

(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2019-536006

(P2019-536006A)

(43) 公表日 令和1年12月12日 (2019. 12. 12)

(51) Int. Cl.			F I		テーマコード (参考)	
GO 1 N 33/53 (2006. 01)			GO 1 N 33/53		Z N A D 4 B O 6 4	
CO 7 K 16/18 (2006. 01)			CO 7 K 16/18		4 H O 4 5	
CO 7 K 14/47 (2006. 01)			CO 7 K 14/47			
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)			C 1 2 N 15/12			
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)			C 1 2 P 21/02		C	
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 36 頁)						
(21) 出願番号 特願2019-519006 (P2019-519006)			(71) 出願人 512151403			
(86) (22) 出願日 平成29年10月10日 (2017. 10. 10)			ドイッチェス・クレプスフォルシュング			
(85) 翻訳文提出日 令和1年5月30日 (2019. 5. 30)			スツェントルム			
(86) 国際出願番号 PCT/EP2017/075774			DEUTSCHES KREBSFORS			
(87) 国際公開番号 W02018/069296			CHUNGSZENTRUM			
(87) 国際公開日 平成30年4月19日 (2018. 4. 19)			ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデル			
(31) 優先権主張番号 16193119.1			ベルク イム・ノイエンハイマー・フェル			
(32) 優先日 平成28年10月10日 (2016. 10. 10)			ト 2 8 0			
(33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)			(74) 代理人 110000855			
			特許業務法人浅村特許事務所			
			(72) 発明者 ツーク ハオゼン、ハラルト			
			ドイツ連邦共和国、ヴァルトミヒェルバッ			
			ハ、アイヒェンシュトラッセ 1			
最終頁に続く						

(54) 【発明の名称】 診断アッセイに使用するためのタンパク質抗原としてのREPタンパク質

(57) 【要約】

多発性硬化症 (MS) の診断に使用するためのDNA複製関連 (Rep) タンパク質であって、(a) 対照試料中の量と比較して、対象からの試料中のRepタンパク質又はその断片の増加量；又は対照試料中の量と比較して、対象からの試料中の抗原を有する抗Repタンパク質抗体の増加量が、MSの診断と相関し、Repタンパク質が、MSBI1 Rep又はMSBI2 Repである、DNA複製関連 (Rep) タンパク質が記載されている。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多発性硬化症（MS）の診断に使用するための DNA 複製関連（Rep）タンパク質であって、

（a）対照試料中の量と比較して、対象からの試料中の Rep タンパク質若しくはその断片の少なくとも 2 倍の増加量；又は

対照試料中の量と比較して、対象からの試料中の抗 Rep 抗体の少なくとも 2 倍の増加量が、

MS の診断と関連し、

（b）前記 Rep タンパク質が、

（i）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列；

（i i）配列番号 1 の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異的な抗 Rep 抗体に結合することができる配列番号 1 の断片；又は

（i i i）（i）若しくは（i i）の前記アミノ酸配列に対して 90% 以上の相同性を有し、かつ配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的な抗 Rep 抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む、DNA 複製関連（Rep）タンパク質。

【請求項 2】

配列番号 1 の前記断片が、配列番号 1 のアミノ酸 1 ～ 229 からなる前記アミノ酸配列内のエピトープを含む、請求項 1 に記載の Rep タンパク質。

【請求項 3】

対照試料と比較して、少なくとも 5 倍の Rep タンパク質若しくはその断片又は抗 Rep 抗体の増加量が、MS を示す、請求項 1 又は 2 に記載の Rep タンパク質。

【請求項 4】

前記タンパク質が、配列番号 13 に示されるポリヌクレオチド酸によってコードされる、請求項 1 に記載の Rep タンパク質。

【請求項 5】

抗体 AB01 523-1-1（DSM ACC3327）、抗体 AB02 304-4-1（DSM ACC3328）、抗体 MSBI1 381-6-2（DSM ACC3329）、抗体 MSBI1 761-5-1（DSM ACC3330）、及び抗体 MSBI1 961-2-2 からなる群から選択される、抗 Rep 抗体。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法における請求項 5 に記載の抗 Rep 抗体の使用。

【請求項 7】

対象における MS を診断する方法であって、

（a）対象からの試料を請求項 1 の（b）で定義された Rep タンパク質とインキュベートする工程；

（b）Rep タンパク質と免疫学的複合体を形成する前記対象からの前記試料中の抗体の量を検出する工程；及び

（c）対照試料中の量と比較して、前記対象からの前記試料中の Rep タンパク質に結合した抗体の少なくとも 2 倍の増加量を MS の診断と関連させる工程を含む、方法。

【請求項 8】

工程（a）において、前記 Rep タンパク質が固定化された後、前記固定化された Rep タンパク質を前記対象からの前記試料とインキュベートする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

工程（a）において、前記 Rep タンパク質を細胞内で発現させた後、前記細胞を前記対象からの前記試料とインキュベートする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

工程（b）において、Rep タンパク質と免疫学的複合体を形成する抗体の量が、シグナル生成化合物と結合した検出結合剤によって定量される、請求項 8 又は 9 に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 1 1】

工程（a）において、前記対象からの前記試料中の前記抗体を固定化した後、規定量の R e p タンパク質とインキュベートする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記対象からの前記試料が、血清又は血漿試料である、請求項 7 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

患者における M S を診断する方法であって、

（a）配列番号 2 又は配列番号 3 に含まれるエピトープに結合する抗 R e p 抗体により、対象からの試料中の R e p タンパク質の量を検出する工程、及び

10

（b）対照試料中の量と比較して、工程（a）において対象からの前記試料中に検出された R e p タンパク質の少なくとも 2 倍の増加量を M S の診断と関連させる工程を含む、方法。

【請求項 1 4】

R e p タンパク質に特異的な前記抗体が、配列番号 1 の 1 ～ 1 3 6、1 3 7 ～ 2 2 9、及び 2 3 0 ～ 3 2 4 のアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸配列内のエピトープに結合する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

対象からの前記試料が、血清試料、血漿試料、又は組織試料からなる群から選択される、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

M S の診断に使用するためのキットであって、

（a）R e p タンパク質であって、前記 R e p タンパク質が、

（i）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列；

（i i）配列番号 1 の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異性を有する抗 R e p 抗体に結合することができる配列番号 1 の断片；又は

（i i i）（i）若しくは（i i）の前記アミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の相同性を有し、かつ配列番号 1 の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異性を有する抗 R e p 抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む、R e p タンパク質、

30

（b）検出可能な標識に結合し、配列番号 1 の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異性を有する抗 R e p 抗体に結合することができる抗ヒト抗体、及び

（c）血清又は血漿試料中に推測される配列番号 1 の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異性を有する（a）による R e p タンパク質又は抗 R e p 抗体を固定化するのに好適な固体マトリックスを含む、キット。

【請求項 1 7】

酵素結合免疫吸着検定法（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、酵素免疫検定法（E I A）、蛍光免疫検定法（F I A）、ルミネセンスイムノアッセイ（L I A）、及びストリップアッセイからなる群から選択されるアッセイに使用するための請求項 1 6 に記載のキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、例えば多発性硬化症（M S）などの神経変性疾患の診断に使用するための D N A 複製関連（R e p）タンパク質又は抗 R e p 抗体の検出及び定量化に関する。特に、本発明は、M S B I 1 ゲノムコード化 R e p タンパク質に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

多発性硬化症（M S）の病因は、解決されていない。したがって、M S の診断及び／若

50

しくはMSの監視又はMSの治療及び／若しくはMSの素因の評価に使用することができるMSのバイオマーカーが求められている。

【0003】

多発性硬化症(MS)は、脳及び脊髄の神経細胞を損傷するMS病変の脱髄によって特徴付けられる。MSの症状は、突然悪化する症状(再発、悪化、発作、発病)として、又は経時的に徐々に悪化する症状(進行型)としてのいずれかで生じる。脱髄は、炎症過程を開始し、それがT細胞並びにサイトカイン及び抗体の放出を誘発する。MSの診断のために、とりわけ、神経画像、脳脊髄液の分析、及び誘発電位が使用される。

【0004】

17個の、異なるが、部分的に関連したDNA分子のスペクトルが、異なる試験材料(多発性硬化症(MS)脳組織、ウシ血清、乳)から分離された(Funk, Gunst et al. 2014, Gunst, Zur Hausen et al. 2014, Lamberto, Gunst et al. 2014, Whitley, Gunst et al. 2014)。

【0005】

これらの分離株のうち、伝染性海綿状脳症(TSE)関連分離株Sphinx 1.76(1, 758bp; 受託番号HQ444404、(Manuelidis L. 2011))と密接に関連する2つのDNA分子がMS患者からの脳組織から分離された。これらの分離株は、それぞれ「MSBI1ゲノム」及び「MSBI2ゲノム」と命名されたMSBI1.176(MSBI、多発性硬化症脳分離株)(1, 766bp)及びMSBI2.176(1, 766bp)であった。MSBI1.176は、Sphinx 1.76の配列と98%のヌクレオチド類似性を共有する。分離株の大きなオープンリーディングフレーム(ORF)は、それらの間で高い類似性を共有する推定DNA複製タンパク質をコードする。別の共通の特徴は、iteron様タンデムリピートの存在である。この反復領域のアラインメントは、単一ヌクレオチドのコアにおける変動を示す。このiteron様反復は、Repタンパク質の結合部位を構成し得る。分離株の配列は、受託番号LK931491(MSBI1.176)及びLK931492(MSBI2.176)(Whitley C. et al. 2014)としてEMBL Databankに寄託されており、国際公開第2016/005064号に整列され、記載されている。

【0006】

さらなる分離株が牛乳から得られた。これらの牛乳分離株(CMI)は、CMI1.252、CMI2.214、及びCMI3.168であり、それぞれ「CMI1ゲノム」、「CMI2ゲノム」、及び「CMI3ゲノム」と命名された。分離株の配列は、受託番号LK931487(CMI1.252)、LK931488(CMI2.214)、及びLK931489(CMI3.168)としてEMBL Databankに寄託されており、国際公開第2016/005064号に整列され、記載されている。

【0007】

本発明者らは、MSBI1ゲノムが転写RNAの有意な産生を示し、MSBI1ゲノムコード化Repタンパク質がヒト細胞において発現されることを見出した。本発明者らは、MSBI1及びMSBI2ゲノムコード化Repタンパク質(MSBI1 Rep及びMSBI2 Rep)が、病原性スクリーニングアッセイのためのバイオマーカーを表すことを見出した。DNA複製関連タンパク質(RepB)として、Repタンパク質は、DNA結合活性を有し、エピソーム又はウイルスDNA分子の複製開始に必須であり得る。本発明によるMSBI1ゲノムコード化Repと構造的に類似するRepタンパク質は、インビボ及びインビトロの原核生物系内に記載された自己オリゴマー化及び凝集の著しい可能性を示す(Giraldó, Moreno-Díaz de la Espina et al. 2011, Torreira, Moreno-Del Alamo et al. 2015)。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、抗原としての R e p タンパク質の使用に基づく病原体特異的診断スクリーニングアッセイのためのプラットフォームを提供する。

【0009】

特定の実施形態では、分離された D N A（例えば M S B I 1）剤の病原活性と R e p タンパク質発現との関連のために、抗 R e p 抗体が病原マーカーとして使用される。抗 R e p 抗体の増加量を含む患者血清は、R e p 特異的免疫応答を開始するのに十分に長い期間中に、対応する患者が R e p 関連タンパク質に確実に曝露されたか又は自分で R e p を発現したことを示す。ヒト抗体の標的として、R e p タンパク質が抗原として使用される。抗 R e p 抗体の量の定量化に基づいて、急性 M S 及び M S の素因を診断又は監視することができる。試料中の誘導された抗 R e p 抗体又は発現された R e p タンパク質の増加量が、M S の発症及び／又は状態を示すことが認識されているので、抗 R e p 抗体及び R e p タンパク質の増加量は、それぞれ M S の診断のための病原性バイオマーカーとして使用することができる。

10

【0010】

有利には、M S についての病原性バイオマーカーは、血清又は血漿試料などの血液試料中で検出することができ、脳脊髄液から試料を得る必要はない。

【0011】

したがって、本発明は、神経変性疾患、例えば多発性硬化症（M S）の診断に使用するための D N A 複製関連（R e p）タンパク質を提供する。特定の実施形態では、R e p タンパク質は、M S B I 1 ゲノムによってコードされており、（i）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列；

20

（i i）配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができる配列番号 1 の断片；又は

（i i i）（i）若しくは（i i）のアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有し、かつ配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む。

【0012】

他の実施形態では、R e p タンパク質は、M S B I 2 ゲノムによってコードされており、（i）配列番号 8 に示されるアミノ酸配列；

（i i）配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができる配列番号 8 の断片；又は

30

（i i i）（i）若しくは（i i）のアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有し、かつ配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む。

