

(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2012-517017

(P2012-517017A)

(43) 公表日 平成24年7月26日(2012.7.26)

(51) Int.Cl.

**G01N 33/574** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**C07K 14/025** (2006.01)

F 1

G01N 33/574  
G01N 33/53  
C07K 14/025

Z  
D  
Z N A

テーマコード(参考)

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 124 頁)

(21) 出願番号 特願2011-549163 (P2011-549163)  
(86) (22) 出願日 平成22年2月5日 (2010.2.5)  
(85) 翻訳文提出日 平成23年9月26日 (2011.9.26)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2010/000342  
(87) 国際公開番号 WO2010/090757  
(87) 国際公開日 平成22年8月12日 (2010.8.12)  
(31) 優先権主張番号 61/150,310  
(32) 優先日 平成21年2月5日 (2009.2.5)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 592221528  
バイオジエン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ケンブリッジセンター 14  
(74) 代理人 100078282  
弁理士 山本 秀策  
(74) 代理人 100062409  
弁理士 安村 高明  
(74) 代理人 100113413  
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 JCポリオーマウイルスの検出のための方法

## (57) 【要約】

対象が、正常ICVと比較してシアル酸に対する低下した結合を有するICVバリアントを持っているかどうかを判定することによって、免疫調節剤で治療されている対象を含む対象が、PMLのリスクがあるかどうかを判定するための方法および組成物を提示する。さらに、PMLと関連し、PMLに感受性がある対象、PML(例えば、初期段階のPML)を患う対象、または免疫抑制治療に応答してPMLを発症するリスクがある対象を特定するためのアッセイの基準として使用することができる、JCV-VPI配列変異の組み合わせを提供する。

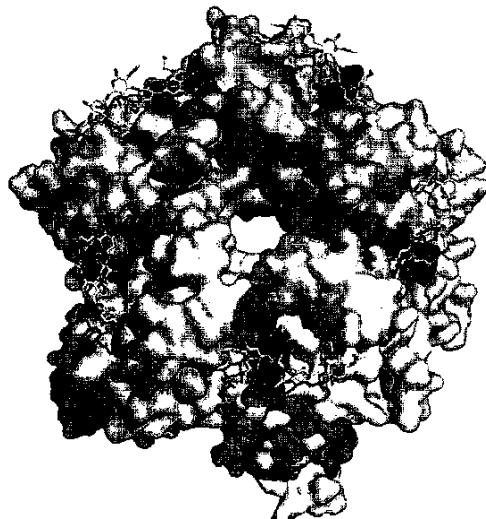


Fig. 5A

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アミノ酸残基 1 2 2 の置換を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、対象からの生体試料を調査することを含み、

前記対象は、前記試料が、前記少なくとも 1 つの兆候を含む場合、P M L に対する感受性が増加していると判定される、方法。

**【請求項 2】**

アミノ酸残基 2 および 6 6 のうちの少なくとも 1 つの置換を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、前記生体試料を調査することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。 10

**【請求項 3】**

前記試料は、アミノ酸残基 2 、 6 6 、および 1 2 2 のうちの少なくとも 1 つの置換を有するバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のそれぞれの、少なくとも 1 つの兆候を検出することが可能なアッセイを用いて調査され、前記対象は、前記試料が、前記バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のうちの少なくとも 1 つの少なくとも 1 つの兆候を含む場合、P M L に対する感受性が増加していると判定される、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

アミノ酸断片 5 0 ~ 5 1 、 5 4 ~ 5 5 、および 1 2 3 ~ 1 2 5 のうちの 1 つまたはそれ以上の欠失を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、前記生体試料を調査することをさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。 20

**【請求項 5】**

前記試料は、アミノ酸断片 5 0 ~ 5 1 、 5 4 ~ 5 5 、および 1 2 3 ~ 1 2 5 のうちの少なくとも 1 つの欠失を有するバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のそれぞれの、少なくとも 1 つの兆候を検出することが可能なアッセイを用いて調査され、前記対象は、前記試料が、前記バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のうちの少なくとも 1 つの少なくとも 1 つの兆候を含む場合、P M L に対する感受性が増加していると判定される、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

低シアル酸結合を有する疑いがあるバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、前記生体試料を調査することをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。 30

**【請求項 7】**

アミノ酸残基 5 5 、 6 0 、 2 6 5 、 2 6 7 、および 2 6 9 のうちの少なくとも 1 つの置換を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、前記生体試料を調査することをさらに含む、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 8】**

前記試料は、アミノ酸残基 5 5 、 6 0 、 2 6 5 、 2 6 7 、および 2 6 9 のうちの少なくとも 1 つの置換を有するバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のそれぞれの、少なくとも 1 つの兆候を検出することが可能なアッセイを用いて調査され、前記対象は、前記試料が、前記バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のうちの少なくとも 1 つの少なくとも 1 つの兆候を含む場合、P M L に対する感受性が増加していると判定される、請求項 7 に記載の方法。 40

**【請求項 9】**

前記生体試料は、血液試料である、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 10】**

前記生体試料は、C S F 試料である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 11】**

前記生体試料は、尿試料である、請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の方法。 50

**【請求項 1 2】**

前記対象は、野生型 J C V に以前に感染したことがあることが知られている、請求項 1 ~ 1 1 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 1 3】**

前記対象からの新しい生体試料が、毎年少なくとも 2 回、少なくとも 1 つのバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について調査される、請求項 1 2 に記載の方法。

**【請求項 1 4】**

バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候の検出を用いて、前記対象が免疫抑制治療に不適当であることを特定する、請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法。 10

**【請求項 1 5】**

バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候の検出を用いて、前記対象に対する免疫抑制治療の修正を勧告する、請求項 1 ~ 1 4 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 1 6】**

バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の兆候の不在を用いて、前記対象が免疫抑制治療に適していることを特定する、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 1 7】**

バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の兆候の不在を用いて、前記対象が継続して行う免疫抑制治療に適していることを特定する、請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法。 20

**【請求項 1 8】**

前記生体試料は、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質に対して特異的な抗体の存在について調査される、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 1 9】**

生体試料は、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の存在について調査される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 2 0】**

前記生体試料は、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の存在について調査される、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の方法。 30

**【請求項 2 1】**

前記生体試料は、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質をコードする核酸配列の存在について調査される、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 2 2】**

前記生体試料は、E L I S A に基づく分析を用いて調査される、請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****関連出願**

本出願は、2 0 0 9 年 2 月 5 日に出願された、名称「M e t h o d s f o r t h e D e t e c t i o n o f J C P o l y o m a V i r u s」の米国仮出願第 6 1 / 1 5 0 , 3 1 0 号からの、3 5 U . S . C . § 1 1 9 ( e ) 下の恩典を主張し、この開示は、参照することによって本明細書に組み込まれる。 40

**【0 0 0 2】**

本発明は、ヒト J C ポリオーマウイルスウイルスの検出のための方法、進行性多病巣性白質脳症 ( P M L ) の診断、および P M L に対する治療薬の開発に関する。

**【背景技術】****【0 0 0 3】**

10

20

30

40

50

ヒトにおけるJCポリオーマウイルス（JCV）感染は、中枢神経系の脱髓疾患である、進行性多病巣性白質脳症（PML）を引き起こし得る。しかしながら、JCV感染は、通常、健常対象においてはPMLをもたらさない。JCV感染は、広範囲にわたってPMLを引き起こすことなく、多くのヒト集団に蔓延している。PMLは、一般的に、弱体化した免疫系をさらに有する、JCVに感染した対象にのみ発症する。疾患または免疫抑制治療により免疫不全をきたした対象は、JCV感染に伴うPMLになりやすい可能性がある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

10

本発明の態様は、対象が、PMLに感受性があるかどうかを判定するための方法および組成物に関する。特に、本発明は、対象の免疫系が損なわれているか、または抑制されている場合、対象がPMLを発症するリスクがあるかどうかを判定するための方法および組成物を提供する。例えば、本発明の態様は、JCV感染によって引き起こされるPMLの発症に関する対象のリスクプロファイルを判定することによって、対象が免疫抑制剤を用いた最初の、または継続される治療に適しているかどうかを判定することに関する。

【0005】

20

ヒトゲノムは、個人の生涯の間に多くのウイルスに暴露され、それらを獲得し得る。そのようなウイルスの一例が、JCポリオーマウイルス（JCV）である。JCウイルス感染は、ヒトの間で高度に蔓延している。JCVによる一次感染は、小児期に無症候性で生じる（Padgett & Walker, 1973）。JCVは、その後、おそらくウイルス血症を通じて体全体に広がる（IKEGAYA et al., 2004）。JCVは、主に、脳および腎組織内にとどまると考えられている。JCVによる感染は、ほとんどの対象において無症候性であるが、感染が深刻な状態（PMLのような）をもたらし、一部の対象においては死をもたらす場合もある。PMLに最も感受性がある対象は、免疫不全をきたした対象（例えば、AIDS患者）、または（例えば、臓器移植後、または多発性硬化症等の炎症関連の病状を治療するために）免疫調節剤による治療を受けている対象である。本発明は、JCVバリエントを提供し、増加したPMLリスクと関連する新規のバリエントを含むバリエントのパネルを特定し、JCVバリエントとPMLとの間の構造的および機能的関係の発見に関する方法を提供する。

30

【0006】

40

「野生型」JCV配列は、PMLに罹患していない、および／またはPMLのリスクがない健常な対象において見出されるJCVの原型のいずれかの配列を指すために、本明細書において使用される。幾つかの実施形態においては、コンセンサス「野生型」参照配列は、健常な個人の群において見出される平均的な配列であり得る。PMLの高いウイルス性有病率と低い発生率との間の不一致は、免疫機能障害に加えて、無症状感染からのPMLへの進行を調節する幾つかの特有のウイルス特性があり得ることを示唆している。幾つかの実施形態においては、本発明の態様は、細胞受容体と宿主細胞感染とのウイルスの相互作用に関するウイルス表面タンパク質の部分が、無症状感染の部位である腎臓から、PMLの部位であるCNSまでのどこか途中で、患者の中で特異的なアミノ酸変異を獲得するという発見に関する。さらに、幾つかの実施形態において、PMLに特異的な変異は、様々なシアル酸および様々な末梢細胞型に結合するウイルスカプシドの能力を変化させるが、CNSグリア細胞に結合する能力は保持する。

【0007】

50

PML患者および非PML患者からの公表されたVP1配列の数学的な解析に基づいて、PMLの間の特異的なアミノ酸バリエントの正の選択を提供する。しかしながら、公的に入手可能なPML配列は、PML患者のCSFまたは脳組織から得られたが、非PML配列は、健常な対象の尿から得られたため、単に、Genbank試料の解析に基づいてでは、これらのアミノ酸バリエントが、患者におけるウイルス変異を介して産生されたかどうか、または全てのJCV分岐群において生じ、PMLを引き起こす可能性が高いも

のとしてPML症例において豊富である（例えば、正の選択による）1つまたはそれ以上のまれなウイルスバリアントを示すかどうかを明らかに示すことができなかった。本発明の態様によれば、VP1置換が患者内で生じ、PMLを引き起こし得る。これは、同じ時点で得られた同じ患者からの整合した尿-CSFおよび尿-血漿試料の分析によって支持される。PML患者からのCSFおよび血漿VP1配列は、同じ患者の尿から単離されたVP1配列と比較して、幾つかのアミノ酸の单一のアミノ酸置換または欠失を含んだ。本明細書に示されるように、同じ個人のCSF、血漿、および尿に見出されるJCVウイルス型は、同じウイルス株からのものであったが、異なる患者は、異なる株を持たした。したがって、理論により拘束されるものではないが、CSF中であって、尿中ではないVP1アミノ酸置換の存在は、2つの異なるウイルスバリアントによる二重感染によってよりはむしろ、患者内の変異の出現に起因する。

10

## 【0008】

PML患者のCSFおよび血漿中に検出されるアミノ酸置換の幾つかは、既に説明されている。しかしながら、これらの置換は、増加したPMLのリスクと直接に相互関係について調べられておらず、それらの構造的および機能的特性は、PMLの発症および進行の局面とは関連付けられていなかった。PMLと関連するさらなるJCV VP1変異および/または欠失も本明細書において提供される。

20

## 【0009】

本発明の態様によれば、VP1タンパク質における置換は、異なる臨床状況での異なる転帰を判定することよりもむしろ、初期疾患進行（例えば、ウイルスが末端からCNSに移動することを可能にし、CNS細胞を感染することによって）を判定するために、さらに重要であり得る。しかしながら、幾つかの実施形態においては、VP1に存在する変異型と、ある臨床的測定との間に関連性がある場合がある。例えば、非変異ウイルスまたは位置122～134に変異/欠失を担持するウイルスを有する患者において、低JCV CSF複製レベルが観察されている。また、変異は、細胞受容体とのウイルスの相互作用の強度に影響を及ぼすため、死細胞からのウイルス放出もまた、これらの受容体に強固に結合するウイルスに対して妨げられ得る。したがって、より弱い細胞結合力を有するウイルスは、さらに豊富に細胞外空間に放出されることが見出され得る。これは、位置55～61および265～271の変異は、非変異ウイルスと比較してシアル酸受容体に結合する能力を欠き、ひいては、細胞残屑から分離するより良好な能力を有し（ウイルスが宿主細胞を殺した後）、CSFにたどり着くという観察と一致する。

30

## 【0010】

したがって、対象がJCVの幾つかの異なる変異型に（例えば、異なる組織または器官中で異なるバリアントに）同時に感染する場合があったとしても、PML関連変異は、野生型JCVに感染している個人の既存のJCVウイルス集団から生じる可能性が高い。

## 【0011】

本発明の態様は、少なくとも部分的に、JCVカプシドタンパク質のある種類の変異が、JCV感染の無症候性型の、JCVのPML関連型への変換と関連するという発見に基づく。本発明の態様によれば、いかなる特定の機序も約束するものではないが、シアル酸に結合するか、またはそれと相互作用するJCV粒子の能力を妨害する変異によって、ウイルスが対象の末梢コンパートメントにもはや含まれず、ウイルスがPML疾患の部位であるCNSへのより自由な経路を得るという結果となり得る。幾つかの実施形態においては、これらの変異が、免疫細胞および赤血球を含むが、これらに限定されない末梢器官および細胞に発現する特定の糖タンパク質および糖脂質擬似受容体上の「捕獲（trappping）」を避けることによって、ウイルスがそれを達成することを可能にする。さらに、これらの部位の一部は、正常宿主免疫応答（抗体およびT細胞）における標的であるため、これらの変異により、特に、弱体化した免疫系を有する対象において、免疫系によるウイルスの認識を回避することができる。

40

## 【0012】

本発明の態様は、PMLに対する対象のリスクプロファイルを評価するための方法およ

50

び組成物を提供する。

**【0013】**

幾つかの実施形態においては、本発明の態様は、対象がいずれかのJCVバリアントによって感染に暴露されているかどうかを判定することに関する。幾つかの態様において、野生型JCVバリアントによる感染は、たとえこれらがまれな事象であるとしても、PML関連変異は野生型JCVに起因する場合があるため、PMLに関するリスクプロファイルを増加させる可能性がある。したがって、幾つかの実施形態においては、対象は、JCV感染の1つまたはそれ以上の兆候（例えば、ウイルスタンパク質または核酸の検出、または例えば、JCVウイルスタンパク質への血清抗体の形での、JCV感染への免疫応答の間接的検出）の存在の検査を受けてもよい。いかなるJCV感染（例えば、野生型またはバリアント）の兆候も評価され得ることを認識するべきである。対象が、既にJCV感染に暴露されている場合、該対象は、非感染対象よりも高いリスクプロファイルを有すると特定することができる。したがって、免疫抑制剤で治療されるべきJCV感染した対象は、特定のJCV変異について評価され得るか、または非感染対象よりもさらに頻繁にモニターされてもよい。

10

**【0014】**

幾つかの実施形態においては、免疫抑制剤で治療されている（またはそれを用いた治療を開始する予定の）対象は、JCV感染の1つまたはそれ以上の兆候の検査を受ける。JCV感染の1つまたはそれ以上の兆候が検出される場合、該対象は、本明細書に記載される、PMLと関連する1つまたはそれ以上のJCVバリアントの存在を判断され得る。JCVに対して兆候が検出されない場合、該対象は、時間経過に伴い、例えば、4週間ごとに、月に1回、3ヶ月ごとに、4ヶ月ごとに、6ヶ月ごとに、または12ヶ月ごとに、JCV感染のいずれの兆候の存在に対しても、モニターされ得る。JCV感染が検出される場合、該対象は、1つまたはそれ以上のJCVバリアントの存在をさらに判断され得る。増加するPMLリスクと関連するJCVバリアントが検出される場合、該対象は、さらに、PMLの任意の初期症状を検出するためにモニターされ得、および／または本明細書に詳述されるように治療計画を変更し得る。

20

**【0015】**

一態様においては、本発明は、アミノ酸残基122の置換を含むバリアントJCVP1カプシドタンパク質の少なくとも1つの兆候について、対象からの生体試料を調査することを含む方法を提供し、該試料が少なくとも1つの兆候を含む場合、該対象は、PMLに対する感受性が増加していると判定される。

30

**【0016】**

一態様においては、本発明は、アミノ酸残基2の置換を含むバリアントJCVP1カプシドタンパク質の少なくとも1つの兆候について、対象からの生体試料を調査することを含む方法を提供し、該試料が少なくとも1つの兆候を含む場合、該対象は、PMLに対する感受性が増加していると判定される。

40

**【0017】**

一態様においては、本発明は、アミノ酸残基66の置換を含むバリアントJCVP1カプシドタンパク質の少なくとも1つの兆候について、対象からの生体試料を調査することを含む方法を提供し、該試料が少なくとも1つの兆候を含む場合、該対象は、PMLに対する感受性が増加していると判定される。

**【0018】**

一態様においては、本発明は、アミノ酸残基283の置換を含むバリアントJCVP1カプシドタンパク質の少なくとも1つの兆候について、対象からの生体試料を調査することを含む方法を提供し、該試料が少なくとも1つの兆候を含む場合、該対象は、PMLに対する感受性が増加していると判定される。

**【0019】**

幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸残基2および66のうちの少なくとも1つの置換を含むバリアントJCVP1カプシドタンパク質の少なくとも1つの兆

50

候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸残基 122 および 66 のうちの少なくとも 1 つの置換を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸残基 2 および 122 のうちの少なくとも 1 つの置換を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該試料は、アミノ酸残基 2、66、および 122 のうちの少なくとも 1 つの置換を有するバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のそれぞれの、少なくとも 1 つの兆候を検出することが可能なアッセイを用いて調査され、該試料が、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの少なくとも 1 つの兆候を含む場合、該対象は、PML に対する感受性が増加していると判定される。幾つかの実施形態においては、該試料は、アミノ酸残基 2、66、122、および 283 のうちの少なくとも 1 つの置換を有するバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のそれぞれの、少なくとも 1 つの兆候を検出することが可能なアッセイを用いて調査され、該試料が、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの少なくとも 1 つの兆候を含む場合、該対象は、PML に対する感受性が増加していると判定される。  
10

## 【0020】

幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸断片 50 ~ 51 の欠失を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸断片 54 ~ 55 の欠失を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸断片 123 ~ 125 の欠失を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸断片 125 ~ 134 の欠失を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸断片 125 ~ 136 の欠失を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。  
20

## 【0021】

幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸断片 50 ~ 51、54 ~ 55、および 123 ~ 125 の 1 つまたはそれ以上の欠失を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該試料は、アミノ酸断片 50 ~ 51、54 ~ 55、および 123 ~ 125 のうちの少なくとも 1 つの欠失を有するバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のそれぞれの、少なくとも 1 つの兆候を検出することが可能なアッセイを用いて調査され、該試料が、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの少なくとも 1 つの兆候を含む場合、該対象は、PML に対する感受性が増加していると判定される。  
30

## 【0022】

幾つかの実施形態においては、該方法は、低シリアル酸結合を有する疑いがあるバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。

## 【0023】

幾つかの実施形態においては、該方法は、アミノ酸残基 55、60、265、267、および 269 のうちの少なくとも 1 つの置換を含むバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について、生体試料を調査することをさらに含む。幾つかの実施形態においては、該試料は、アミノ酸残基 55、60、265、267、および 269 のうちの少なくとも 1 つの置換を有するバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質のそれぞれの、少なくとも 1 つの兆候を検出することが可能なアッセイを用いて調査  
40

され、該試料が、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの少なくとも 1 つの兆候を含む場合、該対象は、P M L に対する感受性が増加していると判定される。

【 0 0 2 4 】

幾つかの実施形態においては、該生体試料は、血液試料である。幾つかの実施形態においては、該生体試料は、C S F 試料である。幾つかの実施形態においては、該生体試料は、尿試料である。

【 0 0 2 5 】

幾つかの実施形態においては、該対象は、野生型 J C V に以前に感染したことがあることが知られている。幾つかの実施形態においては、該対象からの新しい生体試料が、毎年少なくとも 2 回、少なくとも 1 つのバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について調査される。幾つかの実施形態においては、該対象からの新しい生体試料が、少なくとも毎日、週に 1 回、月に 1 回、2 ヶ月ごと、年に 4 回、年に 2 回、年に 1 回、2 年ごと、5 年ごと、またはその間のあらゆる頻度で、少なくとも 1 つのバリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候について調査される。

