敏感であると証明された位置のシステインを除く)を第2ラウンドにおいて査定した。

【0179】

50

実施例 10

A-グリアジン57-73 QE65の置換されたバリエーションのアゴニスト活性

A-グリアジン60-70 QE65は、A-グリアジンにおいて優勢なT細胞エピートープのコア配列である。このエピートープのアンタゴニスト及び非アゴニストペプチドバリエーションは、このコア配列の修飾により生成されるらしい。最初に、対照的な特性を有する、10の異なるアミノ酸を用いて60-70位において置換されたA-グリアジン57-73 QE65を、3日間のグルテンチャレンジ開始から6日後にセリアック病の被験者からのPBMCを用いたIFNガンマELISPOTにおいて査定する。A-グリアジン57-73 QE65のバリエーションの第2群（システイン以外、全ての他の天然に生じるアミノ酸により置換されている）も第2ラウンドにおいて査定した。両群のペプチド（全て50mcg/mlにおいて、二重）を8人の被験者からのPBMCを用いて査定して、未修飾のペプチドと比較した（アッセイあたり20反復）。様々な研究が、このアッセイにおけるA-グリアジン57-73 QE65の最適な濃度が10から100mcg/mlの間であることを示す。

【0180】

結果を、スポット形成細胞（95%コンフルエントの間隔）の平均応答として、個々の個体の%A-G 57-73 QE65平均応答として表現する。対になっていないt-試験を使用することにより、修飾されたペプチドのELISPOT応答をA-G 57-73 QE65と比較する。スーパーアゴニストを、 $p < 0.01$ の有意性のレベルにおいてA-G 57-73 QE65よりも高い応答を有するものとして定義し；部分アゴニストは $p < 0.01$ の有意性のレベルにおいてA-G 57-73 QE65よりも低い応答を有するものとして定義し、そして非アゴニストはブランク（ペプチド無しのバッファー）と顕著に異なるものと定義した。A-G 57-73 QE65のアゴニスト活性の30%又はそれ未満のアゴニスト活性を有するペプチドは、アンタゴニスト活性を評価するための「適切な」部分アンタゴニスト又は非アンタゴニストと考えた（表8及び図17-27参照）。

【0181】

PBMCのA-グリアジン57-73 QE65に対するIFNガンマELISPOT応答は分子レベルにおいて特異性が高い。64位のプロリン（P64）、65位のグルタミン酸（E65）及び66位のロイシン（L66）、及び程度は劣るがQ63, P67, Y68及びP69が修飾に対して特に感受性である。Y61及びY70の置換は共に親ペプチドより30%高い生物活性のスーパーアゴニストを生じ、おそらくは、HLA-DQ2への結合を増強するためであるが、何故ならば、このHLA分子のモチーフが1位及び9位の巨大な疎水性残基に関する選択性を示すからである。18の非アゴニストペプチドを同定した。バリエーションの生物活性（50mcg/ml）：P65, K64, K65及びY65（生物活性7-8%）はブランク（7%）と同等であった。全部で、A-グリアジン57-73 QE65の57の変異バリエーションがA-グリアジン57-73 QE65の30%又はそれ未満の生物活性であった。

【0182】

優勢なエピートープ、A-グリアジン57-73 QE65に対する末梢血リンパ球（PB L）T細胞応答の分子特異性は、HLA-DQ2+セリアック病被験者の間で一貫して再現性があり、そして上記7アミノ酸の中の限定された数のアミノ酸に特異性が高い。A-グリアジン57-73 QE65の特定の単一アミノ酸バリエーションは、全てのHLA-DQ2+セリアック病被験者において一貫して非アゴニストである。

【0183】

実施例 11

置換されたバリエーションのアンタゴニスト活性

HLA-DQ2+被験者におけるA-グリアジン57-73 QE65に対するPB L T細胞応答の均質性は、PB L T細胞応答がポリクローナル又はオリゴクローナルであるらしいとしても、PBMCにおいてか又はエキスビボにおいて拮抗可能な変更された

ペプチドリガンド (APL) が存在するかもしれないことを示唆する。APL アнтаゴニストは一般に弱いアゴニストである。30% 又はそれ未満のアゴニスト活性の A-グリアジン 57-73 QE 65 の 57 の単一アミノ酸置換バリエーションが同定されて、APL アнтаゴニストとしての適切な候補である。さらに、A-グリアジン 57-73 QE 65 の特定の弱い生物活性の天然に生じる多型も同定されて (以下参照)、「天然に生じる」APL アнтаゴニストかもしれない。また、MHC への結合が抗原特異的 T 細胞免疫とも拮抗するかもしれないことが示唆された。よって、グルテンチャレンジ後にセリアック P BMC において IFN ガンマ応答を誘導しないが HLA-DQ2 に結合することが知られている非グリアジンペプチドは、A-グリアジン 57-73 QE 65 により誘導される T 細胞応答を低下させることができるかもしれない。HLA-DQ2 へ貪欲に結合する 2 つのペプチドは HLA クラス 1 α 46-60 (HLA 1a) (PRAPWIEQEGPEYW (配列番号: 15)) 及びチロイドペルオキシダーゼ (tp) 632-645 Y (IDVWLGGLLAENFLPY (配列番号: 16)) である。

【0184】

3 日間のグルテンチャレンジを開始後のセリアックボランティア 6 人からの P BMC を用いた IFN ガンマ ELISPOT におけるペプチド (50 μg/ml) 又はバッファー及び A-グリアジン 57-73 QE 65 (10 μg/ml) の同時添加 (n=5)。結果は、ペプチドプラス A-G 57-73 QE 65 による応答として (二重の平均)、バッファープラス A-G 57-73 QE 65 による応答 (20 反復の平均) の % 応答として表した (表 9 参照)。

【0185】

A-グリアジン 57-73 QE 65 の 4 つの単一アミノ酸置換バリエーションは、A-グリアジン 57-73 QE 65 に対するインターフェロンガンマ P BMC ELISPOT 応答 (p<0.01) を 25% から 28% 低下させ、別の 13 のペプチドバリエーションは ELISPOT 応答を 18% から 24% 低下させた (p<0.06)。HLA-DQ2 バインダー、チロイドペプチド (tp) 632-645 Y は、A-グリアジン 57-73 QE 65 に対する P BMC インターフェロンガンマ応答を 31% 低下させる (p<0.0001) が、他の HLA-DQ2 バインダー、HLA クラス 1 α 46-60 は応答を変化させない (表 9 及び 10 参照)。A-グリアジン 57-73 のトランスグルタミナーゼ修飾された多型に相当するペプチド、Swiss Prot 受け入れ番号 P04725 82-98 QE 90 (PQPQPFPELPYPQPQS (配列番号: 17)) は、A-グリアジン 57-73 QE 65 に対する応答を 19% 低下させる (p<0.009) (表 11 参照)。

【0186】

ELISPOT アッセイにおける A-グリアジン 57-73 QE 65 に対する P BMC のインターフェロンガンマ応答は、特定の単一アミノ酸 A-グリアジン 57-73 QE 65 バリエーション、A-グリアジン 57-73 QE 65 の多型、及び 5 倍過剰に HLA-DQ2 を結合することが公知の非関連ペプチドの同時投与により低下する。これらの発見は、A-グリアジン 57-73 QE 65 の変更されたペプチドリガンドアンタゴニストが存在することを示唆する。仮想上の APL のみならず、HLA-DQ2 を結合する特定のペプチドも、A-グリアジン 57-73 QE 65 に対する PBL T 細胞応答を有効に低下させる。

【0187】

これらの発見は、HLA-DQ2 + セリアック病において優勢な A-グリアジンエピートープに対する T 細胞応答を破壊する 2 つの戦略を支持する。

1. 「伝統的な」ペプチド薬剤としての使用のため又はコムギにおけるグリアジン遺伝子の特異的遺伝的修飾のための、一つの位置より多い位置において (64-67) アミノ酸を置換することによる、APL アнтаゴニストの最適化。

【0188】

2. HLA-DQ2 に付随して A-グリアジン 57-73 QE 65 の提示を競合阻害

するための、高親和性H L A－D Q 2 結合ペプチドの使用。

これらの2つのアプローチは相互に両立可能かもしれない。F 6 1 及びQ 7 0 をチロシン残基で置き換えることにより、スーパーアゴニストを生成した。これらのスーパーアゴニストはT細胞受容体との増強された接触よりむしろH L A－D Q 2 への結合の改善によりもたらされたい。これらの修飾を適度に有効なA P L アンタゴニストを生成する他の置換と組み合わせることにより、置換されたA－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 バリエーションの阻害効果を実質上増強するかもしれない。

【0189】

実施例12

P B M C 及びA－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 及びP 0 4 7 2 4 8 4－1 0 0 Q E 9 2 をセリアック病の診断法として使用したインターフェロンガンマE L I S p o t の開発：新たに診断されたセリアック病における免疫応答の定義 10

インターフェロン番号E L I S p o t において測定されたP B M C 中の優勢なA－グリアジンT細胞エピトープに対する応答性の誘導を、長期間の厳格なグルテンフリーダイエット（G F D）を受けたほとんど全てのD Q 2＋セリアック病被験者においてはグルテンチャレンジに続いて行ったが、厳格なG F Dを受けて4週間後の健康なD Q 2＋被験者においては続いて行わなかった。A－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 応答はグルテンチャレンジ前のセリアック病被験者のP B M C において測定不可能であり、そしてパイロットデータはこれらの応答が未処理の被験者のP B M C において測定できなかったことを示唆した。これらのデータは、セリアック病において、A－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 20 に対する免疫応答性が抗原排除（G F D）後に復元することを示唆する。E L I S p o t アッセイ及びP B M C を用いて診断試験が開発されるとしたら、グルテンチャレンジが血液中のA－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 及び他の免疫反応性グリアジンペプチドに対する応答を誘導できる前に必要とされるG F Dの期間を定義することが望まれる。

【0190】

新たに診断されたD Q 2＋セリアック病被験者を、胃腸学の外来患者サービスから補充した。P B M C を調製して、被験者がG F Dを始める前及びG F Dを初めて1週間又は2週間後に、インターフェロンガンマE L I S p o t アッセイにおいて試験した。さらに、グルテンチャレンジ（3日間は4スライスの標準の白パンを摂取、200g／日）を、G F D開始の1又は2週間後に実施した。P B M C を調製し、そしてグルテンチャレンジを開始して6日後にアッセイした。A－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 （A），P 0 4 7 2 4 8 4－1 0 0 Q E 9 2 （B）（単独及び化合して）及びA－グリアジン5 7－7 3 Q P 6 5 （P 6 5）（非生物活性バリエーション、上記参照）（全て25mcg／ml）を 30 査定した。

【0191】

1人の患者を除いて皆、新たに診断されたセリアック病患者はD Q 2＋であった（一人はD Q 8＋であった）（n＝11）。未処置か又はG F Dの1又は2週間後の新たに診断されたセリアック病患者からのP B M C は、A－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 及びP 0 4 7 2 4 8 4－1 0 0 Q E 9 2 （単独及び化合して）に対する応答を示さずブランク又は及びA－グリアジン5 7－7 3 Q P 6 5 と顕著な差異はなかった（n＝9）（図 40 28参照）。たった1週間しかG F Dを受けなかったセリアック病患者におけるグルテンチャレンジは、A－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 及びP 0 4 7 2 4 8 4－1 0 0 Q E 9 2 （単独及び化合して）に対する応答を実質上増強しなかった。しかし、G F Dを開始して2週間後のグルテンチャレンジは、A－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 及びP 0 4 7 2 4 8 4－1 0 0 Q E 9 2 （単独及び化合して）に対する応答を誘導し、非生物活性バリエーションA－グリアジン5 7－7 3 Q P 6 5 及びブランクより顕著に高かった。グルテンチャレンジ2週間後のこれらの応答は価値のあることであるが、G F D開始後>2カ月の被験者よりは低いらしい。A－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 単独に対する 50 応答は、P 0 4 7 2 4 8 4－1 0 0 Q E 9 2 単独に対する応答又はA－グリアジン5 7－7 3 Q E 6 5 と混合した場合の応答と等しいか又はより大きかった。被験者のだれ

もがグルテンチャレンジの苦痛の兆候を経験しなかった。

【0192】

A-グリアジンに対する免疫応答性（グルテンチャレンジ後にPBM C中で測定）はGFDを開始して2週間後に部分的に回復したことから、この優勢なT細胞エピトープに対する「免疫非応答性」は、未処置のセリアック病患者において且つGFD開始後の少なくとも1週間は優勢であることを示唆する。グルテンチャレンジ及びELISpotアッセイにおけるA-グリアジン57-73 QE65に対する応答の測定を用いたセリアック病の診断試験のタイミングは、GFDを開始して少なくとも2週間後である。

【0193】

A-グリアジン57-73 QE65に特異的なインターフェロンガンマ分泌T細胞は未処置のセリアック病患者においては末梢血中にて測定できず、GFDの少なくとも2週間後のグルテンチャレンジにより誘導することができる（抗原排除）。よって、この方法論を用いた診断試験のタイミングは非常に重大であり、そしてその最適化にはさらなる研究が必要である。これらの発見は、抗原排除により逆転した優勢なエピトープ、A-グリアジン57-73 QE65に特異的なT細胞の機能アネルギーと一致する。この現象は、ヒト疾患において以前には証明されておらず、T細胞アネルギーがセリアック病においてはペプチド治療により誘導可能かもしれないという可能性を支持する。

【0194】

実施例13

コムギグリアジンT細胞エピトープの包括的マッピング

抗原チャレンジは末梢血中で抗原特異的T細胞を誘導する。セリアック病においては、グルテンがこの免疫媒介性疾患を維持する抗原である。グルテンフリーダイエットで処置されたセリアック病のグルテンチャレンジは末梢血中のグルテン特異的T細胞の出現を導き、グルテンT細胞エピトープの分子特異性の決定を可能にさせる。上記のとおり、我々はモデルグルテン蛋白質中の単一の優勢なエピトープ、A-グリアジン（QE65において脱アミド化された57-73）を同定した。この実施例においては、セリアック病患者のグルテンチャレンジを用いて、GenBank中の111エンタリーに由来する各公知のコムギグリアジン蛋白質中の全ての有力な12のアミノ酸配列を試験した。全部で、652の20マーペプチドをHLA-DQ2及びHLA-DQ8関連のセリアック病において試験した。セリアック病において90%を超えて存在する古典的なHLA-DQ2複合体（HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*02）のセリアック病被験者9人のうちの7人は、末梢血中に誘導可能なA-グリアジン57-73 QE65-及びグリアジン-特異的T細胞応答を有した。A-グリアジン57-73は、HLA-DQ2関連セリアック病において、唯一の重要なα-グルテンT細胞エピトープであり、並びにもっとも有力なグリアジンT細胞エピトープであった。さらに、インターフェロン-γ ELISpotアッセイにおいてA-グリアジン57-73ほど有効性のある10%から70%の構造上関連したペプチドの5ファミリーほど存在した。これらの新規なT細胞エピトープは、γ-及びω-グリアジンに由来しており、そしてA-グリアジン57-73のコア配列（コア配列：FPQPQLPYP（配列番号：18））、例えばFPQPQQPF（配列番号：19）及びPQQPQQPF（配列番号：20）と構造上極めて類似しているが同一ではない共通配列を含んだ。A-グリアジン57-73の相同体はライムギ又はオオムギにおいて見いだされなかったが、他の2つの穀類はセリアック病において毒性であり、γ-及びω-グリアジン中の新たに定義されたT細胞エピトープはライムギ及びオオムギの保存蛋白質において完全に適合した（それぞれ、セカリン（secalins）及びホルデイン（hordeins））。

【0195】

HLA-DQ2に関連しないセリアック病はほとんど常にHLA-DQ8と関連していた。7人のHLA-DQ8+セリアック病被験者のだれもが、彼らが完全なHLA-DQ2複合体も所有していないなら、誘導可能なA-グリアジン57-73-特異的T細胞応答をグルテンチャレンジ後に有さなかった。完全なHLA-DQ2複合体を有さない4人

のH L A - D Q 8 +セリアック病被験者のうちの2人は、誘導可能なグリアジンペプチド特異的T細胞応答をグルテンチャレンジ後に有した。一人のH L A - D Q 8被験者においては、新規な優勢T細胞エピトープが、コア配列L Q P Q N P S Q Q Q P Q（配列番号：21）を用いて同定された。このペプチドのトランスグルタミナーゼによる脱アミド化バージョンは非脱アミド化ペプチドよりも有効性であった。以前の研究は、トランスグルタミナーゼにより脱アミド化したペプチドが配列L Q P E N P S Q E Q P E（配列番号：22）を有するはずであることを示唆したが；この配列を確認するためには、さらなる研究が必要である。1カ月の間グルテンフリーダイエットを受けた健康なH L A - D Q 2（10）及びH L A - D Q 8（1）の被験者の間で、グリアジンペプチド特異的T細胞応答は不変であり、グルテンチャレンジによりほとんど変わらず、そして、セリアック病の被験者においてグルテンチャレンジにより明らかにされた有効性T細胞エピトープでは決してなかった。結論として、H L A - D Q 2関連セリアック病において6より多い重要なT細胞エピトープが存在するらしく、そのうち、A - グリアジン57-73がもっと有効性である。H L A - D Q 2 - 及びH L A - D Q 8 - 関連セリアック病は同じT細胞特異性を共有しない。

【0196】

我々は、グルテンフリーダイエット後のセリアック病の個体の短期間のグルテンチャレンジが末梢血中にてグリアジン特異的T細胞を誘導することを示した。これらのT細胞の頻度は末梢血中で6日目に最大であり、続いて、次の週を通して迅速に弱まる。末梢血のグリアジン特異的T細胞は消化管の粘膜固有層へのホーミングに関連するインテグリン α 47を発現する。我々は、原型的なグルテン α -グリアジン蛋白質、A - グリアジンにおいてセリアック病に関連したT細胞エピトープをマップするためにこのヒト抗原-チャレンジデザインを開発した。トランスグルタミナーゼ（tTG）による脱アミド化が有する場合も無い場合も10アミノ酸がオーバーラップする15マーのペプチドを用いて、我々は、末梢血中で誘導されたT細胞が、65位のグルタミン酸が脱アミド化されたひとつのA - グリアジンペプチドの残基57-73を最初に標的化することを証明した。当該エピトープはH L A - D Q 2 - 制限されており、H L A - D Q 2のセリアック病との密接な関連と一致する。

【0197】

コムギ、ライムギ、及びオオムギの暴露によりセリアック病は再活性化される。コムギのグルテンの α/β -グリアジン画分はセリアック病においては一致して毒性であり、そしてほとんどの研究はこれらの蛋白質に焦点を合わせてきた。 α/β -グリアジンをコードする遺伝子クラスターはコムギ染色体の6C上に位置する。ライムギ又はオオムギには α/β -グリアジンの相同物がない。しかしながら、コムギのグリアジンサブタイプの3つ全て（ α/β 、 γ 、及び ω ）がセリアック病において毒性である。 γ -及び ω -グリアジン遺伝子はコムギでは染色体1APL上に位置しており、ライムギ及びオオムギのセカリン及びホルデインに相同である。

【0198】

パンコムギ（*Triticum aestivum*）においては61の α -グリアジンに関して同定された遺伝子が今存在する。 α -グルテン配列は密接に相同であるが、A - グリアジンにおいて優勢なエピトープは、 α -グリアジン配列においてほとんど多型性の領域に由来する。Andersonら（1997）は、パンコムギ（*T. aestivum*）中に全部で約150の異なる α -グリアジン遺伝子が存在するが、多くは偽遺伝子であると見積もった。よって、セリアック病に関連するT細胞のエピトープが公知の α -グリアジン配列中に含まれないことは、ありそうもない。

【0199】

我々の研究は、セリアック病に特異的な有効性のT細胞エピトープとしてA - グリアジン57-73にほとんど同一の、脱アミド化された α -グリアジンペプチドのグループを同定した。90%を超えるセリアック病患者はH L A - D Q 2+であり、これまで、我々はグルテンチャレンジ後のH L A - D Q 2+セリアック病被験者のみを査定してきた。し

かしながら、H L A - D Q 2 を発現しないセリアック病患者がほとんど皆 H L A - D Q 8 を有する。よって、他のコムギ、ライムギ及びオオムギグルテン蛋白質中の A - グリアジン 5 7 - 7 3 及びその相同体が、H L A - D Q 2 + 及び H L A - D Q 8 + セリアック病の両方においてグルテンチャレンジにより誘導される T 細胞により認識される唯一の T 細胞エピトープであるか否かを知ることは非常に不可欠である。これが事実なら、セリアック病のための治療用のペプチドのデザインは、たった一つのペプチドのみしか必要としないかもしれない。

A - グリアジン 5 7 - 7 3 の T 細胞エピトープとしての相同体

A - グリアジン 5 7 - 7 3 (P Q L P Y < 配列番号 : 1 2 >) のコア配列をコードする穀物遺伝子に関する S w i s s P r o t 及び T r e m b l 遺伝子データベースの最初の検索は、 α / β - グリアジンを明らかにしただけであった。しかしながら、A - グリアジン 5 7 - 7 3 Q E 6 5 エピトープの我々の初期のマッピング研究は、コア領域 (P Q L P) 中の許容可能な点の置換が限定された数であることを明らかにした (Q 6 5 はエピトープ中で実際に脱アミド化されている) 。よって、我々は、配列 X X X X X X X P Q [I L M P] [P S T] X X X X X X (配列番号 : 2 3) を有するペプチドをコードする S w i s s P r o t 及び T r e m b l データベースの中の遺伝子に我々の検索を拡大した。相同体は、 γ - グリアジン、グルテニン、ホルデイン及びセカリンの間に同定された (表 1 2 参照) 。さらなる相同体は、G e n B a n k において 3 つの ω - グリアジンエントリーの可視検索により ω - グリアジン中に同定された。

【 0 2 0 0 】

A - グリアジン 5 7 - 7 3 のこれらの相同体は、t T G による脱アミド化 (又は 4 つの密接な相同体中のグルタミン酸 (Q E) - 置換されたバリエーションの合成) の後に、I F N γ E L I S p o t アッセイを用いて、末梢血単核細胞を用いて、セリアック病の被験者においてグルテンチャレンジ後に査定した。 ω - グリアジン配列 (A A G 1 7 7 0 2 1 4 1 - 1 5 7) は唯一の生物活性ペプチドであり、約半分が A - グリアジン 5 7 - 7 3 として有効である (表 1 2 、及び図 2 9 参照) 。よって、優勢な A - グリアジンエピトープの相同体の検索は、 γ - グリアジン、セカリン、及びホルデインの毒性に関して考慮することを怠った。

方法

全ての可能性のあるコムギグリアジン T - 細胞エピトープにわたるペプチドのセットのデザイン

公知のパンコムギ (T r i t i c u m a e s t i v u m) のグリアジン遺伝子又は遺伝子断片によりコードされた全ての可能な T 細胞エピトープを同定するため (G e n B a n k 中の 6 1 α / β - , 4 7 γ - , 及び 3 ω - グリアジンエントリー) 、遺伝子由来の蛋白質配列を、C u s t a l W ソフトウェア (M e g A l i g n) を用いてアラインメントを行い、そして分類することにより系統発生グループ化した (表 2 2 参照) 。多くのエントリーは、より長い配列の末端削除を表し、そして多くの遺伝子セグメントは、ポリグルタミン繰り返し長さ又は稀な置換を除いて同一であった。よって、公知のコムギ遺伝子によりコードされる全ての有力な 1 2 アミノ酸配列を有理化して (r a t i o n a l i z e) 6 5 2 の 2 0 マーペプチドのセットに含ませることができた。 (シグナルペプチド配列は含まれなかった) 。ペプチド配列を表 2 3 に掲載する。

包括的エピトープマッピング

4 週間グルテンフリーダイエットを受けた健康な対照 (H L A - D Q 2 + n = 1 0 , 及び H L A - D Q 8 + n = 1) 、及び長期間のグルテンフリーダイエットを受けたセリアック病の被験者 (6 人の H L A - D Q 2 , 4 人の複合同型接合 H L A - D Q 2 / 8 、及び 3 人の H L A - D Q 8 / X) (表 1 3 参照) を、グルテンチャレンジの前及び後の 6 及び 7 日目に調査した (標準の白パン 5 0 g スライス 4 切れ - セインズベリーズサンドイッチパン、毎日) 。末梢血 (7 日間にわたり全部で 3 0 0 g) を採血して、末梢血単核細胞 (P B M C) を L y m p h o p r e p 密度勾配により分離した。P B M C を 6 又は 8 の 2 0 マーペプチド、又は t T G により脱アミド化されたか又はされていない単一のペプチド

10

20

30

40

50

のプールと、一晚、インターフェロンガンマ（IFN γ ）ELISpotアッセイにおいてインキュベートした。

【0201】

ペプチドはPepsets (Mimotopes Inc., メルボルン、オーストラリア) において96のバッチ中で合成した。約0.6マイクロモルの各651の20マーを提供した。2つのマーカー20マーペプチドを96の各セットに含ませ（VLQQHNIAHGSSQVLQESTY）ーペプチド161（配列番号：24）、そしてIKDFHVYFRESRDALWKGG（配列番号：25）を逆相-HPLC及びアミノ酸配列分析により特性決定した。これらのマーカーペプチドの平均純度はそれぞれ50%及び19%であった。ペプチドを最初にアセトニトリル（10%）及びHepes 100mMから10mg/mlに溶解した。

【0202】

IFN γ ELISpotアッセイのためにPBMCとインキュベートされたプール（又は単独）中の個々のペプチドの最終濃度は20 μ g/mlであった。ペプチドの5倍濃縮した溶液及び1mMの塩化カルシウムを含むPBS中のプールを分配して、ELISpotアッセイにおいて後に使用されるテンプレートに従い96ウェルプレート中に保存した。モルモット組織tTG（Sigma T5398）との100：32の比における2時間37 $^{\circ}$ Cのインキュベーションにより、脱アミド化されたペプチド及びペプチドのプールを調製した。ペプチド溶液を-20 $^{\circ}$ Cにおいて保存して、使用前に新たに解凍した。

【0203】

エンドトキシンフリーの水及び2M尿素中のグリアジン（Sigma G3375）（100mg/ml）を10分間ボイルし、室温に冷却し、そしてフィルター（0.2 μ m）ー滅菌されたHCl 0.02M中のペプシン（Sigma P6887）（2mg/ml）又は重炭酸アンモニウム中のキモトリプシン（C3142）（4mg/ml）とインキュベートした。4時間のインキュベーション後に、ペプシン消化されたグリアジンを水酸化ナトリウムにより中和し、そして次にペプシンー消化グリアジン及びキモトリプシンー消化グリアジンの両方を15分間ボイルした。グリアジンを除いたプロテアーゼとの同一のインキュベーションも実施した。サンプルを15000gにおいて遠心分離し、次に、蛋白質濃度を上清中でBCA法（Pierce, USA）により見積もった。IFN γ ELISpotアッセイにおける最終的な使用の前に、グリアジンープロテアーゼのアリコートをとTGと共に比率2500：64 μ g/mlにてインキュベートした。

【0204】

IFN γ ELISpotアッセイ（Mabtech, スウェーデン）を96ーウェルプレート（MAIP S-45, Millipore）中で、各ウェルが25 μ lのペプチド溶液及び100 μ lのPBMC（2-8105/ウェル）を、10%熱不活性化ヒトAB血清を含むRPMI中に含むように、実施した。脱アミド化されたペプチドプールを一つの96ーウェルELISpotプレート中で査定し、そして第2プレート上で脱アミド化なしのペプチドプール（同一のレイアウト）を0日目及び6日目に査定した。脱アミド化されたペプチドを含むプレート中の全てのウェルがtTGを含んだ（64 μ g/ml）。各ELISpotプレート中に、ペプチドプールを含む83のウェルが存在し（各ウェル中唯一のプール）、そして「対照」ペプチドのウェルのシリーズ（ペプチドは全て>90%の純度、MS及びHPLCにより特性決定された、Research Genetics）：P04722 77-93（QLQPFPQPQLPYPPQP（配列番号：26）、P04722 77-93 QE85（二重）（QLQPFPQPQLPYPPQP（配列番号：27）、P02863 77-93（QLQPFPQPQLPYSPQP（配列番号：28）、P02863 77-93 QE85（QLQPFPQPQLPYSPQP（配列番号：29）、及びキモトリプシン消化されたグリアジン（500 μ g/ml）、ペプシン消化されたグリアジン（500 μ g/ml）、キモトリプシン（20 μ g/ml）単独、ペプシン（10 μ g/ml）単独、及びブランク（PBS+/-tTG）（二重）。

【0205】

展開及び乾燥後に、IFN γ ELISpotプレートをMAIP自動化スポット形成ELISpotカウンターを用いて査定した。HLA-DQ2の健康被験者及びセリアック病被験者において、IFN γ ELISpotアッセイにおいてペプチドプールによりスポット形成細胞(sfc)の誘導を、100万PBMCあたりのスポット形成細胞(sfc)マイナスブランクに適用した、一方をつないだ(one-tailed)Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks試験(SPSSソフトウェア)を用いて、6日目体0日目(「正味の応答」)にて試験した。インビボグルテンチャレンジによるPBMC中のペプチドプールに対するIFN γ 応答の顕著な誘導を、少なくとも10sfc/100万PBMC及び有意性レベル $p < 0.05$ の中央値の「正味の応答」として定義した。6日目のペプチドの特定のプールに対する顕著な応答に、同日又は7日目に採られたPBMCを使用して各プール内において個々のペプチドの評価を続けた。

【0206】

個々のペプチドのIFN γ ELISpotアッセイに関して、生物活性を同じELISpotプレート中で査定されたP04722 77-93 QE85に対する応答のパーセントとして表現した。36万(範囲: 0.3-0.72)、PBMCの中央値を用いて、ブランクに対する中央値の応答(PBS単独)はウエルあたり0.2sfc(範囲0-5)であり、そしてウエルあたり陽性対照(P04722 77-93 QE85)76.5(範囲25-383)sfcであった。よって、P04722 77-93 QE65のパーセンテージとして表現されたブランクに対する中央値の応答は0.2%(範囲: 0-6.7)であった。P04722 QE85のそれより10%高い平均生物活性を有する個々のペプチドを共通の構造上のモチーフに関して分析した。

結果

健康なHLA-DQ2被験者

1カ月グルテンフリーダイエットを受けた健康なHLA-DQ2+被験者の誰も、グルテンチャレンジの前又は後にA-グリアジン57-73の相同体に対してIFN γ ELISpot応答を有さなかった。しかしながら、10人の健康な被験者のうち9人において、グルテンチャレンジが、グリアジンのペプシン消化及びキモトリプシン消化の両方に対するIFN γ 応答の顕著な増加を伴い、0日目の0-4sfcの中央値/百万から16-29sfcの中央値/百万であった(表14参照)。健康な被験者のグリアジン応答は脱アミド化により影響されなかった(表15参照)。健康な被験者のうち、特定のグリアジンペプチドプールに対するIFN γ 応答の、グルテンチャレンジとの一致した誘導はなかった(図30、及び表16参照)。IFN γ ELISpot応答は場合によりみられたが、弱く、そして脱アミド化により影響されなかった。プールに対するもっとも強い応答の多くも0日目には存在しなかった(表17、被験者H2, H8及びH9参照)。4人の健康な被験者はプール50に対して明確な応答を示し、6日目にもっとも強い応答をもった2人は0日目にも応答を有した。両被験者において、プール50に対するチャレンジ後の応答はペプチド390(QQTYPQRPPQPFPTQQPQQ(配列番号: 30))によった。

HLA-DQ2セリアック病被験者

HLA-DQ2+セリアック病被験者におけるグルテンチャレンジの後、P04722 77-93 QE85に対する中央値のIFN γ ELISpot応答は0から133sfc/百万の中央値から上がった(表4参照)。6人のセリアック病被験者のうちの一人(C06)はP04722 77-93 QE85(2sfc/百万)に応答せず、そしてグリアジンペプチドプールに弱く応答しただけであった(最大: プール50+tTG 27sfc/百万)。前の研究に一致して、野生型P04722の生物活性はtTGによる脱アミド化により6.5倍上昇した(表15参照)。グリアジン消化に対するインターフェロンガンマ応答はベースラインに存在したが、キモトリプシン-グリアジンに関しては20から92sfcの中央値/百万まで、そしてペプシン-グリアジンに関しては4

4 から 1 7 6 s f c の中央値／百万まで、グルテンチャレンジにより実質上は増加した。グリアジンの脱アミド化は、キモトリプシン-グリアジンに関して 3. 2 倍の中央値、そしてペプシン-グリアジンに関して 1. 9 倍の中央値だけ生物活性を増加させた（表 1 5 参照）。（ペプシンによる消化に要求される酸性度はグリアジンの部分脱アミド化をもたらすらしい。）