【0013】

他の実施形態では、R e p タンパク質は、C M I 1 ゲノムによってコードされており、（i）配列番号 10 に示されるアミノ酸配列；

（i i）配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができる配列番号 10 の断片；又は

（i i i）（i）若しくは（i i）のアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有し、かつ配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む。

40

【0014】

他の実施形態では、R e p タンパク質は、C M I 2 ゲノムによってコードされており、（i）配列番号 11 に示されるアミノ酸配列；

（i i）配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができる配列番号 11 の断片；又は

（i i i）（i）若しくは（i i）のアミノ酸配列に対して 90 % 以上の相同性を有し、かつ配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む。

50

【0015】

他の実施形態では、R e p タンパク質は、C M I 3 ゲノムによってコードされており、
(i) 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列；

(i i) 配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができる配列番号 1 2 の断片；又は

(i i i) (i) 若しくは (i i) のアミノ酸配列に対して 9 0 % 以上の相同性を有し、かつ配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的な抗 R e p 抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む。

【0016】

特定の実施形態では、対照試料中の R e p タンパク質量と比較して、対象からの試料中の R e p タンパク質の増加量は、神経変性疾患、例えば、M S の診断と相関する、すなわち M S を示す。本発明によれば、神経変性疾患、例えば M S の診断又は神経変性疾患、例えば M S の素因は、対照試料と比較して、少なくとも 2 倍の R e p タンパク質の増加量によって示される。

【0017】

他の実施形態では、対照試料中の抗 R e p 抗体量と比較して、対象からの試料中の抗 R e p 抗体の増加量は、神経変性疾患、例えば、M S の診断と相関する、すなわち M S を示す。本発明によれば、神経変性疾患、例えば M S の診断又は神経変性疾患、例えば M S の素因は、対照試料と比較して、少なくとも 2 倍の抗 R e p 抗体の増加量によって示される。

【0018】

本発明の R e p タンパク質は、抗体又は細胞性免疫応答を検出するために既知の抗原を用いる実質的に任意のアッセイフォーマットにおいて用いられ得る。したがって、本発明はまた、細胞媒介、例えば R e p タンパク質に対する T 細胞免疫応答の検出を包含する。

【0019】

特定の実施形態では、本発明は、

(a) 対象からの試料を R e p タンパク質とインキュベートする工程；

(b) R e p タンパク質と免疫学的複合体を形成する対象からの試料中の抗体の量を検出する工程；及び

(c) 対照試料中の量と比較して、R e p タンパク質に結合した抗体の量を神経変性疾患の診断と相関させる工程を含む、対象における神経変性疾患を診断する方法を提供する。

【0020】

特定の実施形態では、本発明は、

(a) 対象からの試料を R e p タンパク質とインキュベートする工程；

(b) R e p タンパク質と免疫学的複合体を形成する対象からの試料中の抗体の量を検出する工程；及び

(c) 対照試料中の量と比較して、R e p タンパク質に結合した抗体の量を M S の診断と相関させる工程を含む、対象における M S を診断する方法を提供する。

【0021】

特定の実施形態では、R e p タンパク質は、固定化され、例えば支持体又は担体に付着させた後、固定化 R e p タンパク質を対象からの試料とインキュベートする。

【0022】

他の実施形態では、R e p タンパク質を細胞内で発現させた後、その細胞を対象からの試料とインキュベートする。

【0023】

特定の実施形態では、R e p タンパク質と免疫学的複合体を形成する抗体の量は、免疫学的複合体の抗 R e p 抗体に結合することができるシグナル生成化合物、例えば検出可能に標識された二次抗体、好ましくは抗ヒト抗体に結合した追加の結合剤によって定量される。

【0024】

他の実施形態では、対象からの試料中の抗体を固定化した後、規定量の R e p タンパク質とインキュベートする。

【0025】

好ましくは、対象からの試料及び対照試料は、血清又は血漿試料などの血液試料である。

【0026】

他の実施形態では、本発明は、

(a) 抗 R e p 抗体によって対象からの試料中の R e p タンパク質の量を検出する工程、及び

(b) 対照試料中の量と比較して、工程 (a) で対象からの試料中に検出された R e p タンパク質の量を神経変性疾患の診断と関連させる工程を含む、患者における神経変性疾患を診断する方法を提供する。

【0027】

他の実施形態では、本発明は、

(a) 抗 R e p 抗体によって対象からの試料中の R e p タンパク質の量を検出する工程、及び

(b) 対照試料中の量と比較して、工程 (a) で対象からの試料中に検出された R e p タンパク質の量を M S の診断と関連させる工程を含む、患者における M S を診断する方法を提供する。

【0028】

そのような実施形態では、対象からの試料及び対照試料は、血清試料、血漿試料、又は組織試料からなる群から選択される。

【0029】

特定の実施形態では、抗 R e p 抗体は、配列番号 1 の 1 ~ 1 3 6、1 3 7 ~ 2 2 9、及び 2 3 0 ~ 3 2 4 のアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸配列内のエピトープに結合する。例えば、抗体は、配列番号 2 又は配列番号 3 に含まれるエピトープに結合する。

【0030】

さらなる実施形態では、本発明は、(a) R e p タンパク質、特に M S B I 1、M S B I 2、C M I 1、C M I 2、又は C M I 3 R e p タンパク質、(b) シグナル生成化合物に結合した追加の結合剤、例えば、検出可能な標識に結合し、本発明による抗 R e p 抗体に結合することができる抗ヒト抗体、及び(c) (a) による R e p タンパク質又は抗 R e p 抗体を固定化するのに好適な固体マトリックスを含み、補助抗体が、試料、特に血清又は血漿試料中に存在すると推測される、M S の診断に使用するためのキットを提供する。

【0031】

特定の実施形態では、キットは、例えば酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、酵素免疫検定法 (E I A)、蛍光免疫検定法 (F I A)、ルミネセンスイムノアッセイ (L I A)、及びストリップアッセイからなる群から選択される免疫検定法における使用のためにまとめられる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図 1】 1 D サイズ分解 R e p タンパク質膜ストライプの血清インキュベーションによる 2 × 8 試料の例示的な血清スクリーニングを示す図である。R e p タンパク質を含有するニトロセルロースストライプを、それぞれ M S 血清試料プール又は健康なドナー血漿プールの 2 つの異なる血清／血漿希釈 (1 : 5 0 0 及び 1 : 2 0 0 0) とインキュベートした。R e p 結合ヒト I g G を抗ヒト I g G H R P 結合二次抗体で検出した。全長 R e p タンパク質標的のサイズの抗体シグナル (右側のクマシータンパク質染色及び抗 R e p W B 対照参照) をデンシトメトリーにより定量した。

【図 2】 E L I S A スクリーニングに基づく R e p 特異的血清反応の定量化を示す図であ

10

20

30

40

50

る。96ウェルあたり50、100、200、400、又は800ngのRepタンパク質（標的抗原）をスポットした。ブロッキング及び洗浄後、Repタンパク質抗原を、プールしたMS血清試料又はプールした対照血漿試料のいずれかと1：500の希釈で6時間室温（RT）でインキュベートした。洗浄及びHRP結合抗ヒトIgG HRP二次抗体とのインキュベーション及び最後の洗浄工程後、Rep結合ヒトIgGの存在をTMB基質反応及び450nmでの吸光度測定によって定量した。定量化は、シグナル強度とRepタンパク質（抗原）の量との良好な相関関係を明らかにする。平均して、MSプールのシグナル強度レベルは、対照プールの強度を少なくとも1.9倍上回る。一般に、ELISAに基づく血清スクリーニングは、少なくとも1：1000の血清希釈について検出可能な血清抗体を明らかにし（データは示さず）、そのためこの実験の力価は、1：2000～1：4000の領域で1：1000以上、又はプラットフォームの最適化後はさらに高くなる可能性がある。

【図3】ELISAスクリーニングに基づくRep特異的血清反応の定量化を示す図である。96ウェルあたり200ngのRepタンパク質（標的抗原）をスポットした。ブロッキング及び洗浄後、Repタンパク質抗原を7つの個々のMS血清又は7つの個々の対照血清のいずれかと1：500の希釈、室温（RT）で6時間、2連でインキュベートした。洗浄及びHRP結合抗ヒトIgG HRP二次抗体とのインキュベーション及び最後の洗浄工程後、Rep結合ヒトIgGの存在をTMB基質反応及び450nmでの吸収測定によって定量した。MS試料の平均強度は、対照血清の平均強度を少なくとも8倍超えており、いくつかのMS試料は、平均対照強度に対して10～16倍を示している。

【図4】y座標上に示される抗Rep抗体A、B、C、D1、及びD2の使用によって得られた免疫蛍光画像データを示す図である。

【図5】y座標上に示される抗Rep抗体A、B、C、D1、及びD2の使用によって得られた免疫蛍光画像データを示す図である。

【図6】y座標上に示される抗Rep抗体A、B、C、D1、及びD2の使用によって得られた免疫蛍光画像データを示す図である。

【図7】A、B、C、及びD1が、用いられた抗Rep抗体の群を示す、ウェスタンブロット分析を示す図である。

【図8】「最適化」（＝配列番号13）対「原初」（＝野生型；配列番号15）MSBI1配列の配列アラインメントを示す図である。最適化されたコドンは、マークされている。

【0033】

本発明は、病原性マーカーとしての抗Rep抗体の存在についての診断スクリーニングアッセイを提供する。抗Rep抗体の増加量を含む試料は、Repタンパク質特異的免疫応答を誘導するのに十分に長い期間中に対応する対象がRep関連タンパク質に明確に曝露されたか又は自らRepタンパク質を発現したことを示す。そのようなスクリーニングアッセイを用いて、抗Rep抗体の定量化に基づくMSの診断、予後、及び監視を実施することができる。代替の実施形態では、Repタンパク質は、抗Rep抗体によって試料中で直接検出及び定量され得る。

【0034】

本明細書で使用される「Repタンパク質」は、DNA複製関連タンパク質（RepB）を指す。Repタンパク質は、DNA結合活性を含み、エピソード／ウイルスDNA分子の複製開始に必須であり得る。一般に、Repタンパク質は、スモールスフィンクスゲノムの群からのRepタンパク質を指す（Whitley et al., 2014）。特に、Repタンパク質は、MSBI1ゲノムコード化Repタンパク質（MSBI1 Rep）、MSBI2ゲノムコード化Repタンパク質（MSBI2 Rep）、CMI1ゲノムコード化Repタンパク質（CMI1 Rep）、CMI2ゲノムコード化Repタンパク質（CMI2 Rep）、又はCMI3ゲノムコード化Repタンパク質（CMI3 Rep）である。好ましくは、MSBI1 Repタンパク質は、受託番号LK931491の下でEMBLデータベースに寄託されたMSBI1.176によってコー

ドされ、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するか、又はRepタンパク質は、受託番号LK931492の下でEMBLデータベースに寄託されたMSBI2.176によってコードされるMSBI2であり、配列番号8に記載のアミノ酸配列を有する(Whitley, Gunst et al. 2014)。別の好ましい実施形態では、CMI1 Repタンパク質は、受託番号LK931487の下でEMBLデータベースに寄託されているCMI1.252によってコードされ、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有する。別の好ましい実施形態では、CMI2 Repタンパク質は、受託番号LK931488の下でEMBLデータベースに寄託されているCMI2.214によってコードされ、配列番号11に示されるアミノ酸配列を有する。別の好ましい実施形態では、CMI3 Repタンパク質は、受託番号LK931489の下でEMBLデータベースに寄託されているCMI3.168によってコードされ、配列番号12に示されるアミノ酸配列を有する。特に好ましい実施形態では、Repタンパク質は、配列番号1の1~229のアミノ酸から本質的になるスモールスフィンクスゲノム間で保存されたN末端領域、及び配列番号1の230~324のアミノ酸から本質的になるMSBI1.176に特異的なC末端可変領域を含む。N末端保存領域は、配列番号1の1~136のアミノ酸から本質的になる推定の第1のDNA結合ドメイン及び配列番号1の137~229のアミノ酸から本質的になる第2の推定DNA結合ドメインを含む。