10

【 0 0 2 6 】

幾つかの実施形態においては、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの（例えば、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたはそれ以上の）兆候の検出を用いて、該対象が免疫抑制治療に不適当であることを特定する。幾つかの実施形態においては、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、少なくとも 6 つの、少なくとも 7 つの、少なくとも 8 つの、少なくとも 9 つの、少なくとも 10 の、またはそれ以上の兆候の検出を用いて、該対象が免疫抑制治療に不適当であることを特定する。

20

【 0 0 2 7 】

幾つかの実施形態においては、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの兆候の検出を用いて、該対象に対する免疫抑制治療の修正を勧告する。幾つかの実施形態においては、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の少なくとも 1 つの、少なくとも 2 つの、少なくとも 3 つの、少なくとも 4 つの、少なくとも 5 つの、少なくとも 6 つの、少なくとも 7 つの、少なくとも 8 つの、少なくとも 9 つの、少なくとも 10 の、またはそれ以上の兆候の検出を用いて、該対象に対する免疫抑制治療の修正を勧告する。

30

【 0 0 2 8 】

幾つかの実施形態においては、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の兆候の不在を用いて、該対象が免疫抑制治療に適していることを特定する。

【 0 0 2 9 】

幾つかの実施形態においては、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の兆候の不在を用いて、該対象が継続して免疫抑制治療を行うことに適していることを特定する。

【 0 0 3 0 】

幾つかの実施形態においては、該生体試料は、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質に対して特異的な抗体の存在について調査される。

40

【 0 0 3 1 】

幾つかの実施形態においては、該生体試料は、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の存在について調査される。

【 0 0 3 2 】

幾つかの実施形態においては、該生体試料は、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質の存在について調査される。

【 0 0 3 3 】

幾つかの実施形態においては、該生体試料は、バリアント J C V V P 1 カプシドタンパク質をコードする核酸配列の存在について調査される。

50

**【 0 0 3 4 】**

幾つかの実施形態においては、該生体試料は、E L I S Aに基づく分析を用いて調査される。

**【 0 0 3 5 】**

したがって、幾つかの実施形態においては、対象がP M Lを発症するリスクがあるかどうかを判定するために、対象をスクリーニングすることができる。ある実施形態においては、疾患が深刻な臨床症状に進行する前に、初期段階のP M Lを検出するために、対象をスクリーニングすることができる。対象は、P M L関連のJ C Vバリアント、例えば、シアル酸への結合が低下していることが予測されるJ C Vバリアントへの暴露の兆候について、対象から得られた生体試料を調査することによって、P M Lのリスクまたは初期段階のP M Lについてアッセイされ得る。本発明は、P M Lのリスクおよび/またはP M Lの疾患進行と関連する主要J Cウイルスカプシドタンパク質(J C V - V P 1)における特定位置を提供する。幾つかの実施形態においては、P M Lに関する対象のリスクプロファイルは、対象が暴露されたJ CウイルスのV P 1タンパク質の1つまたはそれ以上の選択された位置での変異状態に基づいて決定される。

10

**【 0 0 3 6 】**

本発明の態様は、感受性がある対象、例えば、免疫不全をきたした、および/または免疫抑制剤で治療されている患者において、P M Lのリスクまたは初期段階の疾患進行を検出するのに有用である。

20

**【 0 0 3 7 】**

したがって、一態様においては、本発明は、対象が、P M Lに感受性があることを判定するための方法を提供する。幾つかの実施形態においては、該方法は、対象が、低シアル酸結合特性(例えば、結合力または親和性)を有する疑いがあるJ C Vバリアントを持っている場合、対象がP M Lに感受性があることを判定することを含む。

30

**【 0 0 3 8 】**

幾つかの実施形態においては、該方法は、対象が低シアル酸結合を有する疑いがあるJ C Vバリアントを持っているかどうかを判定することと、対象がそのJ C Vバリアントを持っている場合、P M Lに感受性がある対象を特定することと、を含む。幾つかの実施形態においては、該方法は、低シアル酸結合を有する疑いがあるJ C Vバリアントの存在について、対象を検査することと、低シアル酸結合を有する疑いがあるJ C Vバリアントの存在が検出される場合、対象がP M Lに感受性があると特定することと、を含む。

40

**【 0 0 3 9 】**

一態様においては、本発明は、対象が免疫抑制治療に適していることを判定するための方法を提供する。幾つかの実施形態においては、方法には、対象が低シアル酸結合を有する疑いがあるJ C Vバリアントを持っている場合、対象が免疫抑制治療に適していることを判定することが含まれる。幾つかの実施形態においては、方法には、対象が低シアル酸結合を有する疑いがあるJ C Vバリアントを持っているかどうかを判定することと、対象がJ C Vバリアントを持っている場合、対象を免疫抑制治療に適切であると特定すること、あるいは、対象がJ C Vバリアントを持っている場合、対象が免疫抑制治療に不適切であると特定することと、を含む。

**【 0 0 4 0 】**

一態様においては、本発明は、対象が免疫抑制治療に不適切であることを判定するための方法を提供する。幾つかの実施形態においては、方法は、対象が低シアル酸結合を有する疑いがあるJ C Vバリアントを持っている場合、対象が免疫抑制治療に不適切であることを判定することを含む。

**【 0 0 4 1 】**

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、判定は、低シアル酸結合を有する疑いがあるJ C Vバリアントの兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含む。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、生体試料は、尿試料、血液試料、血漿、血清、粘膜標本、またはC S F試料である。本明細書に提供され

50

る方法の幾つかの実施形態においては、該兆候は、低シアル酸結合を有する疑いがある J C V バリアントに特異的に結合することができる抗体の存在である。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該兆候は、低シアル酸結合を有する疑いがある J C V バリアントと関連する核酸配列の存在であり、その核酸配列は、野生型 J C V には存在しない。

#### 【 0 0 4 2 】

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、アッセイは、生体試料を J C V 抗体と接触させることと、J C V バリアントまたは J C V ペプチドバリアントの存在について、試料を判定することと、を含む。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、アッセイは、生体試料を J C V ペプチドと接触させることと、J C V 抗体の存在について、試料を判定することと、を含む。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、アッセイには、生体試料上で P C R 反応を行うことと、J C V 核酸バリアントの存在について、試料を判定することと、を含む。

10

#### 【 0 0 4 3 】

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該免疫抑制治療は、免疫抑制薬を投与することを含む。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該免疫抑制治療は、抗 V L A 4 抗体の投与を含む。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該免疫抑制薬は、ナタリズマブである。

#### 【 0 0 4 4 】

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、低シアル酸結合を有する疑いがある J C V バリアントは、J C V シアル酸結合部位における 1 つまたはそれ以上の変異を含む J C V バリアントである。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、J C V シアル酸結合部位における変異は、L 5 5 F、K 6 0 M、K 6 0 E、K 6 0 N、N 2 6 5 D、N 2 6 5 T、S 2 6 7 F、S 2 6 7 L、S 2 6 9 F、S 2 6 9 Y、または S 2 6 9 C である。

20

#### 【 0 0 4 5 】

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、J C V バリアントの低シアル酸結合は、野生型 J C V のシアル結合よりも低い。

#### 【 0 0 4 6 】

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該対象は、免疫抑制薬を用いた治療を必要とするか、または該対象は、免疫抑制薬を用いて治療されている。

30

#### 【 0 0 4 7 】

一態様においては、本発明は、対象から生体試料を採取することと、低シアル酸結合を有する疑いがある J C V バリアントの兆候について、生体試料をアッセイすることと、を含む方法を提供し、該生体試料がその J C V バリアントの兆候を含む場合、該対象は、P M L に感受性があると特定される。

#### 【 0 0 4 8 】

一態様においては、本発明は、対象から生体試料を採取することと、低シアル酸結合を有する疑いがある J C V バリアントの兆候について、生体試料をアッセイすることと、を含む方法を提供し、該対象は、i ) 該生体試料が J C V バリアントの兆候を含まない場合、免疫抑制治療に適している、あるいは、ii ) 該生体試料が J C V バリアントの兆候を含む場合、免疫抑制治療に不適切であると特定される。

40

#### 【 0 0 4 9 】

一態様においては、本発明は、免疫抑制治療を受けている対象を、低シアル酸結合を有する疑いがある J C V バリアントを持っていることについて、モニターすることを含む方法を提供する。

#### 【 0 0 5 0 】

一態様においては、本発明は、J C V への暴露の兆しに対して、免疫抑制治療を受けている対象をモニターすることと、J C V への暴露の兆しが検出される場合、低シアル酸結合を有する疑いがある J C V バリアントを持っていることについて、対象をモニターする

50

ことと、を含む方法を提供する。

【0051】

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、モニタリングは、JCVバリアントの兆候について、対象からの生体試料を定期的に採取し、アッセイすることを含む。

【0052】

一態様においては、本発明は、対象から生体試料を採取することと、JCVの兆候について、生体試料をアッセイすることと、を含む方法を提供し、該生体試料がJCVの兆候を含む場合、該対象は、低シアル酸結合を有する疑いがあるJCVバリアントの存在について、定期的にモニターされ、該臨床試料がJCVを含まない場合、該対象は、暴露JCVについて、定期的にモニターされる。

10

【0053】

一態様においては、本発明は、対象への免疫抑制剤を投与するための治療計画を修正すべきかどうかを判定する方法を提供し、該方法は、対象から生体試料を採取することと、低シアル酸結合を有する疑いがあるJCVバリアントの兆候について、生体試料をアッセイすることと、を含み、治療計画は、該生体試料がJCVバリアントの兆候を有する場合、対象に対して修正されるべきである。

【0054】

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該治療計画は、低用量の免疫抑制剤を投与すること、異なる免疫抑制剤と該免疫抑制剤を置き換えること、または該免疫抑制剤の投与を中止することによって、修正されるべきである。

20

【0055】

一態様においては、本発明は、対象に第1の免疫抑制薬を投与することと、該対象が低シアル酸結合を有する疑いがあるJCVバリアントを持っているかどうか、モニターすることと、を含む方法を提供する。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該対象がJCVバリアントを持っている場合、第1の免疫抑制薬の投与量および/または投与頻度が低減される。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該対象がJCVバリアントを持っている場合、第1の免疫抑制薬は、第2の免疫抑制薬と置き換えられる。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該対象がJCVバリアントを持っている場合、該対象は、PMLの症状に対してスクリーニングされる。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、該対象がJCVバリアントを持っている場合、該対象は、PMLに対して治療される。

30

【0056】

一態様においては、本発明は、低シアル酸結合を有する疑いがあるJCVバリアントを検出する方法を提供し、該方法には、低シアル酸結合を有する疑いがあるJCVバリアントの兆候に対して特異的な高感度アッセイを用いて、対象からの生体試料を調査することを含む。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、調査には、JCVバリアントに特異的に結合することができる抗体と生体試料を接触させることを含む。本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、調査には、JCVバリアントポリペプチドと生体試料を接触させることを含む。

40

【0057】

本明細書に提供される方法の幾つかの実施形態においては、調査には、JCVバリアント核酸と生体試料を接触させることを含む。

【0058】

本発明の態様は、パネルのJCV-VP1アミノ酸位置を含み、ここで、配列変異は、PMLのリスクおよび/または疾患進行と関連する。パネルの1つまたはそれ以上のVP-1アミノ酸位置にPML関連配列変異を有するバリアントJCVウイルスに暴露されている個人を特定するために、対象をスクリーニングするための方法および組成物を提供する。

【0059】

50

本発明の態様は、PMLを診断する、または対象におけるPML疾患の進行、回帰、および／もしくは状態を判定する、および／もしくはモニターするために、使用することができる。

【0060】

本発明のある態様は、PMLに対する治療処置を評価することに関する。

【0061】

本発明の他の態様は、PML関連JCウイルスバリアントに対するワクチンに関する。

【0062】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含む。幾つかの実施形態においては、該アッセイは、配列変異の存在について、表1A中の位置69、74、75、113、117、128、134、158、164、223、271、321、332、および345から選択された少なくとも1つのJCV-VP1位置を調査し、配列変異が1つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。10

【0063】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含む。幾つかの実施形態においては、該アッセイは、配列変異の存在について、1つの位置を調査する。幾つかの実施形態においては、該位置は、位置164である。幾つかの実施形態においては、配列変異が位置164に存在する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。20

【0064】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表1A中の位置から選択された少なくとも8つのJCV-VP1位置を調査し、配列変異が1つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。30

【0065】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表1A中の位置から選択された少なくとも8つのJCV-VP1位置を調査し、配列変異は、以下の55F、60M、60E、61L、66H、66N、69D、74S、75R、113L、117S、123C、128A、134G、158L、164K、223A、265D、265T、267F、267L、269F、269Y、271H、321V、332E、または345Kのうちの1つであり、配列変異が1つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。40

【0066】

幾つかの実施形態においては、表1A中の8つを超える位置を調査してもよい。幾つかの実施形態においては、9つ、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22の位置が調査される。

【0067】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリア50

ント JC ポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表 1 B 中の位置から選択された少なくとも 5 つの JCV - VP1 位置を調査し、配列変異が 1 つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PML のリスクがある、または罹患していると特定される。

【 0 0 6 8 】

幾つかの実施形態においては、表 1 B 中の 5 つを超える位置を調査してもよい。幾つかの実施形態においては、6 つまたは 7 つの位置が調査される。

【 0 0 6 9 】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症 (PML) のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアント JC ポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表 1 C 中の位置から選択された少なくとも 4 つの JCV - VP1 位置を調査し、配列変異が 1 つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PML のリスクがある、または罹患していると特定される。

【 0 0 7 0 】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症 (PML) のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアント JC ポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表 1 D 中の位置から選択された少なくとも 2 つの JCV - VP1 位置を調査し、配列変異が 1 つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PML のリスクがある、または罹患していると特定される。

【 0 0 7 1 】

幾つかの実施形態においては、表 1 D 中の 2 つを超える位置を調査してもよい。幾つかの実施形態においては、3 つ、4 つ、または 5 つの位置が調査される。

【 0 0 7 2 】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症 (PML) のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアント JC ポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表 1 F 中の位置から選択された少なくとも 2 つの JCV - VP1 位置を調査し、配列変異が 1 つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PML のリスクがある、または罹患していると特定される。

【 0 0 7 3 】

幾つかの実施形態においては、表 1 F 中の 2 つを超える位置を調査してもよい。幾つかの実施形態においては、3 つまたは 4 つの位置が調査される。

【 0 0 7 4 】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症 (PML) のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアント JC ポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表 1 G 中の位置から選択された少なくとも 8 つの JCV - VP1 位置を調査し、配列変異が 1 つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PML のリスクがある、または罹患していると特定される。

【 0 0 7 5 】

幾つかの実施形態においては、表 1 G 中の 8 つを超える位置を調査してもよい。幾つかの実施形態においては、9 つ、10、11、12、13、14、または 15 の位置が調査される。

10

20

30

40

50

**【 0 0 7 6 】**

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表1H中の位置から選択された少なくとも1つのJCV-VP1位置を調査し、配列変異が1つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。幾つかの実施形態においては、表1H中の2つの位置が調査される。

**【 0 0 7 7 】**

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表1H中の位置から選択された少なくとも1つのJCV-VP1位置を調査し、配列変異は、115Eまたは277Kのうちの1つであり、配列変異が1つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。

10

**【 0 0 7 8 】**

幾つかの実施形態においては、表1H中の2つの位置が調査される。

**【 0 0 7 9 】**

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の選択された領域の位置を調査し、配列変異は、以下の115Eまたは277Kのうちの1つであり、選択された数よりも少ない配列変異が調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。

20

**【 0 0 8 0 】**

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75および265～271を調査し、2つ未満の配列変異が調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。

30

**【 0 0 8 1 】**

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75、113～164、223、265～277、および321～345を調査し、3つ未満の配列変異が調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。

40

**【 0 0 8 2 】**

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75、113～164、223、265～277、および321～345を調査し、2つ未満の配列変異が調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。

**【 0 0 8 3 】**

50

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、位置164および表1A中の位置から選択された少なくとも1つの他のJCV-VP1位置を調査し、配列変異が1つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。

## 【0084】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、位置164および表1A中の位置から選択された少なくとも1つの他のJCV-VP1位置を調査し、配列変異が2つまたはそれ以上の調査された位置に存在する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。 10

## 【0085】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の選択された領域の位置を調査し、調査された位置に存在する特異的な特性を有するアミノ酸の数が増加する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。幾つかの実施形態においては、特異的な特性は、非極性である。 20

## 【0086】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75および265～271を調査し、調査された位置の非極性のアミノ酸バリアント（Gly、Ala、Val、Leu、Ile、もしくはPro）または芳香族バリアント（Phe、Tyr、もしくはTrp）の総数が増加する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。 30

## 【0087】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75、113～164、223、265～277、および321～345を調査し、調査された位置の非極性のアミノ酸バリアントまたは芳香族バリアントの総数が増加する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。 40

## 【0088】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75および265～271を調査し、調査された位置の1つまたはそれ以上の配列変異が、配列変異当たり10平方オングストロームまたはそれ以上の非極性の表面積の増加をもたらす場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。 50

## 【0089】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の選択された領域の位置を調査し、調査された位置に存在する特異的な特性を有するアミノ酸の数が低下する場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。幾つかの実施形態においては、特異的な特性は、極性である。

#### 【0090】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75および265～271を調査し、調査された位置の極性のアミノ酸バリアント（Ser、Thr、Cys、Met、Asn、もしくはGln）、正電荷を持つバリアント（Lys、Arg、もしくはHis）、または負電荷を持つバリアント（AspもしくはGlu）の総数が低下する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。

10

#### 【0091】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75、113～164、223、265～277、および321～345を調査し、調査された位置の極性のアミノ酸バリアント、正電荷を持つバリアント、または負電荷を持つバリアントの総数が低下する場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。

20

#### 【0092】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、JCV-VP1の少なくとも位置55～75および265～271を調査し、調査された位置の1つまたはそれ以上の配列変異が、配列変異当たり10平方オングストロームまたはそれ以上の極性の表面積の低下をもたらす場合、該対象は、PMLのリスクがある、または罹患していると特定される。

30

#### 【0093】

一態様においては、本発明は、生体試料中の配列変異のために選択されたJCV-VP1位置を調査するための方法を提供する。

#### 【0094】

幾つかの実施形態においては、配列変異のために選択されたJCV-VP1位置を調査することは、生体試料中における、表1Aまたは1Hのパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含むポリペプチドに特異的に結合する1つまたはそれ以上の抗体の存在を判定することが含まれる。幾つかの実施形態においては、1つまたはそれ以上の抗体の存在は、1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含む組み換え産生されたポリペプチドへの特異的結合によって決定される。幾つかの実施形態においては、1つまたはそれ以上の抗体の存在は、1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含む合成的に産生されたポリペプチドへの特異的結合によって決定される。

40

#### 【0095】

幾つかの実施形態においては、配列変異のために選択されたJCV-VP1位置を調査することは、生体試料中における、表1Aまたは1Hのパネルから選択された1つまたは

50

それ以上のアミノ酸配列変異を含む1つまたはそれ以上のポリペプチドの存在を判定することが含まれる。幾つかの実施形態においては、1つまたはそれ以上のポリペプチドの存在は、1つまたはそれ以上のペプチド結合剤へのポリペプチドの特異的結合によって検出される。幾つかの実施形態においては、該ペプチド結合剤は、抗体である。

#### 【0096】

幾つかの実施形態においては、配列変異のために選択されたJCV-VP1位置を調査することは、生体試料中における、表1Aまたは1Hのパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異をコードする核酸の存在を判定することが含まれる。

#### 【0097】

幾つかの実施形態においては、配列変異のために選択されたJCV-VP1位置の調査は、血液、脳脊髄液、血清、尿、痰、骨髓、脳、脾臓、腎臓、または他の組織の試料中で行われる。

#### 【0098】

幾つかの実施形態においては、対象が、進行性多病巣性白質脳症(PML)のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法は、バリアントJCVポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、バリアントJCVへの暴露は、バリアントJCVの現行の感染を含む。

#### 【0099】

幾つかの実施形態においては、対象が、進行性多病巣性白質脳症(PML)のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法は、バリアントJCVポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、バリアントJCVへの暴露は、以前の感染を含むか、またはバリアントJCVは、対象の血液または尿中で検出不可能である。

#### 【0100】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症(PML)のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCVポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表1F中の位置から選択された少なくとも2つのJCV-VP1位置を調査し、配列変異が調査された位置のうちの1つに存在しない場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。

#### 【0101】

一態様においては、本発明は、対象が、進行性多病巣性白質脳症(PML)のリスクがあるか、または罹患しているかどうかを判定するための方法を提供し、該方法は、バリアントJCVポリオーマウイルスへの暴露の兆候について、対象からの生体試料をアッセイすることを含み、該アッセイは、配列変異の存在について、表1G中の位置から選択された少なくとも2つのJCV-VP1位置を調査し、配列変異が調査された位置のうちの1つに存在しない場合、該対象は、PMLのリスクが低い、または罹患していないと特定される。