健康な被験者とは対照的に、グルテンチャレンジは、 α -, γ -, 及び ω -グリアジンを含む 8 3 の処理されたプールのうちの 2 2 に対して I F N γ E L I S p o t 応答を誘導した（図 3 1 及び表 1 7 参照）。プールの生物活性は被験者間で一致していた（表 1 8 参照）。ペプチドプールにより誘導された I F N γ E L I S p o t 応答は脱アミド化によりほとんどいつも増加した（表 1 7 参照）。だが、脱アミド化によるプールの生物活性の増 10
強は、A-グリアジン 5 7-7 3 の相同体を含むプールに関してさえ、P 0 4 7 2 2 7 7-7 3 Q E 8 5 ほど顕著ではなかった。これは、P e p s e t ペプチドが合成又は調製の間に部分的に脱アミド化されていたことを示唆し、例えば P e p s e t ペプチドはトリフルオロ酢酸（T F A）の塩として T F A 溶液からの凍結乾燥後にデリバリーされる。

【0 2 0 7】

2 1 のもっとも生物活性なプールからの 1 7 0 の個々の t T G 脱アミド化ペプチドを別々に査定した。7 2 の脱アミド化ペプチドは均等な濃度において P 0 4 7 2 2 7 7-9 3 Q E 8 5 より 1 0 % 生物活性が高かった（2 0 μ g / m l）（表 1 9 参照）。5 つのもっとも有効なペプチド（P 0 4 7 2 2 Q E 8 5 の 8 5-9 4 % の生物活性）は、以前に α -グリアジン相同 A-グリアジン 5 7-7 3 として同定された。5 0 の生物活性ペプ 20
チドは A-グリアジン 5 7-7 3 と相同でなかったが、構造上関連する配列の 6 ファミリーに分類できた（表 2 0 参照）。各々のペプチドファミリーのもっとも生物活性な配列は：P Q Q P Q Q P Q Q P F P Q P Q Q P F P W（配列番号：3 1）（ペプチド 6 2 6、P 0 4 7 2 2 Q E 8 5 の中央値 7 2 % 生物活性）、Q Q P Q Q P F P Q P Q Q P O L P F P Q Q（配列番号：3 2）（3 4 3、3 4 %）、Q A F P Q P Q Q T F P H Q P Q Q Q F P Q（配列番号：3 3）（3 5 5、2 7 %）、T Q Q P Q Q P F P Q Q P Q Q P F P Q T Q（配列番号：3 4）（3 9 6、2 3 %）、P I Q P Q Q P F P Q Q P Q Q P Q Q P F P（配列番号：3 5）（6 2 5、2 2 %）、P Q Q S F S Y Q Q Q P F P Q Q P Y P Q Q（配列番号：3 6）（6 1 8、1 8 %）（コア配列に下線を引く）であった。これらの配列の 30
全ては、トランスグルタミナーゼによる脱アミド化に感受性であると予測されたグルタミン残基を含む（例えば、Q X P, Q X P F（配列番号：3 7）、Q X X [F Y]（配列番号：3 8））（V a d e r e t a l 2 0 0 2 参照）。幾つかの生物活性ペプチドは異なるファミリーからの 2 つのコア配列を含む。

【0 2 0 8】

異なる T 細胞集団が別のコア配列を有するエピトープに応答するという可能性と一致して、異なるファミリーからのペプチドの生物活性は付加的らしい。例えば、t T G 処理されたプール 8 1 の中央値生物活性は P 0 4 7 2 2 Q E 8 5 の 1 4 1 % であったが、個々のペプチドの生物活性は：ペプチド 6 3 1（A-グリアジン 5 7-7 3 の相同体）6 1 %、6 3 6（6 2 6 の相同体）5 1 %、そして 6 3 5 1 9 %、6 2 9 1 6 %、そして 6 3 4 1 3 %（全て 3 9 6 の相同体）の順位の序列であった。 40

【0 2 0 9】

単純化しすぎたかもしれないが、グリアジンペプチドに対する合計の I F N γ E L I S p o t 応答に対する各「ペプチドファミリー」の貢献を H L A - D Q 2 + セリアック病被験者において比較した（図 3 2 参照）。従って、グリアジンペプチドに対する合計の応答に対する P 0 4 7 2 2 7 7-7 3 E 8 5 の貢献は、1 / 5 と 2 / 3 の間であった。

【0 2 1 0】

インターネットのワールドワイドウェブ、例えば「c b r g . i n f . e t h z . c h / s u b s e c t i o n 3 _ 1 _ 5 . h t m l」を通してアクセス可能な、ペプチド相同性検索プログラム、WWW P e p P e p S e a r c h を用いて、及びライムギのセカリンの G e n B a n k 配列との直接の比較により、厳密な適合が、オオムギのホルデイン（ 50

H O R 8) 及びライムギセカリン (A 2 3 2 7 7, C A A 2 6 4 9 9, A A G 3 5 5 9 8) 中にコア配列: Q Q P F P Q P Q Q P F P (配列番号: 3 9) 及びオオムギホルデイン (H O G 1 及び H O R 8) 中にコア配列: Q Q P F P Q Q P Q Q P F P (配列番号: 4 0) に関して厳密な適合が発見され、そして P I Q P Q Q P F P Q Q P (配列番号: 4 1) に関して、オオムギホルデイン (H O R 8) 中に発見された。

H L A - D Q 8 関連セリアック病

7 人の H L A - D Q 8 + セリアック病被験者をグルテンチャレンジの前と後に研究した。これらの H L A - D Q 8 + (H L A - D Q A 0 * 0 3 0 1 - 3, H L A - D Q B 0 * 0 3 0 2) 被験者のうちの 5 人も、セリアック病関連 H L A - D Q 2 複合体 (D Q A 0 * 0 5, D Q B 0 * 0 2) の一方又は両方を有した。両方のセリアック病関連 H L A - D Q 複合体を有する 3 人の被験者のうちの 2 人は、質的及び量的に H L A - D Q 2 セリアック病被験者と同一であったグリアジンペプチドプール (及び P 0 4 7 2 2 7 7 - 9 3 Q E 8 5 を含む個々のペプチド) に対して有効な応答性を有した (図 3 3 及び 3 4、及び表 1 8 を参照)。脱アミド化されたペプチドプール 7 4 は両 H L A - D Q 2 / 8 被験者において生物活性であったが、6 人の H L A - D Q 2 / X 被験者の一人においてのみであった。プール 7 4 の t T G による前処理は生物活性を 3. 8 倍から 2 2 倍増強し、そして 3 人の応答者における t T G 処理されたプール 7 4 の生物活性は、P 0 4 7 2 2 7 7 - 9 3 E 8 5 の生物活性の 7 8 % 及び 3 5 0 % の間に等しい。現在、何れのペプチドが被験者 C 0 2, C 0 7 及び C 0 8 においてプール 7 4 において生物活性であるかわかっていない。

【0 2 1 1】

セリアック病に関連した H L A - D Q 2 対立遺伝子の両方又は一方を欠く 4 人の H L A - D Q 8 セリアック病被験者のうちの 2 人はグリアジンペプチドプールに対して極めて弱い I F N γ E L I S p o t 応答しか示さなかったが、残りの 2 人はプロテアーゼ消化されたグリアジン及び特異的ペプチドプールの両方に応答した。被験者 C 1 2 (H L A - D Q 7 / 8) は、脱アミド化されたプール 1 - 3 に対して激しく応答した (図 3 5 参照)。これらのプールにおける個々のペプチドの評価は、コア配列 L Q P Q N P S Q Q Q P Q (配列番号: 4 2) を含む一連の密接に関連した生物活性ペプチドを同定した (表 2 0 参照)。以前の研究 (我々による) は、この配列中の 3 つのグルタミン残基が t T G 媒介脱アミド化に感受性であることを証明した (下線)。W W W P e p P e p S e a r c h を用いた相同性検索は、コムギ α -グリアジンにおいてのみ L Q P Q N P S Q Q Q P Q (配列番号: 4 3) に対して密接な適合を同定した。

【0 2 1 2】

4 人の H L A - D Q 8 被験者 (C 1 1) は、t T G 処理されたプール 3 3 に対して誘導可能な I F N γ E L I S p o t 応答を有した (図 3 6 参照)。プール 3 2 及び 3 3 は t T G による脱アミド化後に活性な以前に定義された H L A - D Q 8 制限されたグリアジンエピトープ (Q Q Y P S G Q G S F Q P S Q Q N P Q (配列番号: 4 4)) の多型を含む (下線を引かれた G l n は脱アミド化されて生物活性を運ぶ) (v a n d e r W a l e t a l 1 9 9 8)。現在、何れのペプチドがプール 3 3 において被験者 C 1 1 において生物活性であるか分かっていない。

【0 2 1 3】

インビボグルテンチャレンジ及びコムギグリアジン中の全ての公知の 1 2 アミノ酸配列にわたる 6 5 2 ペプチドのセットを使用した、H L A - D Q 2 関連セリアック病における包括的 T 細胞エピトープマッピングは、即ち、公知の α -グリアジンエピトープ、A-グリアジン 5 7 - 7 3 Q E 6 5 の 1 0 % の生物活性の少なくとも 7 2 のペプチドを同定した。しかしながら、これらの生物活性ペプチドはほんの 5 つほどの異なるが密接に関連したペプチドファミリーのセットに減らされ得る。ほとんど全てのこれらペプチドは、プロリン、グルタミン、フェニルアラニン、及び/又はチロシンが豊富であり、そして配列 P Q (Q L) P (F Y) P (配列番号: 4 5) を含む。この配列は t T G による 2 位の Q の脱アミド化を促進させる。A-グリアジン 5 7 - 6 8 の脱アミド化による類推により (A r e n t z - H a n s e n 2 0 0 0)、t T G による脱アミド化により広く見いだされ

10

20

30

40

50

たこれらのペプチドの増強された生物活性は、H L A - D Q 2 に関する結合の親和性の増加によるかもしれない。

【0214】

これらの生物活性グリアジンペプチドの一つより多くをインビボにおいて認識するT細胞の間の交差反応性は起こり得る。しかしながら、関連するペプチドの各セットが別のT細胞集団をインビボにおいて活性化するなら、A-グリアジン57-73 E65に相当するエピトープはもっとも有効であり、そしてグルテンチャレンジの後のグリアジンに対する応答においてI F N γ を分泌する末梢血T細胞の少なくとも40%により広く認識される。

【0215】

非グリアジン-ペプチド特異的応答が、H L A - D Q 2 / X 関連のセリアック病におけるものと質的に異なったH L A - D Q 2 / 8 セリアック病において見いだされた。しかしながら、H L A - D Q 2 対立遺伝子の両方を持たないH L A - D Q 8 + のセリアック病被験者の末梢血T細胞は、A-グリアジン57-73 E65相同体を認識しなかった。2つの異なるエピトープが2つのH L A - D Q 8 + セリアック病において優勢であった。これらのH L A - D Q 8 + の個体における優勢なエピトープは以前に同定されていなかった(L Q P Q N P S Q Q Q P Q (配列番号: 46))。

【0216】

本明細書中の教示を仮定すれば、共通に認識されるT細胞エピトープの全てを利用してセリアック病のための免疫治療のデザインが実用的になり、6より少ない異なるペプチドを含むかもしれない。コムギの γ -及び ω -グリアジン中のエピトープは、オオムギホルディン及びライムギセカリン中にも存在する。

【0217】

実施例14

幾つかのE L I S p o t アッセイを前記のとおりを実施して、以下の結果及び／又は結論を生じた：

P Q L P Y による複数の α -グリアジン多型の拡大

A-グリアジン57-73 Q E の有効なアゴニスト (G 0 1) は、Q L Q P F P Q P E L P Y P Q P Q S (G 0 1), P Q L - Y - - - - - P (G 1 0), 及び P Q P Q P F L - - - - - (G 1 2) を含む。有効性が劣るのは、
 - - - - - L - - - - - P (G 0 4), - - - - -
 - R - - - - - P (G 0 5), 及び - - - - - S - - - - -
 P (G 0 6) を含む。有効性がさらに劣るのは、
 - - - - - L - - - - - S - - - - -
 - - - - - P (G 0 7), - - - - - S - - - - - S - - - - - P (G 0 8)
 - - - - - S - - - - - P (G 0 9), 及び P Q P Q P F P - - - - - (G 1 3) を含む。ダッシュは特定の位置におけるG 0 1 配列との同一性を示す。

グルテンチャレンジは新たに診断されたセリアック病においてたった2週間のグルテンフリーダイエット後にA-グリアジン57-73 Q E 6 5 T細胞を含む

追加の分析は、t T G 脱アミド化されたグリアジン応答が新たに診断されたセリアック病において2週間後に変化することを示した。他の分析は、脱アミド化されたグリアジン特異的T細胞がC D 4 ⁺ α 4 β 7 ⁺ H L A - D Q 2 制限されることを示した。

最適なエピトープ (クローン対グルテンチャレンジ)

「優勢な」エピトープが γ I F N E L I S p o t によりグルテンチャレンジ後に定義される。Q L Q P F P Q P E L P Y P Q P Q S (100% E L I S p o t 応答)。腸のT細胞クローンにより定義されたエピトープ: Q L Q P F P Q P E L P Y (27%), P Q P E L P Y P Q P E L P Y (52%), 及びO O L P Q P E Q P Q Q S F P E Q E R P F (9%)。

個々のペプチド配列間の順位

順位はコムギ又はライムギに依存する。コムギに関して、優勢なペプチドは、ペプチド

10

20

30

40

50

番号 89、90 及び 91 を含む（表 23 における番号を参照）。ライムギに関して、優勢なペプチドは、ペプチド番号 368、369、370、371、及び 372 を含む（表 23 における番号を参照）。635 及び 636（表 23 における番号を参照）を含む幾つかのペプチドは、ライムギ及びコムギの両方において活性を示した。

インビボグルテンチャレンジは T 細胞エピトープのヒエラルキーがセリアック病に関して定義されることを可能にする

エピトープのヒエラルキーは HLA-DQ2⁺ セリアック病の間で一致しているが、HLA-DQ8⁺ セリアック病に関しては異なる。ヒエラルキーはコムギ穀物が消費されることに依存する。脱アミド化はほとんど全てのグリアジンエピトープを生成する。HLA-DQ2、DQ8 及び DR4 が脱アミド化されたペプチドを提示する。HLA-DQ2/8-関連のセリアック病は優先的に DQ2-関連グリアジンエピトープを提示する。グリアジンエピトープは、エピトープに基づく治療剤の開発を正当であると理由付けするのに十分制限される。

【0218】

他の分析は以下を示した：HLA-DR3-DQ2（85-95%）及び HLA-DR4-DQ8（5-15%）。

他の分析は以下を示した：

【0219】

【表 2】

	HLA-DQ	HLA-DQA1	HLA-DQB1	十二指腸	グルテン	グルテン上の	
		対立遺伝子	対立遺伝子	組織構造	フリー	EMA (GFD上)	
C01	2,6	102/6, 501	201, 602	SVA	1 年	+(-)	20
C02	2,2	501	201	SVA	1 年	+(-)	
C03	2,5	101/4/5, 501	201, 501	PVA	1 年	+(-)	
C04	2,5	101/4/5, 501	201, 501	SVA	7 年	+(-)	
C05	2,2	201, 501	201, 202	SVA	4 月	+(ND)	
C06	2,2	201, 501	201, 202	SVA	2 年	+(-)	
C07	2,8	301-3, 501	201, 302	SVA	1 年	+(-)	
C08	2,8	301-3, 501	201,302/8	SVA	11 年	ND (-)	
C09	2,8	301-3; 501	201, 302	SVA	29 年	+(-)	
C10	2,8	201, 301-3	202, 302	IEL	1 年	+(-)	
C11	6,8	102/6, 301-3	602/15, 302/8	IEL	9 月	-(ND)	
C12	8,7	301-3, 505	302, 301/9-10	SVA	2 年	-(-)	
C13	8,8	301	302	SVA	1 年	+(+)	40

【0220】

被験者 12 のプール 1-3 において個々の tTG-脱アミド化されたペプチドの生物活性を測定するために、別の分析を実施した。結果は次のとおりである（配列の番号は表 23 に掲載されたペプチドを指す）：配列 8（100%）、配列 5（85%）、配列 6（82%）、配列 3（77%）、配列 1（67%）、配列 2（59%）、配列 9（49%）、配列 7（49%）、配列 10（33%）、配列 4（15%）、配列 12（8%）、配列 11（0%）、配列 23（26%）、配列 14（18%）、配列 15（18%）、配列 17（18%）、配列 16（13%）、配列 14（8%）、配列 22（5%）、配列 18（3%）、配列 19（3%）、配列 20（0%）、配列 21（0%）。予測された脱アミド化

配列は L Q P E N P S Q E Q P E である。

P B M C による個々の E L I S p o t 応答 (E L I S p o t リーダーにより測定されたスポット形成細胞)

【 0 2 2 1 】

【表 3】

ペプチド(表 2 3 参照) C01 C02 C03 C04 C05

65	16	2	1	2	3
66	32	6	13	0	6
67	16	3	4	0	4
68	25	8	4	2	2
69	4	0	0	0	0
70	2	1	0	0	0
71	1	1	0	0	1
72	0	0	0	0	0
73	95	21	42	31	31
74	122	15	29	21	28
75	5	1	2	2	5
76	108	13	28	16	22
77	3	0	1	0	1
78	21	2	3	5	3
79	20	0	2	0	2
80	5	2	0	0	3
81	4	1	2	3	1
82	3	3	5	2	2
83	14	2	0	0	1
84	3	0	0	0	0
85	14	1	2	1	2
86	11	0	2	0	2

10

20

30

【 0 2 2 2 】

交差反応性

29人の被験者の652のペプチドからのデータを扱うため、又は特定の応答が真実の陽性のペプチド特異的T細胞応答であるかを決定するため、又はペプチドに対する応答が別の構造上関連するペプチドとの交差反応性によるかを決定するために、特定のペプチド応答の発現を「優勢な」ペプチド応答のパーセンテージとすることができる。或いは、当該発現はペプチド応答間の相関係数としての「遅延 (r e t a r d n e s s) 」とし得るか、又はバイオインフォマティックスにより得る。

40

追加のエピトープ

代表的な結果は次の通りである：

ペプチドの P 0 4 7 2 2 E との組み合わせ (全て 2 0 m c g / m l) (n = 4)

	単独	P 0 4 7 2 2 E +
P e p 6 2 6	6 0	1 3 5
P 0 4 7 2 2 E	1 0 0	1 1 0

50

H L A a 0 8 5

(P 0 4 7 2 2 E のパーセントとして表された)

6 2 6 + t T : P Q Q P Q Q P Q Q P F P Q P Q Q P F P W

0 4 7 2 2 E : Q L Q P F P Q P E L P Y P Q P Q L

ペプチド 6 2 6 の t T G 脱アミド化 (n = 1 2)

t T G なし = 1 0 0 %

t T G = 1 7 0 %

特定の位置における置換

ペプチド 6 2 6 P Q Q P [Q 1] Q P [Q 2] Q P F P Q P [Q 3] Q P F P V の置換 (n = 1 2)

10

	G l u	A r g
Q 1	9 5	9 0
Q 2	1 4 5	8 0
Q 3	1 5 5	1 0

(野生型ペプチドのパーセントとして表された)

t T G 処理された 1 5 マーに及ぶペプチド 6 2 6 / 6 2 7 (P Q Q P Q Q P Q Q P F P Q P Q Q P F P W Q P) (n = 8)

P 1 - 1 5 5

P 2 - 1 6 4

P 3 - 1 7 3

P 4 - 1 8 3 8

P 5 - 1 9 6 5

P 6 - 2 0 9 5

P 7 - 2 1 6 5

P 8 - 2 2 9 0

(最大の 1 5 マー応答のパーセントとして表された)

複数エピトープ :

P 0 4 7 2 2 E : Q L Q P F P Q P Q L P Y P Q P Q L

6 2 6 + t T G : P Q Q P Q Q P Q Q P F P Q P Q Q P F P W

最小エピトープ : Q P Q Q P F P Q P Q Q P F P W

20

30

抗 - C D 4 によりコードされたビーズ及び抗インテグリン β_7 による P B M C の免疫磁気除去は I F N γ E L I S p o t 応答を除去させたが、抗 - C D 8 によりコードされたビーズ又は抗アルファ E インテグリンによる P B M C の免疫磁気除去はそうでなかった。即ち、I F N γ を分泌する P B M C は C D 4 + 及び $\alpha_4 \beta_7$ + であり、消化管内の粘膜固有層へのホーミングに関連した。

【 0 2 2 3 】

H L A - D Q 2 に関して異型接合及び同型接合においては、抗 - D Q 抗体によりブロックされたが抗 - D R 抗体によりブロックされなかった。これは一つの配列中の複数のエピトープを暗示するかもしれない。

セリアック病の T 細胞エピトープ

40

他の研究者らは、特定の腸 T 細胞クローンエピトープを特性決定した。例えば、V a d e r e t a l . , G a s t r o e n t e r o l o g y 2 0 0 2 , 1 2 2 : 1 7 2 9 - 3 7 ; A r e n t z - H a n s e n e t a l . , G a s t r o e n t e r o l o g y 2 0 0 2 , 1 2 3 : 8 0 3 - 8 0 9 を参照。これらは、T 細胞をクローン化するために使用されたインビトロ技術のためにその関係がいくらよく見ても不明であるエピトープの例である。

腸対末梢血クローン

腸 : 1) 腸生検、2) グルテンのペプシン-トリプシン消化に対して生じさせた T 細胞クローン、3) 全て H L A - D Q 2 制限される、4) クローンはトランスグルタミナーゼにより脱アミド化されたグリアジンに応答する。

50

末梢血：グルテンに対して生じさせたT細胞クローンはHLA-DQ及びDP制限される。結果：腸T細胞クローンはセリアック病関連エピトープをマップするのに限定的に使用することができる。

GDA__9コムギ307aa定義アルファ／ベータグリアジンMM1前駆体（プロラミン）受け入れ番号P18573—GenBank（その全体を引用により本明細書に編入する）

腸T細胞クローンエピトープ

腸T細胞クローンエピトープの定義は、例えば、Arentz-Hansen et al., J Exp Med. 2000, 191:603-12に見いだすことができる。また、腸T細胞クローンに関するグルテンエピトープも開示されている。脱アミド化されたQLQPFPQQLPYがエピトープであり、QLQPFPQPELPYの脱アミド化配列もある。HLA-DQ2制限がある。相同性検索は他の生物活性γアルファグリアジンがPQPQLPYを単独又は二重に含むことを示す。大多数のT細胞クローンはDQ2-αI:QLQPFPQPELPY DQ2-αII:PQPPELPYPQPELPYの何れかに応答する。 10

優勢なグリアジンT細胞エピトープ

全てトランスグルタミナーゼにより脱アミド化される。

グルテンチャレンジ6日後の末梢血：A-グリアジン57-73:

QLQPFPQPELPYPQPQS

腸T細胞クローン：DQ2-αI:QLQPFPQPELPY DQ2-αII:PQPPELPYPQPELPY 20

腸T細胞クローンエピトープマッピング

【0224】

【表4】

α-グリアジン	A1	PFPQPQLPY
	A2	PQPQLPYPQ
	A3	PYPQPQLPY
	Glia-20	PQQPYPQPQPQ
Γ-グリアジン	G1	PQQSFPQQQ
	G2	IIPQQPAQ
	G3	FPQQPQQPYPQQP
	G4	FSQPQQQFPQPQ
	G5	LQPQQPFPQQPQQPYPQQPQ
	Glu-21	QSEQSQQPFPQQF
	Glu-5	Q(IL)PQQPQQF
グルテニン	Glt-156	PFSQQQQSPF
	Glt-17	PFSQQQQQ

30

40

【0225】

末梢血におけるIFNγ-分泌A-グリアジン57-73 QE65-特異的T細胞のグルテン暴露及び誘導

未処理のセリアック病を1、2又は8週間グルテンフリーダイエットさせ、次にグルテン暴露し（3日パン200g/日）、次にグルテンフリーダイエットをさせた。

【0226】

結果1：グルテンフリーダイエットの期間及びグルテンチャレンジの0日目及び6日目のIFNγELISPOT応答：A-グリアジン57-73 QE65（IFNγ特異的 50

スポット／百万P P B M Cとして表された結果)

0日目：なし(0)、1週(1)、2週(2)、8週(1)

6日目：なし(0)、1週(4)、2週(28)、8週(48)

結果2：グルテンフリーダイエットの期間及びグルテンチャレンジの0日目及び6日目のI F N γ E L I S p o t 応答：t T G－グリアジン57－73 Q E 6 5 (I F N γ 特異的スポット／百万P P B M Cとして表された結果)

0日目：なし(45)、1週(62)、2週(5)、8週(5)

6日目：なし(0)、1週(67)、2週(40)、8週(60)

結果3：グルテンフリーダイエットの期間及びグルテンチャレンジの0日目及び6日目のI F N γ E L I S p o t 応答：A－グリアジン57－73 P 6 5 (I F N γ 特異的スポット／百万P P B M Cとして表された結果) 10

0日目：なし(1)、1週(2)、2週(1)、8週(1)

6日目：なし(0)、1週(0)、2週(0)、8週(0)

結果4：グルテンフリーダイエットの期間及びグルテンチャレンジの0日目及び6日目のI F N γ E L I S p o t 応答：P P D (I F N γ 特異的スポット／百万P P B M Cとして表された結果)

0日目：なし(90)、1週(88)、2週(210)、8週(150)

6日目：なし(0)、1週(100)、2週(210)、8週(100)

結果5：グルテンフリーダイエットの期間及びグルテンチャレンジの0日目及び6日目のI F N γ E L I S p o t 応答：t T G (I F N γ 特異的スポット／百万P P B M Cとして表された結果) 20

0日目：なし(5)、1週(4)、2週(3)、8週(2)

6日目：なし(0)、1週(4)、2週(1)、8週(2)

長期間のグルテンに対するH L A－D Q 2セリアック病におけるグルテンチャレンジ

抗グリアジンT細胞応答の特性決定を、末梢血において、3日間のグルテンチャレンジの6－8日後に実施した。

結果1：P B M C 6日目長期間グルテンフリーダイエット(抗H L A－D R及び－D Q抗体と前インキュベーション)(%阻害として表現)

D R－：t T G－グリアジン100m c g / m l (105), A－グリアジン57－73 Q E 6 5 50m c g / m l (90), P P D 5m c g / m l (30) 30

D Q－：t T G－グリアジン 100m c g / m l (5), A－グリアジン57－73 Q E 6 5 50m c g / m l (22), P P D 5m c g / m l (78)。

【0227】

結果2：P B M C 6日目長期間グルテンフリーダイエット(%C D 8－除去P B M C 応答として表現)

B 7 除去：t T G－グリアジン n = 6 (7), A－グリアジン57－73 n = 9 (6), P P D n = 8 (62)

A E 除去：t T G－グリアジン n = 6 (120), A－グリアジン57－73 n = 9 (80)、P P D n = 8 (110)。

【0228】 40

C D 4 除去：t T G－グリアジン n = 6 (10), A－グリアジン57－73 n = 9 (9), P P D n = 8 (10)。

治療用ペプチドは限定ではないが以下を含む

【0229】

【表 5】

QLQPFPPQLPYQPQS (AG01)

QLQPFPPQLPYQPQP (AG02)

QLQPFPPQLPYQPQL (AG03)

QLQPFPPQLPYLQPQP (AG04)

QLQPFPPQLPYQPQP (AG05)

QLQPFPPQLPYSQPQP (AG06)

QLQPFLQPQLPYSQPQP (AG07)

QLQPFSQPQLPYSQPQP (AG08)

QLQPFPPQLSYSQPQP (AG09)

PQLPYQPQLPYQPQP (AG10)

PQLPYQPQLPYQPQL (AG11)

PQPQFLPQLPYQPQS (AG12)

PQPQFPPQLPYQPQS (AG13)

PQPQFPPQLPYQYQP (AG14)

PQPQFPPQLPYQPPP (AG015)

10

20

【0230】

簡単には、経口の抗原チャレンジ後に、末梢血 T 細胞の特異性が腸の T 細胞クローンの特異性を反映する。末梢血においては、腸 T 細胞クローンのエピトープは、最適な α-グリアジンエピトープである A-グリアジン 57-73 QE65 に比較して準最適である。

【0231】

実施例 15

以下のとおりのマッピング目的のためにも ELISPOT アッセイを実施した。

優勢な DQ-8 関連エピトープのファインマッピング

30

【0232】

【表 6】

配列 / sfc	tTG-処理された配列 / sfc
VPQLQPQNPSQQQPQEQV / 76	RWPVPQLQPQNPSQQ / 60
	WPVPQLQPQNPSQQQ / 90
VPQLQPENPSQQQPQEQV / 3	PVPQLQPQNPSQQQP / 130
VPQLQPRNPSQQQPQEQV / 76	VPQLQPQNPSQQQPQ / 140
	PQLQPQNPSQQQPQE / 59
VPQLQPQNPSQEQPQEQV / 100	QLQPQNPSQQQPQEQ / 95
VPQLQPQNPSQRQPQEQV / 1	LQPQNPSQQQPQEQV / 30
	QPQNPSQQQPQEQVP / 4
VPQLQPQNPSQQQPQEEQV / 71	
VPQLQPQNPSQQQPREQV / 27	DQ8 グリアジンエピトープ
	GDA09 202Q / 6
VPQLQPQNPSQEQPQEEQV / 81	GDA09 202E / 83
VPQLQPENPSQQQPQEEQV / 2	GDA09 202Q+tTG / 17
VPQLQPENPSQEQPQEQV / 6	BI + tTG / 0
VPQLQPENPSQEQPQEEQV / 5	BI / 0

10

20

【0 2 3 3】

優勢なエピトープのファインマッピング (2)

【0 2 3 4】

【表 7】

Pool 33 (脱アミド化された) / sfc
A2b3 301 qqyp sgqg ffqp sqqn pqaq / 2
A2b5 301 qqyp sgqg ffqp fqqn pqaq / 1
A3a1 301 qqyp sgqg ffqp sqqn pqaq / 0
A3b1 301 qqyp ssqv sfqp sqln pqaq / 0
A3b2 301 qqyp ssqg sfqp sqqn pqaq / 2
A4a 301 eqyp sgqv sfqs sqqn pqaq / 28
A1b1 309 sfrp sqqn plaq gsvq pqq1 / 2
A1a1 309 sfrp sqqn pqaq gsvq pqq1 / 2

30

40

【0 2 3 5】

実施例 16

IFN γ -ELISPOT におけるグリアジンエピトープの生物活性 (25 mcg / ml, n = 6) (A-グリアジン 57-73 QE65 応答の % として表された)

DQ2-AII: 野生型 (WT) (4), WT + tTG (52), Glu-置換された (52)

DQ2-AI: 野生型 (WT) (2), WT + tTG (22), Glu-置換された (28)

GDA09: 野生型 (WT) (1), tTG (7), Glu-置換された (8)

A-G31-49: 野生型 (WT) (2), tTG (3), Glu-置換された (0) 50

A-グリアジン57-73 QE65 (G01E)の用量応答 (n=8) (G01Eの最大応答の%として表された)

0.025mcg/ml (1), 0.05mcg/ml (8), 0.1mcg/ml (10), 0.25mcg/ml (22), 0.5mcg/ml (38) < 1mcg/ml (43), 2.5mcg/ml (52), 5mcg/ml (70), 10mcg/ml (81), 25mcg/ml (95), 50mcg/ml (90), 100mcg/ml (85)。

【0236】

単独又はA-グリアジン57-75 (G01E)と混合されたグリアジンエピトープに対するIFN γ ELISpot 10
応答 (全て50mcg/ml, tTG-グリアジン100mcg/ml, PPD 5mcg/ml; n=9) (G01E応答の%として表された)

単独: DQ2-A1 (20), DQ2-A2 (55), オメガG1 (50), tTG-グリアジン (80), PPD (220), DQ2バインダー (0)

G01E+: DQ2-A1 (90), DQ2-A2 (95), オメガG1 (100), tTG-グリアジン (120), PPD (280), DQ2バインダー (80)

個々のセリアック病被験者におけるIFN γ ELISpot 10
応答に対するA-グリアジン57-73 QE65のアラニン及びリジン置換の効果 (n=8)

エピトープ配列: QLQPFPPQPELPYPQPQS

57-59位及び72-73位におけるアラニンの置換はA-グリアジン57-73
QE65 20
応答の%において、ほとんど又は全く低下を示さなかった。60-62位及び68-71位におけるアラニンの置換はA-グリアジン57-73 QE65 20
応答の%において穏やかな低下を示した。63-67位におけるアラニンの置換はA-グリアジン57-73 QE65 20
応答の%において最大の低下を示した。