【0035】

「Repタンパク質」はまた、配列番号1又は配列番号8のアミノ酸配列を有するRepタンパク質に特異的な抗Rep抗体に結合することができる、配列番号1又は配列番号8を有するタンパク質の断片及び変異体も包含する。好ましくは、そのような断片は、配列番号1又は配列番号8のアミノ酸配列を有するタンパク質の免疫原性断片であり、これは、配列番号1又は配列番号8のRepタンパク質に対する抗Repタンパク質抗体に対する少なくとも1つのエピトープを包含し、好ましくは少なくとも7、8、9、10、15、20、25、又は50個の連続アミノ酸を含む。特定の実施形態では、断片は、Repタンパク質のドメイン、例えばN末端保存領域、C末端可変領域、第1若しくは第2のDNA結合ドメインを含むか、又はそれらから本質的になる。配列番号1又は配列番号8を有するタンパク質の変異体は、配列番号1と比較して1つ以上のアミノ酸の欠失、置換、又は付加を含み、配列番号1又は配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の相同性を有し、変異体は、配列番号1又は配列番号8のアミノ酸配列を有するRepタンパク質に特異的な抗Rep抗体に結合することができる。変異体の定義内に含まれるのは、例えば、アミノ酸の1つ以上の類似体を含むポリペプチド(例えば、非天然アミノ酸、ペプチド核酸(PNA)などを含む)、置換結合を有するポリペプチド、並びに当技術分野で既知の他の修飾、天然に存在するもの及び天然に存在しないものの両方である。Repタンパク質という用語は、異種アミノ酸配列、リーダー配列、又はTag配列などとの融合タンパク質を含む。本発明の特定の実施形態では、タンパク質タグは、上記のRepタンパク質、例えばMSBI1、MSBI2、CMI1、CMI2、又はCMI3からなる群から選択されるRepタンパク質に遺伝的に移植される。特に、少なくとも1つのタンパク質タグが、配列番号1~3、8~12、14のうちのいずれか1つに示されるようなアミノ酸配列からなるポリペプチドに付着している。そのようなタンパク質タグは、化学薬品又は酵素的手段によって除去可能であり得る。タンパク質タグの例は、精製のためのアフィニティータグ又はクロマトグラフィータグである。例えば、Repタンパク質は、例えばHis₆-タグ(配列番号4)、T7-タグ(配列番号5)、FLAG-タグ(配列番号6)、及びStrept-III-タグ(配列番号7)、His-タグ(配列番号4)、T7-タグ(配列番号5)、FLAG-タグ(配列番号6)、又はStrept-III-タグ(配列番号7)からなる群から選択されるタグ配列に融合されてもよい。さらに、緑色蛍光タンパク質(GFP)又はその変異体などの蛍光タグを本発明によるRepタンパク質に付着させてもよい。

【0036】

特に好ましい実施形態では、MSBI1ゲノムコード化Repタンパク質（MSBI1 Rep）は、ヒト細胞株（例えば、HEK-293、HEK293TT、HEK293T、HEK293FT、HaCaT、HeLa、SiHa、CaSki、HDMEC、L1236、L428、BJAB、MCF7、Colo678、任意の初代細胞株）、及びウシ（例えば、MAC-T）又はマウス細胞株（例えば、GT1-7）における産生についてコドン最適化されている。コドン最適化に関して、抗原をコードするヌクレオチド配列は、抗原が産生される対象の遺伝子において使用されるコドンを用いるように設計され得る。好ましい実施形態では、使用されるコドンは、「ヒト化」コドンである。そのようなコドン使用は、ヒト細胞における抗原の効率的な発現を提供する。コドン最適化の任意の好適な方法が使用され得る。そのような方法及びそのような方法の選択は、当業者に周知である。本発明によれば、MSBI1ゲノムコード化Repタンパク質（MSBI1 Rep）のそのようなコドン最適化変異体は、配列番号13に示されるような配列を含むか又は有し、配列番号14に示されるようなアミノ酸配列を含むか又は有する。合計で、Repタンパク質をコードする927ヌクレオチドのMSBI1 Rep遺伝子の686ヌクレオチド（開始コドンから終止コドンまで）がコドン使用を改善するために置換された。例えばヒトのコドン使用に対する最適適応を伴う完全なコドン使用は、1のコドン適応指数（CAI）によって記載され、これは全てのコドンがヒト発現に最適化されていることを示す。原初のMSBI1コード化Rep遺伝子について、ヒト系について0.67のCAIが計算され、これは0.8のCAIをはるかに下回っており、これは良好なコドン適応のためのより低い閾値と考えられる。MSBI1 rep遺伝子のコドン最適化後、0.94のCAIが最適化されたDNAについて計算され、これはヒト系にとってほぼ最適なコドン適応を示す。特に、めったに使用されない18個のコドンが変更され、それらのほとんどは、ヒト系において非常に低い使用頻度（10%未満）でロイシンをコードするコドンを表す。配列番号13のコドン最適化MSBI1配列対配列番号15の野生型MSBI1配列の配列アラインメントを図8に示す。

10

20

【0037】

上記のRep断片及びRep変異体を含む本発明のRepタンパク質は、古典的な化学合成によって調製することができる。合成は、均一溶液中又は固相中で行うことができる。本発明によるポリペプチドはまた、組換えDNA技術によっても調製することができる。本発明によるRepタンパク質の産生及び精製の例は、例1に示されている。

30

【0038】

本明細書で使用される「対象」は、マウス、畜牛、例えばウシ、サル、及びヒトを含む哺乳動物の個体又は患者を指す。好ましくは、対象はヒト患者である。

【0039】

本明細書で使用される「試料」は、液体試料及び固体試料を包含する生物学的試料を指す。液体試料は、例えば血清、血漿、及び脳脊髄液（CSF）などの血液液体を包含する。固体試料は、組織培養物又は生検標本などの組織試料を包含する。

【0040】

本明細書で使用される「と相関する」は、例えばMSの疾患状態と有意な相関関係を有する、それぞれ抗Rep抗体及びRepタンパク質の量、すなわちレベル又は力価を指す。相関関係は、試験される対象及び対照試料からの試料中に存在する量の差の程度を検出することによって決定される。「対照試料」とは、単一の試料又は様々な、すなわち2つより多い対照試料の平均を意味する。対照は、MSと診断されていない健康な個人から得られる。あるいは、相関関係は、所定のカットオフ値を用いて試験される対象について試料中に存在する量の差の程度を検出することによって理論的に決定され得る。カットオフ値は、異なる疾患状態間、例えば健康状態と病気の状態との間の統計的に有意な分離を伴う基準値である。カットオフ値は、当技術分野で既知の統計的試験による、病歴を有する患者からの試験試料及び健康な試験群からの試料の十分に大きなパネルの統計分析によって決定することができる。

40

【0041】

50

特定の実施形態では、例えばMSの診断は、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍、500倍、又は1000倍のタンパク質の増加量、すなわち対照試料と比較して、対象からの試料中のRepタンパク質及び抗Rep抗体それぞれによって示される。

【0042】

本明細書で使用される「抗Rep抗体」は、本発明の方法において検出可能なレベルでRepタンパク質に結合する抗体を指し、その親和性は、非Repタンパク質に対するよりも本発明のRepタンパク質に対してより強い。好ましくは、Repタンパク質に対する抗原親和性は、バックグラウンド結合よりも少なくとも2倍大きい。特に、抗Rep抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有するMSBI1 Rep又はMSBI2 Repに特異的である。特定の実施形態では、抗体は、MSBI1 Rep、MSBI2 Rep、CMI1 Rep、CMI2 Rep、及び／又はCMI3 Repに交差特異的である。特定の実施形態では、抗Rep抗体は、MSBI1 Rep、MSBI2 Rep、CMI1 Rep、CMI2 Rep、及び／又はCMI3 Repの少なくとも2つ、好ましくは全てに対して交差特異的であり、配列番号1の1～136のアミノ酸内のエピトープに結合する。

【0043】

全てのアッセイの共通の特徴は、Repタンパク質が、試料中に存在する任意のそのような抗体に結合することを可能にする条件下で、抗Repタンパク質抗体を含有すると推測される試料と接触することである。そのような条件は、典型的には、生理的温度、pH、及び過剰のRepタンパク質を使用するイオン強度である。Repタンパク質を試料とインキュベートした後、抗原を含む免疫複合体を検出する。特定の実施形態では、Repタンパク質がシグナル生成化合物、例えば、検出可能な標識と結合するか、又は、シグナル生成化合物に結合した追加の結合剤、例えば二次抗ヒト抗体が、免疫複合体を検出するために使用される。

【0044】

抗Rep抗体は、タンパク質抗原としてのRepタンパク質に基づくアッセイにおいて検出及び定量することができ、それは試料中に推測される哺乳動物、例えばヒトの抗体の標的として役立つ。好ましくは、Repタンパク質は、精製され（例えば例1参照）、試料は、例えば血清又は血漿試料であり得る。本方法は、マトリックス上へのRepタンパク質の固定化、続いて固定化Repタンパク質の試料とのインキュベーションを含む。最後に、Repタンパク質と試料の抗体との間に形成された免疫学的複合体のRep結合抗体は、シグナル生成化合物に結合された検出結合剤、例えば、HRP-基質に基づく定量化を可能にする二次HRP-（セイヨウワサビーペルオキシダーゼ）結合検出抗体によって定量される。このシグナル生成化合物又は標識は、それ自体が検出可能であるか、又は追加の化合物と反応して検出可能な生成物を生成し得る。

【0045】

他の実施形態では、抗Rep抗体は、最初に試料の抗体をマトリックス上に固定化し、続いて標識され得るか又はTagタンパク質を含み得る規定量のRepタンパク質とインキュベートすることによって間接的に定量され、マトリックス上に固定化されて存在する抗Rep抗体は、タンパク質-試料液体混合物からRepタンパク質を捕捉し、続いて結合Repタンパク質を定量する。

【0046】

他の実施形態では、Repタンパク質を細胞内で発現させることができ、これらの細胞を試料とインキュベートする。その後、細胞によって発現されたRepタンパク質に結合した試料からの抗Rep抗体を検出し定量する。

【0047】

イムノアッセイの設計は、かなり変動を受け、多くのフォーマットが当技術分野で既知である。プロトコルは、例えば、固体支持体又は免疫沈降を使用し得る。ほとんどのアッセイは、シグナル生成化合物、例えば標識抗体又は標識Repタンパク質に結合した結合

剤の使用を伴い、標識は、例えば、酵素分子、蛍光分子、化学発光分子、放射性分子、又は染料分子であり得る。免疫複合体からのシグナルを増幅するアッセイもまた既知であり、その例は、ビオチン及びアビジン又はストレプトアビジンを利用するアッセイ、並びに E L I S A アッセイなどの酵素標識及び媒介イムノアッセイである。

【0048】

イムノアッセイは、異種又は同種のフォーマットであり得、標準タイプ又は競合タイプであり得る。不均一フォーマットでは、ポリペプチド（R e p タンパク質又は抗 R e p 抗体）は、典型的には、インキュベーション後のポリペプチドからの試料の分離を容易にするために、固体マトリックス又は支持体又は担体に結合される。使用できる固体支持体の例は、ニトロセルロース（例えば、膜又はマイクロタイターウェル形態）、ポリ塩化ビニル（例えば、シート又はマイクロタイターウェル）、ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズ又はマイクロタイタープレート）、ポリフッ化ビニリデン（I m m u n o l o n として既知）、ジアゾ紙、ナイロン膜、活性化ビーズ、プロテイン A ビーズである。抗原性ポリペプチドを含有する固体支持体は、典型的には、それを試験試料から分離した後、結合した抗 R e p 抗体を検出する前に洗浄される。標準フォーマット及び競合フォーマットの両方が当技術分野において既知である。

【0049】

均一フォーマットでは、試験試料を溶液中の R e p タンパク質とインキュベートする。例えば、それは、形成される任意の R e p タンパク質-抗体複合体を沈殿させる条件下にあり得る。これらのアッセイのための標準フォーマット及び競合フォーマットの両方が当技術分野において既知である。

【0050】

標準フォーマットでは、抗体-R e p タンパク質複合体中の抗 R e p 抗体の量は、直接監視される。これは、抗 R e p 抗体上のエピトープを認識する（標識された）抗異種（例えば抗ヒト）抗体が複合体形成により結合するかどうかを決定することにより達成され得る。競合フォーマットでは、試料中の抗 R e p 抗体の量は、複合体中の既知量の標識抗体（又は他の競合配位子）の結合に対する競合効果を監視することによって推論される。

【0051】

抗 R e p 抗体（又は競合アッセイの場合には競合抗体の量）を含んで形成された複合体は、フォーマットに応じて、いくつかの既知の技術のいずれかによって検出される。例えば、複合体中の非標識抗 R e p 抗体は、標識（例えば、H R P などの酵素標識）と複合体を形成した抗異種 I g の接合体を使用して検出され得る。

【0052】

免疫沈降又は凝集アッセイフォーマットでは、R e p タンパク質と抗 R e p 抗体との間の反応は、溶液又は懸濁液から沈殿するネットワークを形成し、沈殿物の可視層又はフィルムを形成する。試料中に抗 R e p 抗体が存在しない場合、目に見える沈殿物は、形成されない。

【0053】

選択される固相は、ポリマービーズ又はガラスビーズ、ニトロセルロース、微粒子、反応トレイのマイクロウェル、試験管、及び磁気ビーズを含むことができる。シグナル生成化合物は、酵素、発光化合物、色原体、放射性元素、及び化学発光化合物を含むことができる。酵素の例としては、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（H R P）、及びβ-ガラクトシダーゼが挙げられる。エンハンサー化合物の例としては、ビオチン、抗ビオチン、及びアビジンが挙げられる。エンハンサー化合物結合メンバーの例としては、ビオチン、抗ビオチン、及びアビジンが挙げられる。