#### 【0102】

一態様においては、本発明は、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットを提供する。

#### 【0103】

幾つかの実施形態においては、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットには、1つまたはそれ以上の容器が含まれ、それぞれの容器は、表1A、表17、および/または表18のパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異および/または本明細書に記載される1つまたはそれ以上の他のバリアントを含むポリペプチドを含み、該キットは、さらに、ポリペプチドを用いて、これらのポリペプチドに特異的に結合する抗体の存在を判定するための取扱説明書を含む。

#### 【0104】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態においては、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットには、1つまたはそれ以上の容器が含まれ、それぞれの容器は、表1Bのパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含むポリペプチドを含み、該キットは、さらに、ポリペプチドを用いて、これらのポリペプチドに特異的に結合する抗体の存在を判定するための取扱説明書を含む。

【0105】

幾つかの実施形態においては、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットには、1つまたはそれ以上の容器が含まれ、それぞれの容器は、表1Cのパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含むポリペプチドを含み、該キットは、さらに、ポリペプチドを用いて、これらのポリペプチドに特異的に結合する抗体の存在を判定するための取扱説明書を含む。 10

【0106】

幾つかの実施形態においては、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットには、1つまたはそれ以上の容器が含まれ、それぞれの容器は、表1Dのパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含むポリペプチドを含み、該キットは、さらに、ポリペプチドを用いて、これらのポリペプチドに特異的に結合する抗体の存在を判定するための取扱説明書を含む。

【0107】

幾つかの実施形態においては、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットには、1つまたはそれ以上の容器が含まれ、それぞれの容器は、表1Fのパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含むポリペプチドを含み、該キットは、さらに、ポリペプチドを用いて、これらのポリペプチドに特異的に結合する抗体の存在を判定するための取扱説明書を含む。 20

【0108】

幾つかの実施形態においては、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットには、1つまたはそれ以上の容器が含まれ、それぞれの容器は、表1Gのパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含むポリペプチドを含み、該キットは、さらに、ポリペプチドを用いて、これらのポリペプチドに特異的に結合する抗体の存在を判定するための取扱説明書を含む。

【0109】

幾つかの実施形態においては、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットには、1つまたはそれ以上の容器が含まれ、それぞれの容器は、表1Hのパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異を含むポリペプチドを含み、該キットは、さらに、ポリペプチドを用いて、これらのポリペプチドに特異的に結合する抗体の存在を判定するための取扱説明書を含む。 30

【0110】

幾つかの実施形態においては、対象がPMLのリスクがあるかどうかを診断するためのキットには、1つまたはそれ以上の容器が含まれ、それぞれの容器は、位置164にアミノ酸配列変異を含むポリペプチドを含み、該キットは、さらに、ポリペプチドを用いて、これらのポリペプチドに特異的に結合する抗体の存在を判定するための取扱説明書を含む。 40

【0111】

一態様においては、本発明は、対象における、PMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法を提供する。

【0112】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該方法は、対象から得られた第1の生体試料中のバリアントJCV-VP1のアミノ酸配列変異数を判定することと、第1の試料を採取した時点よりも後の時点で対象から得られた第2の生体試料中のバリアントJCV-VP1のアミノ酸配列変異数を判定することと、第1の試料中の配列変異数を第2の試料中の配列変異数と比較することと、を 50

含み、第2の試料中の配列変異数と比較して第1の試料中の配列変異数が少ないことは、対象におけるPMLの発病または進行を示し、第2の試料中の配列変異数と比較して第1の試料中の配列変異数が多いことは、対象におけるPMLの回帰を示す。

**【0113】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該配列変異は、表1A中の位置から選択される。

**【0114】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該配列変異は、表1B中の位置から選択される。

**【0115】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該配列変異は、表1C中の位置から選択され。

**【0116】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該配列変異は、表1D中の位置から選択される。

**【0117】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該配列変異は、表1F中の位置から選択される。

**【0118】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該配列変異は、表1G中の位置から選択される。

**【0119】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該配列変異は、バリアントJCV - VP1を野生型JCV - VP1と比較することによって決定される。

**【0120】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該方法は、配列変異が対象から得られた第1の生体試料中のバリアントJCV - VP1の位置164に存在するかどうか、配列変異が第1の試料を採取した時点よりも後の時点で対象から得られた第2の生体試料中のバリアントJCV - VP1の位置164に存在するかどうかを判定することを含み、第1の試料中の配列変異の不在および第2の試料中の配列変異の存在は、対象におけるPMLの発病または進行を示し、第1の試料中の配列変異の存在および第2の試料中の配列変異の不在は、対象におけるPMLの回帰を示す。

**【0121】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、さらに、後の時点で対象からさらなる試料を採取すること、これらの試料中のJCV - VP1のアミノ酸配列変異数を判定すること、およびこれらの試料中の配列変異数を1つまたはそれ以上の以前の試料中の配列変異数と比較することによって、対象におけるPMLの発病、進行、または回帰をモニターすることを含む。

**【0122】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該対象は、免疫調節剤による治療を受けながら、モニターされる。幾つかの実施形態においては、該免疫調節剤は、ナタリズマブである。

**【0123】**

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の一実施形態においては、該方法は、対象から得られた第1の生体試料中のバリアントJCV - VP1のウイルス量を判定することと、第1の試料を採取した時点よりも後の時点で対象から得られた第2の生体試料中のバリアントJCV - VP1のウイルス量を判定することと、第1の試料中のウイルス量を第2の試料中のウイルス量と比較することと、を含み、第2の試料

10

20

30

40

50

中のウイルス量と比較して第1の試料中のウイルス量が少ないことは、対象におけるPMLの発病または進行を示し、第2の試料中のウイルス量と比較して第1の試料中のウイルス量が多いことは、対象におけるPMLの回帰を示す。

【0124】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、バリアントJCV-VP1のウイルス量を判定することを含み、該バリエントJCV-VP1は、表1A中の位置から選択された1つまたはそれ以上の配列変異を含む。

【0125】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、バリアントJCV-VP1のウイルス量を判定することを含み、該バリエントJCV-VP1は、表1B中の位置から選択された1つまたはそれ以上の配列変異を含む。

【0126】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、バリアントJCV-VP1のウイルス量を判定することを含み、該バリエントJCV-VP1は、表1C中の位置から選択された1つまたはそれ以上の配列変異を含む。

【0127】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、バリアントJCV-VP1のウイルス量を判定することを含み、該バリエントJCV-VP1は、表1D中の位置から選択された1つまたはそれ以上の配列変異を含む。

【0128】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、バリアントJCV-VP1のウイルス量を判定することを含み、該バリエントJCV-VP1は、表1F中の位置から選択された1つまたはそれ以上の配列変異を含む。

【0129】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、バリアントJCV-VP1のウイルス量を判定することを含み、該バリエントJCV-VP1は、表1G中の位置から選択された1つまたはそれ以上の配列変異を含む。

【0130】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、バリアントJCV-VP1のウイルス量を判定することを含み、該バリエントJCV-VP1は、位置164に配列変異を含む。

【0131】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、バリアントJCV-VP1のウイルス量は、野生型JCV-VP1のウイルス量と比較される。

【0132】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、バリアントJCV-VP1のウイルス量を判定することを含み、該方法は、さらに、後の時点で対象からさらなる試料を採取すること、これらの試料中のバリエントJCV-VP1のウイルス量を判定すること、およびこれらの試料中のウイルス量を1つまたはそれ以上の以前の試料中のウイルス量と比較することによって、対象におけるPMLの発病、進行、または回帰をモニターすることを含む。

【0133】

対象におけるPMLの発病、進行、または回帰を判定するための方法の幾つかの実施形

10

20

30

40

50

態においては、該方法は、バリアント JCV - VP1 のウイルス量を判定することを含み、該対象は、免疫調節剤による治療を受けながら、モニターされる。幾つかの実施形態においては、該免疫調節剤は、ナタリズマブである。

#### 【0134】

一態様においては、本発明は、対象における PML に対する治療への応答をモニターするための方法を提供する。

#### 【0135】

対象における PML に対する治療への応答をモニターするための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、対象から得られた第 1 の生体試料中の JCV - VP1 のアミノ酸配列変異数を判定することと、対象へ PML 治療を施すことと、治療後、および第 1 の試料よりも後の時点で対象から採取された、第 2 の試料中の JCV - VP1 のアミノ酸配列変異数を判定することと、第 1 の試料中のアミノ酸配列変異数を第 2 の試料中のアミノ酸配列変異数と比較することと、を含み、第 1 の試料中のものよりも第 2 の試料中のアミノ酸配列変異数が少ないことは、対象が PML 治療に対して反応性があることを示す。

10

#### 【0136】

対象における PML に対する治療への応答をモニターするための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、対象から得られた第 1 の生体試料中の JCV バリアントのウイルス量を判定することと、対象へ PML 治療を施すことと、第 2 の試料中の JCV バリアントのウイルス量を判定することと、を含み、第 2 の試料は、治療後、および第 1 の試料よりも後の時点で対象から採取され、および第 1 の試料中のウイルス量を第 2 の試料中のウイルス量と比較することと、を含み、第 1 の試料中のものよりも第 2 の試料中のウイルス量が少ないことは、対象が PML 治療に対して反応性があることを示す。

20

#### 【0137】

一態様においては、本発明は、PML に罹患しているか、または罹患している疑いがある対象の治療コースを選択するための方法を提供する。

#### 【0138】

PML に罹患しているか、または罹患している疑いがある対象の治療コースを選択するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、対象から得られた生体試料中の JCV - VP1 のアミノ酸配列変異数を判定することと、配列変異数を配列変異の対照数と比較することと、少なくとも部分的に、配列変異の対照数と比較して試料中の配列変異数の差異に基づいて PML の段階を判定することと、対象に対して、対象の PML の段階に適切な治療コースを選択することと、を含む。

30

#### 【0139】

PML に罹患しているか、または罹患している疑いがある対象の治療コースを選択するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、対象から得られた生体試料中の JCV バリアントのウイルス量を判定することと、該ウイルス量を対照試料中のウイルス量と比較することと、少なくとも部分的に、対照試料と比較して該試料中のウイルス量の差異に基づいて PML の段階を判定することと、対象に対して、対象の PML の段階に適切な治療コースを選択することと、を含む。

40

#### 【0140】

一態様においては、本発明は、1つまたはそれ以上の免疫調節剤による対象の治療を中断する決定を行うこと、または支援するための方法を提供する。

#### 【0141】

1つまたはそれ以上の免疫調節剤による対象の治療を中断する決定を行うこと、または支援するための方法の幾つかの実施形態においては、対象から得られた生体試料中の JCV - VP1 のアミノ酸配列変異数を判定することと、配列変異数を配列変異の対照数と比較することと、少なくとも部分的に、配列変異の対照数と比較した該試料中の配列変異数の差異に基づいて対象の治療を中断する決定を行うことと、を含む。

#### 【0142】

1つまたはそれ以上の免疫調節剤による対象の治療を中断する決定を行うこと、または

50

支援するための方法の幾つかの実施形態においては、対象から得られた生体試料中の JC V バリアントのウイルス量を判定することと、対照試料中のウイルス量と比較することと、少なくとも部分的に、対照試料と比較した該試料中のウイルス量の差異に基づいて1つまたはそれ以上の免疫調節剤による対象の治療を中断する決定を行うことと、を含む。

【 0 1 4 3 】

1つまたはそれ以上の免疫調節剤による対象の治療を中断する決定を行うこと、または支援するための方法の幾つかの実施形態においては、該免疫調節剤は、ナタリズマブである。

【 0 1 4 4 】

一態様においては、本発明は、治療候補化合物を特定するための方法を提供する。 10

【 0 1 4 5 】

治療候補化合物を特定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、表 1 A、表 1 7、および／もしくは表 1 8 のパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異、および／または本明細書に記載される1つまたはそれ以上の他のバリアントを含む単離ポリペプチドを、化合物と接触させて、該化合物が単離ポリペプチドに結合するかどうかを判定することを含み、該化合物が単離ポリペプチドに結合する場合、該化合物は、治療候補化合物である。

【 0 1 4 6 】

一態様においては、本発明はまた、表 1 A、表 1 7、および／もしくは表 1 8 のパネルから選択された1つまたはそれ以上のアミノ酸配列変異、および／または本明細書に記載される1つまたはそれ以上の他のバリアントを含む単離ポリペプチドを接触させることによって特定される治療候補化合物も提供する。 20

【 0 1 4 7 】

治療候補化合物を特定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、対象から得られた第1の生体試料中の JC V - VP 1 のアミノ酸配列変異数を判定することと、化合物を投与することと、化合物を投与した時点よりも後の時点で、対象から得られた第2の生体試料中の JC V - VP 1 のアミノ酸配列変異数を判定することと、を含み、第2の試料中の JC V - VP 1 のアミノ酸配列変異数が、第1の試料中のものよりも低い場合、該化合物は、治療候補化合物である。

【 0 1 4 8 】

一態様においては、本発明はまた、対象から得られた第1の生体試料中の JC V - VP 1 のアミノ酸配列変異数を判定すること、化合物を投与すること、および化合物を投与した時点より後の時点で、対象から得られた第2の生体試料中の JC V - VP 1 のアミノ酸配列変異数を判定することによって特定される治療候補化合物も提供する。 30

【 0 1 4 9 】

治療候補化合物を特定するための方法の幾つかの実施形態においては、該方法は、対象から得られた第1の生体試料中の JC V バリアントのウイルス量を判定することと、化合物を投与することと、化合物を投与した時点よりも後の時点で、対象から得られた第2の生体試料中の JC V バリアントのウイルス量を判定することと、を含み、第2の試料中のウイルス量が第1の試料中のものよりも低い場合、該化合物は、治療候補化合物である。 40

【 0 1 5 0 】

一態様においては、本発明はまた、対象から得られた第1の生体試料中の JC V バリアントのウイルス量を判定すること、化合物を投与すること、および化合物を投与した時点より後の時点で、対象から得られた第2の生体試料中の JC V バリアントのウイルス量を判定することによって特定される治療候補化合物も提供する。

【 0 1 5 1 】

一態様においては、本発明はまた、表 1 A、表 1 7、および／もしくは表 1 8 中の位置から選択された1つまたはそれ以上のJC V - VP 1 位置に配列変異、および／または本明細書に記載される1つまたはそれ以上の他のバリアントを有するポリペプチドを含むワクチンも提供する。幾つかの実施形態においては、該ワクチンは、表 1 A 中の位置から選

択された 1 つまたはそれ以上の J C V - V P 1 位置に配列変異を有する 2 つまたはそれ以上のポリペプチドを含む。幾つかの実施形態においては、該ワクチンは、さらに、アジュバントを含む。

#### 【 0 1 5 2 】

一態様においては、本発明はまた、対象に P M L に対する免疫を与える方法も提供し、該方法は、表 1 A、表 1 7、および／もしくは表 1 8 中の位置から選択された 1 つまたはそれ以上の J C V - V P 1 位置に配列変異、および／または本明細書に記載される 1 つまたはそれ以上の他のバリエントを有する 1 つまたはそれ以上のポリペプチドを含むワクチンを投与することを含む。

#### 【 0 1 5 3 】

一態様においては、本発明はまた、表 1 A 中の位置から選択された 1 つまたはそれ以上の J C V - V P 1 位置に配列変異を有するポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体も提供する。幾つかの実施形態においては、該ポリペプチドは、表 1 A、表 1 7、および／もしくは表 1 8 中の位置から選択された 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、またはそれ以上の配列変異、および／または本明細書に記載される 1 つまたはそれ以上の他のバリエントを有する。幾つかの実施形態においては、該抗体は、モノクローナル抗体である。幾つかの実施形態においては、該抗体は、ポリクローナル抗体である。

#### 【 0 1 5 4 】

ある実施形態においては、該抗体は、本明細書に記載される配列変異を含む少なくとも 1 つの V P 1 ポリペプチドを含む V P 1 粒子に特異的に結合する。本発明に有用な V P 1 粒子は、当技術分野で周知の方法を用いて、一般的に、本明細書に記載されるバリエントを含む組み換え V P 1 ポリペプチドを発現することによって產生することができる。V P 1 粒子は、少なくとも 2 つ、4 つ、10、20、30、40、または 50 の V P 1 ポリペプチドを含む。幾つかの実施形態においては、該 V P 1 粒子は、バリエントを含む V P 1 ポリペプチドのみを含む。他の実施形態においては、該 V P 1 粒子は、1 を超える V P 1 ポリペプチド配列を含む異種粒子、例えば、1 を超えるバリエントポリペプチドまたは少なくとも 1 つのバリエントポリペプチド、および少なくとも 1 つの野生型ポリペプチドである。

#### 【 0 1 5 5 】

本発明はまた、（例えば、表 1 A ~ 1 H、表 1 7、および／もしくは表 1 8 中に記載される 1 つまたはそれ以上のバリエント、および／または本明細書に記載される 1 つまたはそれ以上の他のバリエントを含む）V P 1 ポリペプチドバリエント、またはそのようなポリペプチドのペプチドをコードする単離された核酸配列も包含し、該ポリペプチドまたはペプチドは、V P 1 ポリペプチドのシアル酸結合領域を含む。場合によっては、本発明は、異種発現制御配列に動作可能に連結されたそのような単離された核酸配列を含む。本発明はまた、そのような核酸配列を含む、一時的に、または安定に導入されたベクターおよび宿主細胞も含む。そのような配列、ベクター、および宿主細胞を產生するための方法は、当技術分野で周知である。

#### 【 0 1 5 6 】

本発明の限定のそれぞれは、本発明の様々な実施形態を包含することができる。したがって、いずれか 1 つの構成要素または構成要素の組み合わせを含む本発明の限定のそれぞれは、本発明のそれぞれの態様に含まれ得ることが見込まれる。本発明は、本発明の適用において、以下の説明に記載し、または図面に示す構成要素の構造の詳細および配置に限定されるものではない。本発明は、他の実施形態、および様々な方法で実践する、または実行することが可能である。また、本明細書において使用される表現および用語は、説明の目的のためのものであり、限定と見なされるべきではない。「含む ( i n c l u d i n g )」、「備える ( c o m p r i s i n g )」、「有する ( h a v i n g )」、「含有する ( c o n t a i n i n g )」、または「伴う ( i n v o l v i n g )」、および本明細書におけるそれらの变形の使用は、その後に列記された項目、ならびに追加の項目を包含することを意味する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0157】

【図1】S V 4 0 C O A配列との参照J C V - V P 1配列の比較を示す。

【図2】J C V - V P 1のモデルを示す。

【図3-1】V P 1ペプチド配列を示す。

【図3-2】V P 1ペプチド配列を示す。

【図3-3】V P 1ペプチド配列を示す。

【図3-4】V P 1ペプチド配列を示す。

【図3-5】V P 1ペプチド配列を示す。

【図3-6】V P 1ペプチド配列を示す。

【図3-7】V P 1ペプチド配列を示す。

【図3-8】V P 1ペプチド配列を示す。

10

【図4A】P M L関連ウイルスの系統的分布を示す。

【図4B】P M L関連ウイルスの系統的分布を示す。

【図5A】J C V V P 1 / N e u N A c - ( 2 , 3 ) - G a l - ( 1 , 3 ) - [ ( 2 , 6 ) - N e u N A c ] - G l c - N A c 四糖類複合体の構造モデルを示す。

【図5B】J C V V P 1 / N e u N A c - ( 2 , 3 ) - G a l - ( 1 , 3 ) - [ ( 2 , 6 ) - N e u N A c ] - G l c - N A c 四糖類複合体の構造モデルを示す。

【図6】ウイルス様粒子の性質を示す。

【図7】野生型J C Vが、幾つかのグリカンに結合することを示す。

20

【図8】選択されるガングリオシドの構造および野生型J C Vに結合するそれらの能力を示す。

【図9】F 5 5変異およびF 2 6 9変異が、N e u 5 A c ( 2 - 3 )および( 2 - 6 )グリカンに結合することができないことを示す。

【図10】選択されるガングリオシドの構造および変異型J C Vに結合するそれらの能力を示す。

【図11】選択されたガングリオシドに結合するJ C Vに対する野生型および変異型の能力を比較する。

【図12】変異型J V Cは、さらに、グリア細胞株に結合することができるることを示す。

【図13】変異型に特異的なJ C V抗体は、野生型J C V抗体と区別することができるこ

30

とを示す。

【図14】変異抗体を野生型と区別するためのアッセイを示す。

【図15】変異型J C V - V L Pに結合するそれらの能力について、変異型J C Vおよび野生型J C V抗体を比較する。

【図16】変異型J C V - V L Pに結合するそれらの能力について、変異型J C Vおよび野生型J C V抗体を比較する。

【図17】F 2 6 9変異ウイルスを有する患者は、野生型ウイルスに対して抗体応答を生じたが、F 2 6 9変異ウイルスに対して生じなかつたことを示す。

【図18】(上)非変異V L Pを用いて免疫性を与えられたウサギは、変異することができた部位(この場合、S 2 6 9)への抗体をもたらすことを示す。

【図19】より高いC S F J C V D N Aレベルが、D Eループの変異を有する、または変異を有さないものよりもB CおよびH Iループの変異を有する患者に見出されたことを示す。

【図20】J C V V P 1 / N e u N A c - ( a 2 , 3 ) - G a l - ( b 1 , 3 ) - [ ( a 2 , 6 ) - N e u N A c ] - G l c - N A c 四糖類複合体の構造モデルを示す。