個々のセリアック病被験者におけるIFN γ ELISpot 10
応答に対するA-グリアジン57-73 QE65のリジン置換の効果 (n=8)

エピトープ配列: QLQPFPPQPELPYPQPQS

57-59位及び71-73位におけるリジンの置換はA-グリアジン57-73
QE65 30
応答の%において、ほとんど又は全く低下を示さなかった。60-61位及び69-70位におけるリジンの置換はA-グリアジン57-73 QE65 30
応答の%において穏やかな低下を示した。62-68位におけるリジンの置換はA-グリアジン57-73 QE65 30
応答の%において最大の低下を示した。

【0237】

実施例17

表24は、コムギ又はライムギでチャレンジした数人の患者を用いた652のペプチドを試験する分析の結果を示す。

【0238】

【表 8】

文献

1. Molberg O, et al. Nature Med. 4, 713-717 (1998).
2. Quarsten H, et al. Eur. J. Immunol. 29, 2506-2514 (1999).
3. Greenberg CS et al. FASEB 5, 3071-3077 (1991).
4. Mantzaris G, Jewell D. Scand. J. Gastroenterol. 26, 392-398 (1991).
5. Mauri L, et al. Scand. J. Gastroenterol. 31, 247-253 (1996).
6. Bunce M, et al. Tissue Antigens 46, 355-367 (1995). 10
7. Olerup O, et al. Tissue antigens 41, 119-134 (1993).
8. Mullighan CG, et al. Tissue-Antigens. 50, 688-92 (1997).
9. Plebanski M et al. Eur. J. Immunol. 28, 4345-4355 (1998).
10. Anderson DO, Greene FC. The alpha-gliadin gene family. II. DNA and protein sequence variation, subfamily structure, and origins of pseudogenes. Theor Appl Genet (1997) 95:59-65.
11. Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, Quarsten H, Van der Wal Y, Kooy YMC, Lundin KEA, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SN. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. J Exp Med. 2000; 191:603-12. 20
12. Vader LW, de Ru A, van der Wal, Kooy YMC, Benckhuijsen W, Mearin ML, Drijfhout JW, van Veelen P, Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. J Exp Med 2002; 195:643-649.
13. van der Wal Y, Kooy Y, van Veelan P, Pena S, Mearin L, Papadopoulos G, Koning F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. J Immunol. 1998; 161:1585-8. 30
14. van der Wal Y, Kooy Y, van Veelan P, Pena S, Mearin L, Molberg O, Lundin KEA, Sollid L, Mutis T, Benckhuijsen WE, Drijfhout JW, Koning F. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:10050-10054.
15. Vader W, Kooy Y, Van Veelen P et al. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. Gastroenterology 2002, 122:1729-37
16. Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, et al. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadin rich in proline residues. Gastroenterology 2002, 123:803-809. 40

【 0 2 3 9 】

本明細書において引用されたか又は言及された P C T の公表、合衆国特許、他の特許、定期刊行物、及びあらゆるその他の刊行物はそれらの全体を引用により本明細書に編入する。

【 0 2 4 0 】

【表 9】

表 1. グリアジン蛋白質配列(アミノ酸配列決定に基づく)

VRVPVPQLQP QNPSQQQPFQ QVPLVQQQF PGQQQQFPFQ QPYPQPQFP SQQPYLQLQP FPQPQLPYPQ
 1 11 21 31 41 51 61
 PQSFPPQQPY PQPQPQYSQP QQPISQQQAQ QQQQQQQQQQ QQQILQQILQ QQLPCMDVV LQQHNIAHAR
 71 81 91 101 111 121 131
 SQVLQQSTYQ LLQELCCQHL WQIPEQSQCQ AIHNVVHAH LHQQKQQQQ PSSQVSFQQP LQQYP LGQGS
 141 151 161 171 181 191 201
 FRPSQQNPQA QGSVQPQLP QFEEIRNLAL QTLPAMCNVY IAPYCTIAPF GIFGTN
 211 221 231 241 251 261

表 2. 調査されたセリアック病被験者

	年齢 性別	グルテンフリー ダイエット	HLA-DQ2	パン チャレンジ	パンによる 兆候
1	64 女	14 年	同型接合	3 日	腹痛, 無気力, 口の潰瘍, 下痢
2	57 男	1 年	異型接合	10 日	無気力, 吐き気
3	35 女	7 年	異型接合	3 日	吐き気
4	36 男	6 週	同型接合	3 日	腹痛, 口の潰瘍, 下痢
5	26 男	19 年	異型接合	3 日	なし
6	58 男	35 年	異型接合	3 日	なし
7	55 男	1 年	異型接合	3 日	下痢
8	48 女	15 年	同型接合	3 日	腹痛, 下痢

【 0 2 4 1 】

10

20

【表 10】

65位のアミノ酸	範囲	平均
グルタミン酸	(100)	100%
アスパラギン	(50-84)	70%
アスパラギン酸	(50-94)	65%
アラニン	(44-76)	64%
システイン	(45-83)	62%
セリン	(45-75)	62%
バリン	(24-79)	56%
スレオニン	(46-66)	55%
グリシン	(34-47)	40%
ロイシン	(8-46)	33%
グルタミン	(16-21)	19%
イソロイシン	(3-25)	14%
メチオニン	(3-32)	14%
フェニルアラニン	(0-33)	12%
ヒスチジン	(0-13)	8%
チロシン	(0-17)	8%
トリプトファン	(0-17)	8%
リジン	(0-11)	4%
プロリン	(0-4)	2%
アルギニン	(0-2)	1%

10

20

表 3

pt 応答	ペプチド配列	グリアジン蛋白質配列内の対応残基(受入れ番号)
G TG		
13)	QLQPFPPQQLPYFPQPQS	57-73 α -グリアジン (T. aestivum) Q41545
	QLQPFPPQPELPYPQPQS	57-73 α -グリアジン (T. aestivum) Q41545
7)	QLQPFPPQQLPYSPQPQ	77-93 α/β -グリアジン前駆体 (Triticum. aestivum) P02863
		76-92 α -グリアジン (T. aestivum) Q41528
		77-93 α -グリアジン保存蛋白質 (T. aestivum) Q41531
		57-73 α -グリアジン成熟ペプチド (T. aestivum) Q41533
		77-93 α -グリアジン前駆体 (T. spelta) Q9ZP09
-20) 83 (61-113)	QLQPFPPQQLPYFPQPQ	77-93 α/β -グリアジン A-II 前駆体 (T. aestivum) P0472
-33) 83 (74-97)	QLQPFPPQQLPYFPQPQL	77-93 α/β -グリアジン A-IV 前駆体 (T. aestivum) P04724
		77-93 α/β -グリアジン MM1 前駆体 (T. aestivum) P18573
7)	PQLPYFPQQLPYFPQPQ	84-100 α/β -グリアジン A-IV 前駆体 (T. aestivum) P04724
	PQLPYFPQQLPYFPQPQL	84-100 α/β -グリアジン MM1 前駆体 (T. aestivum) P18573
1)	QLQPFLLQQLPYSPQPQ	77-93 α/β -グリアジン A-I 前駆体 (T. aestivum) P04721
		77-93 α -グリアジン (T. aestivum) Q41509
1)	QLQPFSPQLPYSPQPQ	77-93 α -グリアジン保存蛋白質 (T. aestivum) Q41530
	PQPQFPFPQLPYFPQTQP	77-93 α/β -グリアジン A-III 前駆体 (T. aestivum) P04723
-40) 24 (11-43)	PQPQFPFPQLPYFPQPQS	82-98 α/β -グリアジン A-V 前駆体 (T. aestivum) P04725
-30) 19 (11-33)	PQPQFPFPQLPYFPQPP	82-98 α/β -グリアジンクロン PW1215 前駆体 (T. aestivum) P04726
		82-98 α/β -グリアジン (T. urartu) Q41632
-30) 21 (11-33)	PQPQFPFLPYFPQPQS	79-95 α/β -グリアジンクロン PW8142 前駆体 (T. aestivum) P04726
		79-95 α -グリアジン (T. aestivum) Q41529
		79-95 α/β -グリアジン前駆体 (T. aestivum) Q41546

30

40

表 4

【0 2 4 2】

【表 1 1】

表 5. セリアック病において記載された T 細胞エピトープ

源	制限	頻度	配列*
ガンマグリアジン	DQ2	3/NS (iTCC)	QQLPQPEQPQQSFPEQERPF
アルファグリアジン	DQ2	12/17 (iTCL)	QLQPFQPELPY
アルファグリアジン	DQ2	11/17 (iTCL)	PQPELPYPQPELPY
アルファグリアジン	DQ2	1/23 (bTCC)	LGQQQPFPPQPPYFQPQPF
アルファグリアジン	DQ8	3/NS (iTCC)	QQYPSGEGSFQPSQENPQ
グルテン	DQ8	1/1 (iTCC)	GQQGYPTSPQQSGQ
アルファグリアジン	DQ2	11/12 インビボ	QLQPFQPELPYPQPQS

オリジナルの公表において不記載, iTCC 腸 T 細胞クローン, iTCL 腸ポリクローナル T 細胞系, bTCC 末梢血細胞クローン
 全てのペプチドは第 4 と第 6 のペプチド以外、トランスグルタミナーゼ修飾野生型グルテンペプチド

10

表 6. グルテンチャレンジ後のセリアック病 PBMC 中のグリアジン T 細胞エピトープ 相対生物活性

配列*	% A-グリアジン 57-73 QE65 (全て 25mcg/ml) としての ELISpot 応答性		
	野生型	野生型+tTG	E-置換された
LPQPEQPQQSFPEQERPF	9 (3)	18 (7)	10 (5)
QPFQPELPY	6 (2)	19 (1)	8 (3)
PELPYPQPELPY	13 (6)	53 (8)	48 (9)
YPSGEGSFQPSQENPQ	10 (3)	9 (3)	14 (8)
QPFQPELPYPQPQS	18 (7)	87 (7)	100
LPYPQPELPYPQPQP	14 (4)	80 (17)	69 (20)

配列はトランスグルタミナーゼ (tTG) 修飾されたペプチド及び T 細胞エピトープの配列を指す。野生型は未修飾グリアジン
 ペプチドである。4 人の被験者からのデータ。ブランクは 5 (1) % であった。

20

【 0 2 4 3 】

【表 1 2】

表 7. A-グリアジン 57-73 の多型

A. 北欧の秋季コムギ株 Mjoelner 由来の配列

アルファ-グリアジン蛋白質 (一文字コードは図14のペプチドを指す)	多型
Q41545 A-グリアジン (配列決定された蛋白質から) 57-73 (A)	QLQPFPPQQLPYQPQS
Gli アルファ 1,6: (EMBL: AJ133605 & AJ133602 58-74) (J)	QPQPFPPQQLPYQTQP
Gli アルファ 3,4,5: (EMBL: AJ133606, AJ133607, AJ133608 57-73) (I)	QLQPFPPQQLSYSQPQP
Gli アルファ 7: (EMBL: AJ133604 57-73) (E)	QLQPFPPQQLPYQPQP
Gli アルファ 8, 9, 11: (EMBL:) (F)	QLQPFPPQQLPYQPQP
Gli アルファ 10: (EMBL: AJ133610 57-73) (D)	QLQPFPPQQLPYLQPQS

10

B. XXXXXXXXPQLPYXXXXX を含むグリアジンの SWISSPROT 及び TREMBL スキャン (10. 12. 99)

コムギ (示さない限り <i>Triticum aestivum</i>) グリアジン受入れ番号	多型
Q41545 A-グリアジン (配列決定された蛋白質から) 57-73 (A)	QLQPFPPQQLPYQPQS
SWISSPROT:	
GDA0_WHEAT P02863 77-93 (F)	QLQPFPPQQLPYQPQP
GDA1_WHEAT P04721 77-93 (G)	QLQPFPPQQLPYQPQP
GDA2_WHEAT P04722 77-93 (B)	QLQPFPPQQLPYQPQP
GDA3_WHEAT P04723 77-93 (O)	POQPFPPQQLPYQTQP
GDA4_WHEAT P04724 77-93 (C)	QLQPFPPQQLPYQPQL
GDA4_WHEAT P04724 84-100 (K)	PQLPYQPQLPYQPQP
GDA5_WHEAT P04725 82-98 (N)	POQPFPPQQLPYQPQS
GDA6_WHEAT P04726 82-98 (P)	POQPFPPQQLPYQPPP
GDA7_WHEAT P04727 79-95 (M)	POQPFPPQQLPYQPQS
GDA9_WHEAT P18573 77-93 (C)	QLQPFPPQQLPYQPQL
GDA9_WHEAT P18573 84-100 (L)	PQLPYQPQLPYQPQL
GDA9_WHEAT P18573 91-107 (K)	PQLPYQPQLPYQPQP
TREMBL	
Q41509 ALPHA-GLIADIN 77-93 (G)	QLQPFPPQQLPYQPQP
Q41528 ALPHA-GLIADIN 76-92 (F)	QLQPFPPQQLPYQPQP
Q41529 ALPHA-GLIADIN 79-95 (M)	POQPFPPQQLPYQPQS
Q41530 ALPHA-GLIADIN 77-93 (H)	QLQPFPPQQLPYQPQP
Q41531 ALPHA-GLIADIN 77-93 (F)	QLQPFPPQQLPYQPQP
Q41533 ALPHA-GLIADIN 57-73 (F)	QLQPFPPQQLPYQPQP
Q41546 ALPHA/BETA-GLIADIN 79-95 (M)	POQPFPPQQLPYQPQS
Q41632 ALPHA/BETA-TYPE GLIADIN. <i>Triticum urartu</i> 82-98 (P)	POQPFPPQQLPYQPPP
Q9ZP09 ALPHA-GLIADIN <i>Triticum spelta</i> 77-93 (F)	QLQPFPPQQLPYQPQP

20

30

【 0 2 4 4 】

【表 13】

表 8. 未修飾のA-グリアジン 57-73 QE65 (G) (平均100%, 95% CI 97-104) 及び
 ブランク (ペプチドなし, b) (平均7.1%, 95% CI: 5.7-8.5) に比較した
 A-グリアジン 57-73 QE65 の置換されたバリエーション (Subst) の生物活性

Subst	%	P 対 G	Subst	%	P 対 G	Subst	%	P 対 G	Subst	%	P 対 G	P 対 b)
スーパーアゴニスト			F62	71	0.001	H62	47	<0.0001	N66	24	<0.0001	
Y61	129	<0.0001	V63	70	<0.0001	G69	47	<0.0001	R64	24	<0.0001	
Y70	129	0.0006	S69	70	<0.0001	N63	47	<0.0001	K63	23	<0.0001	
アゴニスト			H63	70	<0.0001	H68	47	<0.0001	V65	23	<0.0001	
W70	119	0.017	F63	70	0.008	M68	46	<0.0001	H66	23	<0.0001	
K57	118	0.02	P70	69	<0.0001	D68	46	<0.0001	H67	22	<0.0001	
Y59	117	0.04	T62	69	<0.0001	V69	46	<0.0001	L64	22	<0.0001	
A57	116	0.046	L61	69	<0.0001	G63	45	<0.0001	S66	22	<0.0001	
S70	116	0.045	S61	69	<0.0001	V64	45	<0.0001	F67	21	<0.0001	
K58	114	0.08	T61	69	<0.0001	E61	45	<0.0001	W66	21	<0.0001	
W59	110	0.21	T63	69	<0.0001	A69	43	<0.0001	G64	21	<0.0001	
A73	109	0.24	M66	68	<0.0001	R62	42	<0.0001	G65	21	<0.0001	
I59	108	0.37	T69	67	<0.0001	G68	42	<0.0001	D64	21	<0.0001	
G59	108	0.34	K60	66	<0.0001	A64	42	<0.0001	I65	21	<0.0001	
A58	108	0.35	S62	66	<0.0001	C65	42	<0.0001	M64	20	<0.0001	<0.0001
W60	105	0.62	M61	66	<0.0001	N67	41	<0.0001	G67	19	<0.0001	<0.0001
A59	104	0.61	P61	65	<0.0001	W63	41	<0.0001	T65	19	<0.0001	0.003
K72	104	0.65	M62	64	<0.0001	F69	41	<0.0001	A66	19	<0.0001	<0.0001
S59	103	0.76	Q61	64	<0.0001	N68	40	<0.0001	I64	19	<0.0001	0.0003
K73	102	0.8	G61	64	<0.0001	V66	40	<0.0001	R63	19	<0.0001	<0.0001
A70	102	0.81	A63	64	<0.0001	H69	40	<0.0001	W67	19	<0.0001	<0.0001
Y60	101	0.96	L62	60	<0.0001	M69	40	<0.0001	K68	18	<0.0001	<0.0001
A72	100	0.94	I68	60	<0.0001	R69	40	<0.0001	H64	18	<0.0001	<0.0001
S63	98	0.67	S67	59	<0.0001	W69	40	<0.0001	W64	18	<0.0001	0.0001
K59	96	0.46	N61	59	<0.0001	Q69	39	<0.0001	Q65	18	<0.0001	0.0002
I60	96	0.5	I69	59	<0.0001	L67	38	<0.0001	F64	16	<0.0001	0.0008
G70	95	0.41	V61	58	<0.0001	K69	38	<0.0001	L65	16	<0.0001	0.0022
D65	95	0.44	D61	58	<0.0001	K62	38	<0.0001	N64	16	<0.0001	<0.0001
E70	93	0.27	E60	57	<0.0001	E67	37	<0.0001	F65	16	<0.0001	0.12
I63	92	0.19	A61	57	<0.0001	L69	37	<0.0001	Q67	15	<0.0001	0.0012
S60	92	0.23	Q62	56	<0.0001	S64	36	<0.0001	M65	14	<0.0001	0.015
P59	88	0.08	F68	56	<0.0001	G62	36	<0.0001	D66	14	<0.0001	0.013
M63	87	0.03	N65	56	<0.0001	E69	36	<0.0001	R67	14	<0.0001	0.002
K71	85	0.047	A62	56	<0.0001	E68	36	<0.0001	非アゴニスト			
V62	84	0.04	A68	53	<0.0001	V67	35	<0.0001	P63	13	<0.0001	0.012
I70	84	0.04	P66	53	<0.0001	D62	35	<0.0001	E64	12	<0.0001	0.053
I61	83	0.01	R61	53	<0.0001	R68	34	<0.0001	W65	11	<0.0001	0.24
V68	82	0.0045	S68	53	<0.0001	Q66	34	<0.0001	Q64	11	<0.0001	0.15
E59	81	0.01	Y63	52	<0.0001	A67	33	<0.0001	G66	11	<0.0001	0.07
部分アゴニスト			N69	51	<0.0001	N62	32	<0.0001	R65	11	<0.0001	0.26
W61	79	0.002	E63	51	<0.0001	F66	31	<0.0001	Y67	10	<0.0001	0.13
A60	78	0.002	T64	51	<0.0001	E62	31	<0.0001	E66	10	<0.0001	0.17
Y62	78	0.006	T67	51	<0.0001	D69	31	<0.0001	K66	10	<0.0001	0.21
G60	77	0.003	Y69	50	<0.0001	D67	30	<0.0001	R66	10	<0.0001	0.23
A71	77	0.003	D63	50	<0.0001	M67	29	<0.0001	K67	10	<0.0001	0.11
W62	76	0.0009	A65	49	<0.0001	Y66	28	<0.0001	P65	8	<0.0001	0.57
Q60	76	0.001	K61	49	<0.0001	I67	28	<0.0001	K64	8	<0.0001	0.82
L63	74	0.0002	I66	49	<0.0001	H65	26	<0.0001	K65	8	<0.0001	0.63
I62	74	0.0005	T68	48	<0.0001	P68	26	<0.0001	Y65	7	<0.0001	0.9
K70	74	0.001	S65	48	<0.0001	Y64	25	<0.0001				
H61	72	<0.0001	L68	48	<0.0001	EK65	25	<0.0001				
W68	72	<0.0001	Q68	48	<0.0001	T66	25	<0.0001				

【表 1 4】

表 9. A-グリアジン 57-73 QE65 の置換されたバリエーション(Subst)による A-グリアジン 57-73 QE65 インターフェロンガンマ ELISPOT 応答の拮抗阻害(Pは不対t-試験における有意なレベルである)。A-グリアジン 57-73 QE65 に比較したペプチドのアゴニスト活性(% agonist) も示される。

Subst	%阻害	P	% agonist.	Subst	%阻害	P	% agonist.
アンタゴニスト				65R	13	0.18	11
65T	28	0.004	19	65M	13	0.16	14
67M	27	0.0052	29	68P	13	0.16	26
64W	26	0.007	18	63R	13	0.19	19
67W	25	0.0088	19	66G	12	0.19	11
有力なアンタゴニスト				65Q	12	0.2	18
67I	24	0.013	10	65Y	12	0.22	7
67Y	24	0.013	21	66S	12	0.22	22
64G	21	0.03	21	67F	11	0.25	21
64D	21	0.029	16	66R	10	0.29	10
65L	20	0.046	26	67K	10	0.29	10
66N	20	0.037	24	64F	10	0.29	16
65H	20	0.038	16	65F	9	0.41	16
64N	19	0.05	16	63P	8	0.42	13
64Y	19	0.06	25	65EK	8	0.39	25
66Y	19	0.048	28	64Q	7	0.49	11
64E	19	0.049	12	64I	5	0.6	21
67A	18	0.058	30	68K	5	0.56	19
67H	18	0.052	22	67Q	5	0.61	18
非アンタゴニスト				65G	5	0.62	15
65V	17	0.07	23	64M	4	0.7	20
65I	17	0.086	21	66H	4	0.66	23
66T	17	0.069	25	66E	3	0.76	10
65W	15	0.11	11	66D	1	0.9	14
67R	15	0.13	14	63K	1	0.88	23
65P	15	0.13	8	64H	1	0.93	18
65K	15	0.11	8	66K	0	0.98	10
66W	15	0.12	21	64K	-2	0.88	8
67G	14	0.14	19	64L	-11	0.26	22
66A	14	0.14	19				

表10. HLA-DQ2 を結合することが公知のペプチドによる A-グリアジン 57-73 QE65 インターフェロンガンマ ELPOT 応答の阻害(Pは不対t-試験において有意なレベルである)。

ペプチド	%阻害	P
TP	31	<0.0001
HLA1a	0	0.95

【 0 2 4 6 】

【表 1 5】

表11. 天然に生じる A-グリアジン 57-73 QE65 の多型による A-グリアジン 57-73 QE65 インターフェロンガンマ ELISpot 応答の拮抗阻害(Pは不対t試験において有意レベルである)。

A-グリアジン 57-73 QE65 多型	%阻害	P
P04725 82-98 QE90 <u>PQ</u> PQFPPELPYPQPQS	19	0.009
Q41509 77-93 QE85 QLQPF <u>L</u> QPELPYSQPQP	11	0.15
Gli α 1,6 58-74 QE66 QPQFP <u>P</u> PELPYPQTQP	11	0.11
P04723 77-93 QE85 <u>PQ</u> PQFPPELPYPQTQP	10	0.14
Gli α 3-5 57-73 QE65 QLQPF <u>P</u> QPELSY <u>S</u> QPQP	7	0.34
P02863 77-93 QE85 QLQPF <u>P</u> QPELPYSQPQP	6	0.35
Q41509 77-93 QE85 QLQPF <u>L</u> QPELPYSQPQP	6	0.41
P04727 79-95 QE65 <u>PQ</u> PQF <u>L</u> PELPYPQPQS	6	0.39
P04726 82-98 QE90 <u>PQ</u> PQFPPELPYPQ <u>P</u> P	5	0.43

【 0 2 4 7 】

【表 1 6】

表12. A-グリアジン 57-73 のプロラミン相同体(アルファ/ベータグリアジンを除く)

プロラミン	受入れ番号	配列	%生物活性*
コムギ: α-グリアジン	A-グリアジン(57-73)	QLQPF <u>P</u> QQLPYQPQS	100 (0)
コムギ: ω-グリアジン	AAG17702 (141-157)	PQ.....F.....QSE	32 (6.4)
Barley: C-ホルデイン	Q40055 (166-182)	...QP <u>F</u> PL.....F.....Q	2.3 (2.0)
コムギ: γ-グリアジン	P21292 (96-112)	...QT <u>F</u> PQ.....F.....QPQ	2.1 (4.2)
ライ麦: セカリン	Q43639 (335-351)	...QP <u>S</u> PQ.....F.....Q	1.6 (1.4)
Barley: γ-ホルデイン	P80198 (52-68)	...QP <u>F</u> PQ.....HQHQFP	-1.0 (1.8)
コムギ: LMWグルテニン	P16315 (67-83)	LQ...QP <u>I</u> L.....FS...Q...Q	-0.9 (1.0)
コムギ: HMWグルテニン	P08489 (718-734)	HGYY <u>P</u> TS.....SGQGQRP	6.4 (4.0)
コムギ: γ-グリアジン	P04730 (120-136)	...QCCQ <u>L</u> I...QSSRYQ	0.7 (0.9)
コムギ: LMWグルテニン	P10386 (183-199)	...QCCQ <u>L</u> I...QSSRYE	-0.7 (0.5)
コムギ: LMWグルテニン	Q49958 (214-230)	...QCC <u>R</u> QL.....I...EQSRYD	-1.1 (0.3)
Barley: B1-ホルデイン	P06470 (176-192)	...QCCQ <u>L</u> I...EQFRHE	1.8 (1.4)
Barley: B-ホルデイン	Q40026 (176-192)	...QCCQ <u>L</u> I <u>S</u> EQFRHE	0.5 (0.9)

*生物活性は 100x(ペプチド 25mcg/ml プラス tTG 8mcg/ml マイナスブランクのスポット形成細胞) / (A-グリアジン 57-73 25mcg/ml プラス tTG 8mcg/ml マイナスブランクのスポット形成細胞) (平均(SEM), n=5) として表す。

ペプチドは tTG と 2 時間 37℃ において前インキュベートした。注、Q は tTG により A-グリアジン 57-73 において脱アミド化されている。

【 0 2 4 8 】

10

20

30

40

【表 17】

表13. セリアック病被験者の臨床的詳細

	HLA-DQ	HLA-DQA1 対立遺伝子	HLA-DQB1 対立遺伝子	十二指腸の 組織構造	グルテンフリー	グルテンに対する EMA (GFDに対する)
C01	2, 6	102/6, 501	201, 602	SVA	1 yr	+ (-)
C02	2, 2	501	201	SVA	1 yr	+ (-)
C03	2, 5	101/4/5, 501	201, 501	PVA	1 yr	+ (-)
C04	2, 5	101/4-5, 501	201, 501	SVA	7 yr	+ (-)
C05	2, 2	201, 501	201, 202	SVA	4 mo	+ (ND)
C06	2, 2	201, 501	201, 202	SVA	2 yr	+ (-)
C07	2, 8	301-3, 501	201, 302	SVA	1 yr	+ (-)
C08	2, 8	301-3, 501	201, 302/8	SVA	11 yr	ND (-)
C09	2, 8	301-3, 501	201, 302	SVA	29 yr	+ (-)
C10	2, 8	201, 301-3	202, 302	IEL	1 yr	+ (-)
C11	6, 8	102/6, 301-3	602/15, 302/8	IEL	9 mo	- (ND)
C12	8, 7	301-3, 505	302, 301/9-10	SVA	2 yr	- (-)
C13	8, 8	301	302	SVA	1 yr	+ (+)

SVA ほぼ全面的な絨毛萎縮, PVA 部分絨毛萎縮, IEL 増加した上皮内萎縮, GFD グルテンフリー
ダイエット, ND 行わず

【0249】

10

20

【表 18】

表14. グルテンチャレンジ前と後の対照ペプチド(20 µg/ml)及びグリアジン

(500 µg/ml)に対する HLA-DQ2+セリアック (C01-6) 及び健康対照 (H01-10) の

IFN γ ELISpot 応答(sfc/百万 PBMC マイナス PBS のみに対する応答)

ペプチド	健康 0 日	健康 6 日	セリアック 0 日	セリアック 6 日
P04722 77-93	0 (-4~17)	0 (-5~9)	-2 (-3~0)	27 (0-100)*
P04722 77-93 + tTG	0 (-5~4)	0 (-9~3)	0 (-4~11)	141 (8~290)**
P04722 77-93 QE85	0 (-5~5)	0 (-3~4)	0 (-6~14)	133 (10~297)*
P02863 77-93	0 (-4~13)	2 (-3~5)	-2 (-3~2)	8 (-2~42)**
P02863 77-93 + tTG	-1 (-5~4)	-1 (-4~11)	1 (-4~6)	65 (8-164)**
P02863 77-93 QE85	0 (-4~13)	0 (-4~14)	-1 (-4~6)	42 (-2~176)*
グリアジンキモトリブシン	2 (-5~20)	18 (0~185)*	20 (11~145)	92 (50~154)
グリアジンキモトリブシン + tTG	0 (-1~28)	16 (-9~171)*	55 (29~248)	269 (206~384)**
キモトリブシン	0 (-4~5)	1 (-4~11)	-2 (-5~5)	1 (-4~8)
キモトリブシン + tTG	0 (-5~8)	6 (0~29)	-2 (-3~11)	2 (-3~18)*
グリアジンペプシン	4 (-4~28)	29 (0~189)***	44 (10~221)	176 (54~265)**
グリアジンペプシン + tTG	2 (-3~80)	27 (-4~241)***	61 (8~172)	280 (207~406)**
ペプシン	0 (-4~10)	0 (-3~12)	0 (-2~3)	2 (-2~8)
ペプシン + tTG	0 (-3~8)	0 (-5~9)	1 (-6~3)	0 (-3~14)
PBSのみ	4 (0~6)	2 (0~6)	4 (1~12)	4 (0~4)
PBS + tTG	3 (0~8)	3 (0~11)	4 (2~10)	4 (2~11)

6 日対 0 日: *P<0.05 **P,0.02, ***P<0.01 一方がテイル化された Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks テストによる

【0 2 5 0】

【表 19】

表15. HLA-DQ2+セリアック (C01-6) 及び健康な対照被験者 (H01-10) に

おけるグリアジン (0.5 mg/ml) 及び A-グリアジン 57-73 相同体への tTG に

よる脱アミド化の IFN γ ELISpot 応答に対する効果

ペプチド	健康 6 日	セリアック 0 日	セリアック 6 日
グリアジンキモトリブシン	0.94 (0.4-9.0)	2.1 (0.8-6.8)*	3.2 (1.8-4.2)**
グリアジンペプシン	1.4 (0.5-1.4)	1.4 (0.8-4.0)*	1.9 (1.1-4.4)**
P04722 77-93 Q85			6.5 (2.3-12)**
P04722 77-93 E85			0.7 (0.6-1.1)
P02863 77-93 Q85			7.5 (3.9-19.9)**
P02863 77-93 E85			1.0 (0.8-1.2)

TTG>tTGなし: *P<0.05 **P,0.02, ***P<0.01 一方がテイル化された Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks テストによる

【0 2 5 1】

【表 20】

表16. 健康な被験者: グルテンチャレンジ6日目の tTG-処理された
グリアジンペプチドプールに対する IFN γ ELISpot 応答 (>10 sfc/百万
PBMC 及び >4 x バッファーのみ) (sfc/百万 PBMC) (イタリック: 0 日目
にも存在する応答):

グループ 1 – HLA-DQ2 (DQA1*0501-5, DQB1*0201)

グループ 2 – HLA-DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302) 及び無し又は「不完全」

DQ2 (DQA1*0501-5 又は DQB1*0201のみ)

被験者	グループ1										グループ2
	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11
HLA-DQ	2, 6	2, 7	2, 8	2, 5	2, 6	2, 6	2, 6	2, 7	2, 5	2, 5	8, 8
プール1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4	.	.	.	.	.	.	.	.	13	.	.
5	.	17	.	.	.	.	.	.	24	.	.
6	.	.	.	.	.	.	.	.	31	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.	20	.	.	.	.
19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20	.	11	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21	.	11	.	.	.	.	.	.	27	.	.
22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23	.	43	.	.	.	.	.	.	.	.	.
24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
25	.	11	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30	.	.	.	.	.	.	.	23	.	.	.
31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
33	.	20	.	.	.	.	.	.	.	.	.
34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
35	.	11	.	.	.	.	.	.	.	.	.
36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
37	.	.	.	.	.	.	.	18	.	.	.
38	14	.	.	.	.	.	.	12	.	.	.
39	.	.	.	.	.	.	.	11	.	.	.
40	.	14	.	.	.	.	.	17	.	.	.
41	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
42	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