【0054】

さらなる実施形態では、本発明は、試料中の R e p タンパク質の増加量が神経変性疾患、例えば M S の診断又は素因と相関するか、又は疾患、例えば M S を監視するために、又は疾患、例えば M S の治療を監視するために使用される方法を提供する。そのような実施形態では、試料中の R e p タンパク質は、抗 R e p 抗体によって検出される。

【0055】

そのような方法は、

(a) 抗Rep抗体によって対象からの試料中のRepタンパク質の量を検出する工程、及び

(b) 対照試料中の量と比較して、工程(a)で対象からの試料中に検出されたRepタンパク質の量を神経変性疾患、例えばMSの診断と関連させる工程を含む。

【0056】

血清又は血漿試料中のRepタンパク質の検出のためのそのような方法において使用することができるアッセイの例としては、免疫沈降、免疫蛍光、ドットブロッキング、及びウエスタンブロットが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0057】

例えば、血清試料を試料中のRepタンパク質を捕捉するために抗Repタンパク質抗体とインキュベートし、続いてRepタンパク質を免疫沈降させる工程、その後SDS-PAGE及びウエスタンブロットにより検出する工程が行われ得る。

【0058】

さらなる例では、ドットブロット膜を血清とインキュベートし、続いてSDS-PAGE及びウエスタンブロットの工程が行われ得る。

【0059】

さらなる例では、試料の血清希釈をSDS-Pageに充填し、続いてウエスタンブロットする。

20

【0060】

さらなる実施形態では、Repタンパク質は、免疫組織化学的方法又は免疫蛍光顕微鏡法によって組織試料中に検出される。

【0061】

特定の実施形態では、抗Rep抗体は、試料中のRepタンパク質の検出又は捕捉のために使用される。

【0062】

「抗体」という用語は、好ましくは、異なるエピトープ特異性を有するプールされたポリクローナル抗体から本質的になる抗体、及び別個のモノクローナル抗体調製物に関する。本明細書で使用される場合、「抗体」(Ab)又は「モノクローナル抗体」(Mab)という用語は、無傷の免疫グロブリン分子並びにRepタンパク質に特異的に結合することができる抗体断片(例えば、Fab及びF(ab')₂断片など)を含むことを意味する。Fab及びF(ab')₂断片は、無傷の抗体のFc断片を欠いており、循環からより迅速に取り除かれ、無傷の抗体よりも非特異的でない組織結合を有し得る。したがって、これらの断片、及びFAB又は他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物が好ましい。さらに、本発明の目的に有用な抗体としては、キメラ、一本鎖、多機能(例えば二重特異性)、及びヒト化抗体、又はヒト抗体が挙げられる。

30

【0063】

特定の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、シグナル生成化合物と結合しており、例えば検出可能な標識を担持している。抗体又はその抗原結合断片は、例えば放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤、又は酵素で直接若しくは間接的に検出可能に標識することができる。当業者は、抗体に結合するための他の好適な標識が既知であるか、又は日常的な実験を使用してそれを確認することができる。

40

【0064】

抗Rep抗体は、好ましくは、当業者に周知の方法によって、配列番号1若しくは配列番号8のアミノ酸配列を有するRepタンパク質又はその断片に対して発生される(生成される)。

【0065】

特定の実施形態では、スモールスフィンクスゲノム(抗スモールスフィンクス様Rep

50

抗体又は抗 S S L R e p 抗体) の群からのいくつか又は全ての種類の R e p タンパク質に結合することができる抗 R e p 抗体を本発明の方法において使用する。そのような抗 S S L R e p 抗体は、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 2 2 9 からの R e p タンパク質の保存 N 末端領域内のエピトープに結合する。特定の実施形態では、配列番号 2 (配列番号 1 のアミノ酸 3 2 ~ 4 9) 又は配列番号 3 (配列番号 1 のアミノ酸 1 9 7 ~ 2 1 6) 内のエピトープに結合する抗 S S L R e p 型の抗 R e p 抗体が使用される。配列番号 2 及び配列番号 3 のペプチド断片は、スモールスフィンクスゲノムグループからの R e p タンパク質の間で高度に保存されており、それらの親水性のために露出されているように見える。抗 S S L R e p 型の抗 R e p 抗体は、例えばマウス若しくはモルモットを、配列番号 2 若しくは 3 に示すようなアミノ酸配列から本質的になるペプチドによって、又は配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 2 2 9 の保存 N 末端 R e p タンパク質領域に由来する、好ましくは少なくとも 8 ~ 1 5 個のアミノ酸を含む、他の免疫原性断片によって、免疫化することによって産生させ得る。

10

【0066】

さらなる実施形態では、M S B I 1 R e p タンパク質に特異的な抗 R e p 抗体が使用される。そのような抗体は、例えば、マウス又はモルモットなどの哺乳動物を、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する全長 R e p タンパク質で免疫化することによって産生され得る。

【0067】

好ましくは、本発明の方法は、例えば血液、血清、髄液、又は脳液などの異なる種類の体液中でピコグラムからフェムトグラムまでの範囲の R e p タンパク質を検出することができる抗 R e p 抗体を使用する。

20

【0068】

本発明の方法では、特定の種類の抗 R e p 抗体又は 2 種類以上の異なる種類の抗 R e p 抗体のプールのいずれかを使用してよい。異なる種類の抗 R e p 抗体のプールが使用される場合、抗 R e p 抗体プールは、R e p タンパク質の異なるドメイン、例えば第 1 の D N A 結合ドメイン (例えば、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 1 3 6) 、第 2 の D N A 結合ドメイン (例えば、配列番号 2 のアミノ酸 1 3 7 ~ 2 2 9) 、及び／又は可変ドメイン (例えば、配列番号 1 のアミノ酸 2 3 0 ~ 3 2 4) 、特に M S B I 1 R e p タンパク質 (配列番号 1) の異なるエピトープに結合する異なる抗 R e p 抗体を含み得る。

30

【0069】

さらなる実施形態では、抗 R e p 抗体は、R e p タンパク質について患者及び／又は健康な個体からのプローブのスクリーニングに使用される。例えば神経変性疾患の患者の組織中の R e p タンパク質の選択的検出は、試料中で検出された R e p タンパク質の分離された D N A ゲノムと試料が由来する患者の疾患との間の因果関係を示している。

【0070】

抗 R e p 抗体法による R e p タンパク質の検出のために、例えば、ウエスタンブロット、免疫蛍光顕微鏡法、又は免疫組織化学的方法などが適用され得る。

【0071】

特定の実施形態では、特定の細胞内局在で R e p タンパク質を検出することができる抗 R e p 抗体が使用される。例えば、抗 R e p 抗体は、細胞質、核膜、及び核中の R e p タンパク質を検出し得るか、又は細胞質中のスペckルを検出し得る。そのような抗 R e p 抗体群の例を表 1 に示す：

40

【0072】

【表 1】

抗体群	Repタンパク質局在	特異性	抗体	DSMZ寄託
A群	細胞質＋核膜(+核)	MSBI1＋スモールスフィンクス様	AB01 523-1-1	DSM ACC3327
B群	細胞質のスペckル	MSBI1＋スモールスフィンクス様	AB02 304-4-1	DSM ACC3328
C群	細胞質＋核膜(+核)	MSBI1固有	MSBI 1 381-6-2	DSM ACC3329
D群	細胞質のスペckル	MSBI1固有	D1:MSBI1 961-2-2 D2:MSBI1 761-5-1	DSM ACC3330

【0073】

10

A群の抗Rep抗体は、配列番号3に示されるアミノ酸配列（配列番号1のアミノ酸198～217）内にエピトープを有し、スモールスフィンクスゲノム群（例えばMSBI2、CMI1、CMI4）のこの保存されたエピトープを含むMSBI1 Repタンパク質及びRepタンパク質を検出することができる。免疫蛍光アッセイにおいて、そのような抗Rep抗体は、特異的Rep局在パターンを検出し、主な局在は、細胞質及び核膜にわたって均一に分布しており、核内には、追加の弱く均一に分布した局在が見られる。そのようなA群抗体の例は、例においてA群抗体として用いられた抗体AB01 523-1-1（DSM ACC3327）である。

【0074】

20

B群の抗Rep抗体は、配列番号2に示されるアミノ酸配列（配列番号1のアミノ酸33～50）内にエピトープを有し、スモールスフィンクスゲノム群（例えばMSBI2、CMI1、CMI4）のこの保存されたエピトープを含むMSBI1 Repタンパク質及びRepタンパク質を検出することができる。免疫蛍光アッセイにおいて、そのような抗Rep抗体は、Repタンパク質のスペckル（細胞質凝集体）（しばしば核膜の周辺にある）を特異的に検出する。そのようなB群抗体の例は、例においてB群抗体として用いられたAB02 304-4-1（DSM ACC3328）と命名された抗体である。

【0075】

30

C群の抗Rep抗体は、MSBI1（配列番号1）の構造的エピトープを特異的に検出する。免疫蛍光アッセイにおいて、そのような抗Rep抗体は、特異的Rep局在パターンを検出し、主な局在は、細胞質及び核膜にわたって均一に分布しており、核内には、追加の弱く均一に分布した局在が見られる。そのようなC群抗体の例は、例においてC群抗体として用いられた抗体MSBI1 381-6-2（DSM ACC3329）である。

【0076】

40

D群の抗Rep抗体は、MSBI1（配列番号1）の構造的エピトープを特異的に検出し、「D1」と命名された抗体MSBI1 961-2-2は、MSBI1のC末端ドメインにおいて配列番号9（アミノ酸配列281～287）に示されるエピトープを検出する。「D2」と命名された抗体MSBI1 761-5-1（DSM ACC3328）は、インビボ条件下で排他的にアクセス可能であり、ウエスタンブロットではアクセス不可能であるMSBI1の3D構造エピトープを検出する。免疫蛍光アッセイにおいて、そのような抗Rep抗体は、Repタンパク質のスペckル（細胞質凝集体）（しばしば核膜の周辺にある）を特異的に検出する。

【0077】

特定の実施形態では、A、B、C、若しくはD群の抗Rep抗体；又は少なくとも2つの異なるA、B、C、若しくはD群の抗Rep抗体の組み合わせを使用して、プローブ中のRepタンパク質局在化の種類及びそのようなRepタンパク質局在化が病原体機能と相関するか否かを決定する。例えば、スペckルが存在するか否かなどである。特定の実施形態、すなわち本発明の方法又はキットでは、A及びB群から選択される少なくとも1つの抗Rep抗体は、C及びD群から選択される少なくとも1つの抗Rep抗体と組み合

50

わされる。特定の実施形態、すなわち本発明の方法又はキットでは、A群の抗Rep抗体は、B、C、及びD群から選択される少なくとも1つのさらなる抗Rep抗体と組み合わせられる。例えば、A群の抗Rep抗体は、C群及びD群のさらなる抗Rep抗体と組み合わせてもよい。異なる群の抗Rep抗体のそのような組み合わせは、特にMSの診断に関して、診断評価の明確さを増大させる。これらのA、B、C、又はD群抗体は、MSの診断における使用に好ましい。

【0078】

以下の抗体は、2017年9月28日にドイツ微生物細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismen und Zellkulturen) (DSMZ) [ドイツ微生物細胞培養コレクション (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)] に寄託された：

DSMZ ACC3327に基づく抗体AB01 523-1-1；

DSMZ ACC3328に基づく抗体AB02 304-4-1；

DSMZ ACC3329に基づく抗体MSBI1 381-6-2；

DSMZ ACC3330に基づく抗体MSBI1 761-5-1。

抗体MSBI1 961-2-2は、2017年10月6日にDSMZに寄託された。

【0079】

さらなる実施形態では、MSの診断に使用するためのキットが提供される。キットは、抗Rep抗体及び／又はRepタンパク質を検出するための材料を、MSの診断のためのアッセイにおける材料の使用のための説明書と共に含み得る。キットは、以下の構成要素：本発明によるバイオマーカー、すなわち、Repタンパク質及び抗Rep抗体、例えば、それぞれ表1の抗体；シグナル生成化合物、捕捉剤を付着させるための固体マトリックス、試料用の希釈剤、洗浄緩衝液のうちの1つ以上を含み得る。シグナル生成化合物は、本発明のバイオマーカーに結合することができる追加の結合剤に結合しているか、又は本発明のバイオマーカーと直接結合しているかのいずれかである検出可能な標識を指す。