【図21】V P 1のP M L特異的変異は、シアル化ガングリオシドに対するウイルスカプシドタンパク質V P 1の特異性をなくす、または大きく変化させることを示す。

【発明を実施するための形態】

## 【0158】

本発明の態様は、進行性多病巣性白質脳症(P M L)の増加したリスクがある対象を特

50

定することと、それらの対象の医療を管理することに関する。PMLは、ヒト、特に、弱体化した免疫系を有する対象において、JCポリオーマウイルス(JCV)感染によって引き起こされ得る。しかしながら、PMLは、弱体化した免疫系を有する全てのJCVに感染した対象において発症するわけではない。本発明によれば、あるJCVバリエントのみがPMLを引き起こす。幾つかの実施形態においては、低下したシアル酸結合を有するJCVバリエントが、特に、PMLを引き起こす可能性がある。したがって、本発明の態様は、シアル酸に低下した結合を有することが予測されるJCVバリエントの存在を検出するための方法および組成物に関する。

#### 【0159】

本発明の態様によれば、理論により拘束されるものではないが、野生型JCVのシアル結合と比較して、低シアル酸結合を有するJCVバリエントは、末梢部位(例えば、末梢細胞、タンパク質、糖、または他の分子におけるシアル酸)に低下した結合を有する。したがって、幾つかの実施形態においては、これらのバリエントは、体の他の部分、例えば、CNSに広がる可能性が高い。さらに、本発明の態様によれば、健康な免疫系を有する対象は、低下したシアル酸結合を有するあるJCVバリエントの広がりを制御する。しかしながら、欠陥がある免疫系を有する対象において、これらのバリエントは、免疫系を回避し、PMLに進行する可能性が高い。

10

#### 【0160】

したがって、本発明の態様は、正常または野生型JCVの結合と比較して、低シアル酸結合(例えば、低結合または結合力)を有することが予測されるJCVバリエントの存在を検出するための組成物および方法に関する。幾つかの実施形態においては、JCVカプシドタンパク質のシアル酸結合ドメインにおいて、1つまたはそれ以上の変異を有するJCVバリエントは、低シアル酸結合特性を有することが予測される。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される特異的バリエントは、低シアル酸結合特性を有することが予測される。

20

#### 【0161】

本発明の態様によれば、シアル酸結合を低下させることが予測される1つまたはそれ以上の変異を有するJCVバリエントを持っている対象は、特に、対象の免疫系が損なわれている場合、PMLに対する感受性が増加している(例えば、JCVまたはそのようなJCVバリエントを持っていない対象と比較して)と特定される。したがって、低下したシアル酸結合JCVバリエントを持っている対象は、対象が免疫抑制薬(例えば、ナタリズマブまたは免疫抑制薬)を用いて治療される場合、PMLを発症するリスクがある。

30

#### 【0162】

幾つかの実施形態においては、対象において、PML感受性と関連するJCV変異は、位置122、2、および66の変異、ならびにJCVのVP1カプシドタンパク質中のアミノ酸50～51、123～125、および126～134の欠失である。幾つかの実施形態においては、対象において、PML感受性と関連するJCV変異は、H122R、A2V、およびD66Gである。幾つかの実施形態においては、対象において、PML感受性と関連するJCV変異は、H122R、A2V、D66G、および283Iである。幾つかの実施形態においては、JCV VP1カプシドタンパク質が、アミノ酸残基122、2、66、55、60、265、267、および269のうちの少なくとも1つの置換、または50～51、123～125、および126～134の1つまたはそれ以上の欠失を含む場合、対象は、PMLに感受性がある。

40

#### 【0163】

本発明の態様は、免疫抑制治療を必要とする対象(例えば、多発性硬化症、または1つまたはそれ以上の免疫抑制薬を用いて治療することができる任意の他の状態を有する対象)に対する治療法を選択および/またはモニタリングを支援するのに有用である。幾つかの実施形態においては、本発明の態様は、免疫抑制治療を開始する前に、PMLに感受性がある対象を特定するために使用することができる。幾つかの実施形態においては、免疫抑制治療を受けている対象は、PMLに対して増加したリスクと関連するJCVバリエント

50

トの出現についてモニターされ得る。幾つかの実施形態においては、対象が、シアル酸への結合が低下しているJCVバリアントを有すると特定される場合、該対象は、i) 免疫抑制薬を用いて治療されない、ii) 低用量または低頻度の薬物投与を用いて治療される、および/またはiii) PMLの初期症状について、定期的にモニターされる。治療時に、PMLの症状が現れる場合、該治療を、中止し得るか、または薬物投与の量もしくは頻度を低減し得る。幾つかの実施形態においては、PMLの1つまたはそれ以上の症状を示す場合、第1の薬物に対して代替的な免疫抑制薬に置き換えてよい。

## 【0164】

本発明の態様は、患者にモニタリング手順を実施するために使用してよい。幾つかの実施形態においては、患者は、まず、JCVに暴露されているかどうかを判定するために、(例えば、JCV抗体の存在について、患者の血清をアッセイすることによって)アッセイされる。JCVに暴露されていない患者は、PMLに対してリスクが低いと特定される。しかしながら、幾つかの実施形態においては、そのような患者は、JCVに暴露されているかどうか、またはいつ暴露されているかを判定するために、定期的にモニターされる。JCV暴露の兆しは、治療前、または治療時に、対象において特定される場合、該対象は、PMLに対する増加したリスクと関連する1つまたはそれ以上のJCVバリアント(例えば、JCVの正常型または野生型と比較して、低下したシアル酸結合を有すると予測される1つまたはそれ以上のバリアント)の存在を評価することができる。患者は、PML関連JCVバリアントの存在について、定期的にモニターされ得る。患者が1つまたはそれ以上のPML関連JCVバリアントを持っていることが分かる場合、PMLの兆しについて、該患者を慎重にモニターすることができ、患者の治療を中断もしくは変更することができ、ならびに/またはPMLから患者を保護するのに役立つように、該患者を、1つまたはそれ以上の予防薬もしくは治療薬を用いて治療することができる。

10

20

30

## 【0165】

幾つかの実施形態においては、患者または対象は、毎日、週に1回、隔週に、月に1回、2ヶ月ごと、年に4回、年に2回、年に1回、または2年ごとにモニターされる。幾つかの実施形態においては、患者または対象は、該患者または対象が、免疫調節剤による治療を受けている場合、モニターされる。

## 【0166】

本発明の態様によれば、JCVバリアントは、該バリアントがJVC VP1タンパク質のシアル結合ポケット中に1つまたはそれ以上の変異を有する場合、低シアル酸結合(例えば、親和性または結合力)を有することが予測され得る。幾つかの実施形態においては、シアル酸結合ポケット中で結合する12オングストロームの分子内にある任意の1つまたはそれ以上のアミノ酸の変異は、シアル酸結合に影響を及ぼすことが予測され得る。シアル酸結合ポケット中で結合する12オングストロームの分子内のVP1アミノ酸の一覧表を実施例12の表16中に提供する。したがって、これらのアミノ酸の1つまたはそれ以上の変異を有するJCVバリアントは、シアル酸への結合を低下させ、したがって、PMLを引き起こすリスクが増加するため候補であると特定され得る。

40

## 【0167】

本発明の態様によれば、幾つかの異なる天然に存在するJCV VP1配列は、本明細書に記載される、PMLに対して増加したリスクと関連しないJCVバリアントに由来する場合、正常なまたは野生型の参照配列として使用され得る。そのような参照配列の例は、例えば、Cubitt et al., Predicted amino acid sequences for 100 JCV strains, Journal of NeuroVirology, 7: 339 - 344, 2001において、本明細書にさらに詳細に記載されており、これらの配列の開示は、参照することによって、その全体として本明細書に組み込まれる。

## 【0168】

本発明の態様によれば、バリアントJCVのシアル酸結合特性(例えば、親和性または結合力)は、任意の適したアッセイを用いて測定することができる。例えば、シアル酸に

50

結合する J C V およびまたは J C V - V P 1 は、赤血球凝集アッセイ、固定化分子（例えば、ガングリオシド、糖、糖たんぱく質等）への直接結合、細胞ベースの結合アッセイ（例えば、結合が、フローサイトメトリーを用いて標識抗体で検出される場合）等、またはこれらの任意の組み合わせを用いて、測定することができる。幾つかの実施形態においては、低結合は、本明細書に記載される、正常型または野生型 J C V 参照の結合と比較して、5倍を超える結合（例えば、結合力または親和性）の低下である。しかしながら、幾つかの実施形態においては、低結合は、正常型または野生型 J C V 参照と比較して、約10倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍、5,000倍、10,000倍、またはそれ以上の結合の低下である。

## 【0169】

10

したがって、本発明の態様は、PML関連JCVバリエントの存在により、対象がPMLに感受性があるかどうかを判定することに関する。幾つかの実施形態においては、この情報を用いて、該対象が免疫抑制剤による治療に適しているかどうかを判定することができる。幾つかの実施形態においては、この情報を用いて、免疫抑制剤で治療されている対象が、治療を継続すべきかどうか、または免疫抑制薬の異なる投与量、計画、および/または種類に切り替えるべきかどうかを判定することができる。ある実施形態においては、免疫抑制剤で治療されている対象において、PML関連JCVバリエントの検出は、少なくとも一定期間、治療を中止するための基準を提供する。

## 【0170】

20

免疫抑制剤で治療されている患者は、JCV感染の存在について、定期的にモニターすることができる。幾つかの実施形態においては、対象がJCVに感染していることが知られている、または感染していると特定される場合、該対象は、シアル酸に対する結合が低下していることが予測されるJCVバリエントの存在について、定期的にモニターすることができる。

## 【0171】

30

したがって、本発明は、対象が進行性多病巣性白質脳症（PML）のリスクがあるか、またはPML（例えば、初期段階のPML）に罹患しているかどうかを判定するための方法および組成物を提供する。一実施形態においては、対象の生体試料は、PMLと関連する1つまたはそれ以上の配列変異、例えば、低下したシアル酸結合をもたらすことが予測される1つまたはそれ以上の配列バリエントを有するバリエントJCVウイルスへの暴露について、調査される。幾つかの実施形態においては、複数の特定の所定のVP-1位置が、それらの変異状態について調査される。特定の位置で見出される配列変異のパターンは、PMLに対する対象のリスクプロファイルを提供する。

## 【0172】

40

幾つかの実施形態においては、本発明は、PMLのリスクおよび/またはPMLの疾患進行と関連する、JCV-VP1アミノ酸位置のパネルを提供する。PMLのリスクの兆候について、生体試料をアッセイするための方法および組成物が提供される。幾つかの実施形態においては、JCVウイルスピリペプチドおよび/または核酸を単離し、分析して、それらが1つまたはそれ以上の所定のVP-1位置に配列変異を有するかどうかを判定することができる。しかしながら、ある特定の状況において、JCVウイルスに暴露されていて、現行のJCにウイルス感染している場合であっても、JCVウイルスは、低いJCVウイルス量を有する対象から得られたある生体試料から単離することは困難であり得る。とはいえ、PML関連バリエントJCVウイルスへの対象の暴露は、1つまたはそれ以上のPML関連バリエントJCV-VP1ポリペプチドに対する抗体（例えば、血清抗体）の、対象から得られた生体試料中の存在から推定することができる。

## 【0173】

50

PML患者の脳におけるJCV配列は、とても変化しやすいので、同一のJCV配列は、異なるPML患者において一度も検出されていない（Yogo & Sugimoto, 2001）。しかしながら、本発明の態様は、健常な対象およびPML対象からのJCV配列の分析、およびアミノ酸置換がPMLと強い相関を持つVP1配列における位置の

サブセットの特定に基づく。一態様においては、本発明は、PMLのリスクプロファイルに達するように調査される必要があるJCV-VP1における位置に関するガイダンスを提供する。一態様においては、本発明は、VP1アミノ酸位置の新しいパネルを提供し、配列変異は、対応するバリアントJCVに感染した対象において、PMLのリスクを予測する。本発明の態様は、シアル酸への低下した結合を有するJCVバリアントの兆または兆候の存在について、対象をスクリーニングすることに関する。幾つかの実施形態においては、異なるPMLリスクプロファイルと関連するJCV配列変異のパネルを、表1A～1H中に提供し、本明細書にさらに詳細に記載している。

#### 【0174】

JCVおよびVP1

幾つかの実施形態においては、PMLと関連するJCV配列変異は、JCVの主要なカプシドタンパク質( VP1 )中の選択された位置で見出される。文献に記載される多くのVP1タンパク質の配列を分析して、配列変異がPMLと強く関連しているVP1位置のサブセットを特定する。本発明によれば、アミノ酸は、それが、コンセンサス配列または他の参照配列( 例えば、野生型原型ウイルスの配列 )の位置でアミノ酸とは異なる場合、VP-1における特定の位置で変異体またはバリアントと特定される。幾つかの実施形態においては、健常な対象からのJCVのVP1タンパク質に対するコンセンサス配列は、GenBank ID番号 # 37050849 ( AAQ88264 、図1中でVP1配列として示される )によって提供される。JCV-VP1は、SV40と比較した場合、図1に示されるように、保存される。多くの異なるJCVの原型が特定されている。本明細書において使用される、原型は、健常な個人の尿中に見られるJCVである。幾つかの実施形態においては、図1のVP1配列は、参照配列である。幾つかの実施形態においては、参照配列は、Zhangら( 2005 )の1つまたはそれ以上の原型である。3つの主な原型は、地域によって決定される( EU原型は、ヨーロッパ系の人々に見られ、CYおよびMY原型は、アジア系の人々に見られる )。PML関連配列変異は、「コンセンサス」配列との比較に基づいて特定されたが、幾つかの原型は、PML関連と特定される位置に同じアミノ酸を有し、したがって、本発明は、原型配列のいずれとの配列比較に基づいても実践することができる。他の実施形態においては、アッセイは、参照配列との比較を行うことなく、JCVが、ある位置で1つまたはそれ以上の所定のアミノ酸を有するかどうかを判定することに基づき得る。あるJCV-VP1バリアント配列の存在を判定するための方法は、対象から単離されたJCV核酸またはポリペプチドの直接特徴付けに基づき得ることを認識すべきである。代替として、対象におけるバリアントJCVの存在( またはバリアントJCVへの対象の事前暴露 )は、1つまたはそれ以上のバリアントJCV-VP1配列に対して特異的な対象抗体( 例えば、血清抗体 )を検出することによって推測することができる。本発明の態様はまた、他の参照配列とJCV-VP1配列を比較するために提供することを認識すべきである。しかしながら、他の参照配列を使用するとしても、分析は、1つまたはそれ以上の本明細書に記載されるPML関連VP1位置にアミノ酸の同一性を判定することを含み得る。

#### 【0175】

本発明によれば、VP1バリアントの配列分析は、PMLのリスクと関連する配列変異の「ホットスポット」領域を特定した。幾つかの実施形態においては、PMLのリスクを示す配列変異は、VP1タンパク質の表面ループに位置する。これらの位置は、表1B～1Dに見出すことができる。幾つかの実施形態においては、VP1タンパク質の特定のエリアにおける総配列変異数は、PMLのリスクを示し得る( 表2を参照のこと )。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される2またはそれ以上( 例えば、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、またはそれ以上 )の位置のバリアントアミノ酸の存在は、PMLのリスクを示し得る。これらの領域の極性は、PMLのリスクを示し得、極性のアミノ酸が非極性のアミノ酸で置き換えられる場合、PMLのリスクは、増加し得る。幾つかの実施形態においては、表1Aまたは表1B～1D中で特定される任意の1つまたはそれ以上の位置の極性のアミノ酸損失は、PMLとの関連性が増加するJCVウイ

10

20

30

40

50

ルスをもたらす。幾つかの実施形態においては、図2に示される構造的領域のうちの1つの領域内（例えば、JCV-VP1ポリペプチド配列の位置55～75または265～271によって画定される領域内）の任意の1つまたはそれ以上の位置の極性のアミノ酸損失は、PMLとの関連性が増加するJCWイルスをもたらす。同様に、ある実施形態においては、表1Aまたは表1B～1D中で特定される任意の1つまたはそれ以上の位置の非極性のアミノ酸獲得は、PMLとの関連性が増加するJCWウイルスをもたらす。また、ある実施形態においては、図2に示される構造的領域のうちの1つの領域内（例えば、JCV-VP1ポリペプチド配列の位置55～75または265～271によって画定される領域内）の任意の1つまたはそれ以上の位置の非極性のアミノ酸獲得は、PMLとの関連性が増加するJCWウイルスをもたらす。図2は、PMLと関連すると特定されるあるアミノ酸位置は、構造にマップされる領域をハイライト表示する予測したJCW-VP1構造を示す。JCW-VP1タンパク質の予測された構造は、SV40コートタンパク質1の結晶構造およびJCWタンパク質とSV40タンパク質との間の配列相同性に基づく。配列変異の解析は、VP1タンパク質の表面積における極性のアミノ酸数の低下および/または非極性のアミノ酸数の増加は、PMLに対する増加したリスクをもたらすことを示した（実施例3を参照のこと）。一実施形態においては、1つまたはそれ以上の表面ループにおける配列変異が、配列変異当たり10平方オングストロームまたはそれ以上の非極性の表面積の増加をもたらす、または配列変異当たり10平方オングストロームまたはそれ以上の極性の表面積の低下をもたらす場合、対象は、PMLのリスクがある。本発明は、特定の機構に限定されないが、表面ループの変化は、抗体が、JCW-VP1に結合する、ならびに/または炭水化物等のその受容体および/もしくは5HT2A等のタンパク質受容体とのJCW-VP1の相互作用を促進するのを妨げ得る。VP1の表面ループの変化（例えば、非極性のアミノ酸もしくは表面積の増加、および/または極性のアミノ酸もしくは表面積の低下）は、細胞受容体に対するVP1の親和性を増加させ、PMLの進行にとって重要な、宿主細胞もしくはある特定の宿主細胞へのウイルスの進入および/または感染を促進し得る。

10

20

30

40

#### 【0176】

##### 配列変異のパネル

位置の調査は、その位置のアミノ酸を判定することと、参照アミノ酸（例えば、コンセンサス配列または原型配列における、例えば、野生型/对照バリエントに見出されるアミノ酸）とそのアミノ酸を比較することの両方を含み得る。

30

#### 【0177】

あらゆる単一のバリエントまたはバリエントの組み合わせが、PMLのリスクを示し得ることを認識すべきである。ある領域または選択された群の調査したバリエントに存在する総バリエント数は、PMLのリスクを示し得ることを認識すべきである。

#### 【0178】

本発明の態様は、PMLのリスクと関連するJCWバリエントに対応するJCW-VP1アミノ酸配列上に1つまたはそれ以上の位置を提供することに関する。例えば、表1Aに示される位置のそれぞれは、PMLのリスクと関連し、任意の適したアッセイを用いて、1つまたはそれ以上の選択された位置にアミノ酸バリエントを有するJCWバリエントの存在、またはJCWバリエントへの過去の暴露の指標（兆候）を検出することができる。幾つかの実施形態においては、アッセイを用いて、表1Aに列記される位置から選択された2つまたはそれ以上の位置にバリエントアミノ酸バリエントを有するJCWバリエントの存在、またはJCWバリエントへの暴露を検出することができ、バリエント/複数のバリエントの存在は、PMLを示す。

40

#### 【0179】

幾つかの実施形態においては、対象において、PML感受性と関連するJCW変異は、位置122、2、および66の変異、ならびにJCWのVP1カプシドタンパク質中のアミノ酸50～51、123～125、および126～134の欠失である。幾つかの実施形態においては、対象において、PML感受性と関連するJCW変異は、H122R、A

50

2 V、および D 6 6 G である。幾つかの実施形態においては、J C V V P 1 カプシドタンパク質が、アミノ酸残基 1 2 2、2、6 6、5 5、6 0、2 6 5、2 6 7、および 2 6 9 の少なくとも 1 つの置換、または 5 0 ~ 5 1、1 2 3 ~ 1 2 5、および 1 2 6 ~ 1 3 4 の 1 つまたはそれ以上の欠失を含む場合、対象は、P M L に感受性がある。

#### 【 0 1 8 0 】

幾つかの実施形態においては、選択された位置は、参照に存在するアミノ酸とその位置に存在するアミノ酸を比較することによって調査される。アミノ酸が、参照に見出されるアミノ酸とは異なる選択された位置に存在する場合、その位置は、変異があると考えられる。したがって、幾つかの態様においては、本発明は、P M L のリスクに関するバリエントの一覧表を含む表（例えば、データベース）を提供する。データベースはまた、P M L を保護するバリエントおよびバリエントを提供する。幾つかの実施形態においては、選択された位置に見出されるあらゆるバリエントは、P M L のリスクを示す。さらなる実施形態においては、表は、対象に関して、P M L のリスクプロファイルに達する群であると調査され得る P M L と関連するバリエント群を提供する。参照データベースにおいて特定される多くのバリエントは、あまり一般的ではないことを認識すべきである。例えば、P M L のリスクを示すバリエントは、P M L のリスクがあることが知られている人の試料のわずか 1 0 % に見出され得る。対象に対するリスクプロファイルに達するために、1 を超える位置を調査する必要があり得る。したがって、一態様においては、本発明は、P M L のリスクプロファイルに達すると特定される必要がある郡内の、位置群および位置番号の表を提供する。幾つかの実施形態においては、表 1 A 中の少なくとも 8 つ（例えば、8 つ、9 つ、1 0 もしくはそれ以上、または全ての）位置が、P M L に対する対象のリスクプロファイルに達することを調査する必要がある。同様に、表のいずれかにおいて、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、8 つ、9 つ、1 0 もしくはそれ以上、または全ての位置を調査することができる。