【 0 2 5 2 】

【表 2 1】

43	.	.	.	.	.	.	.	.	11	.	.
44	.	14	.	.	.	.	.	.	.	.	.
45	.	11	.	.	.	.	.	.	.	.	.
46	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
47	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
48	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
49	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
50	.	14	.	.	12	.	.	22	.	14	.
51	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
52	.	14	.	.	.	.	.	.	.	.	.
53	.	26	.	.	.	.	.	.	.	.	.
54	.	.	.	.	.	.	.	12	.	.	.
55	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
56	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
57	.	23	.	.	.	.	12	.	.	.	.
58	.	14	.	.	.	.	.	.	.	.	.
59	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
60	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
61	.	23	.	.	.	.	.	11	11	.	.
62	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
63	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
64	.	20	.	.	.	.	.	.	.	.	.
65	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
66	.	14	.	.	.	.	.	.	.	.	.
67	.	11	.	.	.	.	.	.	.	.	.
68	.	20	.	.	.	.	.	20	.	.	.
69	.	20	.	.	.	.	.	.	.	.	.
70	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
71	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	16
72	.	11	.	.	.	.	.	.	.	.	.
73	.	14	.	.	.	.	.	.	.	.	.
74	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
75	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
76	.	14	.	.	.	.	.	.	.	.	.
77	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
78	.	11	.	.	.	.	.	.	.	.	.
79	.	11	.	.	19	.	.	.	.	.	.
80	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
81	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
82	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
83	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P04722 77-93	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P04722 77-93 E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P04722 77-93 E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
P02863 77-93	.	.	.	.	.	.	.	11	.	.	.
P02863 77-93 E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
グリアジン+C	171	40	25	16	10	.	18	14	.	17	90
キモトリブシン	29	26	18	.	.	.	.	.	22	.	.
グリアジン+ベブシン	241	151	29	24	48	.	16	45	.	19	35
ベブシン	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

【 0 2 5 3 】

【表 2 2】

表17. HLA-DQ2 セリアック病被験者 C01-6 におけるグルテンチャレンジ
 0 日と 6 日の間のIFNガンマ応答の顕著な増加を示す tTG-脱アミド化
 グリアジンペプチドプール(6 日－0 日応答, 及び tTG-脱アミド化プールと
 tTG 処理なしの同じプールに対する応答の比)

IFN γ ELISpot			IFN γ ELISpot		
プール	(中央値 sfc/百万)	tTG: tTG なし (中央値)	プール	(中央値 sfc/百万)	tTG: tTG なし (中央値)
9	59***	1.0	49	46***	1.4
10	116**	1.7	50	50***	4.6
11	24***	2.5	51	40***	1.7
12	133***	1.1	52	30***	3.1
13	26**	2.1	53	27**	1.4
42	30**	1.2	76	17***	1.1
43	32***	1.3	79	20***	0.9
44	24***	1.5	80	83***	1
45	10***	1.1	81	141***	1.1
46	12***	2.1	82	22***	1.5
48	17***	1.4	83	16**	1.8

6 日対 0 日 **P<0.02, ***P<0.01 一方をテイル化した Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks テストによる

【 0 2 5 4 】

10

20

【表 2 3】

表18. 健康な被験者: グルテンチャレンジ 6 日目の tTG-処理された Pepset

プールに対する IFN γ ELISpot 応答 (>10 sfc/百万 PBMC 及び >4 x バッファーのみ) (sfc/百万 PBMC) (イタリック: 0 日目にも存在する応答):

グループ 1 – HLA-DQ2 (DQA1*0501-5, DQB1*0201/2),

グループ 2 – HLA-DQ2/8 (DQA1*0501-5, *0301, 及び DQB1*0201/2, *0302), 及び

グループ 3 – HLA-DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302) 及び無し又は「不完全」

DQ2 (DQA1*0501-5 又は DQB1*0201/2 のみ)

被験者	グループ1:						グループ2:			グループ3			
	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12	C13
HLA-DQ	2, 6	2, 2	2, 5	2, 5	2, 2	2, 2	2, 8	2, 8	2, 8	2, 8	6, 8	7, 8	8, 8
プール 1	.	.	.	.	.	.	23	.	.	.	.	223	.
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	155	.
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	41	.
4	11	.	.	.	.	.	.	.	.	22	.	.	.
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
6	18	.	.	21	.	.	20	17	.	.	.	.	.
7	.	.	.	.	.	.	.	353	.	.	.	.	.
8	11	64	.	.	.	14	20	480	.	.	.	.	13
9	93	127	.	92	25	.	32	460	.	.	.	.	18
10	175	491	58	200	48	.	84	787	.	.	.	.	.
11	32	118	.	33	14	.	26	27	.	12	.	.	.
12	204	379	54	225	61	.	129	587	.	12	.	.	.
13	93	142	.	29	18	.	.	60	.	.	.	.	11
14	.	45	.	21	.	.	17	.	.	.	.	.	.
15	18	30	.	.	.	.	38	43	.	.	.	.	.
16	.	.	.	.	.	.	.	37	.	.	.	.	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20	11	215	.	.	.	.	51	167	.	.	.	.	.
21	.	.	.	.	.	.	.	.	11	.	.	.	.
22	.	21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23	.	18	.	21	.	.	.	.	.	12	.	.	.
24	.	15	.	.	.	.	.	10	.	.	.	.	.
25	.	15	.	.	.	.	.	.	.	12	.	.	.
26	.	18	.	.	.	.	.	13	.	12	.	.	.
27	.	15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	11
29	.	.	.	.	.	.	11	.	.	.	.	.	.
30	11	.	.	.	.	.	11	.	.	.	.	.	.
31	.	70	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
32	.	18	.	.	.	.	20	.	.	.	.	.	.
33	11	.	.	10	.	.	14	.	11	.	40	.	11
34	.	.	.	.	.	.	.	.	11	.	.	.	.
35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
37	.	.	.	23	.	14	.	.	.	.	.	.	.
38	.	24	.	19	.	.	20	.	.	.	.	.	.
39	.	49	.	15	.	.	.	.	11	.	.	.	.
40	.	.	.	.	.	.	14	.	.	.	.	.	.

【 0 2 5 5 】

10

203040

【 0 2 5 6 】

【表 25】

表19. HLA-DQ2 セリアック病被験者 C01-5 における平均生物活性が

P04722 E85 (20 µg/ml) の>10% の脱アミド化ペプチド

ランク	番号	配列	平均 (SEM)	ランク	番号	配列	平均 (SEM)
	89	PQLPYFPQLPYFPQLPYFP	94 (18)	37	413	SKQPQQPFPQFPQQSFQ	18 (4)
*2	91	PQPFPPQLPYFPQLPYFP	89 (12)	38	380	QFQQPQQPFPQFPQLFP	18 (6)
*3	74	MQLQFPFPQLPYFPQLPY	88 (14)	39	618	PQSFQYQQFPFPQFPYFQ	18 (7)
*4	90	PQLPYFPQLPYFPQFPFR	87 (16)	*40	78	LQLQFPFPQLPYFPQFPFR	17 (8)
*5	76	LQLQFPFPQLPYFPQFPFR	85 (15)	41	390	QQTYPQFPQFPFPQFPQ	17 (9)
6	626	PQFPQFPQFPFPQFPFPW	72 (23)	42	348	QQTFPQFPQFPFPQFPFP	16 (10)
7	627	QFPFPQFPFPQFPFPFPQ	66 (30)	43	409	QFPFPQFPQFPFPQFPQ	16 (2)
*8	631	FPQQPQQFPFPQLFPFQFS	61 (12)	44	382	QFPFPQFPQFPFPQFPQ	16 (6)
9	636	PQQFPQQFPFPQFPFPQ	51 (10)	45	629	FPFQTQSFPLQFPFPFPQ	16 (5)
*10	73	LQLQFPFPQLPYFPQLPY	49 (11)	46	643	PLQFPQFPFPQFPFPFPQ	16 (6)
11	412	SQQPQQFPFPQFPFPFPQ	34 (19)	47	389	QFPFPQTQFPFPFPFPQ	16 (6)
12	343	QQFPQFPFPQFPQLFPFPQ	34 (11)	48	350	QQFPFPQFPFPFPFPQFP	15 (8)
*13	68	LQLQFPFPQLPYLPQFPFR	33 (10)	49	65	FPFSQFPYFPQFPFPFPQ	15 (5)
*14	66	LQLQFPFPQLPYFPQFPFR	32 (7)	50	349	QFPFPQFPFPFPFPFPFP	15 (9)
*15	96	PQFPFPQLPYFPQFPFPQ	28 (6)	51	610	FWQQQLFPQFSFPFPFP	15 (11)
16	393	QLFPFPQFPFPFPFPFPQ	27 (8)	*52	81	PQFPFPFPQLPYFPQFPFP	15 (5)
17	355	QAFPQFPFPFPFPFPFPQ	27 (15)	*53	75	MQLQFPFPQFPFPQLPYFP	14 (5)
*18	67	LQLQFPFPQLPYFPQFPFR	26 (6)	54	368	QFPFPQFPFPFPFPFPFP	14 (7)
19	335	QQQFPFPFPFPFPFPFPQ	25 (11)	*55	82	PQFPFPFPFPFPFPFPFP	14 (3)
*20	95	PQFPFPQLPYFPQFPFPQ	24 (6)	*56	80	LQLQFPFPFPFPFPQLPYFP	14 (4)
21	396	TQQPQQFPFPFPFPFPFPQ	23 (9)	57	624	FTQFPQFPFPFPFPFPFP	14 (6)
22	609	SCISGLERFWQQFLFPQFS	23 (18)	58	407	QFPFPFPFPFPFPFPFPFP	14 (5)
23	385	QFPFPFPFPFPFPFPFPFP	23 (7)	59	337	QQFPFPFPFPFPFPFPFP	13 (4)
24	375	PQFPFPFPFPFPFPFPFPQ	23 (10)	60	634	PQQLQFPFPFPFPFPFPFP	13 (3)
25	406	QFPFPFPFPFPFPFPFPFP	22 (8)	61	388	QFPFPFPFPFPFPFPFPFP	13 (3)
26	625	PIQPQQFPFPFPFPFPFPFP	22 (9)	62	641	FPFLQFPFPFPFPFPFPFP	13 (7)
27	378	QQFPFPFPFPFPFPFPFPFP	22 (10)	63	399	QFPFPFPFPFPFPFPFPFP	13 (5)
28	371	PQQQFPFPFPFPFPFPFPFP	22 (10)	64	387	QQTFPFPFPFPFPFPFPFP	13 (4)
29	642	PQQFPFPFPFPFPFPFPFP	20 (8)	65	628	FPFPFPFPFPFPFPFPFP	12 (4)
30	635	PLQFPFPFPFPFPFPFPFP	19 (5)	*66	88	PQFPFPFPFPFPFPFPFP	12 (3)
*31	93	PQFPFPQLPYFPFPFPFPFP	19 (5)	67	408	QFPFPFPFPFPFPFPFPFP	12 (5)
32	377	PQQFPFPFPFPFPFPFPFP	19 (9)	*68	77	LQLQFPFPFPFPFPFPFP	11 (4)
33	411	LQQFPFPFPFPFPFPFPFP	19 (4)	69	370	PQQFPFPFPFPFPFPFPFP	11 (5)
34	415	SQQFPFPFPFPFPFPFPFP	18 (5)	*70	79	LQLQFPFPFPFPFPFPFP	11 (5)
*35	94	PQFPFPQLPYFPFPFPFPFP	18 (3)	71	379	QFPFPFPFPFPFPFPFPFP	11 (5)
36	329	FSGQVQWTFQFPFPFPFPFP	18 (4)	72	397	PQQFPFPFPFPFPFPFPFP	11 (3)

* コア配列 PQLP(Y/F) を有する A-グリアジン 57-73 の相同体を示す

【 0 2 5 7 】

10

20

30

40

【表 26】

表20. 構造によりグループ分けされた P04722 QE65 の生物活性の >10% ペプチド

ランク	ペプチド番号 (プール) グリアジン-サブタイプ	配列	P04722 77-93 QE85 に 比較した IFNg ELISpot: 平均 (SEM)
グループ 1 : A-グリアジン 57-73 の相同体			
	P04722 77-93	QLQPFPPQLPYPPQPP	
1	89 (12) α	PQL...Y.....LPYP	94 (18)
2	91 (12) α	PQPFPPQL...Y.....	89 (12)
3	74 (10) α	M.....LPY	88 (14)
4	90 (12) α	PQL...Y.....PFRP	87 (16)
5	76 (10) α	L.....PFR	85 (15)
8	631 (81) ω	FPQQPQ.....F.....QS	61 (12)
10	73 (10) α	L.....LPY	49 (11)
13	68 (9) α	L.....L.....PFR	33 (10)
14	66 (9) α	L.....S.....PFR	32 (7)
18	67 (9) α	L.....S.....QFR	26 (6)
20	95 (13) α	PQPFL.....FPPQQ	24 (6)
31	93 (12) α	PQPFP.....PFRPQQ	19 (5)
35	94 (12) α	PQPFP.....PPFSPPQ	18 (3)
40	78 (10) α	L.....R.....PFR	17 (8)
52	81 (11) α	PQPQFP.....T...PFPF	15 (5)
53	75 (10) α	MLQPFPPQPPF.....	14 (5)
55	82 (11) α	PQPQFPQPPF.....	14 (3)
56	80 (10) α	LQLPFPQPPF.....	14 (4)
66	88 (11) α	PQPFP.....S.....PFRPQQ	12 (3)
68	77 (10) α	LQLPFPQPPF.....	11 (4)
70	79 (10) α	LQLPFPQPPFL.....	11 (5)
グループ 2 : ペプチド 626 の相同体			
		QQPFPPQPPFP	
6	626(80) ω	PQQPQQP.....W	72 (23)
7	627(80) ω	WQPQQPFPQ	66 (30)
9	636(81) ω	PQQP.....I...VQPQ	51 (10)
11	412(53) γ	SQQP.....Q.....PQQ	34 (19)
33	411(53) γ	LQQP.....Q.....PQQ	19 (4)
36	329(42) γ	PSGQVQWPQ.....	18 (4)
41	390(50) γ	QQTYPQRP.....T.....QQ	17 (9)
59	337(43) γ	Q.....CQQPQRTI	13 (4)
61	388(50) γ	QQPYPPQP.....T.....QQ	13 (3)
グループ 3 : ペプチド 355 の相同体			
		FPQPQQTFPHQPPQQFP	
17	355(46) γ	QA.....Q	27 (15)
42	348(45) γ	QQT.....	16 (10)
48	350(45) γ	QQI.....A.....	15 (8)
50	349(45) γ	QQI.....	15 (9)
グループ 4 : ペプチド 396 の相同体			
		QQPFPQQPPQPPFP	
21	396(51) γ	TQQP.....QTQ	23 (9)
27	378(49) γ	QQP.....QPQQ	22 (10)
28	371(48) γ	PQQQFIQP.....TY	22 (10)
29	642(82) ω	PQQP.....L.....QQP	20 (8)
30	635(81) ω	PLQP.....QPQ	19 (5)
44	382(49) γ	QTQQPQQ	16 (6)
45	629(81) ω	PFPQT.....S.....L.....QQ	16 (5)
46	643(82) ω	PLQP.....QQP	16 (6)
60	634(81) ω	PQQL.....L.....QQP	13 (3)
64	387(50) γ	T.....L.....QQPQQPF	13 (4)
62	641(82) ω	FPEL.....L.....LQP	13 (7)

【表 2 7】

グループ 5 : ペプチド 343 の相同体 (グループ 2 と 4 と重複する)			
QQPFPPQQPQLPFPQ			
12	343(44) γ	QQP.....Q	34 (11)
16	393(51) γ	QLPFPQQP.....	27 (8)
19	335(43) γ	QQ.....Q.....PQ	25 (11)
23	385(50) γ	QPQQ	23 (7)
24	375(48) γ	P.....Q.....PQQ	23 (10)
25	406(52) γ	QP.....L.....Q.....PQ	22 (8)
32	377(49) γ	P.....Q.....Q.....QPQ	19 (9)
34	415(53) γ	SQQP.....QS.....	18 (5)
37	413(53) γ	SKQP.....QS.....	18 (4)
38	380(49) γ	QPQQP.....	18 (6)
43	409(53) γ	QP.....L.....Q.....L.....PQ	16 (2)
47	389(50) γ	T.....Q.....QPQQ	16 (6)
58	407(52) γ	QP.....S.....Q.....PQ	14 (5)
63	399(51) γ	T.....Q.....LQQP	13 (5)
67	408(52) γ	QP.....SK.....Q.....PQ	12 (5)
71	379(49) γ	QQP.....Q.....Q.....P	11 (5)
72	397(51) γ	PQQP.....T.....Q.....	11 (3)
グループ 6 : ペプチド 625			
PIQPQQPFPQQP			
26	625(80) ω	QQPQQPFP	22 (9)
57	624(80) ω	FTQPQQPT.....	14 (6)
65	628(80) ω	PF...W.....TQQSFPLQ	12 (4)
グループ 7 : ペプチド 618			
39	618(79) ω	PQQSFSYQQQPFPPQQPYFPQQ	18 (7)

【 0 2 5 9 】

10

20

【表 2 8】

表21. 被験者 C12 の個々の tTG-脱アミド化プール 1-3 ペプチドの生物活性					
番号	配列	%	番号	配列	%
8	AVRWPVPQ <u>LOPONPSQQOPO</u>	100	23	<u>LOPONPSQQOPO</u> EQVPLMQQ	26
		85			18
5	MVRVTVPQ.....		14	EQVPLVQQ	
		82			18
6	AVRVSPVQ.....		15	H.....EQVPLVQQ	
		77			18
3	MVRVPVPQ.....H.....		17	KQVPLVQQ	
		67			13
1	AVRFPVPQ.....L.....		16	D.....EQVPLVQQ	
		59			8
2	MVRVPVPQ.....		13	EQVPLVQQ	
		49			5
9	AVRVPVPQ.....L.....		22	K.....EQVPLVQQ	
		49			3
7	AVRVPVPQ.....		18	L.....EQVPLVQE	
		33			3
10	MVRVPVPQ.....L.....		19	L.....EQVPLVQE	
4	MVRVPMPQ.....D.....	15	20	P.....P.....GQVPLVQQ	0
12	AVRVPVPQ.....K.....	8	21	P.....P.....RQVPLVQQ	0
11	AVRVPVPQP.....P.....	0			
エピトープのコア配列に下線を付す。予測された脱アミド化配列はLQPENPSQEQPEである。					

【 0 2 6 0 】

【表 29】

表22：パノムギ(*Triticum aestivum*) グリアジンの系統的分類

アルファ/ベータ-グリアジン (n=61)			
A1a1	AAA96525, EEWTA, P02863	A1b13	B22364, P04271
A1a2	CAB76963	A2a1	AAB23109, CAA35238, P18573, S10015
A1a3	AAA96276	A2a2	CAB76964
A1a4	CAA26384, S07923	A2b1	P04724, T06500, AAA348282
A1a5	AAA34280	A2b2	D22364
A1a6	P04728	A2b3	P04722, T06498, AAA34276
A1b1	CAB76962	A2b4	C22364
A1b2	CAB76961	A2b5	CAB76956
A1b3	BAA12318	A3a1	AAA34277, CAA26383, P04726, S07361
A1b4	CAB76960	A3a2	I307187B, A27319, S13333
A1b5	CAB76958	A3b1	AAA96522
A1b6	CAB76959	A3b2i	AAA34279, P04727,
A1b7	CAB76955	A3b2ii	CAA26385, S07924
A1b8	AAA96524	A3b3	A22364, AAA34278, AAB23108, C61218, P04725
A1b9	CAA10257	A4a	P04723, AAA34283, T06504
A1b10	AAA96523, T06282	A4b	E22364
A1b11	AAA17741, S52124	A4c	CAB76957
A1b12	AAA34281	A4d	CAB76954
ガンマ-グリアジン (n=47)		ガンマ-グリアジン	
GI1a	P08079, AAA34288, PS0094, CAC11079, AAD30556, CAC11057, CAC11065, CAC11056	GI5a	AAK84774, AAK84772
GI1b	CAC11089, CAC11064, CAC11080, CAC11078, AAD30440	GI5b	AAK84773
GI1c	CAC11087	GI5c	AAK84776
GI1d	CAC11088	GI6a	JA0153, P21292, AAA34272, I507333A
GI1e	CAC11055	GI6b	AAK84777
GI2a	JS0402, P08453, AAA34289	GI6c	I802407A, AAK84775, AAK84780
GI2b	AAF42989, AAK84779, AAK84779	GI7	AAB31090
GI3a	AAK84778	GI1a	AAA34287, P04730, S07398
GI3b	CAB75404	GI1b	I209306A
GI3c	BAA11251	GI11a	P04729
GI4	EEWTG, P06659, AAA34274	GI11b	AAA34286
オメガ-グリアジン (n=3)			
O1a	AAG17702		
O1b	P02865		
O1c	A59156		

10

20

【 0 2 6 1 】

30

【表 30】

表23. 全ての公知のコムギグリアジン12マーにわたる合成ペプチド

蛋白質	位置*	配列	番号	蛋白質	位置*	配列	番号
グループ1				グループ43			
A1A1	20	AVRF PVPQ LQPQ NPSQ QLPO		1	G12A 33	QQQL VPQL QQPL SQQP QQTf	331
A1A2	20	MVRV PVPQ LQPQ NPSQ QQPQ		2	G13A 33	QQQP FPQP HQPF SQQP QQTf	332
A1B1	20	MVRV PVPQ LQPQ NPSQ QHPQ		3	G14 33	QQQP FLQP HQPF SQQP QQIF	333
A1B2	20	MVRV PMPQ LQPQ DPSQ QQPQ		4	G15A 33	QQQQ PFPQ PQQP FSQQ PQQI	334
A1B7	20	MVRV TVPQ LQPQ NPSQ QQPQ		5	G15B 33	QQQQ PFPQ PQQP QQPF PQPQ	335
A1B8	20	AVRV SVPQ LQPQ NPSQ QQPQ		6	G15C 33	QQQP FRQP QQPF YQQP QHTF	336
A1B8	20	AVRV PVPQ LQPQ NPSQ QQPQ		7	G16A 33	QQQP FPQP QQPF CQQP QRTI	337
A1B10	20	AVRW PVPQ LQPQ NPSQ QQPQ		8	G16C 42	QQQP FPQP QQPF CEQP QRTI	338
グループ2				グループ44			
A2B3	20	AVRV PVPQ LQLQ NPSQ QQPQ		9	G11A 42	HQPF SQQP QQTf PQPQ QTFF	339
A2B5	20	MVRV PVPQ LQLQ NPSQ QQPQ		10	G12A 42	QQPL SQQP QQTf PQPQ QTFF	340
A3A1	20	AVRV PVPQ PQQP NPSQ PQQP		11	G14 42	HQPF SQQP QQIF PQPQ QTFF	341
A3B1	20	AVRV PVPQ LQPK NPSQ QQPQ		12	G15A 42	QQPF SQQP QQIF PQPQ QTFF	342
A1A1	28	LQPQ NPSQ LQPQ EQVP LVQQ		13	G15B 42	QQPQ QPFP PQPQ PQLP FPQQ	343
A1A2	28	LQPQ NPSQ QQPQ EQVP LVQQ		14	G15C 42	QQPF YQQP QHTF PQPQ QTCP	344
A1B1	28	LQPQ NPSQ QHPQ EQVP LVQQ		15	G16A 42	QQPF CQQP QRTI PQPH QTFF	345
A1B2	28	LQPQ DPSQ QQPQ EQVP LVQQ		16	G16B 42	QQPF CQQP QQTf PQPH QTFF	346
グループ3				グループ45			
A2B1	28	LQPQ NPSQ QQPQ KQVP LVQQ		17	G16C 42	QQPF CEQP QRTI PQPH QTFF	347
A2B3	28	LQLQ NPSQ QQPQ EQVP LVQE		18	G11A 50	QQTf PQPQ QTFF HQPQ QQFP	348
A2B5	28	LQLQ NPSQ QQPQ EQVP LVQE		19	G14 50	QQIF PQPQ QTFF HQPQ QQFP	349
A3A1	28	PQPQ NPSQ PQQP GQVP LVQQ		20	G15A 50	QQIF PQPQ QTFF HQPQ QAFP	350
A3A2	28	PQPQ NPSQ PQQP RQVP LVQQ		21	G16A 50	QRTI PQPH QTFF HQPQ QTFF	351
A3B1	28	LQPK NPSQ QQPQ EQVP LVQQ		22	G15A 58	QTFF HQPQ QAFP PQPQ TFFH	352
A4A	28	LQPQ NPSQ QQPQ EQVP LMQQ		23	G16A 58	QTFF HQPQ QTFF PQPQ TYPH	353
A1A1	36	QLPQ EQVP LVQQ QQFL GQQQ		24	G16C 58	QTFF HQPQ QTFF QPEQ TYPH	354
グループ4				グループ46			
A1B1	36	QHPQ EQVP LVQQ QQFL GQQQ		25	G15A 66	QAFP PQPQ TFFH PQPQ QFPQ	355
A1B2	36	QQPQ EQVP LVQQ QQFL GQQQ		26	G15C 66	QHTF PQPQ QTCP HQPQ QQFP	356
A1B12	36	QQPQ EQVP LVQQ QQFL GQQQ		27	G16A 66	QTFF PQPQ TYPH PQPQ QFPQ	357
A2A1	36	QQPQ EQVP LVQQ QQFP GQQQ		28	G16C 66	QTFF QPEQ TYPH PQPQ QFPQ	358
A2B1	36	QQPQ KQVP LVQQ QQFP GQQQ		29	G11A 73	QTFF HQPQ QQFP PQPQ PQPQ	359
A2B3	36	QQPQ EQVP LVQE QQFQ GQQQ		30	G12A 73	QTFF HQPQ QQVP PQPQ PQPQ	360
A3A1	36	PQPQ GQVP LVQQ QQFP GQQQ		31	G13A 73	QTFF HQPQ QQFS PQPQ PQPQ	361
A3A2	36	PQPQ RQVP LVQQ QQFP GQQQ		32	G15C 73	QTCP HQPQ QQFP PQPQ PQPQ	362
グループ5				グループ47			
A4A	36	QQPQ EQVP LMQQ QQQF PGQQ		33	G16A 73	QTFP HQPQ QQFP QTQQ PQPQ	363
A1A1	44	LVQQ QQFL GQQQ PFPQ QQPY		34	G11A 81	QQFP PQPQ PQPQ FLQP QQFP	364
A1B1	44	LVQQ QQFL GQQQ SFPP QQPY		35	G12A 81	QQVP PQPQ PQPQ FLQP QQFP	365
A1B12	44	LVQQ QQFL GQQQ PFPQ QQPY		36	G13A 81	QQFS PQPQ PQPQ FIQP QQFP	366
A2A1	44	LVQQ QQFP GQQQ PFPQ QQPY		37	G14 81	QQFP PQPQ PQPQ FLQP RQFP	367
A2B1	44	LVQE QQFQ GQQQ PFPQ QQPY		38	G15A 81	QQFP PQPQ PQPQ FPQP PQPQ	368
A3A1	44	LVQQ QQFP GQQQ PFPQ QQPY		39	G16A 81	QQFP QTQQ PQPQ FPQP QQTf	369
A4A	44	LMQQ QQQF PGQQ EQFP PQPQ		40	G11A 89	PQQQ FLQP QQFP PQPQ QQPY	370
グループ6				グループ48			
A4D	44	LMQQ QQQF PGQQ ERFP PQPQ		41	G13A 89	PQQQ FIQP QQFP PQPQ QQTY	371
A1A1	53	GQQQ PFPQ QQPY PQPQ PFPQ		42	G13B 89	PQQQ FIQP QQFP QTYP QRPQ	372
A1A3	53	GQQQ PFPQ QQPY PQPQ PFPQ		43	G14 89	PQQQ FLQP RQFP PQPQ QQPY	373
A1B1	53	GQQQ SFPP QQPY PQPQ PFPQ		44	G15A 89	PQQP FPQP PQPQ FPQP QQFP	374
A2B1	53	GQQQ PFPQ QQPY PQPQ PFPQ		45	G15C 89	PQQP FPQP QQFP QPFP QPQQ	375
A3A1	53	GQQQ QFPQ QQPY PQPQ PFPQ		46	G16A 89	PQQP FPQP QQTf PQPQ QLFP	376
A4A	53	GQQE QFPQ QQPY PHQQ PFPQ		47	グループ49		
A4D	53	GQQE RFPQ QQPY PHQQ PFPQ		48	G15A 97	PQQQ FPQP QQFP QPFP QQFP	377
グループ7				49	G15A 105	QQPQ QPFP QQFP QPFP QPFP	378
A1A1	61	QQPY PQPQ PFPQ QLPY LQLQ		50	G15A 113	QQPQ QQFP PQPQ PQPQ PFPQ	379
A1A3	61	QQPY PQPQ PFPQ LPLY LQLQ		51	G15A 121	QQPQ PQPQ FPQP PQPQ LPFP	380
A1B1	61	QQPY PQPQ PFPQ QQPY LQLQ		52	G11A 126	QQPQ PQPQ QQPY PQPQ QPFP	381
A2B1	61	QQPY PQPQ PFPQ QQPY MQLQ		53	G12A 126	QQPQ PQPQ QPFP PQTQ PQPQ	382
A4A	61	QQPY PHQQ PFPQ QQPY PQPQ		54	G13A 126	QQPQ PQPQ QQTY PQRP QPFP	383
A1A1	69	PFPQ QLPY LQLQ PFPQ PQLP		55	G14 126	RQFP PQPQ QQPY PQPQ QPFP	384
A1B1	69	PFPQ QQPY LQLQ PFPQ PQLP		56	G15A 126	QQPQ PQPQ QPQL PFPQ PQPQ	385
A1B10	69	PFPQ QQPY LQLQ PFPQ PQLP		57	G15C 126	QQPQ PQPQ QAQL PFPQ PQPQ	386
グループ8				58	G16A 126	QQTf PQPQ QLFP PQPQ QPFP	387
A1B11	69	PFPQ QQPY LQLQ PFLQ PQLP		59	G11A 134	QQPY PQPQ QPFP PQTQ PQPQ	388
A1B12	69	PFPQ QQPY LQLQ PFLQ PQLP		60	G12A 134	QQPQ PQTQ PQPQ PFPQ PQPQ	389
A2A1	69	PFPQ QQPY LQLQ PFPQ PQLP		61	G13A 134	QQTY PQRP QPFP PQTQ PQPQ	390
A2B1	69	PFPQ QQPY MQLQ PFPQ PQLP			G15A 134	QPQL PFPQ PQPQ PQPQ PFPQ	391
A2B2	69	PFPQ QQPY MQLQ PFPQ PFPF					