【0080】

以下の例により本発明をさらに説明するが、これらに限定されない。

【0081】

例1：

MSBI1 Repタンパク質精製

MSBI1ゲノム内で同定された全長Repオープンリーディングフレーム (ORF) をコードするヌクレオチド酸分子を、大腸菌高収率無細胞インビトロ翻訳系 (Expressway (商標) 無細胞大腸菌発現システム、Invitrogen) に基づくタンパク質発現を可能にする発現プラスミド (pEXP5-CT、Invitrogen) にクローニングする。インビトロ翻訳反応内で配列番号1のアミノ酸配列を有する合成Repタンパク質を、100mM NaH_2PO_4 、10mM Tris HCl 、pH8.0の5mMイミダゾールを含有する20反応容積の8M尿素試料緩衝液pH8.0を添加することによって変性させる。Repタンパク質は、その後、Repタンパク質に融合したC末端His₆-タグに基づく変性条件下 (洗浄用に20mMイミダゾール及びタンパク質溶出用に300mMイミダゾール) で精製される。精製の質は、クマシータンパク質染色及び抗Repタンパク質抗体を用いたウェスタンブロットティングによって決定される。Repタンパク質純度は、デンシトメトリーで計算され、95%以上である。精製タンパク質を直接ELISAに基づく血清スクリーニングに使用するか、又はSDS-Pageに供し、続いてニトロセルロース膜上に転写ブロットティングして、1Dサイズ分解Repタンパク質膜ストライプの血清インキュベーションを行う。

【0082】

例2：

血清マスタープレートの生成

血清試料を最初に等分して、試料の凍結融解サイクルを低減する。次いで、U字型96

10

20

30

40

50

ウェルプレート中、0.02% (w/v) アジ化ナトリウム最終濃度で安定化されたPBS pH7.2中に1:1希釈の血清を生成することによってマスタープレートを確立する。このプレートは、4℃で保管し、滅菌条件下で取り扱うと少なくとも2ヶ月間安定であり、個々のスクリーニング実験の前にさらなる血清希釈(1:20の最終希釈)のためのテンプレートとして使用される。

【0083】

例3:

1Dサイズ分解Repタンパク質膜ストライプの血清インキュベーションによる血清スクリーニング

1D分解Repタンパク質膜ストライプと血清とのインキュベーションに基づくスクリーニングアッセイのために、20μg精製Repタンパク質をSigma Tru-PAGE 4~20%プレキャストゲルに充填する。ゲルポケットを分離する壁は、ゲル充填の前に除去され、サイズマーカーのための1つの大きなポケット及び1つのポケットが生じる。1Dサイズ分解SDS-PAGE後、標準的な湿式/タンク転写プロットプロトコルを使用してタンパク質をニトロセルロース膜上に転写プロットする。その後、プロット膜上のタンパク質(約40kDaのランニングハイトにある全長Repタンパク質の本質的に1つのバンド)をPonceau Sで可視化して転写品質をチェックし、完全な1Dサイズ分解膜の幅2mm及び高さ2mmの膜ストライプのカットを準備する。次いで、ストライプを各500μlの無血清ブロッキング試薬(Genetex Tridentユニバーサルブロッキング試薬)で1時間ブロッキングする。その後、血清は、2つの異なる血清希釈に基づいて特徴付けられる。血清インキュベーションを4℃で14時間(一晚)線形振盪装置で実行する。その後、膜ストリップを室温で3×5分間、PBS-T pH7.2の0.1%Tween-20で洗浄する。血清内のRep特異的結合ヒトIgGの検出は、HRP結合ヤギ抗ヒトIgG(H+L)二次抗体と室温で1時間インキュベートすることによって行われる。室温で3×5分間、PBS-T pH7.2の0.1%Tween-20で3回洗浄した後、各個々の血清インキュベーションのストリップをプラスチックホイル上にテープで固定する。次いで、ホイルをECL基質(BioRad Clarity)とインキュベートして、BioRad Western Blot検出システムで結合ヒトIgGを可視化する。タンパク質膜上のRepバンドに特異的に結合するIgGの量に対応するシグナルをデンシトメトリーによって定量する。

【0084】

1Dサイズ分解Repタンパク質膜ストライプの結果の例を図1に示し、血清陽性血清/血漿試料の定量化を表2に示す: 血清試料のほぼ50%が両方の希釈(1:500及び1:2000)に対して非常に強いシグナルを与え、21個のうち3個だけが完全に陰性であった。血漿対照のうち、7個の試料が1:500希釈で中間シグナルを与え(非常に低いシグナルを有するいくつかの追加のもの)、一方1:2000希釈では3個の試料のみが非常に弱いシグナルを与えたが、他の全ては、血清陰性であった。全ての定量化は、MS-血清強度が対照血漿強度と比較したとき少なくとも30倍過剰のシグナルを示す傾向を維持する。

【0085】

【表2】

血清希釈	血清陽性試料数	
1:2000	17	3
1:500	21	8
MS血清	対照血漿	

表2: 血清陽性血清/血漿試料の定量化。

【0086】

Rep特異的ヒトIgGを検出した血清／血漿を、MS血清プール及び健常対照血漿プール（それぞれ合計21個）について、血清／血漿希釈1：500及び1：2000のシグナル強度に従って計数した。血清試料のほぼ50％が両方の希釈（1：500及び1：2000）に対して非常に強いシグナルを与え、21個のうち3個のみが完全に陰性であった。血漿対照のうち、7個の試料が1：500希釈で中間シグナルを与え（非常に低いシグナルを有するいくつかの追加のもの）、一方1：2000希釈では3個の試料のみが非常に弱いシグナルを与えたが、他の全ては、血清陰性であった。全ての定量化は、MS－血清強度が対照血漿強度と比較したとき少なくとも30倍過剰のシグナルを示す傾向を維持する。

【0087】

例4：

ELISAによる血清スクリーニング

適量の精製Repタンパク質（通常、1ウェルあたり50～200ng）を、Maxisorp 96ウェルELISAプレート（Fisher Scientific）に予め分注した8M尿素pH8.0とPBS pH7.2との1：1混合物に添加する。タンパク質を線形振盪装置上で4℃で14時間プレートマトリックスに結合させる。次いで、プレートをPBS-T pH7.2の0.1%Tween-20によって室温で3×5分間洗浄し、続いて4℃で少なくとも14時間、0.02%アジ化ナトリウムを最終的に含有するPBS pH7.2の1%（w/v）BSAでブロックする。その後、血清を1：500の希釈で添加し、インキュベーションを室温で6時間実行する。その後、プレートをPBS-T pH7.2の0.1%Tween-20によって室温で3×5分間洗浄する。血清内のRep特異的結合ヒトIgGの検出は、HRP結合ヤギ抗ヒトIgG（H+L）二次抗体と室温で1時間インキュベートすることによって行われる。室温でPBS-T pH7.2の0.1%Tween-20で3×5分間3回洗浄した後、100μlのTMB（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン、HRP感受性）基質溶液をウェルごとに添加して、室温で5分インキュベートする。100μlの8M酢酸／1M硫酸を添加して反応を停止させる。シグナル強度は、450nmで吸光度を測定することにより、Perkin Elmer ELISA適合装置で定量化される。

【0088】

ELISAスクリーニングに基づくRep特異的血清反応の定量化の例の結果を図2に示す：定量化は、シグナル強度とRepタンパク質（抗原）の量との良好な相関関係を明らかにする。平均して、MSプールのシグナル強度レベルは、対照プールの強度を少なくとも1.9倍上回る。一般に、ELISAに基づく血清スクリーニングは、少なくとも1：1000の血清希釈について検出可能な血清抗体を明らかにし（データは示さず）、そのためこの実験の力価は、1：2000～1：4000の領域で1：1000以上、又はプラットフォームの最適化後はさらに高くなる可能性がある。

【0089】

例5：

免疫蛍光分析

HEK293TT細胞（125,000／ウェル）を、DMEM 10%FCS（1×Glutamax（Gibco）及び1×非必須アミノ酸（Gibco）を補充した）中の免疫蛍光8ウェルチャンバー中で24時間培養し、続いて自己蛍光マーカータンパク質ZsGreenを発現する対照プラスミドZsGreen1CI（Clontech）、又はZsGreen-Rep融合タンパク質をコードする3'末端に全長MSBI1 Rep ORFを有する同じプラスミドのいずれかのポリエチレンイミン（PEI）によりDNAトランスフェクションを行った。DNAトランスフェクションの48時間後、細胞をPBSで洗浄し、室温で20分間4%PFA PBSを用いて室温で固定し、振盪装置上で室温にて10分間PBS 0.5%Triton X-100で透過処理した。細胞をPBSで洗浄し、ブロックをPBS 1%BSAで室温にて45分間実行した。マウスモノクローナル抗Rep抗体（表1参照）とのインキュベーションを、1：500抗

10

20

30

40

50

体希釈を含むPBS 1%BSA（一次抗体を欠く対照を含めた）中で37℃にて1時間実行した。細胞をPBSで3回洗浄した後、PBS 1%BSAと室温で15分間インキュベートした。次いで、二次抗体（AlexaFluor546ヤギ抗マウス、1:500；DNAマーカーHoechst 33342、1:5,000）とのインキュベーションを、PBS 1%BSA中、室温で45分間実行した。カバースリップ（Dakoマウント培地）でマウントする前に、細胞をPBS 1%BSAで3回及びPBSで3回洗浄した。免疫蛍光画像をZeiss Cell Observerで撮影した（対物レンズ20倍、試料及び対照デュプレットの固定露光時間）。

【0090】

免疫蛍光画像（図4）は、A群及びC群の抗体による抗体処理が、凝集体の検出なしに細胞質＋核膜（＋核）局在化標的タンパク質の特異的検出をもたらすことを示す。対照的に、B群及びD群の抗体は、スペckルタンパク質と特異的な共局在を示し、0～弱レベルの細胞質シグナルを示す。ZsGreen融合タンパク質単独での抗体の対照インキュベーションは、有意なシグナル検出をもたらさなかった（抗体シグナルの可視化に使用されたのと同じ曝露時間）。

【0091】

例6：

免疫蛍光分析

HEK293TT細胞（125,000／ウェル）を、DMEM 10%FCS（1×Glutamax（Gibco）及び1×非必須アミノ酸（Gibco）を補充した）中の免疫蛍光8ウェルチャンバー中で24時間培養し、続いて自己蛍光マーカータンパク質ZsGreenを発現する対照プラスミドZsGreen1CI（Clontech）、又はZsGreen-Rep融合タンパク質をコードする3'末端に全長CMI1 Rep ORFを有する同じプラスミドのいずれかのポリエチレンイミン（PEI）によりDNAトランスフェクションを行った。DNAトランスフェクションの48時間後、細胞をPBSで洗浄し、室温で20分間4%PFA PBSを用いて室温で固定し、振盪装置上で室温にて10分間PBS 0.5%Triton X-100で透過処理した。細胞をPBSで洗浄し、ブロッキングをPBS 1%BSAで室温で45分間実行した。マウスモノクローナル抗Rep抗体（表1）とのインキュベーションを、1:500抗体希釈を含むPBS 1%BSA（一次抗体を欠く対照を含めた）中で37℃にて1時間実行した。細胞をPBSで3回洗浄した後、PBS 1%BSAと室温で15分間インキュベートした。次いで、二次抗体（AlexaFluor546ヤギ抗マウス、1:500；DNAマーカーHoechst 33342、1:5,000）とのインキュベーションを、PBS 1%BSA中、室温で45分間実行した。カバースリップ（Dakoマウント培地）でマウントする前に、細胞をPBS 1%BSAで3回及びPBSで3回洗浄した。免疫蛍光画像をZeiss Cell Observerで撮影した（対物レンズ20倍、試料及び対照デュプレットの固定露光時間）。

【0092】

免疫蛍光画像（図5）は、A群抗体が、凝集物を検出することなく細胞質＋核膜（＋核）局在化標的タンパク質を特異的に検出するが、B群抗体は、細胞質局在化標的タンパク質のバックグラウンドが最小限であるスペckル標的タンパク質を検出することを示す。C群及びD群のMSBI1特異的抗体は、シグナルの特異的検出をもたらさない。抗体D1及びD2は、両方とも「D」群に属するが、わずかに異なるエピトープ認識を有する。

【0093】

例7：

免疫蛍光分析

HEK293TT細胞（125,000／ウェル）を、DMEM 10%FCS（1×Glutamax（Gibco）及び1×非必須アミノ酸（Gibco）を補充した）中の免疫蛍光8ウェルチャンバー中で24時間培養し、続いて対照プラスミドpcDNA3.1（-）（Invitrogen）又は全長MSBI1 Rep ORF（配列番号1