10

20

30

40

#### 【 0 1 8 1 】

表に示される位置に見出されるアミノ酸は、このアミノ酸を参照に見出されるアミノ酸と比較することによって、P M L のリスクを示すことができる。例えば、表 1 A 中の、位置 5 5 の野生型（例えば、参照 / コンセンサス）アミノ酸は、ロイシン（L）である。幾つかの実施形態においては、ロイシンでない位置 5 5 に見出されるあらゆるアミノ酸は、P M L のリスクを示す。幾つかの実施形態においては、特定のバリエントは、P M L のリスクと関連する。例えば、位置 5 5 のフェニルアラニン（F）の存在は、P M L のリスクを示し得る。したがって、位置 5 5 のバリエントアミノ酸（例えば、P h e）の出現は、P M L の発病または進行を示し得る。同様に、V P 1 上の P M L 関連位置における本明細書に記載される 1 つまたはそれ以上の他のバリエントアミノ酸は、P M L の発病または進行を示し得る。幾つかの実施形態においては、特定の特徴付けを有するアミノ酸の存在は、P M L のリスクを示し得る。例えば、参照配列に見出されるアミノ酸よりも極性が少ないアミノ酸の J C V バリエントの存在は、P M L のリスクを示す。P M L のリスクを示すことに加えて、特定位置に見出されるバリエントを用いて、対象における発病、進行、または回帰も判定し得る。幾つかの実施形態においては、特定の位置に見出されるバリエントは、P M L に対する対象の治療のモニタリングを可能にする。幾つかの実施形態においては、特定の位置に見出されるバリエントは、P M L に罹患している、または罹患している疑いがある対象の治療の選択を可能にする。

#### 【 0 1 8 2 】

幾つかの実施形態においては、特定のアミノ位置に見出されるアミノ酸は、P M L から保護することを示す、例えば、P M L に発症するリスクが低い人を特定することができる。

#### 【 0 1 8 3 】

幾つかの実施形態においては、P M L のリスクは、参照配列と特定の位置に判定されたアミノ酸を比較することなく、判定することができることを認識すべきである。例えば、試料中の位置 5 5 を調査し、その位置に見出されるアミノ酸がフェニルアラニンである場

50

合、該対象は、PMLのリスクがあると判定される。この判定は、野生型参照と位置55に見出されるアミノ酸を比較することなく、行うことができる。

#### 【0184】

本発明は、JCVバリアントの現在の存在および過去の存在の両方を判定するための方法を提供することを認識すべきである。JCVバリアントに暴露されているが、現在、そのJCVバリアントに感染していると特定することができない対象は、そのJCVバリアントに対する指標の存在を判定することによって、そのJCVバリアントに暴露されないと判定することができる。対象は、それが暴露される、ウイルスおよび細菌を含む、任意の外来作用物質に対して抗体を作ることができる。したがって、対象における、ウイルス、またはウイルスのバリアントは、そのウイルスまたはウイルスバリアントに特異的な抗体の検出によって診断することができる。ウイルスが、複製し、変異する（およびひいては、新しいバリアントを作成する）場合、ウイルスの変異型に対して特異的な新しい抗体を作る。特異的ウイルスバリアントがもはや体内に存在しなくとも、バリアントへの過去の暴露はなお、抗体の存在によって判定することができる。したがって、一実施形態においては、JCVバリアントの変異状態（現在の暴露および過去の暴露の両方）は、1つまたはそれ以上の特異的バリアントに対する抗体の存在の検出によって判定される。一実施形態においては、VP1-抗体の存在は、1つまたはそれ以上のバリアントを含む1つまたはそれ以上のポリペプチドへの抗体の特異的な結合によって判定される。抗体は、定性的におよび定量的に決定することができることを認識すべきである。したがって、本発明の抗体検出アッセイは、対象に今までに暴露された全てのウイルスバリアントの決定、および特異的抗体の量子化を通して体内に現在存在するバリアントのウイルス量の推定を促進する。

10

20

30

#### 【0185】

一実施形態においては、アミノ酸バリアントは、直接検出され、例えば、対象におけるウイルスバリアントの存在は、バリアントのうちの1つまたはそれ以上のバリアントを含むポリペプチドの存在を判定することによって判定される。特定のポリペプチドに特異的に結合することができる薬剤が、開発される。幾つかの実施形態においては、これらの薬剤は、抗体である。幾つかの実施形態においては、バリアントは、バリアントをコードする核酸の配列を判定することによって判定される。試料は、対象から採取され、特定のウイルスバリアントの存在について分析される。特異的なJCVバリアントは、脳および髄液中にのみ存在し得るが、「野生型」バリアントは、同じ対象において他の組織に存在し得ることを認識すべきである。ポリペプチドの存在は、これらのポリペプチドに対して特異的な抗体によって判定され得る。アッセイは、特異的なバリアントの存在およびバリアントの定量（ウイルス量）の両方を判定することが可能で、さらに、野生型に対するバリアントの比を決定することができる。

40

#### 【0186】

免疫抑制剤は、潜在的な微生物感染の進行もしくは再発への、または新しい微生物感染の収縮への対象の感受性を増加させ得ることを認識すべきである。幾つかの実施形態においては、微生物感染は、PMLを引き起こす、JCVによる感染である。したがって、PMLのリスクは、免疫抑制剤で治療を開始する前、免疫抑制剤の投与中、評価され得るか、または免疫抑制剤を投与した後、または免疫抑制治療での治療を終えた後に評価され得る。

#### 【0187】

幾つかの実施形態においては、本発明の方法によって判定される、PMLのリスクは、免疫調節剤または免疫抑制剤による治療を決定するのに役立つ。幾つかの実施形態においては、免疫調節剤による治療中、診断されたPMLの増加したリスクは、免疫調節剤による治療計画の修正または終了を示唆し得る。

#### 【0188】

## 【表1A】

表1A: JCV-VP1バリアントのパネル

JCV VP1	WT	健常な個人				PML 患者 (脳 + 末梢組織)				PML 患者 (末梢組織)				PML 患者 (脳組織)				
		位置	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異
55	L	29	0	0	0		50	5	10	5F 2M	13	3	23	3F	37	2	5	2F
60	K	29	0	0	0		50	4	8	1E 1N	13	1	8	1N	37	3	8	2M 1E
61	S	29	0	0	0		50	1	2	1L	13	0	0		37	1	3	1L
66	D	29	0	0	0		50	5	10	4H 1N	13	0	0		37	5	14	4H 1N
69	E	29	0	0	0		50	1	2	1D	13	0	0		37	1	3	1D
74	N	29	0	0	0		50	4	8	4S	13	0	0		37	4	11	4S
75	K	29	0	0	0		50	3	6	3R	13	0	0		37	3	8	3R
113	I	41	3	7	3L		50	18	36	18L	13	5	38	5L	37	13	35	13L
117	T	41	1	2	1S		50	8	16	8S	13	0	0		37	8	22	8S
123	S	41	0	0	0		50	4	8	4C	13	2	15	2C	37	2	5	2C
128	T	41	2	5	2A		50	6	12	6A	13	0	0		37	6	16	6A
134	A	41	20	49	20G		50	47	94	47G	13	10	77	10G	37	37	100	37G
158	V	29	0	0	0		50	4	8	4L	13	0	0		37	4	11	4L
164	T	29	5	17	5K		50	46	92	46K	13	10	77	10K	37	36	97	36K
223	V	42	0	0	0		52	1	2	1A	14	0	0		38	1	3	1A
265	N	42	0	0	0		52	4	8	3D 1T	14	4	29	3D 1T	38	0	0	
267	S	42	0	0	0		52	4	8	3F 1L	14	1	7	1F	38	3	8	2F 1L
269	S	42	0	0	0		52	12	23	9F 3Y	14	1	7	1F	38	11	29	8F 3Y
271	Q	42	0	0	0		52	1	2	1H	14	0	0		38	1	3	1H
321	I	42	20	48	20V		32	28	88	28V	5	1	20	1V	27	27	100	27V
332	Q	42	20	48	20E		32	29	91	29E	5	2	40	2E	27	27	100	27E
345	R	42	0	0	0		32	8	25	8K	5	0	0		27	8	30	8K

【0189】

## 【表1B】

表1B. I群 JCV-VP1バリアントのパネル

JCV VP1	WT	健常な個人				PML 患者 (脳 + 末梢組織)				PML 患者 (末梢組織)				PML 患者 (脳組織)				
		位置	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異
55	L	29	0	0	0		50	5	10	5F 2M	13	3	23	3F	37	2	5	2F
60	K	29	0	0	0		50	4	8	1E 1N	13	1	8	1N	37	3	8	2M 1E
61	S	29	0	0	0		50	1	2	1L	13	0	0		37	1	3	1L
66	D	29	0	0	0		50	5	10	4H 1N	13	0	0		37	5	14	4H 1N
69	E	29	0	0	0		50	1	2	1D	13	0	0		37	1	3	1D
74	N	29	0	0	0		50	4	8	4S	13	0	0		37	4	11	4S
75	K	29	0	0	0		50	3	6	3R	13	0	0		37	3	8	3R

【0190】

## 【表1C】

表1C. II群 JCV-VP1バリアントのパネル

JCV VP1	WT	健常な個人				PML 患者 (脳 + 末梢組織)				PML 患者 (末梢組織)				PML 患者 (脳組織)				
		位置	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異
265	N	42	0	0	0		52	4	8	3D 1T	14	4	29	3D 1T	38	0	0	
267	S	42	0	0	0		52	4	8	3F 1L	14	1	7	1F	38	3	8	2F 1L
269	S	42	0	0	0		52	12	23	9F 3Y	14	1	7	1F	38	11	29	8F 3Y
271	Q	42	0	0	0		52	1	2	1H	14	0	0		38	1	3	1H

【0191】

10  
2030  
40

50

## 【表1D】

表1D. III群JCV-VP1バリアントのパネル

位置 JCV VP1	WT	健常な個人				PML患者 (脳+末梢組織)				PML患者 (末梢組織)				PML患者 (脳組織)			
		配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異
113	I	41	3	7	3L	50	18	36	18L	13	5	38	5L	37	13	35	13L
123	S	41	0	0		50	4	8	4C	13	2	15	2C	37	2	5	2C
158	V	29	0	0		50	4	8	4L	13	0	0		37	4	11	4L
164	T	29	5	17	5K	50	46	92	46K	13	10	77	10K	37	36	97	36K
345	R	42	0	0		32	8	25	8K	5	0	0		27	8	30	8K

10

【0192】

## 【表1E】

表1E : I~III群JCV-VP1バリアントのパネル

位置 JCV VP1	WT	健常な個人				PML患者 (脳+末梢組織)				PML患者 (末梢組織)				PML患者 (脳組織)			
		配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異
55	L	29	0	0		50	5	10	5F 2M	13	3	23	3F	37	2	5	2F
60	K	29	0	0		50	4	8	1E 1N	13	1	8	1N	37	3	8	2M 1E
61	S	29	0	0		50	1	2	1L	13	0	0		37	1	3	1L
66	D	29	0	0		50	5	10	4H 1N	13	0	0		37	5	14	4H 1N
69	E	29	0	0		50	1	2	1D	13	0	0		37	1	3	1D
74	N	29	0	0		50	4	8	4S	13	0	0		37	4	11	4S
75	K	29	0	0		50	3	6	3R	13	0	0		37	3	8	3R
113	I	41	3	7	3L	50	18	36	18L	13	5	38	5L	37	13	35	13L
123	S	41	0	0		50	4	8	4C	13	2	15	2C	37	2	5	2C
158	V	29	0	0		50	4	8	4L	13	0	0		37	4	11	4L
164	T	29	5	17	5K	50	46	92	46K	13	10	77	10K	37	36	97	36K
265	N	42	0	0		52	4	8	3D 1T	14	4	29	1T	38	0	0	
267	S	42	0	0		52	4	8	3F 1L	14	1	7	1F	38	3	8	2F 1L
269	S	42	0	0		52	12	23	3Y	14	1	7	1F	38	11	29	8F 3Y
271	Q	42	0	0		52	1	2	1H	14	0	0		38	1	3	1H
345	R	42	0	0		32	8	25	8K	5	0	0		27	8	30	8K

20

30

【0193】

## 【表1F】

表1F. 大部分のPML脳試料中に見出されるJCV-VP1バリアントのパネル

位置 JCV VP1	WT	健常な個人				PML患者(脳+末梢組織)				PML患者(末梢組織)				PML患者(脳組織)			
		配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異
134	A	41	20	49	20G	50	47	94	47G	13	10	77	10G	37	37	100	37G
164	T	29	5	17	5K	50	46	92	46K	13	10	77	10K	37	36	97	36K
321	I	42	20	48	20V	32	28	88	28V	5	1	20	1V	27	27	100	27V
332	Q	42	20	48	20E	32	29	91	29E	5	2	40	2E	27	27	100	27E

40

【0194】

## 【表1G】

表1G. 健常な個人からの試料中に見出されないJCV-VP1リスクバリエントのパネル

位置 JCV VP1	WT	健常な個人				PML患者 (脳+末梢組織)				PML患者 (末梢組織)				PML患者 (脳組織)			
		配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異
55 L	29	0	0			50	5	10	5F 2M	13	3	23	3F	37	2	5	2F
60 K	29	0	0			50	4	8	1E 1N	13	1	8	1N	37	3	8	2M 1E
61 S	29	0	0			50	1	2	1L	13	0	0		37	1	3	1L
66 D	29	0	0			50	5	10	4H 1N	13	0	0		37	5	14	4H 1N
69 E	29	0	0			50	1	2	1D	13	0	0		37	1	3	1D
74 N	29	0	0			50	4	8	4S	13	0	0		37	4	11	4S
75 K	29	0	0			50	3	6	3R	13	0	0		37	3	8	3R
123 S	41	0	0			50	4	8	4C	13	2	15	2C	37	2	5	2C
158 V	29	0	0			50	4	8	4L	13	0	0		37	4	11	4L
223 V	42	0	0			52	1	2	1A	14	0	0		38	1	3	1A
265 N	42	0	0			52	4	8	3D 1T	14	4	29	3D 1T	38	0	0	
267 S	42	0	0			52	4	8	3F 1L	14	1	7	1F	38	3	8	2F 1L
269 S	42	0	0			52	12	23	3Y	14	1	7	1F	38	11	29	3Y
271 Q	42	0	0			52	1	2	1H	14	0	0		38	1	3	1H
345 R	42	0	0			32	8	25	8K	5	0	0		27	8	30	8K

【0195】

10

## 【表1H】

表1H. 健常な個人に見出されるJCV-VP1バリエントのパネル

位置 JCV VP1	WT	健常な個人				PML患者 (脳+末梢組織)				PML患者 (末梢組織)				PML患者 (脳組織) (tissue)			
		配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異	配列番号	変異数	変異%	変異
115 V	41	1	2	1E	50	0	0		13	0	0		37	0	0		
277 R	42	1	2	1K	52	0	0		14	0	0		38	0	0		

【0196】

30

## 【表2A】

表2A：健常な対象

配列	変異数	#領域	長さ	バリエント			
AAQ88264_gi 37050849 gb AAQ	0	0	347	コンセンサス			
AAB60589_gi 1161330 gb AAB6	2	0	27	128 A	134 G		
AAC54623_gi 1161332 gb AAC5	0	0	27				
AAG48112_gi 12056896 gb AAG	2	0	142	321 V	332 E		
AAG48114_gi 12056899 gb AAG	2	0	142	321 V	332 E		
AAG48119_gi 12056907 gb AAG	2	0	142	321 V	332 E		
AAG48121_gi 12056910 gb AAG	2	0	142	321 V	332 E		
AAG48123_gi 12056913 gb AAG	2	0	142	321 V	332 E		
AAG48125_gi 12056916 gb AAG	2	0	142	321 V	332 E		
AAG48127_gi 12056919 gb AAG	2	0	142	321 V	332 E		
AAG48544_gi 12082440 gb AAG	1	0	56	134 G			
AAG48545_gi 12082442 gb AAG	1	0	56	134 G			
AAG48546_gi 12082444 gb AAG	1	0	56	134 G			
AAG48547_gi 12082446 gb AAG	1	0	56	134 G			
AAG48548_gi 12082448 gb AAG	1	0	56	134 G			
AAG48549_gi 12082450 gb AAG	2	1	56	113 L	134 G		
AAG48550_gi 12082452 gb AAG	2	1	56	113 L	134 G		
AAG48551_gi 12082454 gb AAG	2	1	56	113 L	134 G		
AAL12481_gi 16118426 gb AAL	2	0	142	321 V	332 E		
AAL12483_gi 16118429 gb AAL	2	0	142	321 V	332 E		
AAR06661_gi 37993002 gb AAR	0	0	347				
AAR12957_gi 38156673 gb AAR	1	0	347	134 G			
AAR13077_gi 38176429 gb AAR	1	0	347	134 G			
AAR13659_gi 38195910 gb AAR	0	0	347				
AAR32743_gi 39939397 gb AAR	0	0	347				
AAR89187_gi 40737215 gb AAR	0	0	347				
AAR89193_gi 40737222 gb AAR	0	0	347				
AAR89199_gi 40737229 gb AAR	0	0	347				
AAR89205_gi 40737236 gb AAR	0	0	347				
AAR89211_gi 40737243 gb AAR	1	0	347	277 K			
AAR89217_gi 40737250 gb AAR	0	0	347				
AAR89223_gi 40737257 gb AAR	0	0	347				
AAR89229_gi 40737264 gb AAR	0	0	347				
AAR89235_gi 40737271 gb AAR	0	0	347				
AAR89241_gi 40737278 gb AAR	0	0	347				
AAR89247_gi 40737285 gb AAR	0	0	347				
AAR89253_gi 40737292 gb AAR	0	0	347				
AAR89259_gi 40737299 gb AAR	1	0	347	134 G			
AAR89265_gi 40737543 gb AAR	0	0	347				
AAR89271_gi 40737550 gb AAR	1	0	347	115 E			
AAR89277_gi 40737557 gb AAR	0	0	347				
AAR89283_gi 40737564 gb AAR	0	0	347				
ABA60111_gi 76885940 gb ABA	0	0	58				
BAA01963_gi 425204 dbj BAA0	4	1	347	134 G	164 K	321 V	332 E
BAA01964_gi 425205 dbj BAA0	4	1	347	134 G	164 K	321 V	332 E
BAA07834_gi 1772312 dbj BAA	2	0	134	321 V	332 E		
BAA07836_gi 1785835 dbj BAA	2	0	134	321 V	332 E		
BAA07838_gi 1785837 dbj BAA	2	0	134	321 V	332 E		
BAA07840_gi 1772321 dbj BAA	2	0	134	321 V	332 E		
BAB11698_gi 9796401 dbj BAB	4	1	347	134 G	164 K	321 V	332 E
BAB11704_gi 9796408 dbj BAB	4	1	347	134 G	164 K	321 V	332 E
BAB11716_gi 9796422 dbj BAB	3	0	347	134 G	321 V	332 E	
BAB11722_gi 9796429 dbj BAB	3	0	347	134 G	321 V	332 E	
平均値	1.2	0.1	234.7				