【表 3 1】

A2B4	69	FFPS	QQPY	LQLQ	PPFQ	PQPF	392
A2B5	69	FFPS	QQPY	LQLQ	PPFR	PQLP	393
A4A	69	FFPS	QQPY	PQPQ	PPFF	QLPY	394
ブルール9							
A4B	69	FFPS	QQPY	PQPQ	PPFQ	PQPF	395
A1A1	77	LQLQ	PPFQ	PQLP	YSQP	QFPR	396
A1A4	77	LQLQ	PPFQ	PQLP	YSQP	QQFR	397
A1B1	77	LQLQ	PPFQ	PQLP	YLQP	QFPR	398
A1B4	77	LQLQ	PPFQ	PQLS	YSQP	QFPR	399
A1B10	77	LQLQ	PPFQ	PQLP	YSQP	QFPR	400
A1B11	77	LQLQ	PPFQ	PQLP	YSQP	QFPR	401
A1B12	77	LQLQ	PPFQ	PQLP	YSQP	QFPR	402
ブルール10							
A2A1	77	LQLQ	PPFQ	PQLP	YPQP	QLPY	403
A2B1	77	MQLQ	PPFQ	PQLP	YPQP	QLPY	404
A2B2	77	MQLQ	PPFQ	PQPF	PPQL	PYPQ	405
A2B3	77	LQLQ	PPFQ	PQLP	YPQP	QFPR	406
A2B4	77	LQLQ	PPFQ	PQPF	PPQL	PYPQ	407
A2B5	77	LQLQ	PPFQ	PQPF	PPQL	PYPQ	408
A3B1	77	LQLQ	PPFQ	PQPF	LPQL	PYPQ	409
A3B3	77	LQLQ	PPFQ	PQPF	PPQL	PYPQ	410
ブルール11							
A4A	77	PQPQ	PPFP	QLPY	PQTQ	PPFP	411
A4B	77	PQPQ	PPFP	PQPF	PPQL	PYPQ	412
A1A1	85	PQLP	YSQP	QFPR	PQPF	YPQP	413
A1A6	85	PQLP	YSQP	QFPR	PQPF	YPQP	414
A1B1	85	PQLP	YLQP	QFPR	PQPF	YPQP	415
A1B4	85	PQLS	YSQP	QFPR	PQPF	YPQP	416
A1B6	85	PQLS	YSQP	QFPR	PQPF	YPQP	417
A1B12	85	PQPF	PPQL	PYSQ	PQPF	RPQQ	418
ブルール12							
A2A1	85	PQLP	YPQP	QLPY	PQPQ	LPYP	419
A2B1	85	PQLP	YPQP	QLPY	PQPQ	PPRP	420
A2B2	85	PQPF	PPQL	PYPQ	PQLP	YPQP	421
A2B3	85	PQLP	YPQP	QFPR	PQPF	YPQP	422
A2B4	85	PQPF	PPQL	PYPQ	PQPF	RPQQ	423
A3A1	85	PQPF	PPQL	PYPQ	PPFP	SPQQ	424
ブルール13							
A3B1	85	PQPF	LPQL	PYPQ	PQSF	PPQQ	425
A3B3	85	PQPF	PPQL	PYPQ	PQSF	PPQQ	426
A4A	85	QLPY	PQTQ	PPFP	QQPY	PQPQ	427
A4B	85	PQPF	PPQL	PYPQ	TQPF	PPQQ	428
A2A1	106	LPYP	QFPR	FRPQ	QYPY	QSQP	429
A2B1	106	LPYP	QFPR	FRPQ	QYPY	QSQP	430
A3A1	106	LPYP	QFPR	FRPQ	QYPY	QSQP	431
A3B1	106	LPQL	PYPQ	PQSF	PPQQ	PYPQ	432
ブルール14							
A4A	106	PPQL	PYPQ	TQPF	PPQQ	PYPQ	433
A1A1	112	QFPR	PQPF	YPQP	QPYQ	SQPQ	434
A1B6	112	QFPR	PQPF	YPQP	QPYQ	SQPQ	435
A2A1	112	QFPR	PQPF	YPQP	QPYQ	SQPQ	436
A2B1	112	QFPR	PQPF	YPQP	QPYQ	SQPQ	437
A3A1	112	PPFS	PQPF	YPQP	QPYQ	PQPQ	438
A3B1	112	QSFP	PQPF	YPQP	RPKY	LQPQ	439
A3B2	112	QSFP	PQPF	YPQP	RPKY	LQPQ	440
ブルール15							
A3B3	112	QSFP	PQPF	YPQP	QPYQ	LQPQ	441
A4A	112	PPFP	PQPF	YPQP	QPYQ	PQPQ	442
A1A1	120	YPQP	QPYQ	SQPQ	QPIS	QQQQ	443
A1B3	120	YPQP	QPYQ	SQPQ	EPIS	QQQQ	444
A2A1	120	YPQS	QPYQ	SQPQ	QPIS	QQQQ	445
A3A1	120	YPQP	QPYQ	PQPQ	QPIS	QQQA	446
A3B1	120	YPQP	QPYQ	PQPQ	QPIS	QQQA	447
A3B2	120	YPQP	QPYQ	PQPQ	QPIS	QQQA	448
ブルール16							
A3B3	120	YPQP	QPYQ	LQPQ	QPIS	QQQA	449
A1A1	128	SQPQ	QPIS	QQQQ	QQQQ	QQQQ	450
A1B3	128	SQPQ	EPIS	QQQQ	QQQQ	QQQQ	451
A3A1	128	PQPQ	QPIS	QQQA	QQQQ	QQQQ	452
A1A1	138	QQQQ	QQQQ	QQQQ	QQQQ	ILQQ	453
A1A6	138	QQQQ	QQQQ	QQQQ	QQQQ	ILQQ	454
A1B11	138	QQQQ	QQQQ	QQQQ	QQQQ	ILQQ	455
62	GISC	134	QAQL	PPFQ	QPQQ	PLPQ	392
63	ブルール51						393
64	G16A	134	QLPF	PQPF	QPFQ	PQPF	394
65	G12A	142	QPQQ	PPFQ	QPQQ	PPFQ	395
66	G12A	150	QPQQ	PPFQ	TQPF	QPFQ	396
67	G12A	158	TQPF	QPFQ	QPFQ	PQTQ	397
68	G12A	166	PQPF	QPFQ	PQTQ	QPQQ	398
69	G11A	170	QPFQ	PQTQ	QPQQ	LFPQ	399
70	G12A	170	QPFQ	PQTQ	QPQQ	PPFQ	400
71	G13A	170	QPFQ	PQTQ	QPQQ	PPFQ	401
ブルール52							
72	G14	170	QPFQ	PQTQ	QPQQ	PPFQ	402
73	G15A	170	QPFQ	PQTQ	QPQQ	PPFQ	403
74	G15C	170	QPLP	PQPQ	QPQQ	PPFQ	404
75	G16A	170	QPFQ	PQPQ	QPQQ	PPFQ	405
76	G11A	178	QPQQ	LFPQ	SQPF	QQQF	406
77	G12A	178	QPQQ	LFPQ	SQPF	QQQF	407
78	G13A	178	QPQQ	LFPQ	SQPF	QQQF	408
79	G14	178	QPQQ	LFPQ	SQPF	QQQF	409
ブルール53							
80	G15A	178	QPQQ	LFPQ	SQPF	QQQF	410
81	G11A	186	SQPF	QPFQ	QPFQ	QPFQ	411
82	G12A	186	SQPF	QPFQ	QPFQ	QPFQ	412
83	G13A	186	SQPF	QPFQ	QPFQ	QPFQ	413
84	G14	186	SQPF	QPFQ	QPFQ	QPFQ	414
85	G15A	186	SQPF	QPFQ	QPFQ	QPFQ	415
86	G15C	186	SQPF	QPFQ	QPFQ	QPFQ	416
87	G11A	194	SQPF	QPFQ	QPFQ	QPFQ	417
ブルール54							
88	G12A	194	PQPQ	QQLP	QPQQ	PQQS	418
89	G13A	194	PQPQ	QQLP	QPQQ	PQQS	419
90	G14	194	PQPQ	QQLP	QPQQ	PQQS	420
91	G15A	194	PQPQ	QQLP	QPQQ	PQQS	421
92	G15C	194	PQPQ	QQLP	QPQQ	PQQS	422
93	G11A	202	QPQQ	PQPF	PPQL	YPQP	423
94	G12A	202	QPQQ	PQPF	PPQL	YPQP	424
ブルール55							
95	G11A	210	FPQQ	QPFQ	QPFQ	QPFQ	425
96	G12A	210	FPQQ	QPFQ	QPFQ	QPFQ	426
97	G13A	210	FPQQ	QPFQ	QPFQ	QPFQ	427
98	G14	210	FPQQ	QPFQ	QPFQ	QPFQ	428
99	G15A	210	FPQQ	QPFQ	QPFQ	QPFQ	429
100	G15C	210	FPQQ	QPFQ	QPFQ	QPFQ	430
101	G11A	218	IQPS	LQQQ	VNPK	KNFL	431
102	G12A	218	IQPS	LQQQ	VNPK	KNFL	432
ブルール56							
103	G13A	218	IQPS	LQQQ	VNPK	KNFL	433
104	G14	218	IQPS	LQQQ	VNPK	KNFL	434
105	G15A	218	IQPS	LQQQ	VNPK	KNFL	435
106	G15C	218	IQPS	LQQQ	VNPK	KNFL	436
107	G11A	226	VNPK	KNFL	LQQC	KPVS	437
108	G12A	226	VNPK	KNFL	LQQC	KPVS	438
109	G13A	226	VNPK	KNFL	LQQC	KPVS	439
110	G14	226	VNPK	KNFL	LQQC	KPVS	440
ブルール57							
111	G15A	226	VNPK	KNFL	LQQC	KPVS	441
112	G15C	226	VNPK	KNFL	LQQC	KPVS	442
113	G11A	234	LQQC	KPVS	LVSS	LWSM	443
114	G12A	234	LQQC	KPVS	LVSS	LWSM	444
115	G13A	234	LQQC	KPVS	LVSS	LWSM	445
116	G14	234	LQQC	KPVS	LVSS	LWSM	446
117	G15A	234	LQQC	KPVS	LVSS	LWSM	447
118	G15C	234	LQQC	KPVS	LVSS	LWSM	448
ブルール58							
119	G11A	242	LVSS	LWSM	ILPR	SDCQ	449
120	G12A	242	LVSS	LWSM	ILPR	SDCQ	450
121	G13A	242	LVSS	LWSM	ILPR	SDCQ	451
122	G14	242	LVSS	LWSM	ILPR	SDCQ	452
123	G15A	242	LVSS	LWSM	ILPR	SDCQ	453
124	G15C	242	LVSS	LWSM	ILPR	SDCQ	454
125	G11A	250	IWPQ	SDCQ	VMRQ	QCCQ	455
126	G12A	250	IWPQ	SDCQ	VMRQ	QCCQ	456
127	G13A	250	IWPQ	SDCQ	VMRQ	QCCQ	457
128	G14	250	IWPQ	SDCQ	VMRQ	QCCQ	458
129	G15A	250	IWPQ	SDCQ	VMRQ	QCCQ	459
130	G15C	250	IWPQ	SDCQ	VMRQ	QCCQ	460

【表 3 2】

A2A1 138 QQQQ QQQQ QQQQ QQQQ QQQI プール17	126 G15C 250 ILPR SDCQ VMQQ QCCQ QLAQ プール59	456
A4B 139 AQQQ QQQQ QQQQ QQQQ TLQQ	127 G11A 258 VMRQ QCCQ QLAQ IPQQ LQCA	457
A1A1 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLIP	128 G15A 258 VMRQ QCCQ QLAR IPQQ LQCA	458
A1A6 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLIP	129 G15C 258 VMQQ QCCQ QLAQ IPQQ LQCA	459
A1B6 146 QQQQ QQQQ ILQQ MLQQ QLIP	130 G16A 258 VMQQ QCCQ QLAQ IPQQ LQCA	460
A1B10 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLTP	131 G11A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT IIHS	461
A1B11 146 QQQQ QQQQ ILQQ ILQQ QLIP	132 G11B 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHT VIHS	462
A2A1 146 QQQQ QQQQ QQQI LQQI LQQQ	133 G12A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHS VVHS	463
A3A2 146 QQQQ QQQQ ILPQ ILQQ QLIP	134 G13A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHS IVHS	464
プール18	プール60	
A4A 146 QQQQ QQQQ TLQQ ILQQ QLIP	135 G15A 266 QLAR IPQQ LQCA AIHG IVHS	465
A1A1 163 ILQQ ILQQ QLIP CMDV VLQQ	136 G15C 266 QLAQ IPRQ LQCA AIHS VVHS	466
A1B6 163 ILQQ MLQQ QLIP CMDV VLQQ	137 G16A 266 QLAQ IPQQ LQCA AIHS VAHS	467
A1B10 163 ILQQ ILQQ QLTP CMDV VLQQ	138 G11A 274 LQCA AIHT IIHS IIMQ QEQQ	468
A2B1 163 ILQQ ILQQ QLIP CRDV VLQQ	139 G11B 274 LQCA AIHT VIHS IIMQ QEQQ	469
A3A2 163 ILPQ ILQQ QLIP CRDV VLQQ	140 G12A 274 LQCA AIHS VVHS IIMQ QQQQ	470
A4A 163 TLQQ ILQQ QLIP CRDV VLQQ	141 プール61	
A1A1 171 QLIP CMDV VLQQ HNIA HGRS	142 G13A 274 LQCA AIHS IVHS IIMQ QEQQ	471
プール19	G14 274 LQCA AIHS VVHS IIMQ QEQQ	472
A1A3 171 QLIP CMDV VLQQ HNKA HGRS	143 G15A 274 LQCA AIHG IVHS IIMQ QEQQ	473
A1B2 171 QLIP CMDV VLQQ HNLA HGRS	144 G16A 274 LQCA AIHS VAHS IIMQ QEQQ	474
A1B7 171 QLIP CMDV VLQQ HNIV HGRS	145 G11A 282 IIHS IIMQ QEQQ EQQQ GMHI	475
A1B10 171 QLTP CMDV VLQQ HNIA RGRS	146 G11B 282 VIHS IIMQ QEQQ QGMH ILLP	476
A1B11 171 QLIP CMDV VLQQ HNIV HGKS	147 G12A 282 VVHS IIMQ QQQQ QQQQ QGID	477
A2A1 171 QLIP CRDV VLQQ HSIA YGSS	148 G13A 282 IVHS IIMQ QEQQ EQRQ GVQI	478
A2B1 171 QLIP CRDV VLQQ HSIA HGSS	149 プール62	
A2B3 171 QLIP CRDV VLQQ HNIA HGSS	150 G14 282 VVHS IIMQ QEQQ EQLQ GVQI	479
プール20	G15A 282 IVHS IIMQ QEQQ QQQQ QQQQ	480
A3A1 171 QLIP CRDV VLQQ HNIA HARS	151 G15C 282 VVHS IIMQ QEQQ QQQQ QQQQ	481
A3B1 171 QLIP CRDV VLQQ HNIA HASS	152 G16A 282 VAHS IIMQ QEQQ QGVP ILRP	482
A1A1 179 VLQQ HNIA HGRS QVLQ QSTY	153 G11A 290 QEQQ EQQQ GMHI LLPL YQQQ	483
A1A3 179 VLQQ HNKA HGRS QVLQ QSTY	154 G12A 290 QQQQ QQQQ QGID IFLP LSQH	484
A1B2 179 VLQQ HNLA HGRS QVLQ QSTY	155 G12B 290 QQQQ QQQQ QGMH IFLP LSQQ	485
A1B7 179 VLQQ HNIV HGRS QVLQ QSTY	156 G13A 290 QEQQ EQRQ GVQI LVPL SQQQ	486
A1B10 179 VLQQ HNIA RGRS QVLQ QSTY	157 プール63	
A1B11 179 VLQQ HNIV HGKS QVLQ QSTY	158 G14 290 QEQQ EQLQ GVQI LVPL SQQQ	487
プール21	G15A 290 QEQQ QQQQ QQQQ QQQQ IQIM	488
A2A1 179 VLQQ HSIA YGSS QVLQ QSTY	159 G15C 290 QEQQ QGIV ILRP LFQL VQGG	489
A2B1 179 VLQQ HSIA HGSS QVLQ QSTY	160 G16A 290 QEQQ QGVP ILRP LFQL AQGL	490
A2B3 179 VLQQ HNIA HGSS QVLQ QSTY	161 G15A 298 QQQQ QQQQ IQIM RPLF QLVQ	491
A3A1 179 VLQQ HNIA HARS QVLQ QSTY	162 G11A 305 GMHI LLPL YQQQ QVGQ GTLV	492
A3B1 179 VLQQ HNIA HASS QVLQ QSTY	163 G12A 305 GIDI FLPL SQHE QVGQ GSLV	493
A4A 179 VLQQ HNIA HASS QVLQ QSSY	164 G12B 305 GMHI FLPL SQQQ QVGQ GSLV	494
A1A1 187 HGRS QVLQ QSTY QLLQ ELCC	165 プール64	
A1A3 187 HGRS QVLQ QSTY QLLR ELCC	166 G13A 305 GVQI LVPL SQQQ QVGQ GTLV	495
プール22	G14 305 GVQI LVPL SQQQ QVGQ GILV	496
A1B8 187 HGRS QVLQ QSTY QLLR ELCC	167 G15A 305 GIQI MRPL FQLV QGQG IIQP	497
A1B11 187 HGKS QVLQ QSTY QLLQ ELCC	168 G15C 305 GIQI LRPL FQLV QGQG IIQP	498
A2A1 187 YGSS QVLQ QSTY QLVQ QLCC	169 G16A 305 GVPI LRPL FQLA QGLG IIQP	499
A2B1 187 HGSS QVLQ QSTY QLVQ QFCC	170 G11A 313 YQQQ QVGQ GTLV QGQG IIQP	500
A2B3 187 HGSS QVLQ QSTY QLVQ QLCC	171 G12A 313 SQHE QVGQ GSLV QGQG IIQP	501
A3A1 187 HARS QVLQ QSTY QPLQ QLCC	172 G12B 313 SQQQ QVGQ GSLV QGQG IIQP	502
A3B1 187 HASS QVLQ QSTY QLLQ QLCC	173 プール65	
A4A 187 HASS QVLQ QSSY QQLQ QLCC	174 G13A 313 SQQQ QVGQ GTLV QGQG IIQP	503
プール23	G14 313 SQQQ QVGQ GILV QGQG IIQP	504
A1A1 195 QSTY QLLQ ELCC QHLW QIPE	175 G11A 321 GTLV QGQG IIQP QQPA QLEA	505
A1A3 195 QSTY QLLR ELCC QHLW QIPE	176 G12A 321 GSLV QGQG IIQP QQPA QLEA	506
A1B8 195 QSTY QLLR ELCC QHLW QIPE	177 G15A 321 FQLV QGQG IIQP QQPA QLEV	507
A2A1 195 QSTY QLVQ QLCC QQLW QIPE	178 G16A 321 FQLA QGLG IIQP QQPA QLEG	508
A2B1 195 QSTY QLVQ QFCC QQLW QIPE	179 G11A 329 IIQP QQPA QLEA IRSI VLQT	509
A3A1 195 QSTY QPLQ QLCC QQLW QIPE	180 G13A 329 IIQP QQPA QLEV IRSI VLQT	510
A3B1 195 QSTY QLLQ QLCC QQLL QIPE	181 プール66	
A4A 195 QSSY QQLQ QLCC QQLF QIPE	182 G13C 329 IIQP QQPA QLEV IRSS VLQT	511
プール24	G15C 329 IIQP QQPA QYEV IRSI VLRT	512
A1A1 203 ELCC QHLW QIPE QSQC QAIH	183 G16A 329 IIQP QQPA QLEG IRSI VLKT	513
A1B6 203 ELCC QHLW QIPE QSQC QAIH	184 G11A 337 QLEA IRSI VLQT LPTM CNVY	514
A1B10 203 ELCC QHLW QIPE KLQC QAIH	185 G12A 337 QLEA IRSI VLQT LPTM CNVY	515
A2A1 203 QLCC QQLW QIPE QSRC QAIH	186 G13A 337 QLEV IRSI VLQT LATM CNVY	516
A2B1 203 QFCC QQLW QIPE QSRC QAIH	187 G13C 337 QLEV IRSS VLQT LATM CNVY	517
A3B1 203 QLCC QQLL QIPE QSRC QAIH	188 G15A 337 QLEV IRSI VLGT LPTM CNVY	518
プール25	プール67	

【0 2 6 4】

【表 3 3】

A3B3 203 GLCC QQLL QIPE QSQC QAIH	189 G15C 337 QYEV IRSI VLRT LPNM CNVY	519
A4A 203 QLCC QQLF QIPE QSRC QAIH	190 G16A 337 QLEG IRSI VLKT LPTM CNVY	520
A1A1 211 QIPE QSQC QAIH NVVH AIL	191 G11A 345 VLQT LPTM CNVY VPPE CSII	521
A1B3 211 QIPE QSQC QAIH NVVH AIL	192 G12A 345 VLQT LPSM CNVY VPPE CSIM	522
A1B6 211 QILE QSQC QAIH NVVH AIL	193 G13A 345 VLQT LATM CNVY VPPY CSTI	523
A1B9 211 QIPE QSQC QAIH KVVH AIL	194 G15A 345 VLGT LPTM CNVY VPPE CSTI	524
A1B10 211 QIPE KLQC QAIH NVVH AIL	195 G15C 345 VLRT LPNM CNVY VRPD CSTI	525
A2A1 211 QIPE QSRC QAIH NVVH AIL	196 G16A 345 VLKT LPTM CNVY VPPD CSTI	526
ブール26	ブール68	
A3B3 211 QIPE QSQC QAIH NVAH AILM	197 G11A 353 CNVY VPPE CSII KAPF SSVV	527
A4A 211 QIPE QSRC QAIH NVVH AIL	198 G12A 353 CNVY VPPE CSIM RAPF ASIV	528
A1A1 219 QAIH NVVH AIL HQQQ KQQQ	199 G13A 353 CNVY VPPY CSTI RAPF ASIV	529
A1A6 219 QAIH NVVH AIL HQQQ KQQQ	200 G15A 353 CNVY VPPE CSTI KAPF ASIV	530
A1B3 219 QAIH NVVH AIL HQQQ KQQQ	201 G15C 353 CNVY VRPD CSTI NAPF ASIV	531
A1B9 219 QAIH KVVH AIL HQQQ KQQQ	202 G16A 353 CNVY VPPD CSTI NVPY ANID	532
A1B13 219 QAIH NVVH AIL HQQQ QQQQ	203 G11A 361 CSII KAPF SSVV AGIG GQ	533
A2B3 219 QAIH NVVH AIL HQQH HHHQ	204 G12A 361 CSIM RAPF ASIV AGIG GQ	534
ブール27	ブール69	
A3A1 219 QAIH NVVH AIL HQQQ RQQQ	205 G13A 361 CSTI RAPF ASIV AGIG GQYR	535
A3B1 219 QAIH NVVH AIL HQQE QQQQ	206 G14 361 CSTI RAPF ASIV ASIG GQ	536
A3B3 219 QAIH NVAH AIL HQQQ QQQQ	207 G15A 361 CSTI KAPF ASIV ADIG GQ	537
A4A 219 QAIH NVVH AIL HHHQ QQQQ	208 G15C 361 CSTI NAPF ASIV AGIS GQ	538
A1A1 227 AIL HQQQ KQQQ QPSS QVSF	209 G16A 361 CSTI NVPY ANID AGIG GQ	539
A1A6 227 AIL HQQQ KQQQ QPSS QVSF	210 G11 1 PQQP FPLQ PQQS FLWQ SQQP	540
A1B2 227 AIL HQQQ KQQQ QLSS QVSF	211 G11 9 PQQS FLWQ SQQP FLQQ PQQP	541
A1B10 227 AIL HQQQ KQQQ PSSQ VSFQ	212 G11 17 SQQP FLQQ PQQP SPQP QQVV	542
ブール28	ブール70	
A1B13 227 AIL HQQQ QQQQ EQKQ QLQQ	213 G11 25 PQQP SPQP QQVV QIIS PATP	543
A2A1 227 AIL HQQQ QQQQ QQQQ QPLS	214 G11 33 QQVV QIIS PATP TTIP SAGK	544
A2B3 227 AIL HQQH HHHQ QQQQ QQQQ	215 G11 41 PATP TTIP SAGK PTSA PFPQ	545
A2B4 227 AIL HQQH HHHQ EQKQ QLQQ	216 G11 49 SAGK PTSA PFPQ QQQQ HQQL	546
A3A1 227 AIL HQQQ RQQQ PSSQ VSLQ	217 G11 57 PFPQ QQQQ HQQL AQQQ IPVV	547
A3B1 227 AIL HQQE QQQQ LQQQ QQQQ	218 G11 65 HQQL AQQQ IPVV QPSI LQQL	548
A3B3 227 AIL HQQQ QQQQ EQKQ QLQQ	219 G11 73 IPVV QPSI LQQL NPCK VFLQ	549
A4A 227 AIL HHHQ QQQQ QPSS QVSF	220 G11 81 LQQL NPCK VFLQ QQCS PVAM	550
ブール29	ブール71	
A1A1 235 KQQQ QPSS QVSF QQPQ QQYP	221 G11 89 VFLQ QQCS PVAM PQRL ARSQ	551
A1A6 235 KQQQ QPSS QVSF QQPQ QQYP	222 G11 97 PVAM PQRL ARSQ MLQQ SSCH	552
A1B2 235 KQQQ QLSS QVSF QQPQ QQYP	223 G11 105 ARSQ MLQQ SSCH VMQQ QCCQ	553
A1B10 235 KQQQ PSSQ VSFQ PQQP QYPL	224 G11 113 SSCH VMQQ QCCQ QLPQ IPQQ	554
A1B13 235 QQQQ EQKQ QLQQ QQQQ QQQQ	225 G11 121 QCCQ QLPQ IPQQ SRYQ AIRA	555
A2B4 235 HHHQ EQKQ QLQQ QQQQ QQQQ	226 G11 127B PQIP QQSR YEAI RAIT YSII	556
A3A1 235 RQQQ PSSQ VSLQ PQQP QYPS	227 G11 129 IPQQ SRYQ AIRA IYIS IILQ	557
A3B1 235 QQQQ LQQQ QQQQ LQQQ QQQQ	228 G11 137 AIRA IYIS IILQ EQQQ VQGS	558
ブール30	ブール72	
A4A 235 QQQQ QPSS QVSF QQPQ EQYP	229 G11 145 IILQ EQQQ VQGS IQSQ QQQP	559
A1B13 243 QLQQ QQQQ QQQQ QQQQ KQQQ	230 G11 153 VQGS IQSQ QQQP QQLG QCVS	560
A1B13 251 QQQQ QQQQ KQQQ QPSS SQVS	231 G11 161 QQQP QQLG QCVS QPQQ QSQQ	561
A2A1 260 QQQQ QQQQ QPLS QVSF QQPQ	232 G11 169 QCVS QPQQ QSQQ QLGQ QPQQ	562
A2B1 260 QQQQ QQQQ QPLS QVCF QQSQ	233 G11 177 QSQQ QLGQ QPQQ QQLA QGTF	563
A2B3 260 HHHQ QQQQ QQQQ QPLS QVSF	234 G11 185 QPQQ QQLA QGTF LQPH QIAQ	564
A3B1 260 QQQQ QQQQ QPSS QVSF QQPQ	235 ブール73	
A2A1 289 QPLS QVSF QQPQ QQYP SGQG	236 G11 193 QGTF LQPH QIAQ LEVM TSIA	565
ブール31	G11 201 QIAQ LEVM TSIA LRIL PTMC	566
A2B1 289 QPLS QVCF QQSQ QQYP SGQG	237 G11 209 TSIA LRIL PTMC SVNV PLYR	567
A3B1 289 QPSS QVSF QQPQ QQYP SSQV	238 G11 217 PTMC SVNV PLYR TTTS VPFG	568
A1A1 293 QVSF QQPQ QQYP LGQG SFRP	239 G11 225 PLYR TTTS VPFG VGTG VGAY	569
A1A6 293 QVSF QQPQ QQYP LGQG SFRP	240 G111 1A 1 TTTR TFP1 PTIS SNNN HHFR	570
A1B2 293 QVSF QQPQ QQYP LGQG SFRP	241 G111 1A 9 PTIS SNNN HHFR SNNS HHFH	571
A2A1 293 QVSF QQPQ QQYP SGQG SFQP	242 G111 1A 17 HHFR SNNS HHFH SNNS QFYR	572
A2B1 293 QVCF QQSQ QQYP SGQG SFQP	243 ブール74	
A2B3 293 QVSF QQPQ QQYP SGQG FFQP	244 G111 1A 25 HHFH SNNS QFYR NNNS PGHN	573
ブール32	G111 1A 33 QFYR NNNS PGHN NPLN NNNS	574
A2B5 293 QVSF QQPQ QQYP SGQG FFQP	245 G111 1A 41 PGHN NPLN NNNS PNNN SPSN	575
A3A1 293 QVSL QQPQ QQYP SGQG FFQP	246 G111 1A 49 NNNS PNNN SPSN HHNN SPNN	576
A3B1 293 QVSF QQPQ QQYP SSQV SFQP	247 G111 1A 57 SPSN HHNN SPNN NFQY HTHP	577
A3B2 293 QVSF QQPQ QQYP SSQV SFQP	248 G111 1A 65 SPNN NFQY HTHP SNHK NLPH	578
A4A 293 QVSF QQPQ EQYP SGQV SFQS	249 G111 1A 73 HTHP SNHK NLPH TNNI QQQQ	579
A1A1 301 QQYP LGQG SFRP SQQN PQAQ	250 G111 1A 81 NLPH TNNI QQQQ PFFS QQQQ	580
A1B2 301 QQYP LGQG SFRP SQQN SQAQ	251 ブール75	
A2A1 301 QQYP SGQG SFQP SQQN PQAQ	252 G111 1A 89 QQQQ PFFS QQQQ PFFS QQQQ	581
ブール33	G111 1A 97 QQQQ PFFS QQQQ PVLP QQSP	582

【表 3 4】

A2B3 301 QQYP SGQG FFQP SQQN PQAQ
 A2B5 301 QQYP SGQG FFQP FQQN PQAQ
 A3A1 301 QQYP SGQG FFQP SQQN PQAQ
 A3B1 301 QQYP SSQV SFQP SQLN PQAQ
 A3B2 301 QQYP SSQG SFQP SQQN PQAQ
 A4A 301 EQYP SGQV SFQS SQQN PQAQ
 A1B1 309 SFRP SQQN PLAQ GSVQ PQQL
 A1A1 309 SFRP SQQN PQAQ GSVQ PQQL
 プール34
 A1A3 309 SFRP SQQN PQTQ GSVQ PQQL
 A1B2 309 SFRP SQQN SQAQ GSVQ PQQL
 A1B3 309 SFRP SQQN PQDQ GSVQ PQQL
 A1B4 309 SFRP SQQN PRAQ GSVQ PQQL
 A2A1 309 SFQP SQQN PQAQ GSVQ PQQL
 A2B3 309 FFQP SQQN PQAQ GSFQ PQQL
 A2B5 309 FFQP FQQN PQAQ GSFQ PQQL
 A3A1 309 FFQP SQQN PQAQ GSVQ PQQL
 プール35
 A3B1 309 SFQP SQLN PQAQ GSVQ PQQL
 A3B1 309 SFQP SQLN PQAQ GSVQ PQQL
 A3B2 309 SFQP SQQN PQAQ GSVQ PQQL
 A4A 309 SFQS SQQN PQAQ GSVQ PQQL
 A1A1 317 PQAQ GSVQ PQQL PQFE EIRN
 A1A3 317 PQTQ GSVQ PQQL PQFE EIRN
 A1A6 317 PQAQ GSVQ PQQL PQFE IRNL
 A1B1 317 PLAQ GSVQ PQQL PQFE EIRN
 プール36
 A1B3 317 PQDQ GSVQ PQQL PQFE EIRN
 A1B4 317 PRAQ GSVQ PQQL PQFE EIRN
 A2B3 317 PQAQ GSFQ PQQL PQFE EIRN
 A2B5 317 PQAQ GSFQ PQQL PQFE AIRN
 A3B1 317 PQAQ GSVQ PQQL PQFA EIRN
 A4A 317 PQAQ GSVQ PQQL PQFQ EIRN
 プール37
 A1A1 325 PQQL PQFE EIRN LALQ TLPA
 A1A6 325 PQQL PQFE IRNL ALQT LPAM
 A1B12 325 PQQL PQFE EIRN LARK
 A2A1 325 PQQL PQFE EIRN LALQ TLPA
 A2B5 325 PQQL PQFE AIRN LALQ TLPA
 A3B1 325 PQQL PQFA EIRN LALQ TLPA
 A4A 325 PQQL PQFQ EIRN LALQ TLPA
 A1A1 333 EIRN LALQ TLPA MCNV YIPP
 プール38
 A1A3 333 EIRN LALQ TLPS MCNV YIPP
 A2A1 333 EIRN LALQ TLPA MCNV YIPP
 A3A1 333 EIRN LALQ TLPR MCNV YIPP
 A1A1 341 TLPA MCNV YIPP YCTI APFG
 A1A3 341 TLPS MCNV YIPP YCTI APFG
 A1B1 341 TLPA MCNV YIPP YCTI VPFG
 A1B4 341 TLPA MCNV YIPP YCAM APFG
 A1B9 341 TLPA MCNV YIPP YCTI TPFG
 プール39
 A2A1 341 TLPA MCNV YIPP YCTI APVG
 A2B2 341 TLPA MCNV YIPP YCST TIAP
 A3A1 341 TLPR MCNV YIPP YCST TIAP
 A3A2 341 TLPR MCNV YIPP YCST TTAP
 A3B1 341 TLPA MCNV YIPP HCST TIAP
 A1A1 349 YIPP YCTI APFG IFGT NYR
 A1B1 349 YIPP YCTI VPFG IFGT NYR
 A1B4 349 YIPP YCAM APFG IFGT NYR
 プール40
 A1B5 349 YIPP YCTM APFG IFGT NYR
 A1B9 349 YIPP YCTI TPFG IFGT N
 A2A1 349 YIPP YCTI APVG IFGT NYR
 A2B2 349 YIPP YCST TIAP VGIF GTN
 A3A2 349 YIPP YCST TTAP FGIF GTN
 A3B1 349 YIPP HCST TIAP FGIF GTN
 A3B3 349 YIPP HCST TIAP FGIS GTN
 A4D 350 IPPY CSTT IAPF GIGF TNYR
 プール41
 G1A 17 GTAN MQVD PSSQ VQWP QQQP
 G1A 17 GTAN IQVD PSGQ VQWL QQQL