3) のコドン最適化変異体を発現する同じプラスミドのいずれかのポリエチレンジイミン (PEI) によるDNAトランスフェクションを行った。DNAトランスフェクションの48時間後、細胞をPBSで洗浄し、室温で20分間4% PFA PBSを用いて室温で固定し、振盪装置上で室温にて10分間PBS 0.5% Triton X-100で透過処理した。細胞をPBSで洗浄し、ブロッッキングをPBS 1% BSAで室温で45分間実行した。マウスモノクローナル抗Rep抗体 (表1) とのインキュベーションを、1:500抗体希釈を含むPBS 1% BSA (一次抗体を欠く対照を含めた) 中で37℃にて1時間実行した。細胞をPBSで3回洗浄した後、PBS 1% BSAと室温で15分間インキュベートした。次いで、二次抗体 (Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス、1:500; DNAマーカー Hoechst 33342、1:5,000) とのインキュベーションを、PBS 1% BSA中、室温で45分間実行した。カバースリップ (Dakoマウント培地) でマウントする前に、細胞をPBS 1% BSAで3回及びPBSで3回洗浄した。免疫蛍光画像をZeiss Cell Observerで撮影した (対物レンズ20倍、試料及び対照デュプレットの固定露光時間)。

10

【0094】

免疫蛍光画像 (図6) は、A群及びC群の抗体による抗体処理が、凝集体の検出なしに細胞質+核膜 (+核) 局在化標的タンパク質の特異的検出をもたらすことを示す。対照的に、B群及びD群の抗体は、スペckルタンパク質と特異的な共局在を示し、0~弱レベルの細胞質シグナルを示す。ZsGreen融合タンパク質単独での抗体の対照インキュベーションは、有意なシグナル検出をもたらさなかった (抗体シグナルの可視化に使用されたのと同じ曝露時間)。

20

【0095】

例8:

ウエスタンブロット分析

HEK293TT (1, 5 Mio/6ウェル) を、DMEM 10% FCS (1× Glutamax (Gibco) 及び1×非必須アミノ酸 (Gibco) を補充したもの) 中の6ウェル細胞培養プレート中で24時間培養し、続いてN末端ZsGreenタグとの融合タンパク質として全長MSBI1、CMI1、又はMSBI2 Repタンパク質の過剰発現をコードするZsGreen1C1プラスミドのポリエチレンジイミン (PEI) によりDNAトランスフェクションを行った。DNAトランスフェクションの48時間後、細胞をPBSで洗浄し、トリプシン処理により脱着し、PBSで再度洗浄し、SDS-PAGE Laemmli緩衝液中で溶解した (98℃で5分間煮沸)。試料を1つの大きなポケットを有するプレキャスト12.5% SDS-PAGEゲル上に充填した。転写ブロット後、PBS 5% スキムミルクでブロッッキングした後、表1の異なるマウスモノクローナル抗体 (PBS 5% スキムミルク中1:1000希釈) とストライプを個々にインキュベートするために、膜の各2つのストライプを切断した。ストライプをPBS 0.1% Tween 20で3回洗浄し、HRP結合抗マウス二次抗体とインキュベートして、BioRad ChemiDoc装置上で異なるZsGreen-Rep融合タンパク質を検出する抗体のウエスタンブロット分析を可能にした。ZsGreen抗体 (OriGene、1:2000) とのインキュベーションに基づいて陽性対照検出を実行した。

30

40

【0096】

図7は、A群及びB群の抗体がMSBI1 Rep融合タンパク質に加えてCMI1及びMSBI2 Rep融合タンパク質を含む3つ全てのRep融合タンパク質を特異的に検出する一方、C群及びD群のMSBI1特異的抗体は、MSBI1のみを検出することを示している。抗体D2は、おそらく、SDS-PAGEにおける変性条件下で優勢ではない3D構造エピトープの検出に起因してWB陰性であり、ここでは試験されなかった。

【0097】

配列概要

【表 3 - 1】

配列 番号	シーケンス	
1	MSBI1. 176によってコードされるRepタンパク質のアミノ酸配列 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAIEARETGKGINANDPLTVHASSYINQ FNVERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDDTATV EIIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELICWRSTGKTPIIHELDE FRKRIGVLDTEYTRTDNLKMRVIELALKQINEHTDITASYEQHKKGRVITGFSFKF KHKKQNSDKTPKNSDSSPRIVKHSQIPTNIVKQPENAKMSDLEHRASRVTEIMR NRLSDRFKQGDESAIDMMKRIQSEIITDAIADQWESKLEEFVVF	10
2	Repペプチド断片のアミノ酸配列 EARETGKGINANDPLTVH	
3	Repペプチド断片のアミノ酸配列 KQINEHTDITASYEQHKKGRT	
4	His-Tag (2つの中性スタッファーアミノ酸を含む) GAHHHHHH	
5	T7-タグ MASMTGGQQMG	
6	FLAG-タグ DYKDDDDK	20
7	Strep-II-タグ WSHPQFEK	
8	MSBI2. 176によってコードされるRepタンパク質のアミノ酸配列 MSKLVVKDNALMNASYNLDLVEQRLILLAIEARESGKGINANDPLTVHA ESYINQFGVHRVTAYQALKDACDNLFARQFSYQSKSEKGNIQNHRSRWVS EIIYIDTEATVKIIFAPAIVPLITRLEEQFTKYDIEQISDLSSAYAIRLY ELICWRSTGKTPIIGLGEFRNRVGVLDSEYHRIAHLKERVIEHSIKQIN EHTDITATYEQHKKGRTITGFSFKFKQKKPKQAEIATETPKTATNDPDTT KPLTEPQIAKYSMILCKLGSISDLSNFPDYPAFANWIGNILRNPEKADEQ IAKRIFTALKTETDYSKKN	30
9	MSBI. 1特異的エピトープ NRLSDRF	
10	CMI1. 252によってコードされるRepタンパク質のアミノ酸配列 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYIN QFNVERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDDTAT VEIIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISELSSAYAVRLYELICWRSTGKTPIIDLTE FRKRLGVLDTEYTRTDNLKMRVIELGLKQINEHTDITASYEQHKKGRTITGFSFKF KQKKKTGAEMPKNSSPHIEKPSQIPANIAKQPENAKKDDLGHRAKITGLIMS NGLADRFKRGDESVIDMMKRIKEEITDTTADQWENKLEEFVIFQS	40

【表 3 - 2】

11	CMI2. 214によってコードされるRepタンパク質のアミノ酸配列 MSDLIVKDNALMNASYNLDLVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHAESYIN QFGVARQTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKRERGRANITSRWVSQIAYIDETAT VEVIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLICWRSTGKTPVIELA EFRKRLGVLNDEYTRSDNFKKWIIENPIKQINEHTDITASYEQHKKGRTITGFSFK FKQKKKTEPETPKNSDSSQRIEKPSQIPANIVKQPENANLSDLQHRASKITGLIMS NRLSDRFKQGDESIMQMMARIQSEITTDSDIADQWQSKLEEFVGVF	
12	CMI3. 168によってコードされるRepタンパク質のアミノ酸配列 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYIN QFNVERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKRERGRANITSRWVSQIAYIDETAT VEVIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLICWRSTGKTPVLDL TEFRKRLGVLDTEYTRTDNLKMRVIEQSLKQINKHTDITASYEQHKKGRTITGFSF KFKQKKKTEPETPKNNDSGVSKPKTVEIPAENVKQPKNTNLSBLEKRVRMITGAI AKNNLASRFQHGNEsplDMMKRIQSEITSDDETADLWQNKLESMGVF	10
13	DNA配列MSBI1 Repコドン最適化 ATGAGCGACCTGATCGTGAAAGACAATGCCCTGATGAACGCCTCCTACAACC TGGCACTGGTCGAACAGAGACTGATTCTGCTGGCTATCATCGAGGCAAGGGA GACCGGCAAGGGCATCAACGCCAATGACCCCTGACAGTGCACGCCAGCTCC TACATCAACCAGTTTAATGTGGAGCGCCACACCGCCTATCAGGCCCTGAAGG ACGCCTGCAAGGATCTGTTTGCCCGGCAGTTCAGCTACCAGGAGAAGCGGGA GAGAGGCAGGATCAACATCACAAGCAGATGGGTGTCCCAGATCGGCTATATG GACGATACCGCCACAGTGGAGATCATCTTTGCACCAGCAGTGGTGCCTCTGAT CACCAGGCTGGAGGAGCAGTTCACACAGTACGACATCGAGCAGATCTCCGGA CTGTCTAGCGCCTACGCCGTGCGCATGTATGAGCTGCTGATCTGTTGGCGGTC TACCGGCAAGACACCTATCATCGAGCTGGATGAGTTCCGCAAGCGGATCGGC GTGCTGGACACCGAGTACACCAGAACAGATAACCTGAAGATGAGAGTGATCG AGCTGGCCCTGAAGCAGATCAATGAGCACACCGATATCACAGCCTCTTATGA GCAGCACAAGAAGGGCCGCGTGATCACC GGCTTCAGCTTTAAGTTCAAGCAC AAGAAGCAGAACTCTGACAAGACACCAAAGAATAAGCGATTCTCTCCCCGG ATCGTGAAGCACAGCCAGATCCCTACCAACATCGTGAAGCAGCCAGAGAATG CCAAGATGTCCGACCTGGAGCACAGGGCATCTAGGGTGACAGGCGAGATCAT GAGAAATAGGCTGAGCGATCGGTTCAAGCAGGGCGACGAGTCCGCCATCGAT ATGATGAAGAGAATCCAGTCCGAGATCATCACCGACGCCATCGCCGATCAGT GGGAATCTAAACTGGAAGAGTTTGAGTTCGTGTTTGAGCACATCACCATCAT CATCACTGA	20
14	タンパク質配列MSBI1 Repコドン最適化 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAIIARETGKGINANDPLTVHASSYINQ FNVERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKRERGRINITSRWVSQIGYMDDTATV EIIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLICWRSTGKTPHIELDE FRKRIGVLDTEYTRTDNLKMRVIELALKQINEHTDITASYEQHKKGRVITGFSFKF KHKKQNSDKTPKNSDSSPRIVKHSQIPTNIVKQPENAKMSDLEHRASRVTGEIMR NRLSDRFKQGDESAIDMMKRIQSEITDAIADQWESKLEEFVGVFGA	30
		40

【表 3 - 3】

15	DNA配列MSBI1 Rep野生型 ATGAGCGATTTAATAGTAAAAGATAACGCCCTAATGAATGCTAGTTATAACTT AGCTTTGGTTGAACAGAGGTTAATTCTATTAGCAATCATAGAAGCGAGAGAA ACAGGCAAAGGGATTAATGCCAATGATCCTTTAACAGTTCATGCAAGTAGCT ATATCAATCAATTTAACGTAGAAAGGCATACGGCATATCAAGCCCTCAAAGA TGCTTGTAAGACTTGTTTGCCCGTCAATTCAGTTACCAAGAAAAGCGAGAAC GAGGACGAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTCGCAAATTGGCTATATGGAC GATACAGCAACCGTTGAGATTATTTTTGCCCCTGCGGTTGTTCTCTGATTAC ACGGCTAGAGGAACAGTTCACCCAGTACGATATTGAGCAAATTAGCGGTTTA TCGAGTGCATATGCTGTTTCGTATGTACGAACTGCTGATTTGTTGGCGTAGCAC AGGCAAAACACCAATTATTGAGCTAGACGAGTTTAGAAAGCGAATAGGTGTT TTAGATACTGAATACACTAGAACAGATAATTTAAAGATGCGAGTTATTGAATT AGCCCTAAAACAAATCAACGAACATACAGACATCACAGCAAGCTATGAACAA CACAAAAAAGGGCGAGTGATTACAGGATTCTCATTCAAGTTTAAGCACAAAGA AACAAAACAGCGATAAAACGCCAAAAAATAGCGATTCTAGCCACGTATCGT AAAACATAGTCAAATCCCTCCAACATTGTAAAACAGCCTGAAAACGCCAAAA TGAGCGATTTAGAACATAGAGCGAGCCGTGTTACAGGGGAAATAATGCGAAA TCGTCTGTCAGATCGGTTTAAACAAGGCGATGAATCAGCAATCGACATGATG AAACGTATTCAAAGTGAAATAATAACCGATGCAATAGCAGACCAGTGGGAAA GCAAACCTGGAGGAGTTTGGCGTGGTTTTTTAG
----	---

10

20

参考文献：

Funk, M., et al. (2014). "Isolation of protein-associated circular DNA from healthy cattle serum". *Genome Announc* 2(4)

Giraldo, R., et al. (2011). "RepA-WH1 prionoid: a synthetic amyloid proteinopathy in a minimalist host." *Prion* 5(2):60-64

Gunst, K., et al. (2014). "Isolation of bacterial plasmid-related replication-associated circular DNA from a serum sample of a multiple sclerosis patient." *Genome Announc* 2(4).

10

Lamberto, I., et al. (2014). "Mycovirus-like DNA virus sequences from cattle serum and human brain and serum samples from multiple sclerosis patients." *Genome Announc* 2(4).

Manuelidis L., 2011. "Nuclease resistant circular DNAs co-purify with infectivity in scrapie and CJD". *J. Neurovirol.* 17:131-145.

Torreira, E., et al. (2015). "Amyloidogenesis of bacterial prionoid RepA-WH1 recapitulates dimer to monomer transitions of RepA in DNA replication initiation." *Structure* 23(1):183-189

20

Whitley, C., et al. (2014). "Novel replication-competent circular DNA molecules from healthy cattle serum and milk and multiple sclerosis-affected human brain tissue." *Genome Announc* 2(4).