10

20

30

## 【表2B】

表2B: PML試料

配列	変異数	#領域	長さ	バリアント				
AAB62680_gi 2246607 gb AA	5	1	347	128A	134 G	<u>164</u> K	321 V	332 E
AAT09819_gi 47078338 gb A	5	3	347	113L	134 G	<u>164</u> K	<u>265</u> T	332 E
AAT09825_gi 47078345 gb A	1	1	347	267F				
AAT09831_gi 47078352 gb A	1	1	347	<u>55</u> F				
AAT09837_gi 47078359 gb A	1	1	347	<u>60</u> N				
BAE02848_gi 68445641 dbj	4	3	246	113L	134 G	<u>164</u> K	<u>265</u> D	
BAE02849_gi 68445643 dbj	3	2	246	<u>55</u> F	134 G	<u>164</u> K		
BAE02850_gi 68445645 dbj	4	3	246	113L	134 G	<u>164</u> K	<u>265</u> D	
BAE02851_gi 68445647 dbj	4	3	246	113L	123 C	134 G	<u>164</u> K	
BAE02852_gi 68445649 dbj	3	2	246	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> F		
BAE02853_gi 68445651 dbj	4	3	246	113L	123 C	134 G	<u>164</u> K	
BAE02854_gi 68445653 dbj	3	2	246	<u>55</u> F	134 G	<u>164</u> K		
BAE02855_gi 68445655 dbj	2	1	246	134 G	<u>164</u> K			
BAE02856_gi 68445657 dbj	3	2	246	134 G	<u>164</u> K	<u>265</u> D		
AAB60586_gi 1161322 gb AAB	2	0	134	321 V	332 E			Partial
AAB60584_gi 1161319 gb AAB	2	0	134	321 V	332 E			Partial
AAB62687_gi 2246615 gb AAB	6	2	347	<u>55</u> F	128A	134 G	<u>164</u> K	321 V
AAB94036_gi 2735983 gb AAB	4	1	347	<u>55</u> F	134 G	321 V	332 E	
BAA01965_gi 425206 dbj BAA	6	2	347	128A	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> F	321 V
BAA01966_gi 425207 dbj BAA	9	5	347	<u>60</u> H	<u>75</u> R	117 S	134 G	158 L
BAA01967_gi 425208 dbj BAA	8	4	347	117 S	134 G	158 L	<u>164</u> K	267 L
BAA01968_gi 425209 dbj BAA	8	3	347	74 S	117 S	128 A	134 G	<u>164</u> K
BAA01969_gi 425210 dbj BAA	6	3	347	113 L	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> F	321 V
BAA01970_gi 425211 dbj BAA	5	2	347	113 L	134 G	<u>164</u> K	321 V	332 E
BAA05636_gi 538231 dbj BAA	5	2	347	113 L	134 G	<u>164</u> K	321 V	332 E
BAA05637_gi 538234 dbj BAA	6	3	347	113 L	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> F	321 V
BAA05638_gi 538238 dbj BAA	5	2	347	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> Y	321 V	332 E
BAB11728_gi 9796436 dbj BA	6	3	347	113 L	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> F	321 V
BAB11734_gi 9796443 dbj BA	5	2	347	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> Y	321 V	332 E
BAE00111_gi 67968154 dbj B	8	3	347	74 S	117 S	128 A	134 G	<u>164</u> K
BAE00117_gi 67968161 dbj B	9	4	347	74 S	117 S	128 A	134 G	<u>164</u> K
BAE00123_gi 67968168 dbj B	9	4	347	74 S	117 S	128 A	134 G	<u>164</u> K
BAE00129_gi 67968175 dbj B	9	4	347	74 S	117 S	128 A	134 G	<u>164</u> K
BAE00135_gi 67968182 dbj B	4	1	347	134 G	<u>164</u> K	321 V	332 E	
BAE00141_gi 67968189 dbj B	4	1	347	134 G	<u>164</u> K	321 V	332 E	
BAE00147_gi 67968204 dbj B	5	2	347	113 L	134 G	<u>164</u> K	321 V	332 E
BAE00153_gi 67968211 dbj B	6	3	347	113 L	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> Y	321 V
BAE00159_gi 67968218 dbj B	6	3	347	<u>60</u> M	113 L	134 G	<u>164</u> K	321 V
BAE00165_gi 67968225 dbj B	6	3	347	113 L	123 C	134 G	<u>164</u> K	321 V
BAE00171_gi 67968232 dbj B	6	3	347	105 L	123 C	134 G	<u>164</u> K	321 V
BAE02837_gi 68445619 dbj B	2	1	246	134 G	<u>164</u> K			
BAE02838_gi 68445621 dbj B	3	2	246	<u>55</u> H	134 G	<u>164</u> K		
BAE02839_gi 68445623 dbj B	3	2	246	<u>55</u> H	134 G	<u>164</u> K		
BAE02840_gi 68445625 dbj B	4	3	246	<u>60</u> E	<u>66</u> H	134 G	<u>164</u> K	
BAE02841_gi 68445627 dbj B	4	3	246	113 L	134 G	<u>164</u> K	267 F	
BAE02842_gi 68445629 dbj B	4	3	246	<u>60</u> M	134 G	<u>164</u> K	270 H	
BAE02843_gi 68445631 dbj B	3	2	246	<u>55</u> H	134 G	<u>164</u> K		
BAE02844_gi 68445633 dbj B	4	3	246	113 L	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> F	
BAE02845_gi 68445635 dbj B	4	3	246	113 L	134 G	<u>164</u> K	267 F	
BAE02846_gi 68445637 dbj B	3	1	246	134 G	<u>164</u> K	223 A		
BAE02847_gi 68445639 dbj B	4	3	246	69 D	134 G	<u>164</u> K	<u>269</u> F	
P03089_gi 116626 sp P03089	8	4	347	<u>75</u> R	117 S	134 G	158 L	<u>164</u> K
BAB11710_gi 9796415 dbj BAB	8	4	347	<u>75</u> R	117 S	134 G	158 L	<u>164</u> K
								MAD-1
平均値	4.7	2.4	300.8					

## 診断

したがって、本発明の方法は、対象が、本発明のバリアント / 複数のバリアントのパネルおよび群に基づく PML のリスクがあるか、または PML に罹患しているかどうかを判定するために、一態様において有用である。バリアント JC Vへの暴露の兆候について、対象からの生体試料のアッセイは、人が、PML のリスクがあるか、または PML に罹患しているかどうか、または PML と関連する JC V バリアントによって感染しているかどうかを決定することを可能にする。対象が、本明細書に記載される 1つまたはそれ以上の VP 1 位置に配列変異を有する JC V バリアントに暴露しているかどうか、または感染しているかどうかの判定は、対象が、PML のリスクがあるかどうかの評価を可能にする (PML と関連する JC V バリアントの VP 1 位置のバリアントは、本発明のバリアントと称される)。一態様においては、本発明は、JC V バリアントの所定の位置の変異状態と PML のリスクとの間の相関関係を提供する。幾つかの実施形態においては、該バリアントは、JC V - VP 1 タンパク質に位置する。

本明細書において使用される、PMLを「診断する」および「特定する」とは、人がPMLのリスクがあるかどうか、またはPMLに罹患しているかどうかの認識を意味する。PMLのリスクがあるという診断は、JCVバリアントへの暴露を示す位置のバリアントの判定に限定されず、当技術分野で日常の診断方法と組み合わせられ得る。これらの診断アッセイとしては、MRIおよびトモグラフィー、神経学的アッセイ、生化学的アッセイを含む、組織病理学、免疫組織化学、フローサイトメトリー、細胞学、病態生理学アッセイが含まれるが、これらに限定されない。CSF中のPCRによるJCV-DNAの検出は、最も広く容認されているPMLの診断テストである。それは、99%の特異性および70%の選択性を有する。CSFのJCV-PCR陽性結果がない場合は、脳生検が行われ得る。脳組織中のJCV-DNA検出は、PMLの陽性診断として用いることができる。生化学的アッセイとしては、所定の位置以外のバリアント分析、ウイルスゲノム分析、特異タンパク質のELISA分析、血小板数等が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、当技術分野で日常的に利用される多くの診断プロトコルおよびパラメータを知っているであろう。

10

#### 【0199】

診断はまた、JCVバリアントの量（ウイルス量）の判定、ならびに試料および／または対象におけるJCVバリアント対JCV野生型の比を網羅する。

#### 【0200】

本発明の方法および／またはキットを用いて、JCVバリアントへの暴露を示す所定の位置のバリアント（本発明のバリアント）の存在によって示されるように、PMLに罹患している、およびPMLのリスクがある対象をスクリーニングすることができ、ここで、本発明の1つまたはそれ以上のバリアントの存在は、PMLのリスクがあることと関連する。PMLと関連するJCVバリアントに暴露されている、または暴露される疑いがある対象からの試料中の本発明のバリアントを評価することによって、本発明の方法を用いて、PMLのリスクを診断することができる。

20

#### 【0201】

幾つかの態様においては、本発明は、対象が、VP1タンパク質中の特定の位置に1つまたはそれ以上のバリアントを有するJCVバリアントに暴露されているかどうかを判定するための様々なアッセイを含む。本発明の方法およびアッセイを用いて、時間経過に伴う、試料および／または対象における本発明のバリアントの状態の変化をモニターすることができる。さらに、本発明の方法を用いて、異なる時点で対象から複数の試料を採取することによって、時間経過に伴う、対象に存在するJCVバリアント量をモニターすることができる。故に、本発明の方法を用いて、時間経過に伴う、対象または試料における、本発明のバリアントおよび／またはJCVバリアントの量の変化を試験することができる。これは、PMLを発症するリスクがあると疑われている対象における変異状態のモニタリングが可能であり、また、JCVバリアントに暴露されることが知られている対象において定量的モニタリングも可能である。

30

#### 【0202】

##### JCV-VP1バリアント核酸、ポリペプチド、および抗体の検出

一態様においては、本発明は、生体試料中のJCVバリアントポリペプチドに特異的に結合することができるJCV-VP1バリアントポリペプチドおよび／または抗体（またはそれぞれ、本発明のポリペプチドおよび抗体とも称される）の検出のための方法を提供する。ポリペプチドおよび抗体を検出する方法は、当技術分野で周知であり、本発明は、任意の特定の検出方法に限定されない。さらに、本発明のポリペプチドまたは抗体をコードする核酸の検出を通して、ポリペプチドおよび抗体を直接検出することができる。核酸の検出のための方法は、当技術分野で周知であり、限定されない例は、PCR、シーケンシング、ハイブリダイゼーション分析、プローブ分析、およびマイクロアレイ分析であり、これらは全て、本発明に包含される。ポリペプチドおよび／または抗体の検出のための方法の限定されない例には、ペプチドシーケンシング、質量分析、および免疫吸着アッセイ（例えば、抗体へのポリペプチドの結合）およびタンパク質アレイが含まれる。

40

50

## 【0203】

酵素結合免疫吸着剤アッセイ（E L I S A）は、ポリペプチドを含む様々な抗原の検出のために使用される周知のアッセイである。本発明は、本発明のポリペプチドの存在を検出することができる任意のE L I S A、および試料中の本発明の抗体の存在を検出することができる任意のE L I S Aを包含する。

## 【0204】

一実施形態においては、E L I S Aの第1のステップは、マルチウェルプレートに結合するJ C V - V P 1ポリペプチドに対して特異的な一次抗体を提供することを含む。本発明は、マルチウェルプレートに限定されず、抗体は、ビーズおよびスライドガラスを含む任意の表面に固定化され得る。本発明はまた、抗体に限定されず、アプタマー、抗体断片、および小分子を含む任意のペプチド結合部分は、本発明に包含される。本発明は、本発明のポリペプチドの存在の定性的および定量的決定の両方を包含する。一実施形態においては、ウェルは、ウシ血清アルブミンまたはカゼイン等の高濃度の無関連タンパク質を含有する緩衝液を用いて、遮断することができる。遮断ステップは、表面の任意のコーティングされていない領域が、必要に応じて、反応しないタンパク質で占有されることを確実にする。次いで、過剰な遮断剤は、1回またはそれ以上の洗浄によって除去される。幾つかの実施形態においては、E L I S Aは、多重アッセイであり、マルチウェルプレートのそれぞれのウェルは、ある特異的なJ C V - V P 1ポリペプチドバリアントに対して特異的な抗体を含む。表面が遮断されると、J C V - V P 1ポリペプチドを含む試料、またはJ C V - V P 1ポリペプチドの存在に対して試験すべき試料は、一次抗体と接触させることができ、一次抗体へのJ C V - V P 1ポリペプチドの特異的な結合を可能にするのに適した条件下および時間、インキュベートすることが可能である。そのような条件および時間は、例えば、室温で、3～4時間、または4°で、10～16時間であり得る。次いで、過剰な試料は、1回またはそれ以上の洗浄によって除去される。次のステップとして、J C V - V P 1ポリペプチドに対して特異的な二次抗体はまた、一次抗体・ポリペプチド複合体に接触し、二次抗体によってJ C V - V P 1ポリペプチドの特異的な結合を可能にするのに適した条件下および時間、インキュベートすることが可能である。そのような条件および時間は、例えば、1～10マイクログラム/mLでの抗体、室温で、1～4時間、4°で10～16時間であり得る。幾つかの実施形態においては、二次抗体を、蛍光タグ、または代謝酵素に接触させ、結合J C V - V P 1ポリペプチドの検出を可能にする。代替として、結合J C V - V P 1ポリペプチドは、標識三次抗体と二次抗体を接触させることによって判定することができる。上記のE L I S Aは、J C V - V P 1ポリペプチドが、2つの抗体（一次抗体および二次抗体）の間に挟まれる場合、サンドイッチE L I S Aとして称される。

## 【0205】

幾つかの実施形態においては、J C V - V P 1ポリペプチドに対して特異的な抗体の存在が、判定される。本発明は、本発明の抗体の存在の定性的および定量的決定の両方を包含する。抗体の存在の決定は、現在および過去の感染の両方の決定を可能にことができる。ほとんどの場合、人体は、J C V タンパク質等の外来ポリペプチドに対して抗体を生じる。ウイルス（例えば、ウイルス核酸）自体がもはや体内に検出されない場合であっても、ウイルスに対する抗体はなお、存在し、それによって、ウイルスへの暴露の指標であり得る。バリアントJ C V - V P 1ポリペプチドに対して特異的な抗体を検出するための方法の一実施形態においては、1つまたはそれ以上の固体表面（例えば、マルチウェルプレート、ビーズ、またはスライド）が提供され、それぞれの表面は、固定化した特有のJ C V - V P 1ポリペプチドバリアントを有する。

## 【0206】

幾つかの実施形態においては、J C V - V P 1ポリペプチドバリアントは、J C V 粒子（例えば、1つまたはそれ以上のバリアントを含み、例えば、アッセイ表面上に固定化される粒子を形成するために自己組織化した、組み換えV P 1タンパク質）として固定化される。これらの粒子は、本明細書に記載される1つまたはそれ以上のバリアントを含み得

10

20

30

40

50

る（例えば、表1A～1H、表17、および／もしくは表18、および／または本明細書に記載される1つまたはそれ以上の他のバリアントを参照のこと）。

#### 【0207】

それぞれのポリペプチドバリアントは、表1A～1H、表17、および／もしくは表18の1つまたはそれ以上のバリアント、および／または本明細書に記載される1つまたはそれ以上の他のバリアントを含む。複数のペプチドは、1つまたはそれ以上の同じバリアントを網羅し得る。一実施形態においては、ポリペプチドバリアントの組み合わせを固体表面に付着させる。幾つかの実施形態においては、固体表面のマルチウェルプレートを提供し、それぞれのウェルは、1つまたはそれ以上のバリアントを含む。幾つかの実施形態においては、マルチウェルプレートは、PMLのリスクを示す本明細書に記載される全てのバリアントを網羅するペプチドを有するウェルを含む。本明細書に記載されるJCV-VP1ポリペプチドバリアントに結合することができる1つまたはそれ以上の抗体を含む、または含む疑いがある試料は、固定化JCV-VP1ポリペプチドに結合するための抗体に適した条件下で、固定化ペプチドと接触させる。続いて、結合抗体の存在は、二次抗体の結合を通して検出される。

10

#### 【0208】

本発明のELISAは、上記の実施形態に限定されないが、競合ELISAならびに本発明のポリペプチドおよび抗体の検出を可能にするいかなる形態のELISAも包含する。

20

#### 【0209】

##### 発病、進行、回帰

本発明の方法および／またはキットを用いて、PMLの発病、進行、および／または回帰の早期指標を提供することによって有用な予後情報を得ることができる。本発明は、例えば、連続する時点で、対象から試料を得ること、および本発明のJCVバリアントへの暴露のためにそのような試料をアッセイすることによって、対象におけるPMLおよび／またはJCVバリアント感染の発病、進行、または回帰をモニターするための方法を含む。対象は、PMLに罹患している疑いがあり得るか、またはPMLに罹患していないと考えられ得、後者の場合、該試料は、その後の試料との比較のための正常なベースライン値として機能を果たし得る。

30

#### 【0210】

状態の発病は、対象における状態と関連する変化の開始である。そのような変化は、生理的症状によって証明され得る。しかしながら、患者は、臨床的に無症候であり得る。例えば、PMLおよび／またはJCV感染の発病後、臨床的症状がその時は明らかではないかもしれないが、対象におけるPML関連の病原性変化があり得る期間が続き得る。PMLの進行は、発病に続き、状態の病原性（例えば、生理的）要素の進展であり、これは、臨床的な症状の増加を特徴とし得るか、または特徴とし得ない。対照的に、PMLおよび／またはJCV感染の回帰は、おそらく並行した症状の低減とともに、状態の生理的な特徴の低減を含み得、治療に由来し得るか、または状態の天然の逆転であり得る。PMLおよび／またはJCV感染の発病は、対象から得られた試料中の調査された位置のバリアントの変化によって示され得る。例えば、調査された位置のバリアント数が、対象からの第2の、もしくはそれに続く試料においてよりも、対象からの第1の試料において少ない場合、それは、PMLおよび／またはJCV感染の発病または進行を示し得る。幾つかの実施形態においては、唯一1つのバリアントの存在が、PMLの発病または進行を示し得る。幾つかの実施形態においては、該バリアントは、位置164である。特定の実施形態においては、位置164のバリアントアミノ酸（例えば、Lys）の出現は、PMLの発病または進行を示す。幾つかの実施形態においては、PMLおよび／またはJCV感染の発病は、JCVバリアントのウイルス量および／またはJCV野生型に対するJCVバリアントの比の変化によって示される。幾つかの実施形態においては、ウイルス量の増加は、バリアント数の増加を伴う。

40

#### 【0211】

50

PMLおよび/またはJCV感染の進行および回帰は、一般的に、時間経過に伴い、対象の試料中の調査された位置のバリアント数の増加または減少によって示され得る。例えば、バリアント数が、対象からの第1の試料中に少なく、バリアントレベルの増加が、対象からの第2の、もしくはそれに続く試料に存在すると判定される場合、それは、それぞれ、PMLおよび/またはJCV感染の進行を示し得る。バリアント数の増加および減少は共に、それぞれ、PMLおよび/またはJCV感染の進行または回帰を示し得ることを認識すべきである。例えば、ある位置のバリアント数は増加し得るが、他の位置のバリアント数は、減少し得、その双方の変化は、PMLおよび/またはJCV感染を示す。

#### 【0212】

PMLおよび/またはJCV感染の進行はまた、JCVバリアントのウイルス量の増加、またはJCV野生型に対するJCVバリアントの比の増加によって示され得るが、回帰は、JCVバリアントのウイルス量の減少、またはJCV野生型に対するJCVバリアントの比の減少によって示され得る。

#### 【0213】

発病、進行、および回帰は、異なる時点で対象から得られた複数の試料をアッセイすることによって判定することができる。例えば、異なる時点で取り込んだ第1群の試料が、PMLの発病、進行、または回帰を示さないとしても、さらなる試料を採取して、本発明のバリアントについてアッセイし、早期試料と比較して、発病、進行、または回帰が生じているかどうかを判定することができる。幾つかの実施形態においては、さらなる試料は、1つまたはそれ以上の免疫調節剤の投与計画が修正される場合、アッセイされる。

#### 【0214】

##### PML治療のためのアッセイ

また、本発明の方法を用いて、様々な時点で、対象における、JCウイルスのバリアントへの暴露に対する調査によって、PMLの治療処置の有効性を評価し得る。例えば、バリアントJCウイルスへの暴露を示すバリアント数は、治療計画の開始前（癌または前癌状態の予防または治療のいずれか）、治療計画中、および/または治療計画後に得ることができ、故に、対象における該計画の有効性における情報を提供することができる。さらに、PMLリスクを示すJCVバリアントの存在度はまた、時間経過に伴いモニターすることができる。幾つかの実施形態においては、JCVバリアントの量（ウイルス量）または野生型JCVに対するJCVバリアントの比は、対象における該計画の有効性における情報を提供し得る。本発明の方法を用いて、異なる時点で、対象から得られた2つまたはそれ以上の試料中の変異した位置を比較し得る。幾つかの実施形態においては、試料は、対象から得られ、該対象は、PMLの治療を施され、その後の試料が、対象から得られる。本発明の対象のバリアント、またはJCバリアントのウイルス量、またはJCV野生型に対するJCバリアントの比の比較は、異なる時点で、および/または異なる日数において、得られた試料中で判定され、それによって、対象のPMLの状態の測定を提供し、これを用いて、対象における、PMLおよび/またはJCV感染の任意の治療の有効性を判定することができる。

#### 【0215】

本明細書において使用される、PML治療は、予防および治療処置の両方を包含し、PMLの予防および治療の両方を包含する。対象は、PMLのリスクがあると判定されている、または代替として、該対象が、PMLに罹患し得るため、対象は、PML治療を受けることができる。故に、治療は、PMLおよび/またはJCV感染を低減させるか、または完全に排除するか、または悪化するのを予防し得る。本明細書において使用される、「治療の評価」とは、異なる試料時点で、例えば、少なくとも1日おきに、対象から得られた試料中のJCVバリアントへの暴露を示す対象のバリアントレベルまたはJCVバリアントのウイルス量の比較を意味する。幾つかの実施形態においては、対象から第2の試料を得る時間は、対象から第1の試料を得てから少なくとも5、10、20、30、40、50分後である。ある実施形態においては、対象から第2の試料を得る時間は、対象から第1の試料を得てから少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、1

10

20

30

40

50

2、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、36、48、72、96、120時間後、またはそれ以上である。幾つかの実施形態においては、対象から第2の試料を得る時間は、対象から第1の試料を得てから少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、28、35、42、49、56、60、90、120、150、180、360日後、またはそれ以上である。

#### 【0216】

##### PMLの治療

一実施形態においては、PMLの治療のための治療剤は、抗感染剤である。治療剤は、微生物感染を治療する抗感染剤、例えば、CNSの感染を治療するのに有効な治療剤であり得る。幾つかの実施形態においては、抗感染剤は、siRNAであり得る。しかしながら、他の適した抗感染剤が、使用され得る。抗感染剤は、抗ウイルス剤等の抗菌剤であり得る。抗感染剤は、抗真菌薬または抗菌剤等のさらなる抗感染剤と組み合わせられ得る。本発明の治療剤は、天然に存在する、または合成分子または化合物であり得る。本発明の方法および組成物に有用な治療剤は、ポリペプチド、化学的、小分子、脂質、核酸、または他の化合物であり得る。