253 G1II 1A 105 QQQQ PVLQ QQSP FSQQ QQLV 583
 254 G1II 1A 113 QQSP FSQQ QQLV LPPQ QQQQ 584
 255 G1II 1A 121 QQLV LPPQ QQQQ QLVQ QQIP 585
 256 G1II 1A 129 QQQQ QLVQ QQIP IVQP SVLQ 586
 257 G1II 1A 137 QQIP IVQP SVLQ QLNQ CKVF 587
 258 G1II 1A 145 SVLQ QLNQ CKVF LQQQ CSPV 588
 259 プール76
 260 G1II 1A 153 CKVF LQQQ CSPV AMPQ RLAR 589
 G1II 1A 161 CSPV AMPQ RLAR SQMW QQSS 590
 261 G1II 1A 169 RLAR SQMW QQSS CHVM QQQC 591
 262 G1II 1A 177 QQSS CHVM QQQC CQQL QQIP 592
 263 G1II 1A 185 QQQC CQQL QQIP EQSR YEAI 593
 264 G1II 1A 193 QQIP EQSR YEAI RAIJ YSII 594
 265 G1II 1A 201 YEAI RAIJ YSII LQEQ QQGF 595
 266 G1II 1A 209 YSII LQEQ QQGF VQPQ QQQP 596
 267 プール77
 268 G1II 1A 217 QQGF VQPQ QQQP QQSG QGVS 597
 G1II 1A 225 QQQP QQSG QGVS QSQQ QSQQ 598
 269 G1II 1A 233 QGVS QSQQ QSQQ QLQV CSFQ 599
 270 G1II 1A 241 QSQQ QLQV CSFQ QPQQ QLQV 600
 271 G1II 1A 249 CSFQ QPQQ QLQV QPQQ QQQQ 601
 272 G1II 1A 257 QLQV QPQQ QQQQ QVLQ GTFL 602
 273 G1II 1A 263 QQQQ QVLQ GTFL QPHQ IAHN 603
 274 G1II 1A 271 GTFL QPHQ IAHN EAVT SIAL 604
 275 プール78
 276 G1II 1A 279 IAHN EAVT SIAL RTLP TMCS 605
 G1II 1A 287 SIAL RTLP TMCS VNVP LYSA 606
 277 G1II 1A 295 TMCS VNVP LYSA TTSV PFGV 607
 278 G1II 1A 303 LYSA TTSV PFGV GTGV GAY 608
 279 G1II 1B 26 SCIS GLER PWQQ QPLP PQQS 609
 280 G1II 1B 34 PWQQ QPLP PQQS FSQQ PFFS 610
 281 G1II 1B 42 PQQS FSQQ PFFS QQQQ QPLP 611
 282 G1II 1B 50 PFFS QQQQ QPLP PQPS FSQQ 612
 プール79
 283 G1II 1B 58 QPLP PQPS FSQQ QPPF SQQQ 613
 284 G1II 1B 66 FSQQ QPPF SQQQ PILS QQQP 614
 285 G1II 1B 74 SQQQ PILS QPPF FSQQ QQPV 615
 286 O 1A 17 ATAA RELN PSNK ELQS PQQS 616
 287 O 1A 25 PSNK ELQS PQQS FSYQ QQPF 617
 288 O 1A 33 PQQS FSYQ QQPF PQQP YPQQ 618
 289 O 1A 41 QQPF PQQP YPQQ PYPS QQPY 619
 290 O 1A 49 YPQQ PYPS QQPY PSQQ PFPT 620
 プール80
 291 O 1A 57 QQPY PSQQ PFPT PQQQ FPEQ 621
 292 O 1A 65 PFPT PQQQ FPEQ SQQP FTQP 622
 293 O 1A 73 FPEQ SQQP FTQP QPPT PIQP 623
 294 O 1A 81 FTQP QPPT PIQP QQPF PQQP 624
 295 O 1A 89 PIQP QQPF PQQP QPQP QPFP 625
 296 O 1A 97 PQQP QPQP QPFP QPQP PFPW 626
 297 O 1A 105 QPFP QPQP PFPW QPQP PFPQ 627
 298 O 1A 113 PFPW QPQP PFPQ TQSS FPLQ 628
 プール81
 299 O 1A 121 PFPQ TQSS FPLQ PQQP FPQP 629
 300 O 1A 129 FPLQ PQQP FPQP PQQP FPQP 630
 301 O 1A 137 FPQP PQQP FPQP QLPP PQQS 631
 302 O 1A 145 FPQP QLPP PQQS EQII PQQL 632
 303 O 1A 153 PQQS EQII PQQL QPFP PLQP 633
 304 O 1A 161 PQQL QPFP PLQP QPFP PQQP 634
 305 O 1A 169 PLQP QPFP PQQP QPFP PQQP 635
 306 O 1A 177 PQQP QPFP PQQP QPIP VQPQ 636
 プール82
 307 O 1A 185 PQQP QPIP VQPQ QSPF QSSQ 637
 308 O 1A 193 VQPQ QSPF QSSQ QSSQ PFAQ 638
 309 O 1A 201 QSSQ QSSQ PFAQ PQQL FPPL 639
 310 O 1A 209 PFAQ PQQL FPPL QQPI PQQP 640
 311 O 1A 217 FPPL QQPI PQQP QPFP PLQP 641
 312 O 1A 225 PQQP QPFP PLQP QPFP PQQP 642
 313 O 1A 233 PLQP QPFP PQQP QPFP PQQP 643
 314 O 1A 241 PQQP QPFP PQQP QSPF PQQP 644
 プール83
 315 O 1A 249 PQQP QSPF PQQP QPYP PQQP 645
 316 O 1A 257 PQQP QPYP PQQP PYGS SLTS 646

10

20

30

40

【表 3 5】

GI3A 17 ATAN MQVD PSGQ VPWP QQQP	317 O 1A 265 PQQQ PYGS SLTS IGGQ	647
GI3B 19 MN IQVD PSGQ VPWP QQQP FP	318 O 1B 1 ARQL NPSD QELQ SPQQ LYPQ	648
GI4 17 ATAN MQAD PSGQ VQWP QQQP	319 O 1B 9 QELQ SPQQ LYPQ QPYP QQPY	649
GI5A 17 TTAN IQVD PSGQ VQWP QQQQ	320 O 1C 1 SRLL SPRG KELH TPQE QFPQ	650
GI5C 17 ATAN MQVD PSGQ VQWP QQQP	321 O 1C 9 KELH TPQE QFPQ QQQF PQPQ	651
GI7 20 QIVF PSGQ VQWP QQQQ PFP	322 O 1C 17 QFPQ QQQF PQPQ QFPQ	652
ブール42		
GI1A 25 PSSQ VQWP QQQP VPQP HQPF	323	
GI2A 25 PSGQ VQWL QQQL VPQL QQPL	324	
GI3A 25 PSGQ VPWP QQQP FPQP HQPF	325	
GI4 25 PSGQ VQWP QQQP FLQP HQPF	326	
GI5A 25 PSGQ VQWP QQQQ PFPQ PQPF	327	
GI5C 25 PSGQ VQWP QQQP FRQP QQPF	328	
GI6A 25 PSGQ VQWP QQQP FPQP QQPF	329	
GI1A 33 QQQP VPQP HQPF SQQP QQTF	330	

* α -, γ 1-, γ 2-, γ 3-, 又は ω コンセンサス配列中のN末端残基の位置

【 0 2 6 7 】

【表 3 6】

表24. 652 合成ペプチド及び患者とグルテンチャレンジによる ELISpot 分析

セリアック病被験者	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28
HLA-DQ	22	22	22	22	22	22	22X	2X	2X	2X	28	28	2X	2X	2X
抗原チャレンジ	コムギ												ライ麦		
チャレンジ期間(日)	3	3	6	3	6	3	3	3	3	0.5	3	1	3	3	3
優勢なペプチドの ELISPOT SFC	203	46	96	195	114	136	29	57	129	259	50	18	163	52	229
ブランクの ELISPOT SFC	1	2	4	0.5	3	1	1	4	3	2	1	2	1	2	6

ペプチド	配列														
1	AVRFPVPLQLQPNFSQQLPQ														
2	MVRVPVPLQLQPNFSQQQPQ														
3	MVRVPVPLQLQPNFSQQHPQ														
4	MVRVPVPLQLQPDPSQQQPQ														
5	MVRVTVPQLQPNFSQQQPQ														
6	AVRVSVPLQLQPNFSQQQPQ														
7	AVRVVPVPLQLQPNFSQQQPQ														
8	AVRWVPVPLQLQPNFSQQQPQ														
9	AVRVVPVPLQLQNPFSQQQPQ														
10	MVRVPVPLQLQNPFSQQQPQ														
11	AVRVVPVPLQPNFSQFPQPQ														
12	AVRVVPVPLQPNFSQQQPQ														
13	LQPNFSQQLPQEQVPLVQQ														
14	LQPNFSQQPQEQVPLVQQ														
15	LQPNFSQQHPQEQVPLVQQ														
16	LQPDPSQQPQEQVPLVQQ														
17	LQPNFSQQPQKQVPLVQQ														
18	LQLQNPFSQQPQEQVPLVQE														
19	LQLQNPFSQQPQEQVPLVQE														
20	PQPNFSQFPQEQVPLVQQ														
21	PQPNFSQFPQEQVPLVQQ														
22	LQPNFSQQPQEQVPLVQQ														
23	LQPNFSQQPQEQVPLMQQ														
24	QLPQEQVPLVQQQFLGQQQ														
25	QHPQEQVPLVQQQFLGQQQ														
26	QQPQEQVPLVQQQFLGQQQ														
27	QQPQEQVPLVQQQFLGQQQ														
28	QQPQEQVPLVQQQFFPGQQQ														
29	QQPQEQVPLVQQQFFPGQQQ														
30	QQPQEQVPLVQEQQFFPGQQQ														
31	PQPQEQVPLVQQQFFPGQQQ														
32	PQPQEQVPLVQQQFFPGQQQ														
33	QQPQEQVPLMQQQFFPGQQQ														
34	LVQQQQLGQQQFFPQQPY														
35	LVQQQQLGQQQSFPQQPY														
36	LVQQQQLGQQQFFPQQPY														
37	LVQQQQLGQQQFFPQQPY														
38	LVQEQQLGQQQFFPQQPY														
39	LVQQQQLGQQQFFPQQPY														
40	LMQQQQLGQQQFFPQQPY														
41	LMQQQQLGQQQFFPQQPY														
42	GQQQFFPQQPYFPQPFPS														
43	GQQQFFPQQPYFPQPFPS														

【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

10

20

30

40

【 0 2 7 0 】

10

20

30

40

【 0 2 7 1 】

[illegible]

【 0 2 7 2 】

10

20

30

40

【 0 2 7 3 】

10

20

30

40

【 0 2 7 4 】

[illegible]

【 0 2 7 5 】

10

20

30

40

【 0 2 7 6 】

10

20

30

40

【 0 2 7 7 】

10

20

30

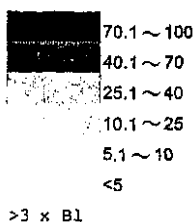
40

10

20

30

40

[illegible]

10

【 0 2 8 0 】

【図1a】図1は、最初のうちはグルテンフリーダイエットのあとに緩解して、次に1日目から3日間200gのパン(bread)で毎日チャレンジされた、セリアック病被験者1における、A-グリアジン51-85にわたる5つのオーバーラップする15マーを含むトランスグルタミナーゼ(tTG)-処理されたものと処理されないペプチドプール3(各ペプチド10μg/ml)(表1参照)及びキモトリプシン-消化されたグリアジン(40μg/ml)に対する、新たに単離されたPBMC(末梢血単核細胞)IFNγ ELISPOT応答(垂直軸は10⁶ PBMCあたりのスポット形成細胞を示す)を示す(a)。10日間の間のパンチャレンジの間の全A-グリアジン蛋白質にわたるtTG-処理されたA-グリアジンペプチドプール1-10に対する被験者2によるPBMC IFNγ ELISPOT応答(b)。水平軸はパン開始後の日にちを示す。

20

【図1b】図1は、最初のうちはグルテンフリーダイエットのあとに緩解して、次に1日目から3日間200gのパン(bread)で毎日チャレンジされた、セリアック病被験者1における、A-グリアジン51-85にわたる5つのオーバーラップする15マーを含むトランスグルタミナーゼ(tTG)-処理されたものと処理されないペプチドプール3(各ペプチド10μg/ml)(表1参照)及びキモトリプシン-消化されたグリアジン(40μg/ml)に対する、新たに単離されたPBMC(末梢血単核細胞)IFNγ ELISPOT応答(垂直軸は10⁶ PBMCあたりのスポット形成細胞を示す)を示す(a)。10日間の間のパンチャレンジの間の全A-グリアジン蛋白質にわたるtTG-処理されたA-グリアジンペプチドプール1-10に対する被験者2によるPBMC IFNγ ELISPOT応答(b)。水平軸はパン開始後の日にちを示す。

30

【図2】図2は、最初のうちはグルテンフリーダイエットのあとに緩解して、次に3日間パンでチャレンジされた、セリアック病の7人の被験者における、tTG-処理されたペプチドプール3（A-グリアジン51-85にわたる）に対する、PBMC-IFN γ -ELISPOT応答（垂直軸は10⁶ PBMCあたりのスポット形成細胞を示す）を示す（1から3日）。垂直軸はパンを初めた後の日にちを示す。（a）。プール3中に含まれるtTG処理のオーバーラップ15マーに対する応答；バーは6日目又は7日目の6人のセリアック病の被験者の個々のペプチド（10 μ g/ml）に対する、平均（ $\pm$ SEM）の応答を表す（b）。（個々の被験者において、ペプチドに対するELISPOT応答はペプチド12により導かれた応答の%として計算された—水平軸により示されるとおり。）

40

【図 3】図 3 は、A-グリアジン 56-75 の tTG-処理された末端削除体 (0.1 μ M) に対する PBM C I F N γ E L I S P O T 応答を示す。バーは 5 人のセリアック病被験者の平均 ($\pm$ S E M) を表す。)(個々の被験者において、応答は試験されたペプチドにより導かれた最大応答の % として計算された一水平軸により示されるとおり。)

【図 4】図 4 は、優勢な A-グリアジンエピトープの最小構造が如何にして t T G-処理された 7-17 マーの A-グリアジンペプチド (0.1 μ M) を用いてマップされたかを示し、配列 P Q P Q L P Y (配列番号: 4) (A-グリアジン 62-68) (a)、及び t T G 処理しなかったが Q $\rightarrow$ E 65 の置換を伴う同じペプチドを含む (b)。各線はパン

50

を1-3日目に摂取してから6又は7日目の3人のセリアック病被験者におけるPBMCIγELISPOT応答を表す。)。 (個々の被験者において、ELISPOT応答は17マー、A-グリアジン57-73により導かれた応答の%として計算された。)

【図5】図5はtTGにより脱アミド化されたアミノ酸を示す。A-グリアジン56-75LQLQPFPPQLPYPPQPSFP (配列番号: 5) (0.1 μM)をtTG (50 μg/ml)と共に37℃において2時間インキュベートした。逆相HPLCにより単一の生成物が同定されて精製された。アミノ酸分析により、tTGに帰し得るA-グリアジン56-75内の各Gln残基の%脱アミド化(Q→E)の計算が可能になった(水平軸)。

【図6】図6は、パンを1-3日目に摂取してから6又は7日目の3人のセリアック病被験者における、17マー: QLQPFPPQPELPYPQPES (配列番号: 6) (E57, 65), QLQPFPPQPELPYPQPES (配列番号: 7) (E65, 72), ELQPFPPQPELPYPQPES (配列番号: 8) (E57, 65, 72), 及びQLQPFPPQPELPYPQPQS (配列番号: 9) (E65)を用いた、A-グリアジン57-73中のQ65に加えた他の位置においてQ→Eを置換した効果を示す。水平軸はE65応答の%を示す。

【図7】図7は、tTG処理されたA-グリアジン56-75 (0.1 μM)が(a)CD4及びCD8の磁気ビーズ除去した(depleted)PBMCにおいてIFN-γELISPOT応答を導いたことを示す。(バーはCD4除去PBMC応答をCD8除去PBMC応答の%として表す; 百万のCD8除去PBMCあたりのスポット形成細胞は: 被験者4: 29、及び被験者6: 535であった。)(b)HLA-DQaI*0501, bI*0201に関して同型接合体の2人のセリアック病被験者における、tTG-処理56-75 (0.1 μM)の1時間前の、HLA-DR(L243), -DQ(L2)及び-DP(B7.21) (10 μg/ml)に対するモノクローナル抗体とのインキュベーション後のPBMC IFNγELISPOT応答(スポット形成細胞/百万PBMC)。

【図8】図8は、免疫上優勢なエピトープ内の65位における他のアミノ酸のGluによる置換の効果を示す。水平軸は免疫上優勢なエピトープに関しての3人の被験者における%応答を示す。

【図9】図9は、トランスグルタミナーゼ処理を伴う場合(影)及び伴わない場合(透明)の配列PQLPY (配列番号: 12)を含む、天然に存在するグリアジンペプチドの免疫反応性を示す(3人の被験者の応答を測定)。

【図10】図10は、グルテンチャレンジを開始して、次にインターフェロンガンマELISPOTを行ってから6日後の2人のセリアック病被験者からの末梢血単核細胞のCD8, CD4, β₇, 及びα^E-特異的免疫磁気ビーズ除去を示す。A-グリアジン57-73 QE65 (25 mcg/ml), tTG-処理されたキモトリプシン-消化グリアジン (100 mcg/ml)又はPPD (10 mcg/ml)を抗原として用いた。

【図11】図11は、最適なT細胞エピトープの長さを示す。

【図12a】図12は、A-グリアジン57-73 QE65と他のペプチドとの用量応答研究における比較を示す。

【図12b】図12は、A-グリアジン57-73 QE65と他のペプチドとの用量応答研究における比較を示す。

【図12c】図12は、A-グリアジン57-73 QE65と他のペプチドとの用量応答研究における比較を示す。

【図12d】図12は、A-グリアジン57-73 QE65と他のペプチドとの用量応答研究における比較を示す。

【図12e】図12は、A-グリアジン57-73 QE65と他のペプチドとの用量応答研究における比較を示す。

【図12f】図12は、A-グリアジン57-73 QE65と他のペプチドとの用量応答研究における比較を示す。

10

20

30

40

50

【図 1 2 g】図 1 2 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 と他のペプチドとの用量応答研究における比較を示す。

【図 1 2 h】図 1 2 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 と他のペプチドとの用量応答研究における比較を示す。

【図 1 3 a】図 1 3 は、グリアジンと A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 特異的応答の比較を示す。

【図 1 3 a】図 1 3 は、グリアジンと A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 特異的応答の比較を示す。

【図 1 3 b】図 1 3 は、グリアジンと A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 特異的応答の比較を示す。

【図 1 3 c】図 1 3 は、グリアジンと A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 特異的応答の比較を示す。

【図 1 4 a】図 1 4 は、セリアック病被験者におけるグリアジンの多型の生物活性を示す。

【図 1 4 b】図 1 4 は、セリアック病被験者におけるグリアジンの多型の生物活性を示す。

【図 1 4 c】図 1 4 は、セリアック病被験者におけるグリアジンの多型の生物活性を示す。

【図 1 4 d】図 1 4 は、セリアック病被験者におけるグリアジンの多型の生物活性を示す。

【図 1 4 e】図 1 4 は、セリアック病被験者におけるグリアジンの多型の生物活性を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、コアエピトープ配列の定義を示す。

【図 1 6】図 1 6 は、コアエピトープ配列の定義を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 1 8】図 1 8 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 1 9】図 1 9 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 0】図 2 0 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 1】図 2 1 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 3】図 2 3 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 5】図 2 5 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 6】図 2 6 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 7】図 2 7 は、A-グリアジン 5 7-7 3 Q E 6 5 バリエントのアゴニスト活性を示す。

【図 2 8 a】図 2 8 は、異なる患者群における応答を示す。

【図 2 8 b】図 2 8 は、異なる患者群における応答を示す。

【図 2 8 c】図 2 8 は、異なる患者群における応答を示す。

【図 2 8 d】図 2 8 は、異なる患者群における応答を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 8 e】図 2 8 は、異なる患者群における応答を示す。

【図 2 8 f】図 2 8 は、異なる患者群における応答を示す。

【図 2 8 g】図 2 8 は、異なる患者群における応答を示す。

【図 2 9】図 2 9 は、A-グリアジン 5 7-7 3 のプロラミン相同体の生物活性を示す。

【図 3 0】図 3 0 は、健康な H L A-D Q 2 被験者についての、t T G-脱アミド化されたグリアジンペプチドプールに対する E L I S p o t 応答の変化を示す。

【図 3 1】図 3 1 は、セリアック病の H L A-D Q 2 被験者についての、t T G-脱アミド化されたグリアジンペプチドプールに対する E L I S p o t 応答の変化を示す。

【図 3 2】図 3 2 は、「要約された」グリアジンペプチド応答に対する個々のペプチドの寄与を示す。

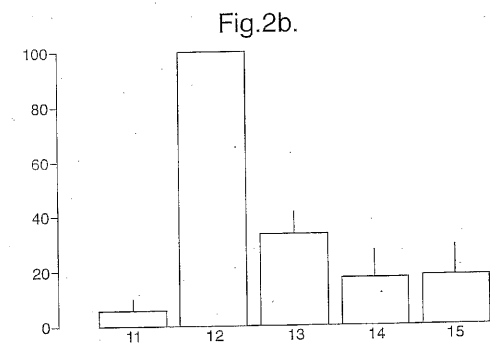
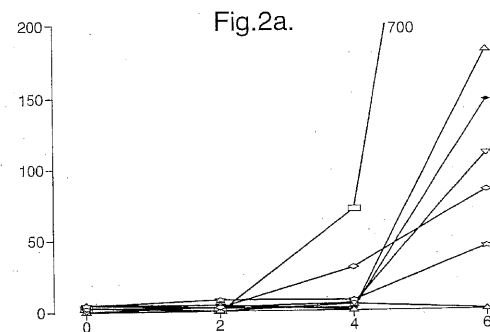
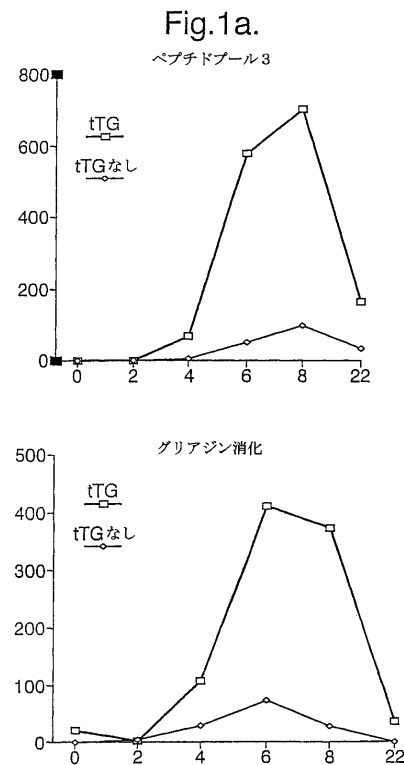
【図 3 3】図 3 3 は、セリアック病の H L A-D Q 2 / 8 被験者 C 0 8 に関しての、t T G-脱アミド化されたグリアジンペプチドプールに対する、グルテンチャレンジが導いた I F N γ E L I S p o t 応答を示す。

【図 3 4】図 3 4 は、セリアック病の H L A-D Q 2 / 8 被験者 C 0 7 に関しての、t T G-脱アミド化されたグリアジンペプチドプールに対する、グルテンチャレンジが導いた I F N γ E L I S p o t 応答を示す。

【図 3 5】図 3 5 は、セリアック病の H L A-D Q 8 / 7 被験者 C 1 2 に関しての、t T G-脱アミド化されたグリアジンペプチドプールに対する、グルテンチャレンジが導いた I F N γ E L I S p o t 応答を示す。

【図 3 6】図 3 6 は、セリアック病の H L A-D Q 6 / 8 被験者 C 1 1 に関しての、t T G-脱アミド化されたグリアジンペプチドプールに対する、グルテンチャレンジが導いた I F N γ E L I S p o t 応答を示す。

【図 1 a】



【図 3】

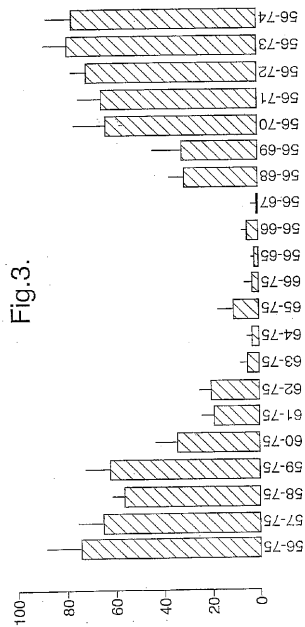


Fig.4a.

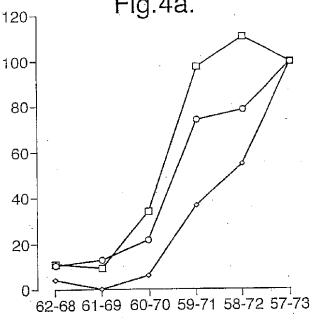
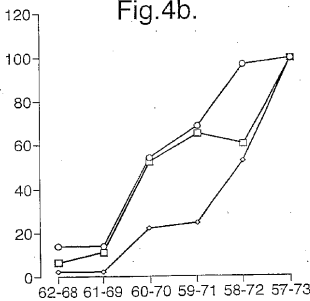
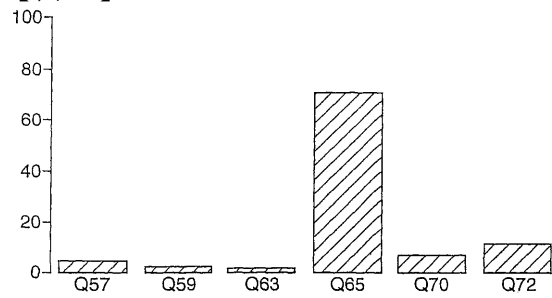


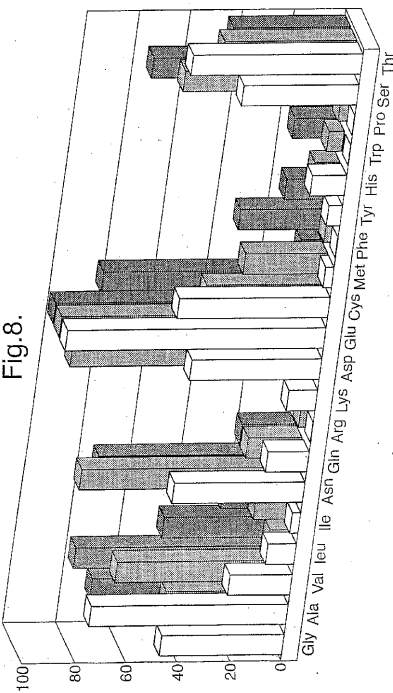
Fig.4b.



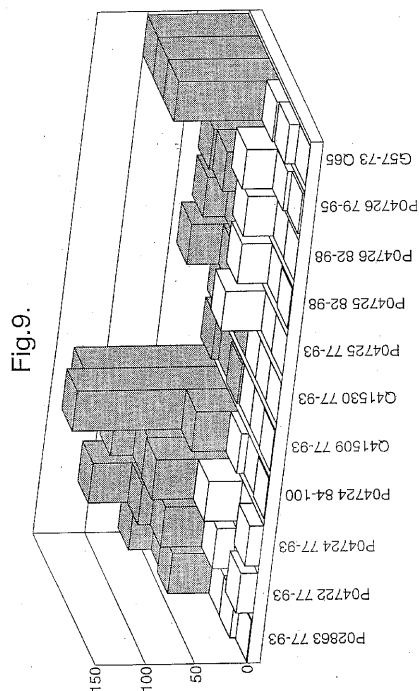
【図 5】



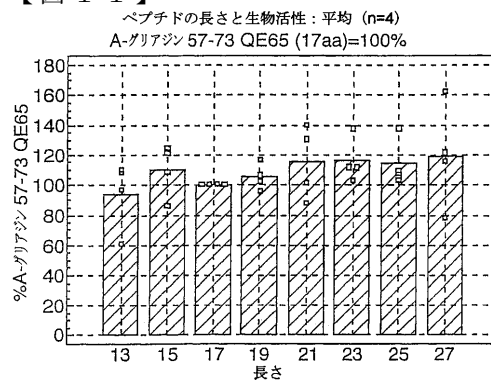
【図 8】



【図 9】



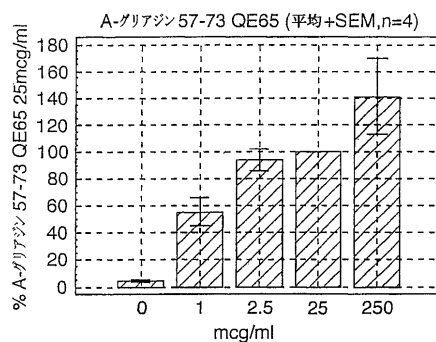
【図 11】



【図 12 a】

Fig.12a.

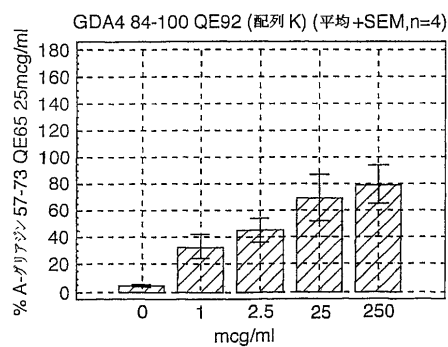
A-グリアジン 57-73 QE65: QLQPFPPQPELPYPQPQS
に対する用量応答性



【図 12 b】

Fig.12b.

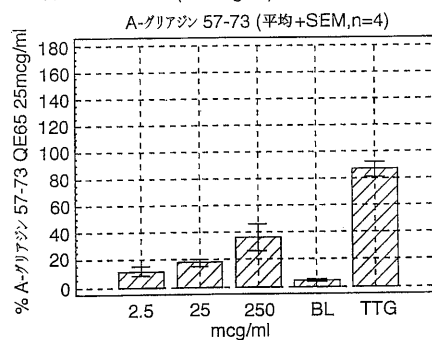
GDA4_WHEAT P04724 84-100 QE92: PQLPYPQPPELPYPQPQP
に対する用量応答性



【図 12 c】

Fig.12c.

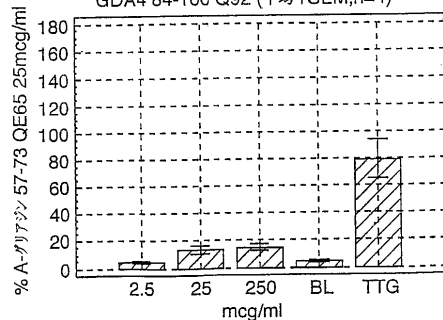
A-グリアジン 57-73: QLQPFPPQQLPYPQPQS (2.5, 25 & 250 mcg/ml),
及び A-グリアジン 57-73 (25 mcg/ml) + tTG 処理に対する用量応答性



【図 1 2 d】

Fig.12d.

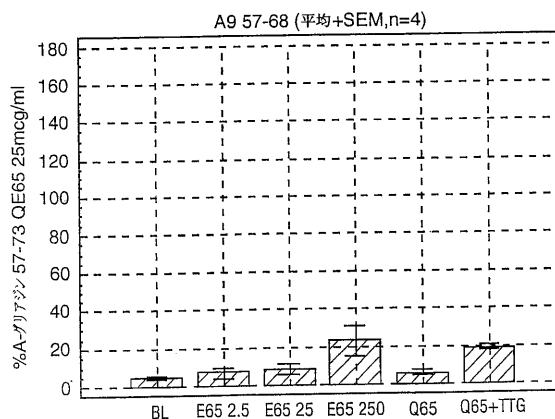
GDA4 WHEAT P04724 84-100:
PQLPYPQQLPYPQPQP (2.5, 25 & 250 mcg/ml),
及び P04724 84-100 (25 mcg/ml) + tTG 処理に対する用量応答性
GDA4 84-100 Q92 (平均+SEM,n=4)



【図 1 2 e】

Fig.12e.

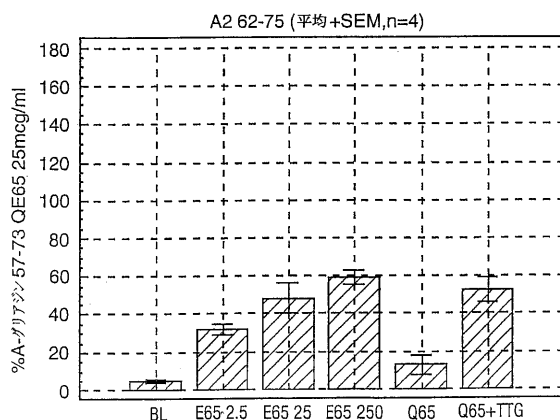
DQ2-制限された α グリアジン T
細胞エпитープ A-グリアジン57-68 QE65:
QLQPFPPQPELPY (E65) (2.5, 25 & 250 mcg/ml),
及び A-グリアジン57-68: QLQPFPPQQLPY (Q65)
(25 mcg/ml) +/- tTG 処理に対する用量応答性



【図 1 2 f】

Fig.12f.