30

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0-1	Form PCT/RO/134 Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	CMS Online Filing Version CMS 1.14 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	International Application No.	PCT/EP2017/075774
0-3	Applicant's or agent's file reference	K 3610PCT
1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	22
1-2	line	25
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
1-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Date of deposit	28 September 2017 (28.09.2017)
1-3-4	Accession Number	DSMZDSM ACC3327
1-4	Additional Indications	
1-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
1-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	
2	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
2-1	page	22
2-2	line	26
2-3	Identification of deposit	
2-3-1	Name of depositary institution	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
2-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig, Germany
2-3-3	Date of deposit	28 September 2017 (28.09.2017)
2-3-4	Accession Number	DSMZDSM ACC3328
2-4	Additional Indications	
2-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
2-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	

10

20

30

40

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

3	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
3-1	page	22
3-2	line	27
3-3	Identification of deposit	
3-3-1	Name of depositary institution	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
3-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig, Germany
3-3-3	Date of deposit	28 September 2017 (28.09.2017)
3-3-4	Accession Number	DSMZDSM ACC3329
3-4	Additional Indications	
3-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
3-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	
4	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
4-1	page	22
4-2	line	28
4-3	Identification of deposit	
4-3-1	Name of depositary institution	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
4-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig, Germany
4-3-3	Date of deposit	28 September 2017 (28.09.2017)
4-3-4	Accession Number	DSMZDSM ACC3330
4-4	Additional Indications	
4-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
4-6	Separate Furnishing of Indications These indications will be submitted to the International Bureau later	

10

20

30

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

5	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
5-1	page	22
5-2	line	29
5-3	Identification of deposit	
5-3-1	Name of depositary institution	DSMZ Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
5-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B 38124 Braunschweig, Germany
5-3-3	Date of deposit	06 October 2017 (06.10.2017)
5-3-4	Accession Number	DSMZ
5-4	Additional Indications	
5-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
5-6	Separate Furnishing of Indications	
	These indications will be submitted to the International Bureau later	

10

20

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	YES
0-4-1	Authorized officer	Wilson, Patrick

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

30

【配列表フリーテキスト】

【0098】

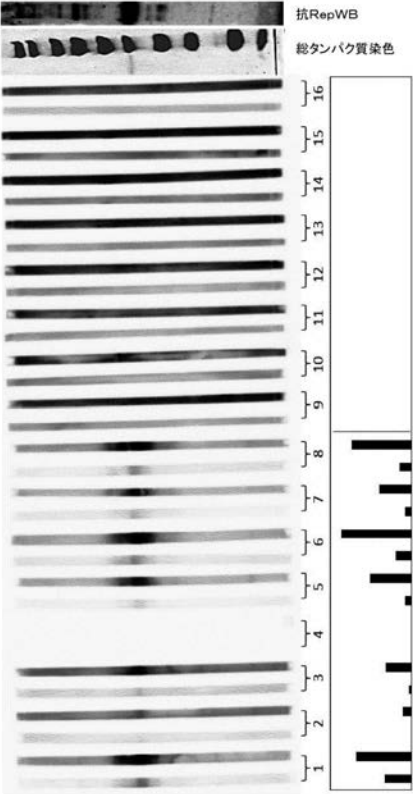
配列表1 <223>MSBI1 Repタンパク質
 配列表2 <223>Repペプチド
 配列表3 <223>Repペプチド
 配列表4 <223>Hisタグ
 配列表5 <223>T7タグ
 配列表6 <223>FLAGタグ
 配列表7 <223>Trep IIタグ
 配列表8 <223>MSBI2.176
 配列表9 <223>MSBI1エピトープ
 配列表10 <223>CMI1.252
 配列表11 <223>CMI2.214
 配列表12 <223>CMI3.168
 配列表13 <223>コドン最適化MSBI1
 配列表14 <223>MSBI1タンパク質

40

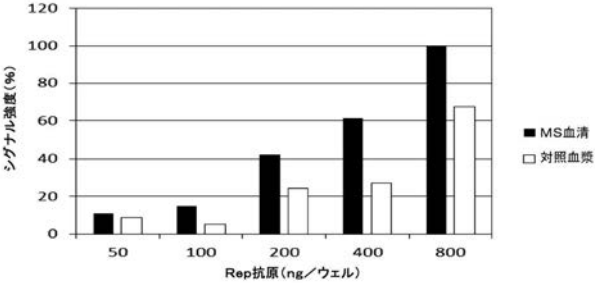
50

配列表 1 5 < 2 2 3 > M S B I 1 野生型

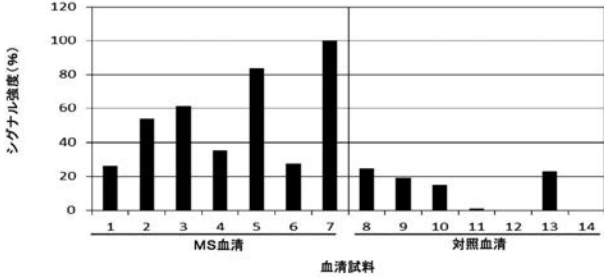
【 図 1 】



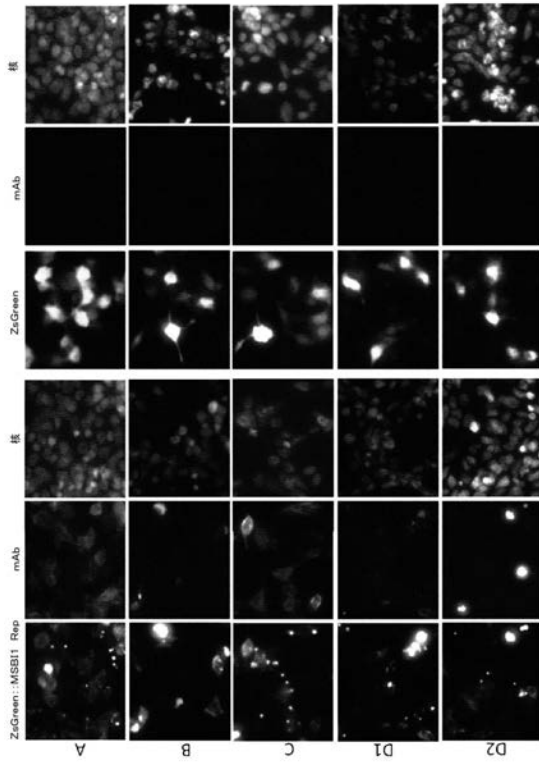
【 図 2 】



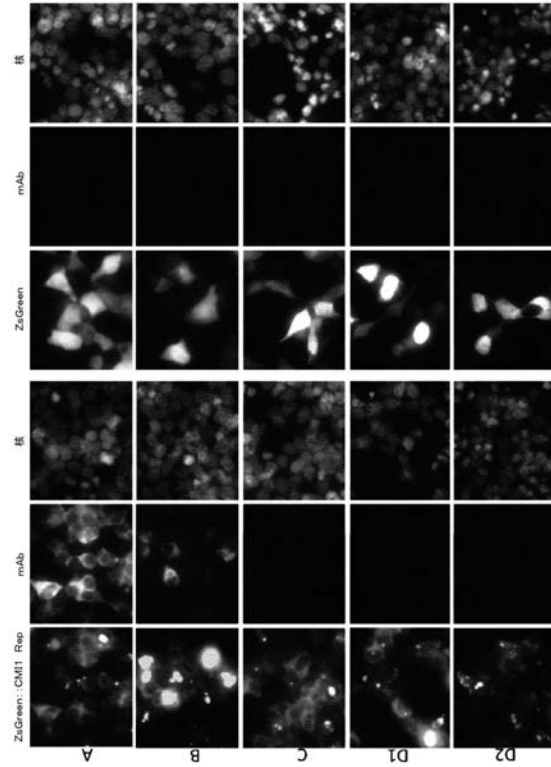
【 図 3 】



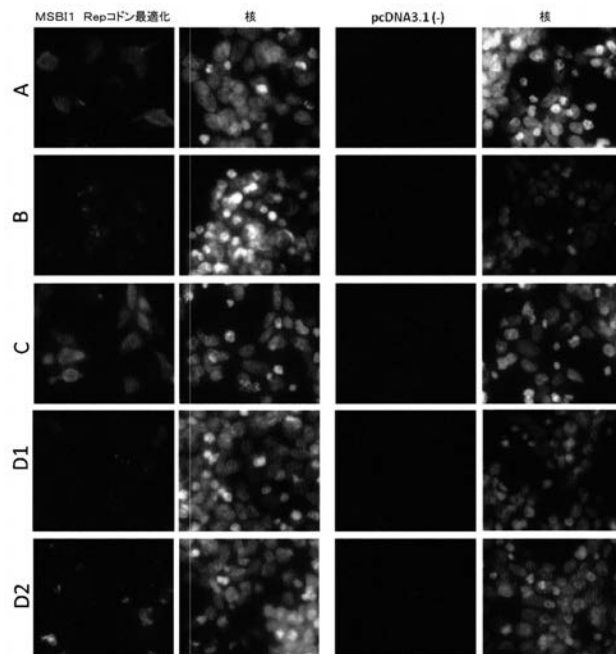
【図 4】



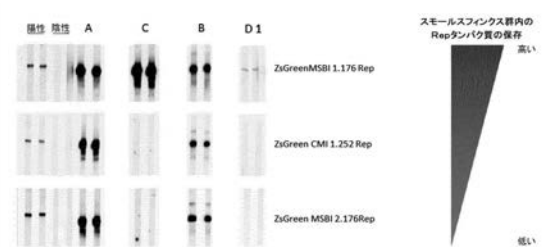
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

```

最通化      ATGAGCGACCTGATCGTGAAGACAATGCCCTGATGAACGCCCTCCTACAACTGGCACTG
オリジナル  ATGAGCGATTTAATAGTAAAGATAACGCCCTATGAATGCTAGTTATAACTTAGCTTTG
*****
最通化      GTCGAACAGAGACTGATTCTGTGGCTATCATCGAGGCAAGGAGACCGGCAAGGGCATC
オリジナル  GTTGAACAGAGGTTAATTCTATTAGCAATCATAGAAGCGAGAGAAACAGGCAAGGGGATT
*****
最通化      AACGCCAATGACCCCTGACAGTGCAGGCCAGCTCCTACATCAACCAAGTTTAATGTGGAG
オリジナル  AATGCCAATGATCCTTTACAGTTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTTACGTAGAA
*****
最通化      CGCCACACCGCCTATCAGGCCCTGAAGGACGCCCTGCAAGGATCTGTTTGGCCGGCAGTTC
オリジナル  AGGCATACGGCATATCAAGCCCTCAAGATGCTTGTAAAGACTTGTTCGCCGTCAATTC
*****
最通化      AGCTACCAGGAGAAGCGGGAGAGAGGAGGATCAACATCAACAGCAGATGGGTGTCCAG
オリジナル  AGTTACCAAGAAAAGCGAGAACGAGGAGCAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTCGCAA
*****
最通化      ATCGGCTATATGGACGATACCGCCACAGTGAGATCATCTTTGCACAGCAGTGTGCCT
オリジナル  ATTGGCTATATGGACGATACAGCAACCGTTGAGATTATTTTGGCCCTGCGGTTGTTCCT
*****
最通化      CTGATCACCAGGCTGGAGGAGCAGTTTACACAGTACGACATCGAGCAGATCTCCGGACTG
オリジナル  CTGATTACCGCTAGAGGAACAGTTTACCCAGTACGATATTGAGCAAATTAGCGGTTTA
*****
最通化      TCTAGCGCTACGCCGTGCGCATGTATGAGCTGCTGATCTGTTGGCGGTCTACCGGCAAG
オリジナル  TCGAGTGCATATGCTGTTGCTATGTACGAACTGCTGATTTGTTGGCGGTAGCACAGGCAAA
*****
最通化      ACACCTATCATCGAGCTGGATGAGTTCCGCAAGCGGATCGCGGTGCTGGACACCGAGTAC
オリジナル  ACACCAATTATTGAGCTAGACGAGTTTAGAAAGCGAATAGTGTGTTTAGATATGAAATAC
*****
最通化      ACCAGAACAGATAACCTGAAGATGAGAGTGATCGAGCTGGCCCTGAAGCAGATCAATGAG
オリジナル  ACTAGAACAGATAATTTAAGATGCGAGTTATTGAATTAGCCCTAAJAJAAATCAACGAA
*****
最通化      CACACCGATATCACAGCCTCTTATGAGCAGCACAGAAAGGCGCGGTGATCACCGGCTTC
オリジナル  CATACAGACATCACAGCAAGCTATGAACACACAAAAAGGCGAGTGATTACAGGATTTC
*****
最通化      AGCTTTAAGTTCAAGCACAAAGAGCAGAACTCTGACAAAGACACCAAAGAAATAGCAATTCC
オリジナル  TCATTCAAGTTTAAAGCACAAAGAAACAAAACAGCGATAAJAJGCGCAAAJATAGCAATTCT
*****
最通化      TCTCCCGGATCGTGAAGCACAGCCAGATCCCTACCAACATCGTGAAGCAGCCAGAGAAT
オリジナル  AGCCACGATCGTAAACATAGTCAATCCCTACCAACATTTGAAJAJAGCCTGAAJAJAC
*****
最通化      GCCAAGATGTCGACCTGAGCAGAGGCACTAGGGTGACAGGCGAGATCATGAGAAAT
オリジナル  GCCAAATGAGCGATTTAGACATAGAGCGAGCCGTGTTACAGGGGAAATATGCGGAAAT
*****
最通化      AGGCTGAGCGATCGGTTCAAGCAGGCGCAGAGTCCGCCATCGATATGATGAAGAGAAATC
オリジナル  CGTCTGAGATCGGTTTAAJAJAGGCGATGAATCAGCAATCGACATGATGAJAJGATTT
*****
最通化      CAGTCCGAGATCATCACCGACGCCATCGCCGATCAGTGGGAATCTAJAJCTGGAAGAGTTT
オリジナル  CAAAGTGAATAATAACCGATGCAATAGCAGACAGTGGGAJAJAJCTGGAAGAGTTT
*****
最通化      GGAGTCGTGTTGGAGCACATCACCATCATCACTGA
オリジナル  GCGTGGTTTTTAG-----
*****