10

#### 【0217】

本発明の方法および組成物において、治療剤（例えば、抗感染剤）として使用することができる核酸の例は、PMLを含む、CNS疾患または障害を予防する、および／または治療するために使用することができる低分子干渉RNA分子（siRNA）、アンチセンスDNA、アンチセンスRNA、またはアプタマーである。本明細書において使用される、「低分子干渉RNA」または「siRNA」とは、RNA分子を産生するために、細胞内で、二本鎖RNA（dsRNA）の連続的切断に由来し得るRNA分子を指す。有効なsiRNAは、一般的に、15～30ヌクレオチドの長さ、さらに、多くの場合、20～25のヌクレオチドの長さを有する。siRNAは、動物におけるRNA干渉中に、対応するmRNA標的の破壊を導くために機能する。本発明の方法は、部分的に、バリアントJCウイルスと関連するCNS疾患または障害（例えば、CNS感染）を治療するために、siRNA分子の投与を含む。幾つかの態様においては、本発明の方法は、CNS疾患または状態の治療として、siRNAおよび／または前駆体siRNAを含む治療組成物を対象に投与することを含み得る。前駆体siRNA分子は、投与後、例えば、酵素Dicerによって、大きさを減少させ、所望のsiRNAを形成することができる、二本鎖RNA分子であり、これにより、CNS疾患または状態のRNAi治療に対して機能的になる。故に、本発明の方法は、CNS疾患または状態を治療するために、siRNAまたは前駆体siRNA分子の投与を含み得る。

20

#### 【0218】

##### 治療の選択

幾つかの実施形態においては、本発明の方法を用いて、PMLに罹患している、またはPMLのリスクがある対象のための治療を選択するのに役立ち得る。PMLに対する治療の選択は、JCVバリアントへの暴露を示すバリアントの判定に基づき得る。治療の選択はまた、試料中のJCVバリアント量（ウイルス量）または野生型JCVに対するバリアントJCVの比に基づき得る。治療を選択する方法は、既にPMLに対して薬物または治療を受けている対象の治療を評価する、および／または調節するのに有用であり得る。JC Vバリアントへの暴露を示すことが見出されるバリアントに基づいて、対象に対する治療計画を変更するのに適切であり得る。例えば、PMLまたはJC Vの治療を受けたことがあるか、または受けている対象における、JC Vバリアントへの暴露を示す1つまたはそれ以上の位置の変化の検出は、治療計画が、調節すべきであることを示し得る（例えば、投与の用量または頻度、増加した、開始される新規の治療等）。幾つかの実施形態においては、JC Vバリアントのウイルス量、または野生型JC Vに対するバリアントJC Vの比の変化は、治療計画が調節すべきであることを示し得る。幾つかの実施形態においては、対象は、PMLおよび／またはJC V感染に対するいかなる現行の治療もなく、

30

40

50

J C V バリアントへの暴露を示す位置のバリアントのモニタリング、および / または J C V バリアントのウイルス量および / または J C V 野生型に対する J C V バリアントの比は、P M L および / または J C V 感染に対する治療の候補として対象を特定し得る。故に、対象は、J C V バリアントへの暴露の兆候、および / または J C V バリアントのウイルス量、および / または J C V 野生型に対する J C V バリアントの比に対するアッセイの結果として、より高いレベルの同じ薬物、または異なる治療法を選択し、これらで治療し得る。

#### 【 0 2 1 9 】

本発明によれば、一部の対象は、そうでなければ特定の療法での治療を要求するであろう症状がなく、J C V バリアントへの暴露の兆候の検出および / または J C V バリアントのウイルス量および / または J C V 野生型に対する J C V バリアントの比は、対象を治療が必要であるとして特定し得る。これは、J C V バリアントへの暴露の兆候および / または J C V バリアントのウイルス量および / または J C V 野生型に対する J C V バリアントの比を特定するために本発明の方法の使用がない限り、対象は、慣例によれば、本出願の出願日現在で、特定の P M L および / または J C V 感染治療で治療を要求する症状がないことを意味する。

#### 【 0 2 2 0 】

一態様においては、本発明は、P M L に対する治療計画に関する決定のための方法を提供する。医師は、本発明の診断アッセイに基づいて少なくとも部分的に、治療法の選択肢の決断を下すことができる。

10

20

30

40

#### 【 0 2 2 1 】

##### 免疫調節剤に関する治療

治療を選択する方法は、P M L または J C V 感染を対象にしないが、異なる状態を対象にする治療を受けている対象に有用であり得る。一実施形態においては、該治療は、免疫調節剤を含む治療である。幾つかの実施形態においては、P M L を発症するリスクがある疑いがある人は、免疫調節剤で治療を受けている人である。

#### 【 0 2 2 2 】

幾つかの実施形態においては、P M L を対象にする治療を受けたことがあるか、または受けている対象において、J C V バリアントへの暴露の 1 つまたはそれ以上の兆候の変化の検出は、治療計画が、調整されるべきであることを示し得る。幾つかの実施形態においては、免疫調節剤による治療を受けたことがあるか、または受けている対象において、J C V バリアントへの暴露の 1 つまたはそれ以上の兆候の変化の検出は、治療計画が、調整されるべきであることを示し得る。幾つかの実施形態においては、免疫調節剤による治療を受けたことがあるか、または受けている対象において、J C V バリアントのウイルス量または野生型に対する J C V バリアントの比の変化の検出は、治療計画が、調整されるべきであることを示し得る。幾つかの実施形態においては、該免疫調節剤は、ナタリズマブである。幾つかの実施形態においては、免疫調節剤による治療を受けたことがあるか、または受けている対象において、J C V バリアントのウイルス量および / または野生型に対する J C V バリアントの比の増加の検出は、治療計画が、終了されるか、または中断されるべきであることを示し得る。幾つかの実施形態においては、該免疫調節剤は、ナタリズマブである。

#### 【 0 2 2 3 】

一態様においては、本発明は、治療計画の決定のための方法を提供する。医師は、本発明の診断アッセイに基づいて、少なくとも部分的に治療の選択肢を決定することができる。幾つかの実施形態においては、本発明の方法は、免疫抑制剤による適した治療を決定するための診断アッセイを提供する。幾つかの実施形態においては、医師は、本発明の 1 つまたはそれ以上の J C V - V P 1 の診断アッセイの結果に基づいて、免疫抑制剤による治療を終了するか、または中断することを決定し得る。幾つかの実施形態においては、本発

50

明の方法は、対象が免疫不全をきたした場合、該対象の治療のための診断アッセイを提供する。幾つかの実施形態においては、医師は、本発明の J C V - V P 1 の診断アッセイの結果に基づいて、免疫不全をきたした対象の治療を終了するか、または中断することを決定し得る。

**【 0 2 2 4 】**

免疫不全をきたした対象または免疫調節剤による治療を受けている対象

本発明のアッセイは、特に、免疫不全をきたした対象および／または 1 つまたはそれ以上の免疫調節剤により治療されている対象に有用であり得る。

**【 0 2 2 5 】**

対象は、異なる疾患または状態を対象にする 1 つまたはそれ以上の免疫抑制剤（免疫調節剤とも称される）による治療を受けている場合があり、これには、1 つまたはそれ以上の以下の限定されない例を含む：癌、臓器もしくは組織移植、炎症状態もしくは疾患、多発性硬化症（M S）、関節炎等、またはその任意の組み合わせ。

**【 0 2 2 6 】**

また、対象は、免疫不全をきたした者であり得る。免疫不全をきたした対象の限定されない例は、H I V 陽性であるか、またはA I D S もしくはリンパ腫に罹患している、または免疫応答の抑制を生じさせる任意の他の状態を有する、対象である。

**【 0 2 2 7 】**

本明細書において使用される、「免疫抑制剤」という用語は、本明細書において治療される対象の免疫系を抑制するか、遮蔽するように作用する物質を指す。免疫抑制剤は、サイトカイン産生を抑制する、自己抗原を下方制御するか、もしくは抑制する、またはM H C 抗原を遮蔽する物質であり得る。このような薬剤の例には、2 - アミノ - 6 - アリール - 5 - 置換ピリミジン（米国特許第 4 , 6 6 5 , 0 7 7 号を参照のこと）；非ステロイド抗炎症性薬物（N S A I D ）；ガンシクロビル、タクロリムス、グルココルチコイド、例えばコルチゾールもしくはアルドステロン、抗炎症剤、例えばシクロオキシゲナーゼ阻害剤、5 - リポキシゲナーゼ阻害剤、もしくはロイコトリエン受容体アンタゴニスト；ブリンアンタゴニスト、例えばアザチオプリンもしくはミコフェノレートモフェチル（M M F ）；アルキル化剤、例えばシクロホスファミド；プロモクリプチン；ダナゾール；ダブソン；グルタルアルデヒド（米国特許第 4 , 1 2 0 , 6 4 9 号に記載されるように、M H C 抗原を遮蔽する）；M H C 抗原およびM H C 断片に対する抗イディオタイプ抗体；シクロスボリン A ；ステロイド、例えばコルチコステロイドもしくはグルココルチコステロイドまたはグルココルチコイドアナログ、例えばプレドニゾン、メチルプレドニゾロン、およびデキサメタゾン；ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤、例えばメトトレキセート（経口または皮下）；ヒドロキシクロロキン；スルファサラジン；レフルノミド；サイトカインまたはサイトカイン受容体アンタゴニスト（抗インターフェロン 抗体、抗インターフェロン 抗体もしくは抗インターフェロン 抗体、抗腫瘍壞死因子 抗体（インフリキシマブまたはアダリムマブ）、抗T N F - イムノアヘシン（エタネルセプト）、抗腫瘍壞死因子 抗体、抗インターロイキン 2 抗体、および抗I L - 2 受容体抗体を含む）；抗L F A - 1 抗体（抗C D 1 1 a および抗C D 1 8 抗体を含む）；抗C D 2 0 抗体（例えばリツキシマブ、例えば、商標R I T U X A N 下で入手可能）；抗L 3 T 4 抗体；抗V L A - 4 抗体（例えば、ナタリズマブ、例えば、商標T Y S A B R I 下で入手可能）；異種抗リンパ球グロブリン；汎T 抗体、例えば抗C D 3 抗体もしくは抗C D 4 / C D 4 a 抗体；L F A - 3 結合ドメインを含有する可溶性ペプチド（1 9 9 0 年 7 月 2 6 日に公開されたW O 第 9 0 / 0 8 1 8 7 号）； streptokinase ; T G F - ; streptodornase ; 宿主からのR N A もしくはD N A ; F K 5 0 6 ; R S - 6 1 4 4 3 ; デオキシスペルグアリン ; ラパマイシン ; T 細胞受容体 ( Cohen et al . , 米国特許第 5 , 1 1 4 , 7 2 1 号 ) ; T 細胞受容体断片 ( Offner et al . , Science , 2 5 1 : 4 3 0 4 3 2 ( 1 9 9 1 ) ; W O 第 9 0 / 1 1 2 9 4 号 ; Ianeway , Nature , 3 4 1 : 4 8 2 ( 1 9 8 9 ) ; およびW O 第 9 1 / 0 1 1 3 3 号 ) ; およびT 細胞受容体抗体 ( E P 第 3 4 0 , 1 0 9 号 ) 、例えばT 1 0 B 9 が含まれる。しかしながら、他の

10

20

30

40

50

免疫抑制剤を受けている対象は、診断アッセイに選択され得る、および / または本発明が、本態様に限定されないものとして処理され得る。

【 0 2 2 8 】

## 候補治療剤に対するスクリーニング

本発明はまた、PMLおよび/もしくはJCV感染を予防するおよび/もしくは治療するための候補治療剤または戦略に対するスクリーニングのための方法も包含する。候補治療剤および戦略の有効性の評価は、対象（例えば、非ヒト動物）において、および培養液からの細胞中の本発明のアッセイを用いて行われ得る。幾つかの実施形態においては、候補治療剤は、PMLと関連する1つまたはそれ以上のJCV-VP1バリアントを含むポリペプチドと相互作用することができる化合物または分子であり得る。幾つかの実施形態においては、候補治療剤は、JCV感染に罹患している対象における、JCVP1バリアントのパターンおよび数を変化させることができる化合物または分子であり得る。幾つかの実施形態においては、候補治療剤は、試料または対象における、JCVP1バリアントの量（ウイルス量）を低下させることができる薬剤である。幾つかの実施形態においては、候補治療剤は、野生型JCVに対するバリアントJCVの比を低下させることができる薬剤である。幾つかの実施形態においては、候補治療剤は、JCVP1バリアントを模倣し、かつJCV結合に対して競合することができる薬剤（例えば、小分子）である。幾つかの実施形態においては、対象への薬剤の投与、または候補剤もしくは候補治療への試料の暴露は、対象における、JCV感染と関連するJCVP1バリアントのパターンの変化をもたらす。幾つかの実施形態においては、対象への薬剤の投与、または候補剤もしくは候補治療への試料の暴露は、JCV感染において、PML関連のJCVP1バリアント数の変化をもたらす。幾つかの実施形態においては、対象への薬剤の投与、または候補剤もしくは候補治療への試料の暴露は、JCVP1バリアントのウイルス量および/またはJCV野生型に対するJCVP1バリアントの比の低下をもたらす。

【 0 2 2 9 】

一実施形態においては、JCVバリアントを発現する細胞を含む試料が、候補治療剤または治療に暴露される。JCVバリアントを発現しない、該候補剤に暴露される細胞を含む試料は、対照としての機能を果たす。JCVバリアントの発現レベル（ウイルス量）は、候補治療剤または治療の投与の際、モニターされ、JCVバリアントの発現の変化は、候補治療剤による治療が施されなかった試料と比較される。薬剤に暴露されている試料中の本発明のJCVバリアントのウイルス量のレベルが、対照試料と比較して変化がある場合、該薬剤は、候補治療剤または候補治療である。幾つかの実施形態においては、JCVバリアントは、細胞から発現し、分泌され、候補剤と接触させる。JCVバリアントに結合することができる任意の候補剤は、候補治療剤である。幾つかの実施形態においては、該候補治療剤は、JCVバリアントのVP1ポリペプチドに結合する。

【 0 2 3 0 】

幾つかの実施形態においては、本発明は、JCV感染におけるPML関連VP1バリアントの数またはレベルを抑制し、かつPMLのリスクを抑制する、候補治療剤を特定するための方法を提供する。幾つかの実施形態においては、該候補治療剤は、PMLでもJC V感染でもない疾患または状態を対象にする。幾つかの実施形態においては、該候補治療剤は、免疫調節剤である。幾つかの実施形態においては、該候補治療剤は、免疫抑制治療に規定されている薬剤である。

[ 0 2 3 1 ]

J C V バリアントの発現レベルを調節する薬剤または治療に対してスクリーニングする方法が、本発明に包含される。スクリーニング法は、細胞もしくは組織と、または対象において、候補剤を混合すること、または細胞もしくは組織もしくは対象を候補治療に暴露すること、および J C V バリアントのウイルス量をアッセイする方法を用いて、候補剤または治療と接触させる前および後の発現のレベルを判定することを含み得る。対照と比較して J C V バリアントの発現量の低下は、候補剤または治療が、細胞、組織、および／または対象において、P M L および／または J C V 感染を治療することが可能であることを

示す。

### 【0232】

幾つかの実施形態においては、候補剤を試験するためのアッセイ混合物は、候補剤を含む。候補剤は、抗体、小有機化合物、またはポリペプチドであり得、したがって、組み合わせ抗体ライブラリー、組み合わせタンパク質ライブラリー、または有機小分子ライブラリーから選択され得る。通常、様々な濃度に対する異なる反応を得るために、複数の反応混合物を、異なる薬剤濃度で並行して実行する。通常、これらの濃度のうちの1つは、例えば、薬剤のゼロ濃度で、またはアッセイ検出の限度を下回る薬剤の濃度で、陰性対照としての役割を果たす。

### 【0233】

任意の分子または化合物は、候補治療剤であり得る。候補治療剤の限定されない例は、小分子、siRNAを含むRNA、アプタマーを含むDNA、ならびに抗体および抗体断片を含むタンパク質である。本発明はまた、異なる作用モードを有する候補治療剤を包含する。

### 【0234】

候補剤は、多くの化学クラスを包含するが、通常、それらは有機化合物、タンパク質、または抗体（および抗原に結合するその断片）である。幾つかの実施形態においては、該候補剤は、小有機化合物、例えば、50超で約2500未満、例えば、約1000未満、ある実施形態においては、約500未満の分子量を有するものである。候補剤は、ポリペプチドおよび/または核酸との構造的相互作用に必要な化学官能基を含み、少なくとも1つのアミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボキシル基を含み得、任意に、少なくとも2つの化学官能基、または少なくとも3つの化学官能基を含み得る。候補剤は、1つまたはそれ以上の上記で特定された官能基により置換されている、環式炭素もしくは複素環構造、および/または芳香族もしくはポリ芳香族構造を含むことができる。候補剤はまた、生体分子、例えば核酸、ポリペプチド、単糖類、脂肪酸、ステロール、イソプレノイド、プリン、ピリミジン、上記のものの誘導体または構造類似体、またはそれらの込み合わせ等であり得る。

### 【0235】

候補剤は、合成または天然化合物のライブラリーを含む、広範囲の供給源から得られる。例えば、多くの手段は、広範囲の有機化合物および生体分子のランダムおよび定方向合成に利用可能であり、これには、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現、合成有機組み合わせライブラリー、ランダムまたは非ランダムポリペプチドのファージ提示ライブラリー、タンパク質もしくは抗体の組み合わせライブラリー等が含まれる。代替として、細菌、真菌、植物、および動物抽出物の形態での天然化合物のライブラリーが利用可能であり、また、容易に産生される。さらに、天然および合成的に産生されたライブラリーおよび化合物を、従来の化学的、物理的、および生化学的手段により容易に修飾することができる。さらに、既知の薬剤を、アクリル化、アルキル化、エステル化、アミド化等の定方向的またはランダム化学修飾に供して、薬剤の構造的類似体を産生し得る。

### 【0236】

種々の他の試薬もまた、混合物に含むことができる。これらには、最適なタンパク質-タンパク質および/またはタンパク質-薬剤結合を促進するために用いられ得る、塩、緩衝液、中性タンパク質（例えばアルブミン）、界面活性剤等の試薬を含む。そのような試薬も、反応成分の非特異的またはバックグラウンド相互作用を低下させることができる。プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等のアッセイの効率を改善する他の試薬も用いられ得る。

### 【0237】

#### キット

本発明の幾つかの態様においては、キットが提供される。本発明のキットは、PMIおよび/もしくはJCV感染のインビトロでの診断、予防、モニタリング、JCVバリアントへの暴露、ならびに/または候補治療剤を試験するために用いる、核酸、ポリペプチド

10

20

30

40

50

、抗体、または本発明の他の分子を含み得る。キットの構成要素は、水性媒質中で、あるいは凍結乾燥された形態のいずれかで包装され得る。PCRおよびELISAアッセイで用いる試薬もまた、PML、JCV感染、またはJCVバリアントへの暴露のリスクをアッセイするための手順の一部として共役される中間体の形態または別個の部分としての検出可能な標識薬剤と同様、本発明のキットに含まれ得る。本発明のキットの幾つかの実施形態においては、該キットは、本発明のバリアントの存在を判定するため、および／またはJCVバリアントのウイルス量を判定するための取扱説明書を含み得る。該キットはまた本発明において使用される方法の結果を解釈するために使用することができる対照値（例えば、参照番号）も含み得る。

## 【0238】

10

本発明のキットは、1つまたはそれ以上のPML関連のVP1バリアントを有するJCVバリアントへの暴露の1つまたはそれ以上の兆候を特定するために使用することができる、核酸、抗体、またはポリペプチドを含み得る。幾つかの実施形態においては、キットは、JCVバリアントへの暴露を示す1つまたはそれ以上のバリアントを含む1つまたはそれ以上のポリペプチドに結合することができる抗体を特定するために、ELISAの標準の手法を用いる物質を含む。幾つかの実施形態においては、本発明のキットは、PMLと関連するような、1つまたはそれ以上のバリアントまたは本明細書に記載されるバリアントの組み合わせをコードする核酸に結合し、検出するための核酸構成要素を含み得る。幾つかの実施形態においては、キットは、1つまたはそれ以上のバリアントまたは本発明のバリアントの組み合わせを含む1つまたはそれ以上のポリペプチドに特異的に結合する1つまたはそれ以上の異なる抗体を含み得る。キットはまた、細胞、組織、または対象において、JCVバリアントの発現またはJCVバリアントへの暴露を判定するために、抗体と共に用いる構成要素を含み得る。

20

## 【0239】

キットは、試験管、バイアル、フラスコ、瓶、シリング等のような、1つまたはそれ以上の容器手段または一連の容器手段を密閉した状態で受けるために区画分けされる担体を含み得る。該キットはまた、対照試料を含み得る。幾つかの実施形態においては、該キットは、アッセイ中の検出された薬剤のレベルが、JCV感染への暴露と相関するかどうかを示すかどうかを判定する（例えば、野生型またはバリアントJCVによって）ための取扱説明書等の試験結果を解釈するための取扱説明書を含む。