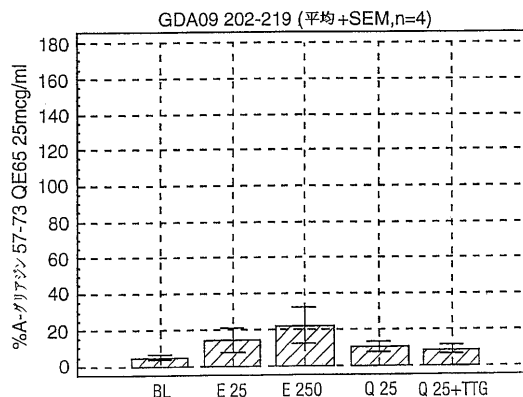
DQ2-制限された α グリアジン T
細胞エпитープ α -2 62-75 QE65 & QE72:
PQPQLPYPQPELPY (E65) (2.5, 25 & 250
mcg/ml), 及び α -2 62-75: PQPQLPYPQQLPY
(Q65) (25 mcg/ml) +/- tTG 処理に対する用量応答性



【図 1 2 g】

Fig.12g.

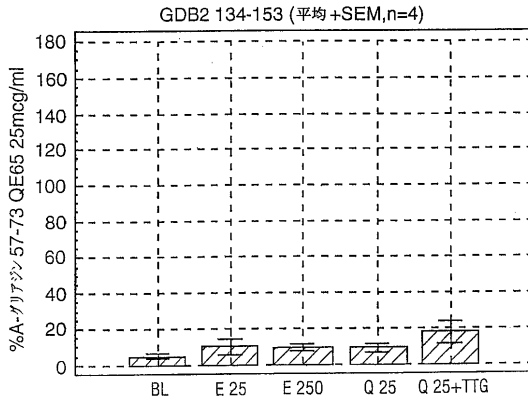
DQ8-制限された α グリアジン T
細胞エпитープ GDA9 202-219: QE208 & 216:
QQYPSGEGSFQPSQENPQ (E) (25 & 250
mcg/ml), 及び GDA9 202-219
QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (Q) (25 mcg/ml) +/- tTG 処理
に対する用量応答性



【図 1 2 h】

Fig.12h.

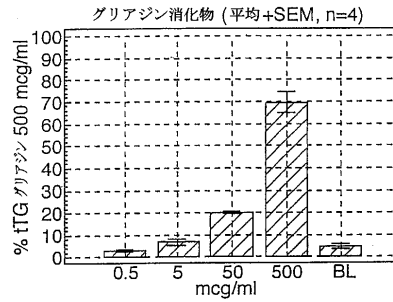
DQ2-制限された γ グリアジン T
細胞エピトープ GDB2 134-153 QE140, 148,150:
QQLPQPEQPQQSFPEQERPF (E) (25 & 250
mcg/ml), 及び GDB2 134-153:
QQLPQPQQPQQSFQQQRPF (Q) (25 mcg/ml) +/- tTG 処理
に対する用量応答性



【図 1 3 a】

Fig.13a.

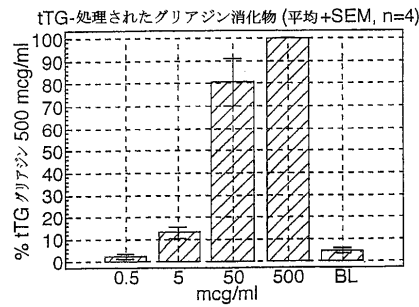
キモトリプシンによるグリアジン消化に
対する用量応答性



【図 1 3 b】

Fig.13b.

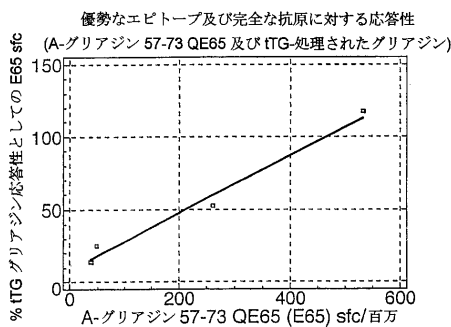
キモトリプシンにより消化され、次にtTGにより
処理されたグリアジンに対する用量応答性



【図 1 3 c】

Fig.13c.

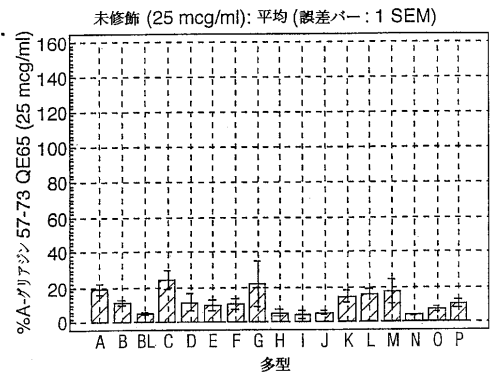
A-グリアジン 57-73 QE65 (25 mcg/ml) に対する
全 ELIS pot 応答 対 tTG グリアジン (500 mcg/ml) 応答の
パーセントとしての A-グリアジン 57-73 QE65 応答



【図 1 4 a】

グルテンチャレンジの 6/7 日後のセリアック病被験者における
A-グリアジン 57-73 (A) のグリアジン多型の生物活性
(ガンマーインターフェロンElispot) (n=4).

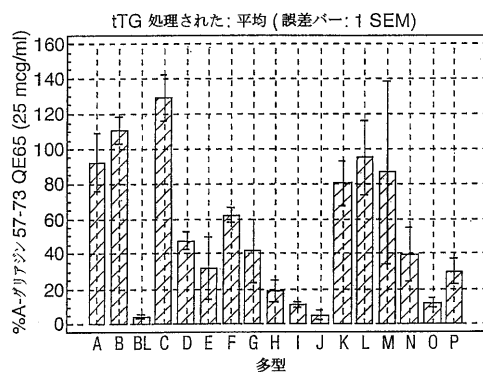
Fig.14a.



A	QLQPFPPQQLPYQPQPS	I	QLQPFPPQQLSYSQPQP
B	QLQPFPPQQLPYQPQP	J	QEQPFPPQQLPYPQIQP
C	QLQPFPPQQLPYQPQL	K	PQLPYPQPQLPYQPQP
D	QLQPFPPQQLPYLQPQS	L	PQLPYPQPQLPYQPQL
E	QLQPFPPQQLPYQPQP	M	PQPQFPLPQLPYQPQP
F	QLQPFPPQQLPYSQPQP	N	PQPQFPPQQLPYQPQS
G	QLQPFPPQQLPYQPQP	O	PQPQFPPQQLPYPQIQP
H	QLQPFPPQQLPYQPQP	P	PQPQFPPQQLPYQPQP

【図 1 4 b】

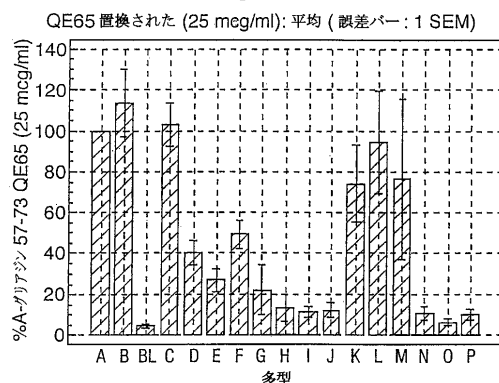
Fig.14b.



A	QLQPFPPQQLPYQPQS	I	QLQPFPPQQLSYSQPQP
B	QLQPFPPQQLPYQPQP	J	QEQQFFPPQLPYPQTQP
C	QLQPFPPQQLPYQPQL	K	PQLPYQPQLPYQPQP
D	QLQPFPPQQLPYLQPQS	L	PQLPYQPQLPYQPQL
E	QLQPFPPBQLPYQPQP	M	PQPQFFLPQLPYQPQS
F	QLQPFPPQQLPYQPQP	N	PQPQFFPPQLPYQPQS
G	QLQFFLQQLPYQPQP	O	PQPQFFPPQLPYPQTQP
H	QLQPFSSQQLPYQPQP	P	PQPQFFPPQLPYQPQP

【図 1 4 c】

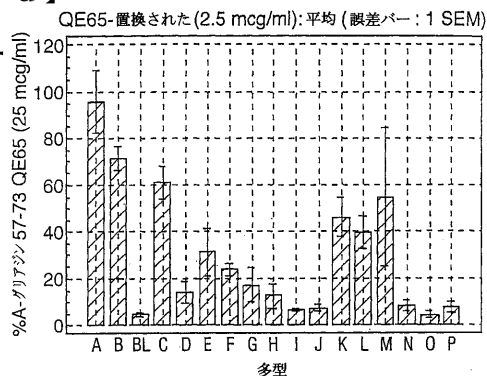
Fig.14c.



A	QLQPFPPQQLPYQPQS	I	QLQPFPPQQLSYSQPQP
B	QLQPFPPQQLPYQPQP	J	QEQQFFPPQLPYPQTQP
C	QLQPFPPQQLPYQPQL	K	PQLPYQPQLPYQPQP
D	QLQPFPPQQLPYLQPQS	L	PQLPYQPQLPYQPQL
E	QLQPFPPBQLPYQPQP	M	PQPQFFLPQLPYQPQS
F	QLQPFPPQQLPYQPQP	N	PQPQFFPPQLPYQPQS
G	QLQPFLLQQLPYQPQP	O	PQPQFFPPQLPYPQTQP
H	QLQPFSSQQLPYQPQP	P	PQPQFFPPQLPYQPQP

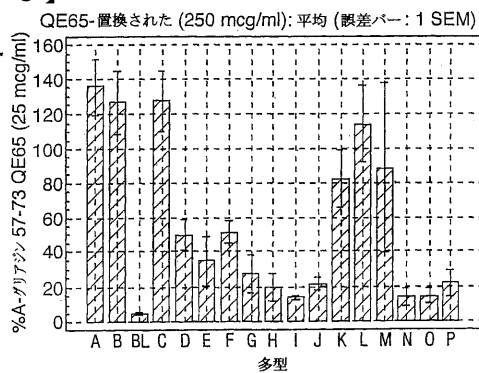
【図 1 4 d】

Fig.14d.



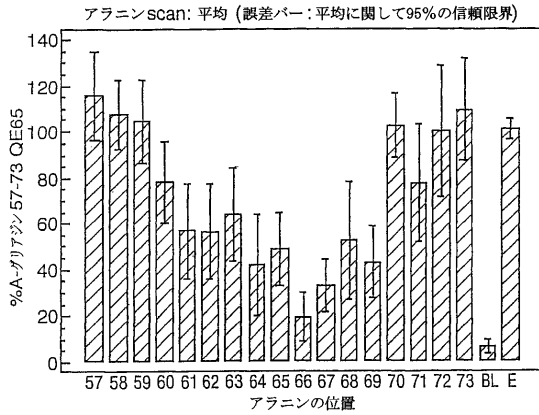
【図 1 4 e】

Fig.14e.

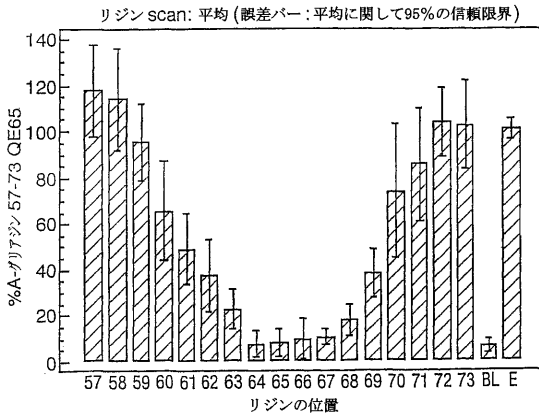


A	QLQPFPPQQLPYQPQS	I	QLQPFPPQQLSYSQPQP
B	QLQPFPPQQLPYQPQP	J	QEQQFFPPQLPYPQTQP
C	QLQPFPPQQLPYQPQL	K	PQLPYQPQLPYQPQP
D	QLQPFPPQQLPYLQPQS	L	PQLPYQPQLPYQPQL
E	QLQPFPPBQLPYQPQP	M	PQPQFFLPQLPYQPQS
F	QLQPFPPQQLPYQPQP	N	PQPQFFPPQLPYQPQS
G	QLQPFLLQQLPYQPQP	O	PQPQFFPPQLPYPQTQP
H	QLQPFSSQQLPYQPQP	P	PQPQFFPPQLPYQPQP

【図 15】



【図 16】

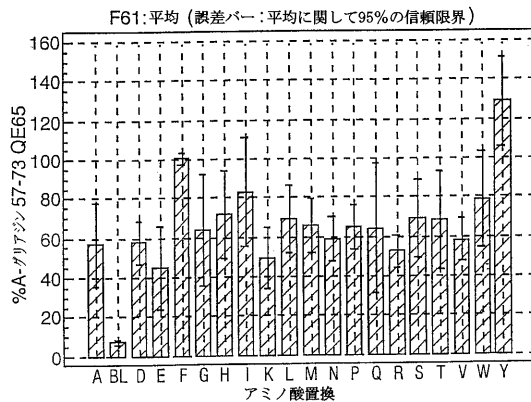


【図 18】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエーションのアゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT における 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)

QLQPFPPQPELPYPQPQS

60.....70

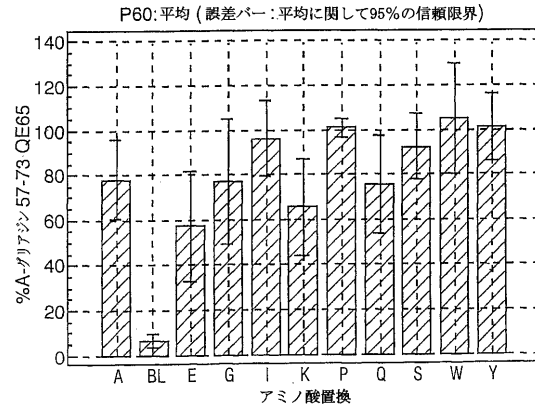


【図 17】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエーションのアゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT における 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)

QLQPFPPQPELPYPQPQS

60.....70

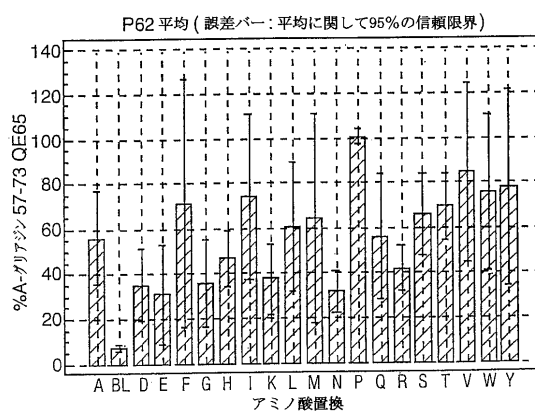


【図 19】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエーションのアゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT における 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)

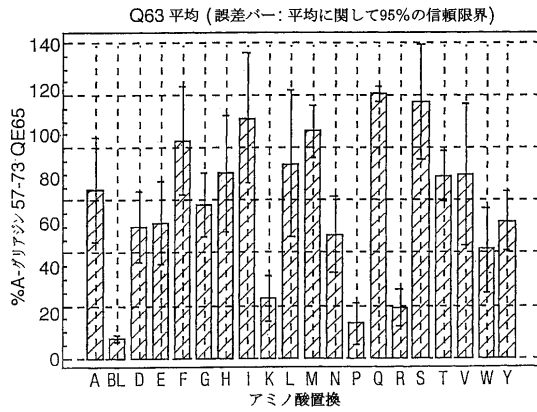
QLQPFPPQPELPYPQPQS

60.....70



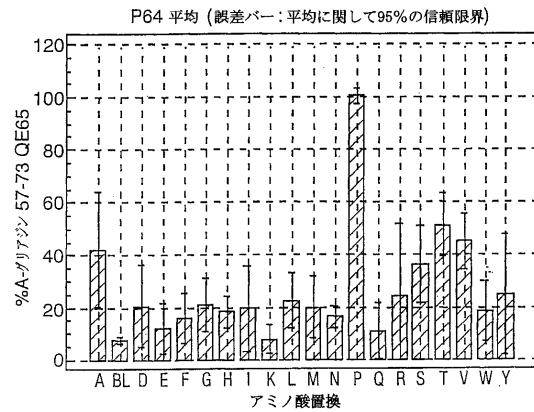
【図 20】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエントの
アゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT に
おける 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)
QLQPFPPQPELPYPQPQS
60.....70



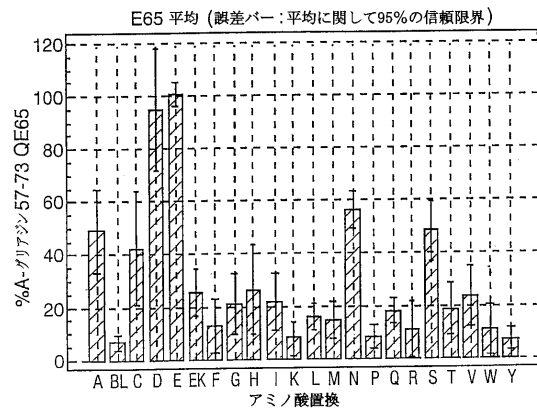
【図 21】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエントの
アゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT に
おける 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)
QLQPFPPQPELPYPQPQS
60.....70



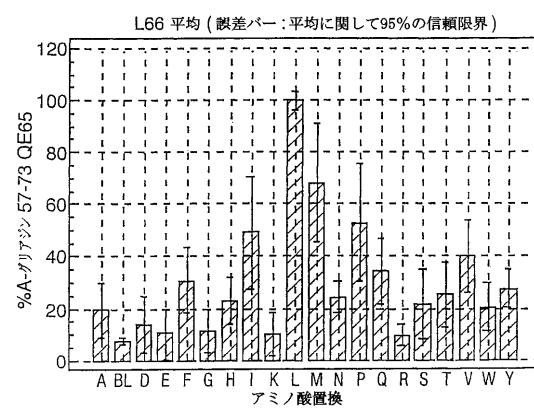
【図 22】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエントの
アゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT に
おける 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)
QLQPFPPQPELPYPQPQS
60.....70



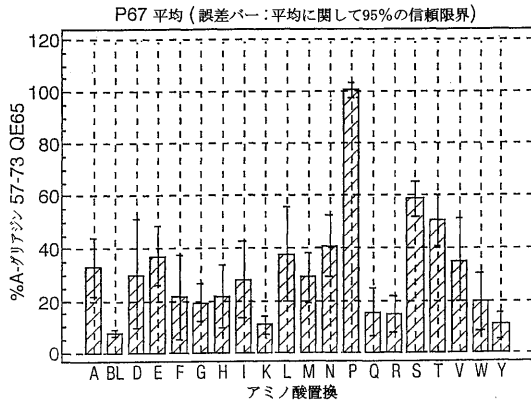
【図 23】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエントの
アゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT に
おける 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)
QLQPFPPQPELPYPQPQS
60.....70



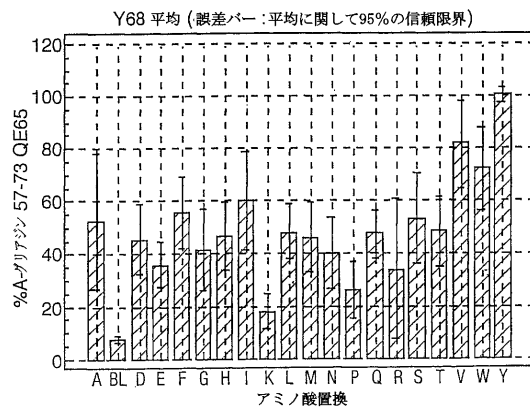
【図 2 4】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエントの
アゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT に
おける 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)
QLQPFPPQPELPYPQPQS
60.....70



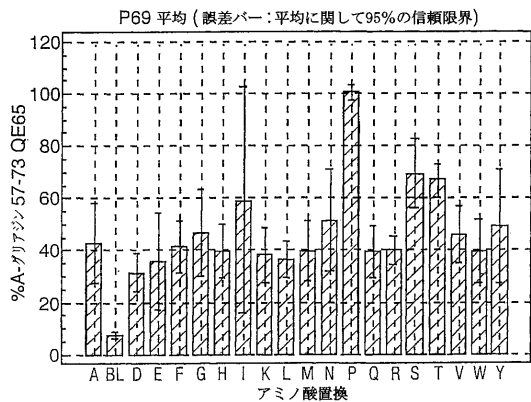
【図 2 5】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエントの
アゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT に
おける 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)
QLQPFPPQPELPYPQPQS
60.....70



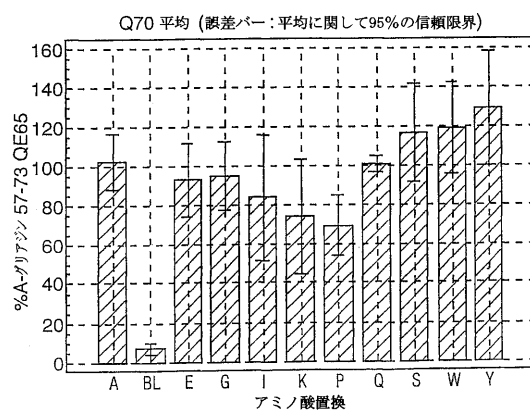
【図 2 6】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエントの
アゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT に
おける 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)
QLQPFPPQPELPYPQPQS
60.....70



【図 2 7】

位置を置換したことによる A-グリアジン 57-73 QE65 バリエントの
アゴニスト活性 (グルテンチャレンジ後のインターフェロンガンマ ELISPOT に
おける 8 人のセリアック病被験者の PBMC 応答性の平均)
QLQPFPPQPELPYPQPQS
60.....70

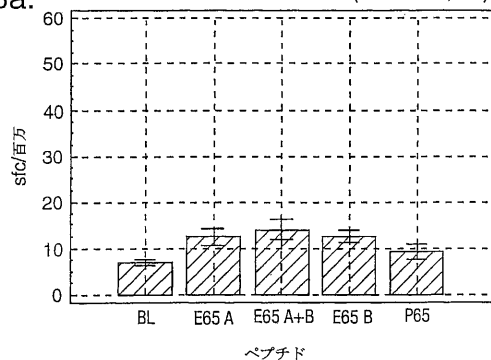


【図 28 a】

グルテンチャレンジ前と後の新たに診断されて処置された
セリアック病被験者におけるインターフェロンガンマ ELISpot 応答性

Fig.28a.

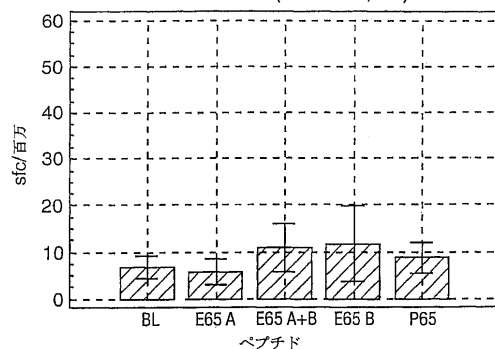
未処置の新たに診断されたセリアック病 (平均+SEM,n=9)



【図 28 b】

Fig.28b.

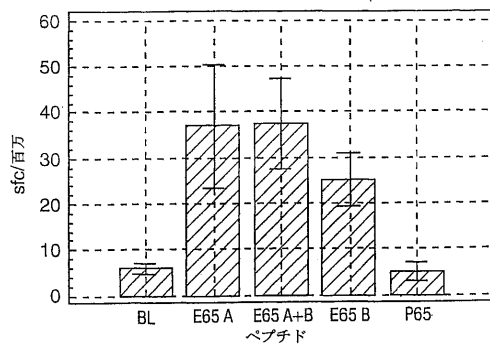
1 週間の GFD (平均+SEM,n=4)



【図 28 e】

Fig.28e.

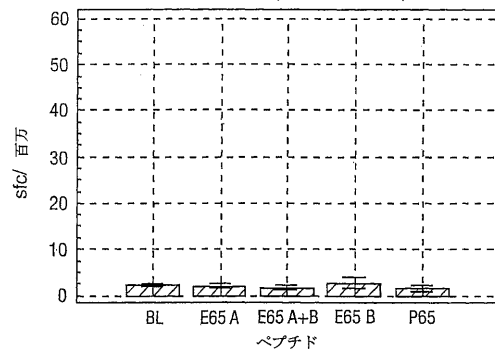
2 週間の GFD 後の 6 日グルテンチャレンジ (平均+SEM,n=3)



【図 28 f】

Fig.28f.

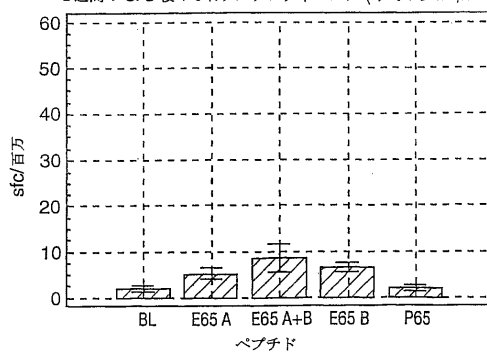
2 カ月 GFD (平均+SEM,n=3)



【図 28 c】

Fig.28c.

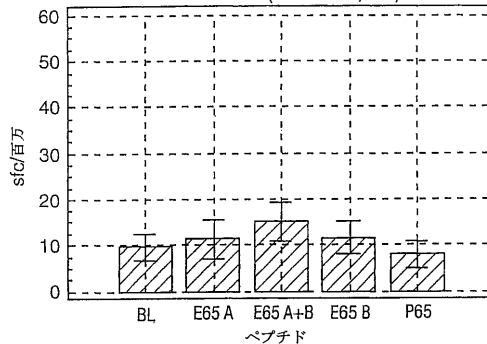
1 週間の GFD 後の 6 日グルテンチャレンジ (平均+SEM,n=4)



【図 28 d】

Fig.28d.

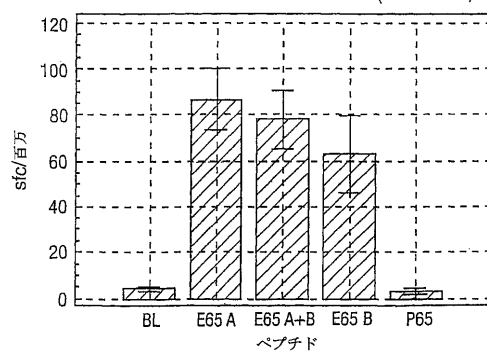
2 週間 GFD (平均+SEM,n=3)



【図 28 g】

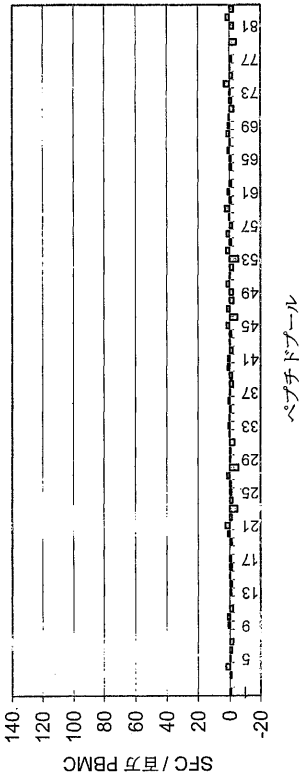
Fig.28g.

2 カ月の GFD 後の 6 日グルテンチャレンジ (平均+SEM,n=3)



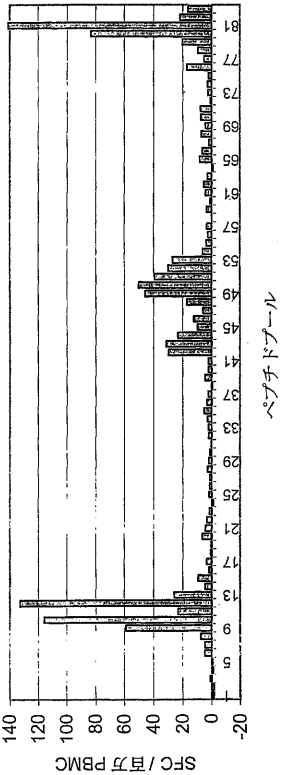
【図 30】

Figure 30. 健康な HLA-DQ2 被験者 : tTG-脱アミド化されたグリアジン
ペプチドプールに対する IFNガンマ ELISpot 応答の変化
(中央値変化 6 日 対 0 日, n=10)



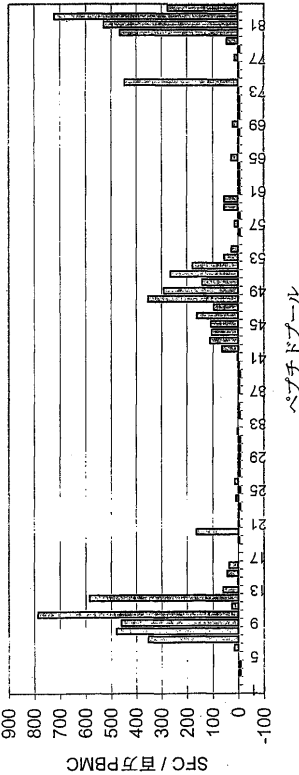
【図 31】

Figure 31. セリアック病 HLA-DQ2 被験者 : tTG-脱アミド化された
グリアジンペプチドプールに対する IFNガンマ ELISpot 応答の変化
(中央値変化 6 日 対 0 日, n=6)



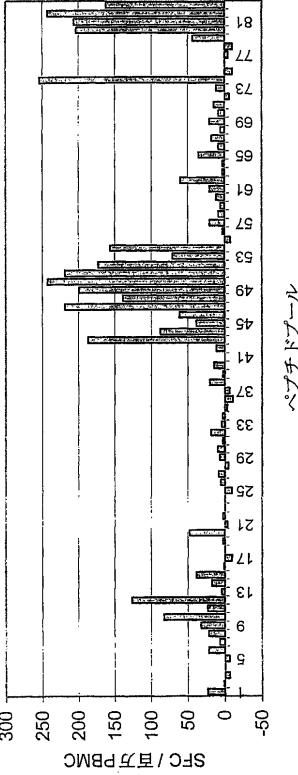
【図 33】

Figure 33. セリアック病 HLA-DQ2/8 被験者 : tTG-脱アミド化された
グリアジンペプチドプールに対する IFNガンマ ELISpot 応答の変化



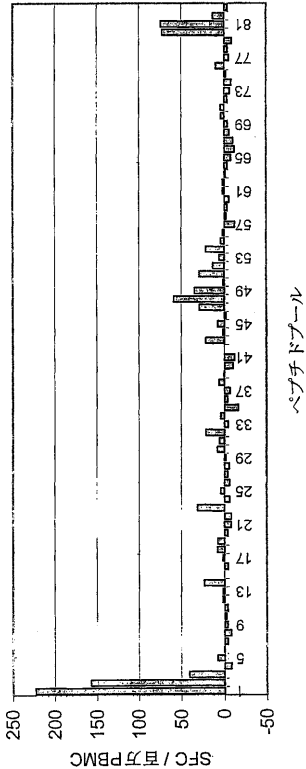
【図 34】

Figure 34. セリアック病 HLA-DQ2/8 被験者 C07 : tTG-脱アミド化された
グリアジンペプチドプールに対する IFNガンマ ELISpot 応答の変化



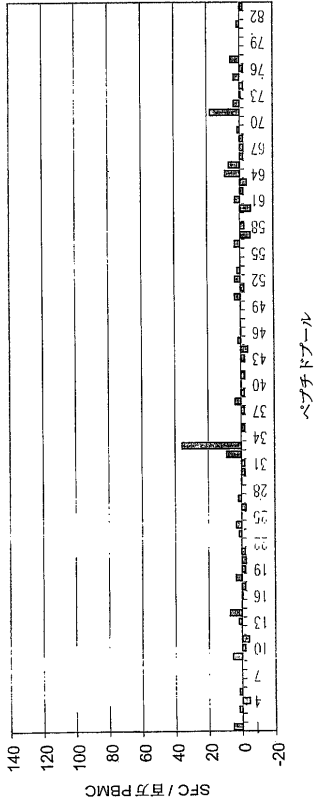
【図 3 5】

Figure 35. セリアック病 HLA-DQ2/8 被験者 C12 : tTG-脱アミド化された
グリアジンペプチドプールに対する IFNガンマ ELISpot 応答の変化