```

【配列表】

2019536006000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年7月24日(2019.7.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

DNA複製関連(R e p)タンパク質又は前記R e pタンパク質に特異的な抗R e p抗体を含む、多発性硬化症(MS)の診断に使用するための医薬組成物であって、

前記R e pタンパク質が、

(i) 配列番号1に示されるアミノ酸配列；

(i i) 配列番号1の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異的な抗R e p抗体に結合することができる配列番号1の断片；又は

(i i i) (i)若しくは(i i)の前記アミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有し、かつ配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質に特異的な抗R e p抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む、医薬組成物。

【請求項2】

配列番号1の前記断片が、配列番号1のアミノ酸1～229からなる前記アミノ酸配列内のエピトープを含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記タンパク質が、配列番号13に示されるポリヌクレオチド酸によってコードされる

、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記抗 R e p 抗体が、配列番号 1 の 1 ～ 1 3 6、1 3 7 ～ 2 2 9、及び 2 3 0 ～ 3 2 4 のアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸配列内のエピトープに結合する、請求項 1 ～ 3 の何れか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記抗 R e p 抗体が、抗体 A B 0 1 5 2 3 - 1 - 1 (D S M A C C 3 3 2 7)、抗体 A B 0 2 3 0 4 - 4 - 1 (D S M A C C 3 3 2 8)、抗体 M S B I 1 3 8 1 - 6 - 2 (D S M A C C 3 3 2 9)、抗体 M S B I 1 7 6 1 - 5 - 1 (D S M A C C 3 3 3 0)、及び抗体 M S B I 1 9 6 1 - 2 - 2 からなる群から選択される、請求項 1 ～ 4 の何れか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記 R e p タンパク質が、固定化されている、請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記 R e p タンパク質が細胞内で発現している、請求項 1 ～ 5 の何れか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

抗体 A B 0 1 5 2 3 - 1 - 1 (D S M A C C 3 3 2 7)、抗体 A B 0 2 3 0 4 - 4 - 1 (D S M A C C 3 3 2 8)、抗体 M S B I 1 3 8 1 - 6 - 2 (D S M A C C 3 3 2 9)、抗体 M S B I 1 7 6 1 - 5 - 1 (D S M A C C 3 3 3 0)、及び抗体 M S B I 1 9 6 1 - 2 - 2 からなる群から選択される、抗 R e p 抗体。

【請求項 9】

対象における M S の診断を補助する方法であって、

- (a) 対象からの試料を R e p タンパク質又は抗 R e p 抗体とインキュベートする工程；
- (b) 前記 R e p タンパク質と免疫学的複合体を形成する前記対象からの前記試料中の抗体の量、或いは前記抗 R e p 抗体と免疫学的複合体を形成する前記対象からの前記試料中の R e p タンパク質の量を検出する工程を含む、方法。

【請求項 10】

対照試料中の量と比較して、少なくとも 2 倍の前記 R e p タンパク質又は前記抗 R e p 抗体の増加量を、M S と相関させる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

対照試料と比較して、少なくとも 5 倍の前記 R e p タンパク質又は前記抗 R e p 抗体の増加量を、M S と相関させる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 (a) において、前記 R e p タンパク質が固定化された後、前記固定化された R e p タンパク質を前記対象からの前記試料とインキュベートする、請求項 9 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

工程 (a) において、前記 R e p タンパク質を細胞内で発現させた後、前記細胞を前記対象からの前記試料とインキュベートする、請求項 9 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

工程 (a) において、前記対象からの前記試料中の前記抗体を固定化した後、規定量の R e p タンパク質とインキュベートする、9 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

工程 (b) において、前記 R e p タンパク質と免疫学的複合体を形成する抗体の量、或いは前記抗 R e p 抗体と免疫学的複合体を形成する R e p タンパク質の量が、シグナル生

成化合物と結合した検出結合剤によって定量される、9～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

前記対象からの前記試料が、血清又は血漿試料である、請求項9～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

患者におけるMSの診断を補助する方法であって、

配列番号2又は配列番号3に含まれるエピトープに結合する抗Rep抗体により、対象からの試料中のRepタンパク質の量を検出する工程を含む、方法。

【請求項18】

対照試料中のRepタンパク質の量と比較して、対象からの前記試料中に検出されたRepタンパク質の少なくとも2倍の増加量をMSと相関させる、請求項17に記載の方法。
°

【請求項19】

対照試料中のRepタンパク質の量と比較して、少対象からの前記試料中に検出されたRepタンパク質の少なくとも5倍の増加量をMSと相関させる、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記Repタンパク質に特異的な抗体が、配列番号1の1～136、137～229、及び230～324のアミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸配列内のエピトープに結合する、請求項17～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

対象からの前記試料が、血清試料、血漿試料、又は組織試料からなる群から選択される、請求項17～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項22】

MSの診断に使用するためのキットであって、

(a) Repタンパク質であって、前記Repタンパク質が、

(i) 配列番号1に示されるアミノ酸配列；

(ii) 配列番号1の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異性を有する抗Rep抗体に結合することができる配列番号1の断片；又は

(iii) (i)若しくは(ii)の前記アミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有し、かつ配列番号1の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異性を有する抗Rep抗体に結合することができるアミノ酸配列を含む、Repタンパク質、

(b) 検出可能な標識に結合し、配列番号1の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異性を有する抗Rep抗体に結合することができる抗ヒト抗体、及び

(c) 血清又は血漿試料中に推測される配列番号1の前記アミノ酸配列を有するタンパク質に特異性を有する(a)によるRepタンパク質又は抗Rep抗体を固定化するのに好適な固体マトリックスを含む、キット。

【請求項23】

酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素免疫検定法(EIA)、蛍光免疫検定法(FIA)、ルミネセンスイムノアッセイ(LIA)、及びストリップアッセイからなる群から選択されるアッセイに使用するための請求項16に記載のキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/075774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, 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	EP 2 966 176 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]) 13 January 2016 (2016-01-13) par 0066-0069, 0078-0090, 0069; cl 1, 5-9, 12. -----	1-17
X	EP 2 868 751 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]) 6 May 2015 (2015-05-06) 0047, 0056-0066; cl 1-11. -----	1-12
A	I. LAMBERTO ET AL: "Mycovirus-Like DNA Virus Sequences from Cattle Serum and Human Brain and Serum Samples from Multiple Sclerosis Patients", GENOME ANNOUNCEMENTS, vol. 2, no. 4, 28 August 2014 (2014-08-28) , pages e00848-14, XP055168024, DOI: 10.1128/genomeA.00848-14 the whole document ----- -/-	1-17

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

* Special categories of cited documents:

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

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2018

Date of mailing of the international search report

26/01/2018

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Motrescu-Hateley, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/075774

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	K. GUNST ET AL: "Isolation of Bacterial Plasmid-Related Replication-Associated Circular DNA from a Serum Sample of a Multiple Sclerosis Patient", GENOME ANNOUNCEMENTS, vol. 2, no. 4, 28 August 2014 (2014-08-28), pages e00847-14, XP055340230, DOI: 10.1128/genomeA.00847-14 the whole document -----	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/075774

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2966176	A1	13-01-2016	AU 2015287139 A1 02-02-2017
		CA 2954541 A1	14-01-2016
		EP 2966176 A1	13-01-2016
		EP 3167078 A2	17-05-2017
		JP 2017522869 A	17-08-2017
		US 2017198018 A1	13-07-2017
		WO 2016005054 A2	14-01-2016

EP 2868751	A1	06-05-2015	AU 2014344236 A1 17-03-2016
		CA 2922872 A1	07-05-2015
		EP 2868751 A1	06-05-2015
		EP 3063298 A2	07-09-2016
		JP 2017500883 A	12-01-2017
		US 2016244492 A1	25-08-2016
		WO 2015062726 A2	07-05-2015

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N
2. T R I T O N

(72)発明者 デ ヴィリエール、エテル — ミケーレ
ドイツ連邦共和国、ヴァルトミヒェルバッハ、アイヒェンシュトラーセ 1

(72)発明者 ブント、ティモ
ドイツ連邦共和国、ドッセンハイム、ブッヒェンヴェク 3

(72)発明者 エイレブレヒト、セバスチャン
ドイツ連邦共和国、エスローエ、イム ヴェステンフェルト 1 4

Fターム(参考) 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA13
4H045 AA30 BA10 CA40 DA76 EA21 EA22 EA50 FA74

專利名称(译)	Rep蛋白作为蛋白质抗原用于诊断测定		
公开(公告)号	JP2019536006A	公开(公告)日	2019-12-12
申请号	JP2019519006	申请日	2017-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	德国癌症研究公共权益基金会		
申请(专利权)人(译)	Doitchesu 约扫描文件夹中顺集团曾托时间		
发明人	ツア ハオゼン、ハラルト デ ヴィリエール、エテル - ミケーレ ブント、ティモ エイレブレヒト、セバスチャン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K14/47 C12N15/12 C12P21/02		
CPC分类号	G01N33/502 G01N33/53 G01N33/564 G01N2800/285 G01N33/6896 C07K16/18 G01N33/563 G01N33/577 G01N33/6857 G01N2496/80		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C07K16/18 C07K14/47 C12N15/12 C12P21/02.C		
F-TERM分类号	4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2016193119 2016-10-10 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于诊断多发性硬化症 (MS) 的DNA复制相关 (Rep) 蛋白，包括： (a) 与对照样品相比，来自受试者的样品中的Rep蛋白或其片段。与对照样品中的量相比，受试者样品中具有抗原的抗Rep蛋白抗体的量增加或增加的量与MS的诊断相关，并且Rep蛋白是MSBI1 Rep或MSBI2 Rep 已经描述了DNA复制相关 (Rep) 蛋白。

(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2019-536006 (P2019-536006A)
		(43) 公表日 令和1年12月12日 (2019. 12. 12)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考) 4 B 0 6 4 4 H 0 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01) C O 7 K 16/18 (2006.01) C O 7 K 14/47 (2006.01) C 1 2 N 15/12 (2006.01) C 1 2 P 21/02 (2006.01)	G O 1 N 33/53 C O 7 K 16/18 C O 7 K 14/47 C 1 2 N 15/12 C 1 2 P 21/02	Z N A D C
		審査請求 有 予備審査請求 有 (全 36 頁)
(21) 出願番号 特願2019-519006 (P2019-519006) (22) 出願日 平成29年10月10日 (2017. 10. 10) (3) 翻訳文提出日 令和1年5月30日 (2019. 5. 30) (8) 国際出願番号 PCT/JP2017/075774 (9) 国際公開番号 WO2018/068296 (10) 国際公開日 平成30年4月19日 (2018. 4. 19) (11) 優先権主張番号 16193119.1 (12) 優先日 平成28年10月10日 (2016. 10. 10) (13) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 512151403 ドイツ・クレプスフォルシュング スツェントルム DEUTSCHES KREBSFORS CHUNGSZENTRUM ドイツ連邦共和国 69120 ハイデル ベルク・イム・ノイエンハイマー・フェル ト 280 (74) 代理人 110000855 特許業務法人遠村特許事務所 ツア ハオゼン、ハラルト (72) 発明者 ドイツ連邦共和国、ヴァルトミヒェルバッ ハ、アイヒェンシュトラッセ 1	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 診断アッセイに使用するためのタンパク質抗原としてのREPタンパク質		