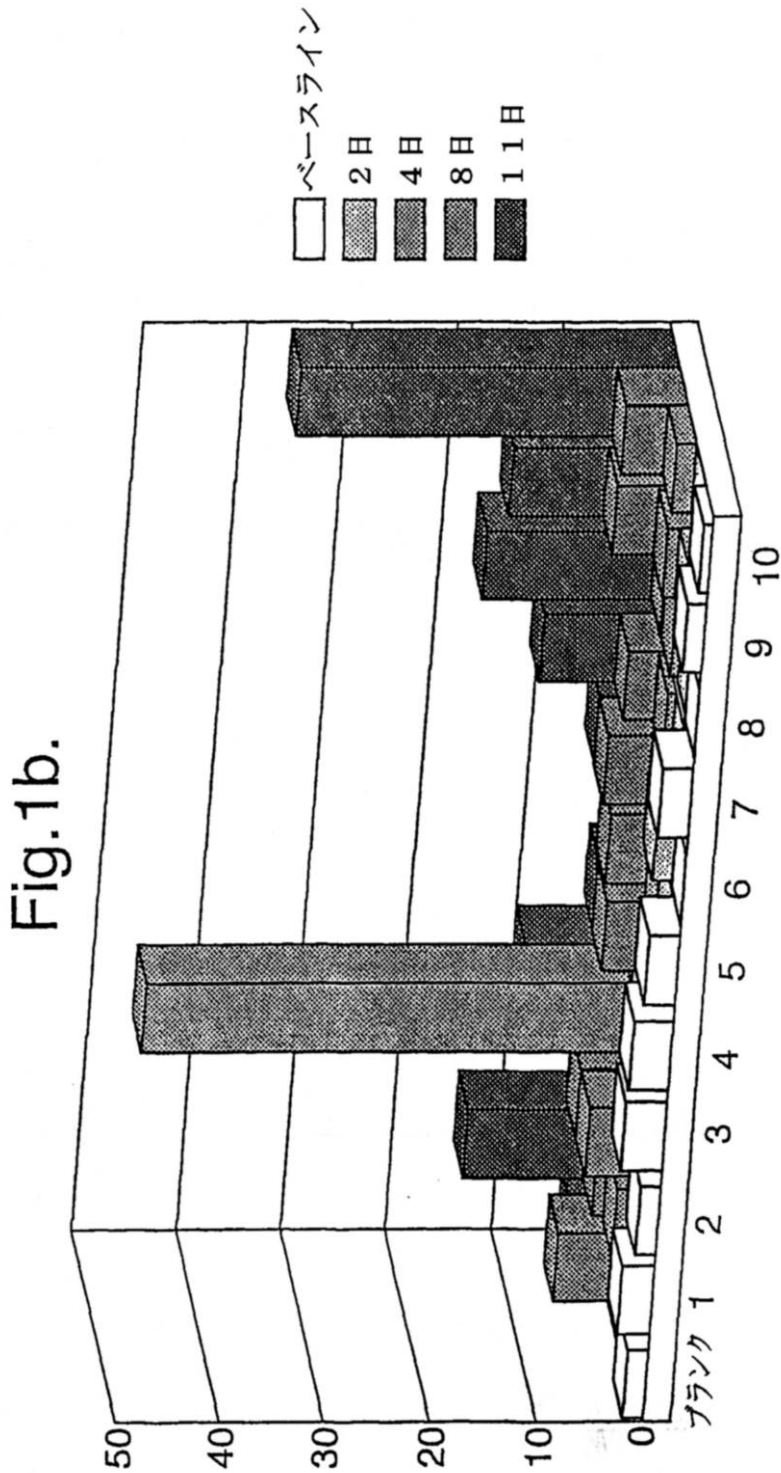


【図 3 6】

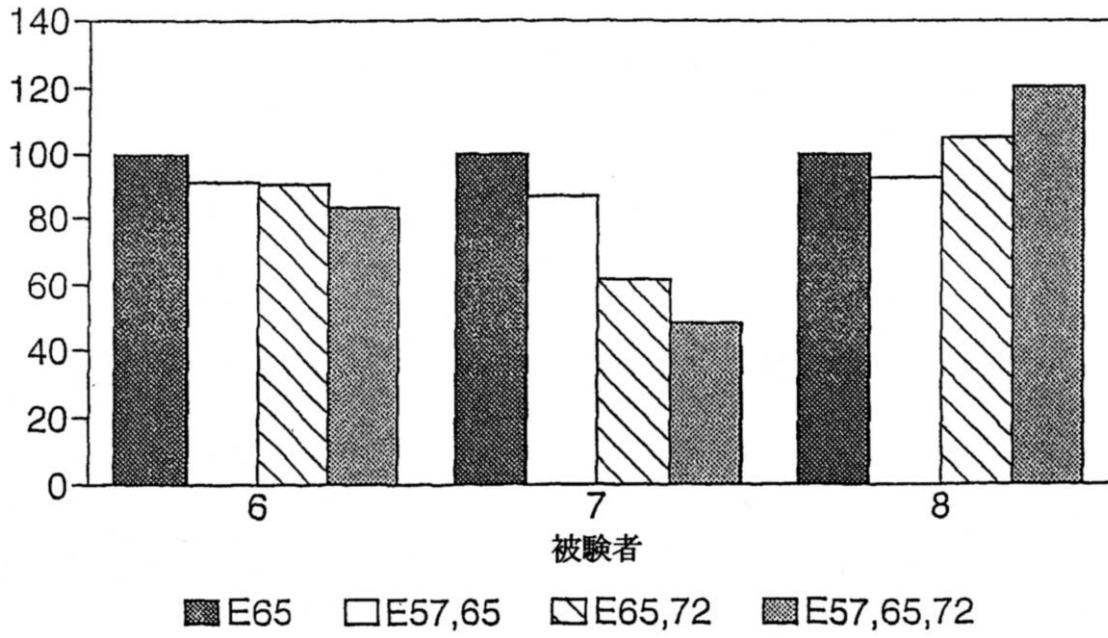
Figure 36. セリアック病 HLA-DQ2/8 被験者 C11 : tTG-脱アミド化された
グリアジンペプチドプールに対する IFNガンマ ELISpot 応答の変化



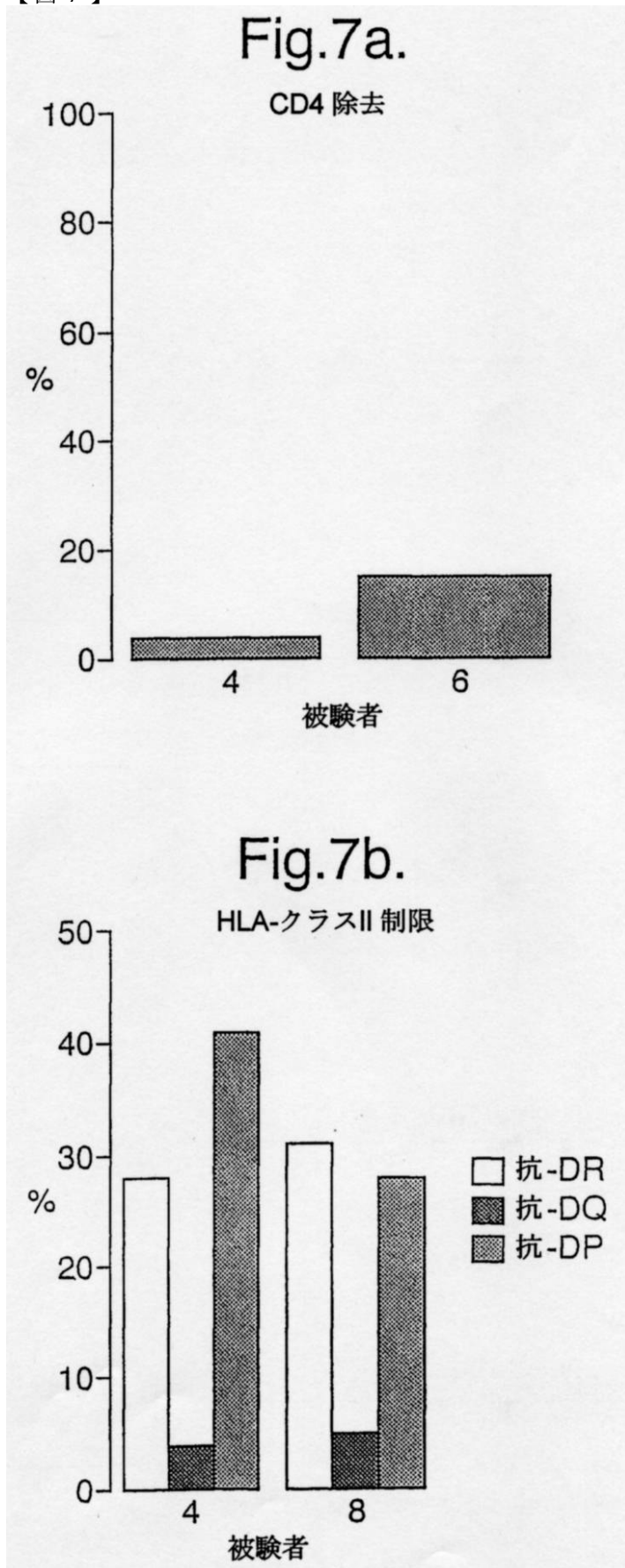
【図 1 b】



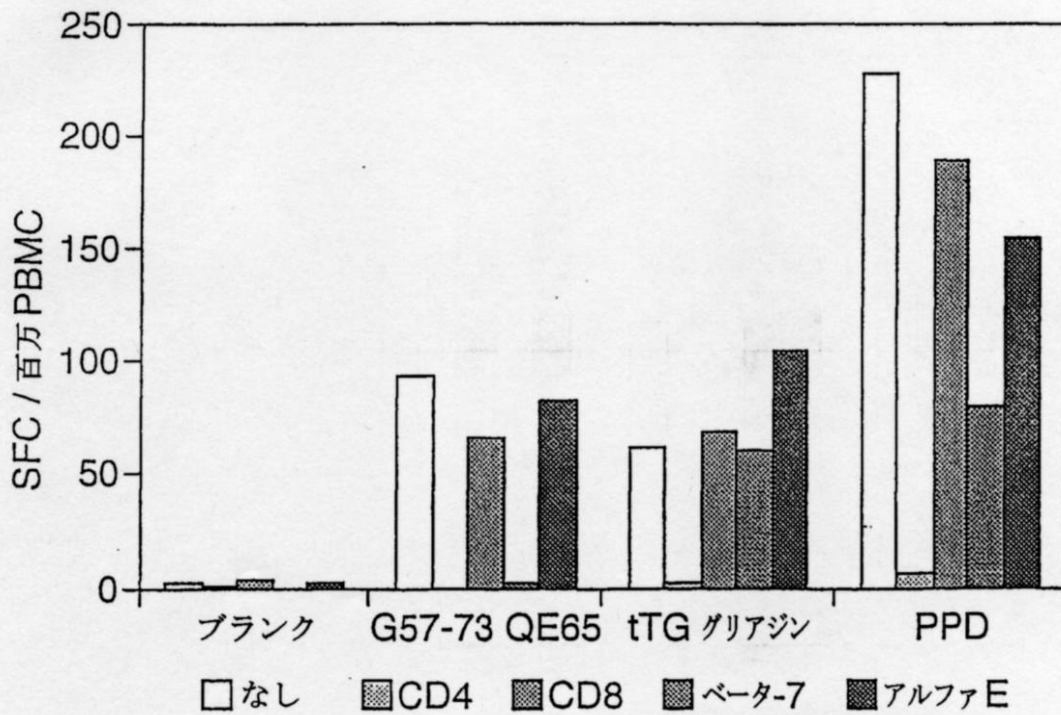
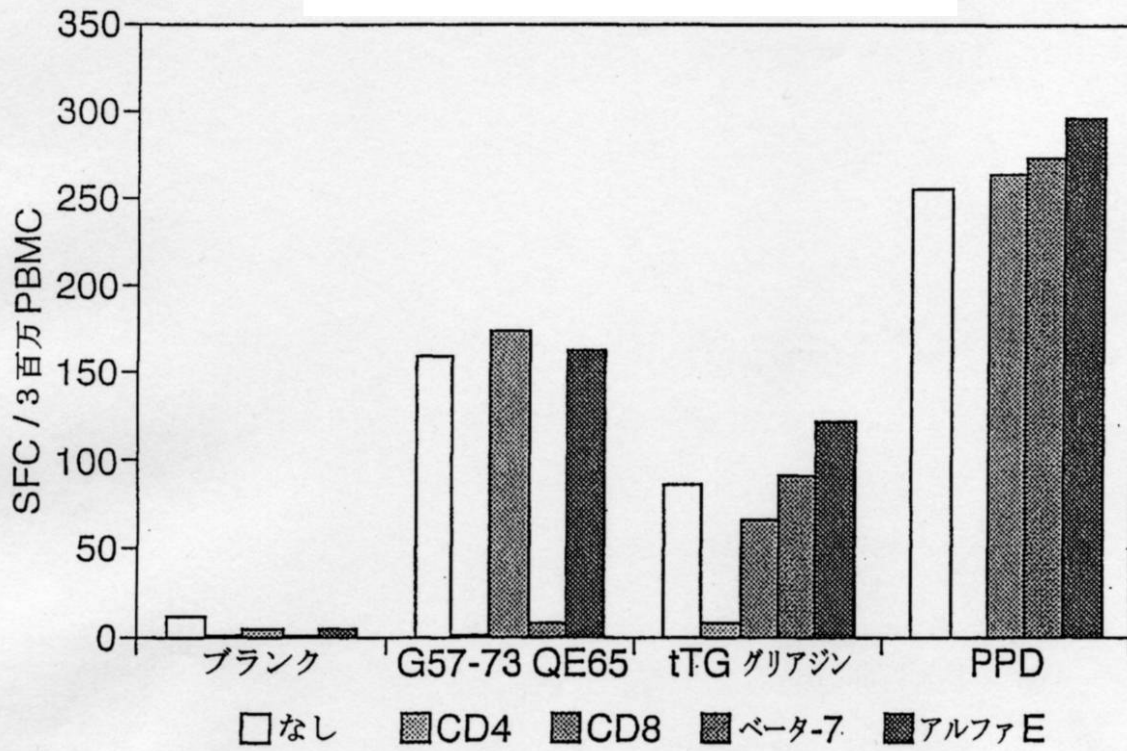
【図 6】



【図 7】

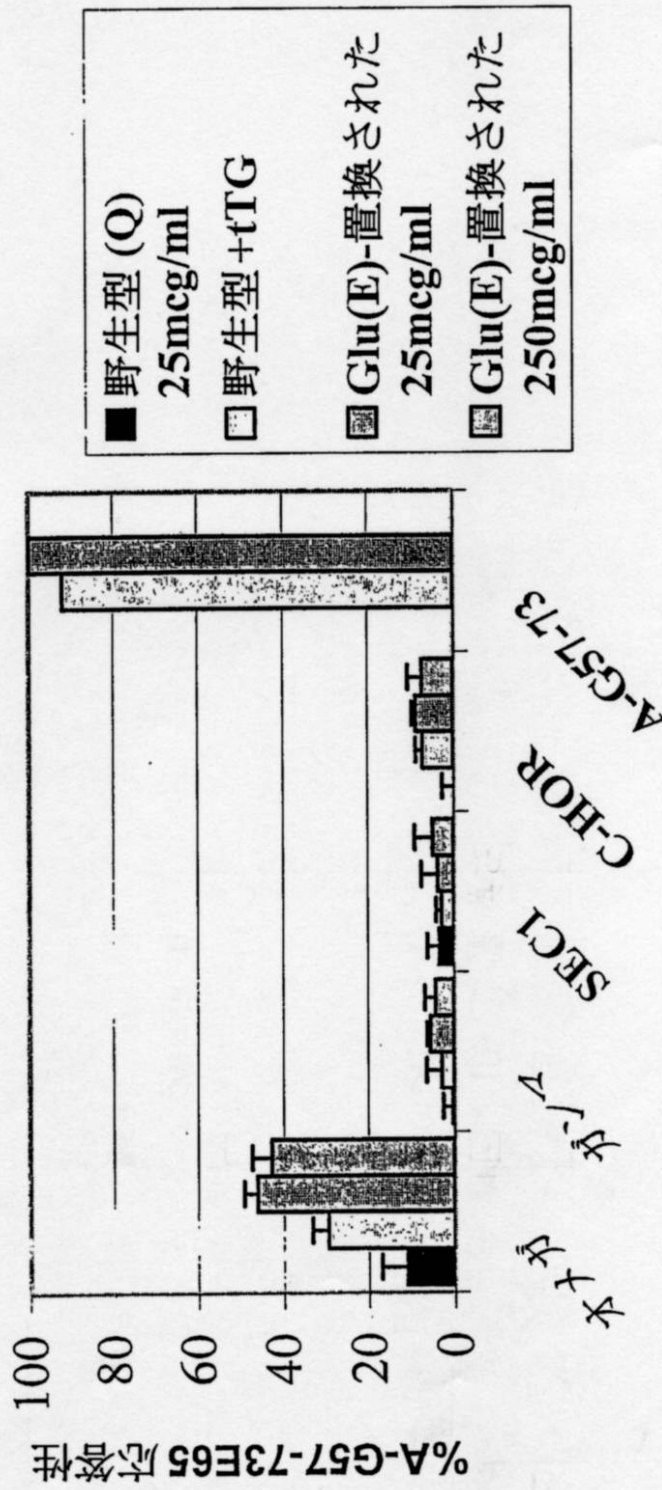


【図 10】



【図 29】

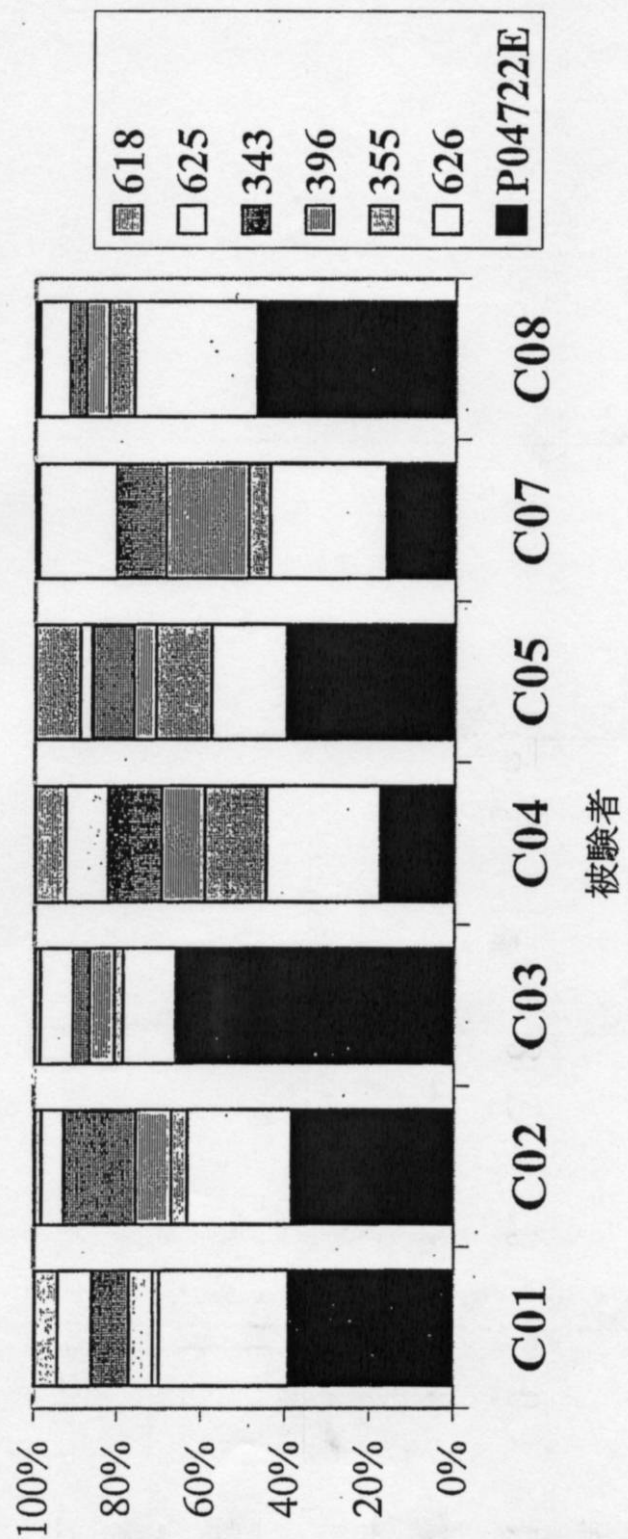
Figure 29. A-グリアジン 57-73 のプロラミン相同体の
生物活性 (IFNg-ELISpot, 平均+SEM, n=6)



オメガ: AAG17702 (141-157), ガンマ: P21292 (96-112), SEC1: Q43639 (335-351), C-HOR: Q40055 (166-182). E-置換されたペプチドは9位のQをEにして合成した。

【図 3 2】

Figure 32. 「合計の」グリアジンペプチド応答への個々のペプチドの貢献



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Application No PCT/GB 03/02450
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/415 A61K39/35 G01N33/68 C12N15/82 A01H5/10 A23L1/025		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/25793 A (HILL ADRIAN VIVIAN SINTON ; ISIS INNOVATION (GB); ANDERSON ROBERT P) 12 April 2001 (2001-04-12) cited in the application	1-5, 11, 13-19, 25-42, 44-64, 67-84
Y	page 1-20; claims 1-59; figures 126, 14-28; examples 3, 8; tables 7-9 --- -/---	6-10, 20-24, 43, 65
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 June 2004		Date of mailing of the international search report 09.07.04
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moonen, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/GB 03/02450

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PIPER JUSTIN L ET AL: "High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: Implications for Celiac Sprue" BIOCHEMISTRY, vol. 41, no. 1, 8 January 2002 (2002-01-08), pages 386-393, XP002267668 ISSN: 0006-2960 Abstract, Introduction, Discussion	28,30, 32-34
Y	the whole document	1-11, 13-27, 44-58, 60-64,67
X	ARENTZ-HANSEN H ET AL: "THE INTESTINAL T CELL RESPONSE TO ALPHA-GLIADIN IN ADULT CELIAC DISEASE IS FOCUSED ON A SINGLE DEAMIDATED GLUTAMINE TARGETED BY TISSUE TRANSGLUTAMINASE" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 191, no. 4, 21 February 2000 (2000-02-21), pages 603-612, XP000986723 ISSN: 0022-1007 cited in the application Abstract, Table II, Fig.4, Discussion	28,30, 32-34
Y		44-58, 60-64,67
X	ANDERSON R P ET AL: "IN VIVO ANTIGEN CHALLENGE IN CELIAC DISEASE IDENTIFIES A SINGLE TRANSGLUTAMINASE-MODIFIED PEPTIDE AS THE DOMINANT A-GLIADIN T-CELL EPITOPE" NATURE MEDICINE, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, vol. 6, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 337-342, XP000982628 ISSN: 1078-8956 abstract; figure 1	28,30, 32-34
Y		44-58, 60-64,67
X	EP 0 905 518 A (UNIV LEIDEN ;ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (NL)) 31 March 1999 (1999-03-31) Paragr. '0001!-'0014!; SEQ ID NOs:11,12,14,15,16 claims 11-14; figures 3,5	1-11, 13-28, 30, 32-34, 44-58, 60-64,67
	--- -/-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/GB 03/02450

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VADER L W ET AL: "Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 195, no. 5, 4 March 2002 (2002-03-04), pages 643-649, XP002204499 ISSN: 0022-1007 cited in the application Abstract, Page 645, Figure 1 ---	1-11, 13-28, 30, 32-34, 44-58, 60-64,67
Y	WIESER H ET AL: "COELIAC ACTIVE PEPTIDES FROM GLIADIN: LARGE-SCALE PREPARATION AND CHARACTERIZATION" ZEITSCHRIFT FÜR LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND -FORSCHUNG, XX, XX, vol. 194, no. 3, 1992, pages 229-234, XP002072056 ISSN: 0044-3026 Summary; sequence B3143 ---	1-11, 13-28, 30, 32-34, 44-58, 60-64,67
Y	KUMAR R ET AL: "Human Genome Search in Celiac Disease: Mutated Gliadin T-cell-like Epitope in Two Human Proteins Promotes T-cell Activation" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 319, no. 3, 30 May 2002 (2002-05-30), pages 593-602, XP004449660 ISSN: 0022-2836 Abstract; pages 597-599 & KUMAR ET AL: "Human Genome Search in Celiac Disease: Mutated Gliadin T-cell-like Epitope in Two Human Proteins Promotes T-cell Activation" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, 'Online! 30 May 2002 (2002-05-30), doi:10.1016/S0022-2836(02)00366-2 Retrieved from the Internet: <URL:www.sciencedirect.com> 'retrieved on 2004-06-01! ---	12,29, 31-33, 35-42, 59,64, 68-84
Y	MOUSTAKAS A K ET AL: "STRUCTURE OF CELIAC DISEASE-ASSOCIATED HLA-DQ8 AND NON-ASSOCIATED HLA-DQ9 ALLELES IN COMPLEX WITH TWO DISEASE-SPECIFIC EPITOPES" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 12, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 1157-1166, XP001021489 ISSN: 0953-8178 the whole document --- -/--	12,29, 31-33, 35-42, 59,64, 68-84

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/GB 03/02450

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JUNG G ET AL: "From combinatorial libraries to MHC ligand motifs, T-cell superagonists and antagonists" BIOLOGICALS, ACADEMIC PRESS LTD., LONDON, GB, vol. 29, no. 3-4, September 2001 (2001-09), pages 179-181, XP002242277 ISSN: 1045-1056 the whole document	12,29, 31-33, 35-42, 59,64, 68-84
Y	MOWAT A M: "Coeliac disease-a future for peptide therapy?" LANCET, XX, XX, vol. 356, no. 9226, 22 July 2000 (2000-07-22), pages 270-271, XP004263756 ISSN: 0140-6736 the whole document	1,2,4-7, 9-11, 13-16, 18-21, 23-28, 30, 32-34, 44-58, 60-64,67
Y	MADSEN LARS S ET AL: "A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor" NATURE GENETICS, vol. 23, no. 3, November 1999 (1999-11), pages 343-347, XP002283438 ISSN: 1061-4036 the whole document	43,65
A	O'KEEFFE J ET AL: "T CELL PROLIFERATION, MHC CLASS II RESTRICTION AND CYTOKINE PRODUCTS OF GLIADIN-STIMULATED PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMC)" CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, OXFORD, GB, vol. 117, no. 2, August 1999 (1999-08), pages 269-276, XP000989621 ISSN: 0009-9104 the whole document	
A	WAL VAN DE Y ET AL: "Coeliac disease: it takes three to tango " GUT, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON,, GB, vol. 46, 2000, pages 734-737, XP002204498 ISSN: 0017-5749 -/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/GB 03/02450

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	ARENTZ-HANSEN HELENE ET AL: "Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues" GASTROENTEROLOGY, vol. 123, no. 3, September 2002 (2002-09), pages 803-809, XP009024146 ISSN: 0016-5085 abstract; table 1	1,2,4-7, 9-11, 13-16, 18-21, 23-28, 30, 32-34, 44-58, 60-64,67
Y,P	WO 02/083722 A (KONING FRITS ;ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (NL); DRIJFHOUT JAN WOU) 24 October 2002 (2002-10-24) page 1-15; claims 1-52	1
E	WO 03/066079 A (KONING FRITS ;ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (NL); DRIJFHOUT JAN WOU) 14 August 2003 (2003-08-14) & EP 1 332 760 A (ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN) 6 August 2003 (2003-08-06) SEQ ID NOs: 2,21,38,42,43,46,59,73 figure 2B	1-11
E	WO 03/096984 A (HAUSCH FELIX ;QUARSTEN HANNE (NO); SOLLID LUDVIG M (NO); UNIV LELA) 27 November 2003 (2003-11-27) page 1-18; claims 1-18	12,29, 31-33, 35-42, 59,64, 68-84

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 application No.
PCT/GB 03/02450
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 1-14; 67
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 66
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB 03 /02450

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 1-14; 67

Although claims 1-14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the agent.

Although claim 67 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 66

Present claim 66 relates to a product defined by reference to a method of identification having the desirable characteristic of being of use in a method of preventing or treating coeliac disease.

The claim covers all products having this characteristic, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products mentioned in Table 9 of the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

International Application No. PCT/ GB 03/02450

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-2, 4-7, 9-11, 13-16, 18-21,
23-28, 30, 32-34, 44-58, 60-64, 67, all partially

All embodiments concerning in particular the closely related wheat sequences SEQ ID NOS:18-20, 31 and 34-35, HLA-DQ2-restricted.

Invention 2: claims 1-2, 4-7, 9-11, 13-16, 18-21,
23-28, 30, 32-34, 44-58, 60-64, 67, all partially

All embodiments concerning in particular the closely related wheat sequences SEQ ID NOS:21-22, 42, 43 and 46, HLA-DQ2-restricted.

Invention 3: claims 1-2, 4-7, 9-11, 13-16, 18-21,
23-28, 30, 32-34, 44-58, 60-64, 67, all partially

All embodiments concerning in particular the wheat sequences SEQ ID NOS:32-33 and 36, HLA-DQ2-restricted.

Invention 4: claims 1-4, 6-11, 13-16, 18, 20-28,
30, 32-34, 44-58, 60-64, 67, all partially

All embodiments concerning in particular the rye secalins and barley hordeins SEQ ID NOS:39-41, HLA-DQ2-restricted.

Invention 5: claims 1, 3-11, 13-15, 17-28, 30,
32-34, 44-58, 60-64, 67, all partially

All embodiments concerning in particular the epitope SEQ ID NO:44 bioactive in HLA-DQ8+ patients.

Invention 6: claims 12, 29, 31, 35-42, 59, 68-84,
completely; claims 32-33, 64, partially

All embodiments referring to antagonists or mutated gliadin proteins.

Invention 7: claims 43, 65-66

International Application No. PCT/ GB 03 /02450

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Concerning mammals expressing a T cell receptor that
recognises a peptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Application No

PCT/GB 03/02450

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0125793	A	12-04-2001	AU 7539400 A CA 2386089 A1 EP 1218751 A2 WO 0125793 A2 JP 2003511670 T	10-05-2001 12-04-2001 03-07-2002 12-04-2001 25-03-2003
EP 0905518	A	31-03-1999	EP 0905518 A1	31-03-1999
WO 02083722	A	24-10-2002	CA 2443886 A1 EP 1377604 A2 WO 02083722 A2 NO 20034588 A	24-10-2002 07-01-2004 24-10-2002 10-12-2003
WO 03066079	A	14-08-2003	EP 1332760 A1 WO 03066079 A2	06-08-2003 14-08-2003
WO 03096984	A	27-11-2003	WO 03068170 A2 WO 03096979 A2 WO 03096984 A2 US 2003215438 A1	21-08-2003 27-11-2003 27-11-2003 20-11-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/415 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 C	4 C 0 8 4
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	C 0 7 K 14/415	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 2 3 L 1/30 B	4 C 0 8 8
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 36/899 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 1	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 U	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 P	
	G 0 1 N 33/15 Z	
	G 0 1 N 33/50 Z	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(72)発明者 アンダーソン, ロバート・ポール

オーストラリア国ブライアイシー 3 0 5 0, パークビル, グラッタン・ストリート, シー／オー・ロイヤル・メルボルン・ホスピタル・ピー・オー, ウォルター・アンド・エリーザ・ホール・インスティテュート, オートイミュニティ・アンド・トランスプランテーション・ディビジョン

(72)発明者 ヒル, エイドリアン・ビビアン・シントン

イギリス国オックスフォード オーエックス 3・7 ビーエヌ, ルーズベルト・ドライブ, ユニバーシティ・オブ・オックスフォード, ウェルカム・トラスト・センター・フォー・ヒューマン・ジェネティクス

(72)発明者 ジェウェル, デレック・パーリー

イギリス国オックスフォード オーエックス 2・6 エイチイー, ウッドストック・ロード, ラドクリフ・インファーマリー, ギブソン・ビルディング, ガストロエンテロロジー・ユニット

F ターム(参考) 2B030 AB03 AD20 CA14

2G045 AA29 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB20 DA36 FB03

4B018 MD20 ME07

4B024 AA01 AA05 BA31 CA04 DA01 DA02 DA05 EA04 GA11 HA01
HA03

4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ13 QS36

4B064 AG01 CA02 CA10 CA11 CA19 CC24 DA01 DA10

4B065 AA01X AA88X AA88Y AA90X AB01 BA01 CA24 CA41 CA44

4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA13 CA53
DA10 NA14 ZB082

4C085 AA02 AA13 AA14 CC01 DD61 EE01 HH20 KA04 LL03

4C088 AB73 AB75 AB78 AC20 NA14 ZB08 ZC41

4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 BA17 CA30 DA86 EA01 EA20 FA20
FA72 FA74