30

## 【0240】

## 生体試料

JCVバリアントへの暴露についてアッセイするための方法は、任意の適した生体試料において実行され得る。幾つかの実施形態においては、試料は、本明細書に記載されるように、対象から得られ、直接処理され、JCVの兆候についてアッセイし得る。幾つかの実施形態においては、細胞は、生体試料から単離され、分析前に、培養液中で成長させ得る。本明細書において使用される、対象は、ヒト、または非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、またはげっ歯類を含むが、これらに限定されない、非ヒト動物であり得る。本発明の方法を用いて、まだPMLと診断されていない対象におけるJCVのバリアントへの暴露について、アッセイし得る。本発明の方法を用いて、まだJCVに感染していない対象におけるJCVバリアントアッセイへの暴露について、アッセイし得る。さらに、本発明の方法を、PMLおよび／またはJCVバリアントによる感染と判断されている対象に、適用し得る。試料は、1つまたはそれ以上の細胞を含み得る。試料は、対象から、または細胞培養に直接起源し得る。試料は、（例えば、細胞溶解物を調製するために）処理され得るか、または本発明の方法に用いる前に、部分的に処理され得る。幾つかの実施形態においては、対象または培養からの試料を、アッセイで用いる核酸またはポリペプチド得るために処理し、本明細書に記載されるJCウイルスのバリアントへの暴露を検出し得る。故に、アッセイにおける初期ステップは、ゲノム核酸試料、ならびに／または細胞、組織、および／もしくは他の試料からの他の核酸および／もしくはポリペプチドの単離を含み得る。核酸および／またはポリペプチドの抽出は、洗剤溶解物

40

50

、超音波照射、および／またはガラスビーズを用いたボルテックス攪拌等の使用が含まれる方法等の当業者によって使用される日常的方法を含む、任意の適した手段によるものであり得る。

#### 【0241】

本明細書において使用される、「試料」という用語は、例えば、個人から単離された組織または流体（血漿、血清、脳脊髄液、尿、リンパ液、涙、唾液、および組織切片が含まれるが、これらに限定されない）等の、またはインビトロ細胞培地構成要素からの、DNAまたはRNAまたはタンパク質を含む任意の動物性物質を意味する。核酸を含む試料は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、またはデオキシリボ核酸およびリボ核酸のコポリマー、またはこれらの組み合わせを含み得る。ポリペプチドを含む試料は、ペプチドおよび／またはタンパク質を含み得る。幾つかの実施形態においては、該試料は、抗体を含む。試料は、精製（例えば、抽出）および／または他の処理に供され得る。また、「試料」という用語は、「生体試料」を指し得る。

10

#### 【0242】

本明細書において使用される、「生体試料」という用語は、対象の組織、細胞、または構成要素部分（例えば、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、羊水、臍帯血、尿、膣液、および精液等を含むが、これらに限定されない体液）を意味し得る。また、「生体試料」は、組織、細胞、もしくは構成要素部分から調製されたホモジネート、溶解物、もしくは抽出物、またはその画分もしくは部分を意味し得、例えば、血漿、血清、髄液、リンパ液、尿、皮膚の外部切片、気道、腸管および尿生殖路、涙、唾液、大便、母乳、血液細胞、腫瘍、器官、CNSの生検等を含むが、これらに限定されない。

20

#### 【0243】

試料源は、リンパ組織、体液（例えば、血液、リンパ液等）、培養細胞、細胞株、組織学的スライド、パラフィン中の包埋された組織等を含むが、これらに限定されない、組織を含み得る。本明細書において使用される、「組織」という用語は、局在および分散した細胞集団の両方を指し、これには、脳、心臓、血清、乳房、結腸、膀胱、表皮、皮膚、子宮、前立腺、胃、睾丸、卵巣、すい臓、下垂体、副腎、甲状腺、唾液腺、乳腺、腎臓、肝臓、腸、脾臓、胸腺、骨髄、気管、および肺を含むが、これらに限定されない。生体液は、血液、リンパ液、脳脊髄液、涙、唾液、尿、および便等を含むが、これらに限定されない。浸襲的および非浸襲的技術を用いて、かかる試料を得ることができ、これらは当分野においてよく記録されている。対照試料は、細胞、組織、または、その溶解物を含み得る。幾つかの実施形態においては、対照試料は、PMLおよび／もしくはJCVバリアントによる感染、またはJCVバリアントへの暴露がない、細胞または対象からの試料であり得る。幾つかの実施形態においては、対照試料は、PMLに罹患している、および／またはJCVバリアントに暴露されている、細胞または対象からの試料であり得る。幾つかの実施形態においては、対照試料は、野生型JCウイルスを含む試料である。

30

#### 【0244】

##### ワクチン

本発明はさらに、PML、またはPML関連JCVバリアントによる感染に対して哺乳類に免疫を与えるためのワクチンに関する。ワクチンは、本発明の1つまたはそれ以上のJCVバリアント配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを含み得る。幾つかの実施形態においては、ワクチンは、シアル酸結合を低下させることが予測される、本明細書に記載される1つまたはそれ以上のバリアントJCVまたはJCVPを含み得る。幾つかの実施形態においては、ワクチンは、複数の異なるペプチド（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～15、15～20、20～50、またはそれ以上）を含み、広範囲の異なるエピトープを提供し得る。幾つかの実施形態においては、該ポリペプチドは、完全長JCVP-VP1バリアントポリペプチドである。さらに別の実施形態においては、該ポリペプチドは、本明細書に記載される1つまたはそれ以上の所定の位置に、少なくとも1つのバリアントアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のバリアントアミノ酸）を有する、本明細書に記載されるポリペ

40

50

チドからなる群から選択された完全長 J C V - V P 1 ポリペプチド（例えば、図 3 または表 1 または 2 B、表 17、および / もしくは表 18 中の、および / または本明細書に記載される 1 つまたはそれ以上の他のバリエント）、またはその任意の断片（例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、100 ~ 150、150 ~ 200 のアミノ酸長ポリペプチド、またはさらに長い、短い、もしくは中間の長さのポリペプチド）である。幾つかの実施形態においては、該ポリペプチドは、本発明の 1 つまたはそれ以上のバリエントアミノ酸を含む J C V - V P 1 タンパク質の断片である。さらなる態様においては、本発明は、少なくとも 1 つの J C V バリエントポリペプチド、および適した賦形剤、希釈剤、または担体を含む薬学的組成物に関する。幾つかの実施形態においては、ワクチン中のポリペプチドは、約 5、約 10、約 20、約 30、約 40、または約 50 個のアミノ酸であるか、または J C V - V P 1 タンパク質の全長を含む。これらの組成物は、P M L および / または P M L と関連する J C V バリエントによる感染を予防するまたは治療するのに適している。薬学的組成物を、防御抗体または防御 T 細胞応答の生産を刺激するのに有効な量で対象に投与し得る。幾つかの実施形態においては、該ワクチンは、本発明の 1 つまたはそれ以上のバリエント J C V ポリペプチドをコードする核酸を含む核酸ワクチンである。

10

## 【 0 2 4 5 】

「免疫を与える」という用語は、アジュバントの存在下または不在下で、単独の場合または担体に結合した場合のいずれであっても、対象において、物質の体液性および / または細胞性応答を生じる能力を指し、また、病原菌の感染性を一部または完全に遮断する免疫応答を指す。P M L 「ワクチン」は、P M L に対する保護を一部または完全に導くことが可能な免疫原性組成物である。ワクチンはまた、P M L に罹患している対象を治療するのに有用であり得る。ワクチン用の投与計画は、当業者には周知である。幾つかの実施形態においては、P M L の予防用のポリペプチドワクチンの量の範囲は、0.01 ~ 100 マイクログラム / 用量、例えば、0.1 ~ 50 マイクログラム / 用量である。P M L 、または P M L と関連する J C V バリエントによる感染に対して、十分な免疫応答およびそれに続く保護を達成するために、対象ごとに、幾つかの用量が、必要とされ得る。

20

## 【 0 2 4 6 】

薬学的に許容される担体は、組成物を受けている個人に対して有害な抗体の産生を、それ自体が誘発しない任意の担体を含む。適した担体は、典型的には、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー等の大きな、ゆっくりと代謝される巨大分子；および不活性ウイルス粒子である。そのような担体は、当業者によく知られている。

30

## 【 0 2 4 7 】

本発明のポリペプチドワクチンの有効性を増強するために好ましいアジュバントとしては、水酸化アルミニウム ( a l u m ) 、米国特許第 4,606,918 号に見出されている N - アセチル - ムラミル - L - トレオニル - D - イソグルタミン ( t h r - M D P ) 、N - アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン ( n o r - M D P ) 、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - アラニン - 2 - ( 1 ' - 2 ' - ジパルミトイール - s - n - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ ) - エチルアミン ( M T P - P E ) 、および、2 %スクアレン / トウイーン ( T w e e n ) 80 エマルジョン中の細菌から抽出された 3 つの成分、すなわち、モノホスホリル脂質 A 、トレハロースジミコール酸、および細胞壁骨格 ( M P L + T D M + C W S ) を含有する R I B I が含まれるが、これらに限定されない。3 つの成分 M P L 、T D M または C W S のいずれも、単独で、または、2 つずつ組み合わせて用いてよい。幾つかの実施形態においては、本発明の 1 つまたはそれ以上のペプチドは、Goldmann et al. , 1999, Journal of Virology, Vol. 73, No. 5, pp 4465 - 4469 に記載される 1 つまたはそれ以上の技法を用いて、免疫付与のために使用され得、この開示は、参照することによって本明細書に組み込まれる。

40

## 【 0 2 4 8 】

50

幾つかの実施形態においては、ワクチンは、免疫抑制治療、または免疫系に影響を及ぼし得る（例えば、弱体化させる）任意の他の治療の開始前、または開始と共に、対象に投与することができる。

#### 【0249】

##### 抗体

ある実施形態においては、JCVバリアントへの抗体またはその抗原結合断片はまた、本発明に包含する。抗体は、本明細書に記載される検出アッセイ（例えば、ELISAアッセイ）において使用され得る。抗体は、PMLに罹患している対象を治療するための、および／またはJCVバリアントによる感染を予防する、もしくは減少させるための治療に使用され得る。適した抗体またはその断片は、本明細書に記載される1つまたはそれ以上のJCVバリアントポリペプチドに結合する能力に対して選択され得る。抗体またはその抗原結合断片は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、IgEであり得るか、またはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、もしくはIgEの免疫グロブリン定常および／もしくは可変ドメインを有し得る。幾つかの実施形態においては、該抗体は、二重特異的または多重特異的抗体である。さらなる実施形態においては、該抗体は、組み換え抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、あるいはこれらの混合物である。幾つかの実施形態においては、該抗体は、ヒト抗体、例えば、ヒトモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはモノクローナルおよびポリクローナル抗体の混合物である。抗原結合断片は、FAB断片、F(A'B')<sub>2</sub>断片、および／またはF<sub>v</sub>断片CDR3を含み得る。

10

20

30

40

#### 【0250】

抗体は、完全長JCV-VP1タンパク質バリアントに対して、またはJCV-VP1タンパク質バリアントの部分配列を含むポリペプチドバリアントに対して生じることができる。動物、例えば、ウサギまたはヤギまたはマウスに注入することによって、抗原（例えば、JCV-VP1バリアントのポリペプチド）を有する抗体を生成することができる。

#### 【0251】

ポリクローナル抗体を調製するために、JCV-VP1バリアントを含む融合タンパク質を、適したクローニング媒体中に対応するDNA配列の発現によって、細菌内で合成することができる。次いで、タンパク質を精製し、担体タンパク質に連結させ、（ウサギによる抗原応答の誘発を補助するために）フロイントアジュvantと混合し、ウサギまたは他の実験動物に注入することができる。代替として、該ポリペプチドは、タンパク質を発現する培養細胞から単離することができる。2週間間隔でブースター注入を行った後、ウサギまたは他の実験動物に瀉血を施し、血清を単離する。血清は、直接使用するか、または例えば、親和性クロマトグラフィー等の方法によって、プロテインA-セファロース、抗原セファロース、および抗マウスIgG-セファロースを使用する前に精製することができる。次いで、JCVバリアントポリペプチドを特定するために、ポリアクリルアミドゲルにかけたタンパク質抽出物を検出するために血清を用いることができる。代替として、合成JCVバリアントポリペプチドを作製し、使用して、動物に予防接種することができる。

#### 【0252】

モノクローナルJCVバリアント抗体を产生するために、マウスに複数回注入し（上記を参照）、マウスの脾臓を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に再懸濁する。この脾臓細胞は、リンパ球の供給源としての機能を果たし、その一部は、適切な特異性のある抗体を产生する。次いで、これらを永久増殖性の骨髄腫パートナー細胞と融合させ、HAT等の選択性薬剤の存在下において、融合産物を多数の組織培養ウェルに平板培養する。次いで、有用な抗体を発現する細胞を含むウェル特定するために、ELISAによって、ウェルをスクリーニングする。次いで、これらを新たに平板培養する。一定期間増殖させた後、抗体産生細胞を特定するために、これらのウェルを再びスクリーニングする。9

50

0 %を超えるウェルが、抗体産生に関して陽性である單一クローニングを含むようになるまで、何回かのクローニング手順を実施する。この手順によって、抗体を産生するためのクローニングの安定系列が確立される。次いで、プロテインAセファロース、イオン交換クロマトグラフィー、ならびにこれらの手法の変形および組み合わせを用いる親和性クロマトグラフィーにより、モノクローナル抗体を精製することができる（例えば、米国特許第6,98,467号を参照のこと）。

#### 【0253】

幾つかの実施形態においては、「ヒト化」抗体が、ヒトにおける治療に使用される。抗体のヒト化は、治療抗体をヒトに導入すると、免疫応答の機会を低減させるように、天然のマウス配列をヒト配列と置き換えることを含む。

10

#### 【0254】

##### CNS感染

J Cポリオーマウイルスは、脳およびCNS（中枢神経系）に感染するウイルスである。CNSの微生物感染を患っている対象は、CNSにおいて、バリアントJ Cウイルス感染および/または増殖に感受性があり得る。CNSの微生物感染としては、細菌、真菌、原生動物、ウイルス様、およびウイルス感染が含まれるが、これらに限定されない。感染には、急性状態および慢性状態の両方が含まれる。例示的な微生物CNS感染症は、脳腫瘍、髄膜炎、脳炎、血管炎、または進行性多病巣性白質脳症（PML）をもたらし得る。CNSのほとんどの腫瘍を形成する感染症は、血液によって広がり、敗血症および心内膜炎に関連しているが、膿瘍または中耳/乳突部感染から生じる直接感染があり得る。CNSの細菌感染症には、肺炎連鎖球菌、化膿連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、エンテロバクテリアセア、プロピオニバクテリウム属、緑膿菌、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）、インフルエンザ菌、またはリストリア・モノサイトゲネスによる感染が含まれ得るが、これらに限定されない。CNSの真菌感染症は、細菌感染症ほど一般的ではないが、後天性免疫不全症候群（AIDS）に罹患している個人および化学療法または免疫抑制療法を受けているもの等の他の免疫不全をきたした個人に生じ得る。CNSの原生動物感染症の例は、後期神経トリパノソーマ症、または睡眠病であり、これは、トリパノソーマ原虫によるCNSの感染によって引き起こされる。

20

#### 【0255】

CNSのウイルス感染症には、無菌性髄膜炎、脳炎、および進行性多病巣性白質脳症（PML）が含まれ得るが、これらに限定されない。ウイルス感染と関連する急性神経学的症候群には、例えば、急性ウイルス性脳炎、弛緩性麻痺、ウイルス性髄膜炎、および感染後脳脊髄炎が含まれる。急性ウイルス性脳炎は、例えば、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、水痘、狂犬病、またはアルボウイルスによって引き起こされ得る。弛緩性麻痺の一般的なウイルス性因子には、例えば、エンテロウイルス、ムンプスウイルス、およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスが含まれる。感染後脳脊髄炎は、例えば、はしか、流行性耳下腺炎、風疹、および一次水痘帶状ヘルペスウイルス感染による感染の合併症である。また、ギランバレー症候群も、ウイルス感染と関連する急性神経学的症候群である。

30

#### 【0256】

ウイルス感染に起因するさらなる慢性神経系疾患には、麻痺、萎縮、および運動失調により特徴付けられる、亜急性硬化性汎脳炎（持続性麻疹感染により生じる）、海綿状脳症（ブリオン病）（例えば、クロイツフェルトヤコブ病（CJD）、ゲルストマン・ストロイスラー症候群）、およびレトロウイルスによる疾病（例えば、HIV-1およびHIV-2）が含まれる。

40

#### 【0257】

したがって、本発明の態様を用いて、微生物CNS感染の1つまたはそれ以上の症状を有する対象における、PMLのリスクを評価し得る。

#### 【0258】

##### JCVバリアントの研究

50

宿主およびウイルス遺伝学は共に、PMLに貢献し得る。ウイルス遺伝因子に焦点を当てる先行研究は、ウイルスゲノムの調節領域における複製および再配列を特定した [Pfister LA, Letvin NL, Koralewski IJ (2001) JCV virus regulatory region tandem repeats in plasma and central nervous system isolates correlate with poor clinical outcome in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 75:5672-5676. Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR (1992) Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev* 5:49-73. Loeber G, Dorries K (1988) DNA rearrangements in organ-specific variants of polyomavirus JC strain GS. *J Virol* 62:1730-1735. Martin JD, King DM, Slauch JM, Frisque RJ (1985) Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *J Virol* 53:306-311. および Zheng HY, Takasaka T, Noda K, Kanazawa A, Mori H, et al. (2005) New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Gen Virol* 86:2035-2045]。また、PMLおよび健常な個人からの非常に限られた試料数による幾つかの研究は、PMLに罹患しているVP1タンパク質中の幾つかの変異の可能性がある関連性における矛盾した結果を報告した [Zheng HY, Takasaka T, Noda K, Kanazawa A, Mori H, et al. (2005) New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Gen Virol* 86:2035-2045. Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Matsushima-Ohno T, Sakurai M, et al. (2005) Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 333:996-1002. Kato A, Sugimoto C, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y (2000) Lack of disease-specific amino acid changes in the viral proteins of JC virus isolates from the brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Arch Virol* 145:2173-2182]。PMLに罹患しているJCVの遺伝子をコードするタンパク質中の変化の関連性の総合的解析は報告されていない。インフルエンザウイルス [Srinivasan A, Viswanathan K, Raman R, Chandrasekaran A, Raguram S, et al. (2005) Identification of the gene(s) coding for the proteins showing differential changes in the brain of progressive multifocal leukoencephalopathy patients. *Arch Virol* 150:101-111].

l. (2008) Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 105:2800-2805、およびChandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, Viswanathan K, Raguram S, et al. (2008) Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. Nat Biotechnol 26:107-113]からヒトJCV類に近親なマウスポリオーマウイルス [Bauer PH, Bronson RT, Fung SC, Freund R, Stehle T, et al. (1995) Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyomavirus VP1. J Virol 69:7925-7931、およびBauer PH, Cui C, Liu WR, Stehle T, Harrison SC, et al. (1999) Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. J Virol 73:5826-5832]に及ぶウイルスの病原性は、シアル化されたグリカン受容体へのウイルスカプシドタンパク質の結合に関するアミノ酸配列によって決定されることを示した。その細胞受容体におけるウイルスの親和性および特異性の変化は、ウイルス感染率および伝染に影響を及ぼし、故に、毒性に重要な役割を果たす。例えば、マウスポリオーマウイルスの研究は、コードされていない調節領域の変化よりもむしろVP1アミノ酸の変化が、ウイルスの増加した病原性に関与することを示した。  
10  
20

## 【0259】

本発明の態様を、VP1タンパク質に関する実験およびPMLとのその関係によって説明する。分子進化の方法を用いて、PMLと関連するVP1アミノ酸配列の推定的適応変化の存在を判定した。疾患に罹患している配列バリエントの単純な統計の関連性に伴うこのアプローチの利点は、ウイルス株の系統発生関係を考慮に入れ、また、配列進化の速度を試験することによって、機能的に有意なアミノ酸位置の特定を可能にすることである。  
30

## 【0260】

本発明の態様によれば、置換を含むウイルスは、単離されたPML患者のCNSにおいて、そのウイルスが十分豊富である場合、十分に感染性を有する。幾つかの実施形態においては、グリカン特異性の変化により、JCVが、CNSの外（例えば、RBC）に発現したシアル化グリカンへのその特異性を失わせることが予測される。故に、このようなウイルスは、「擬似受容体」上で捕獲されることを避け、脳に進入するためにウイルス排出の部位から妨げないで移動した。変異したウイルスはなお、乏突起膠細胞上に発現したグリカンへのその特異性を維持しなければならない。これは、JCVの位置269に対してオーソロガスな位置の変異が、RBCに結合するウイルス能力に影響を及ぼす、マウスポリオーマウイルスモデルからの観察と一致し、また、致死的な転帰を有する動物を通してウイルス伝播の劇的な増加にもつながる [Dubensky TW, Freund R, Dawe CJ, Benjamin TL (1991) Polyomavirus replication in mice: influences of VP1 type and route of inoculation. J Virol 65:342-349、およびFreund R, Garcea RL, Sahli R, Benjamin TL (1991) A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. J Virol 65:350-355]。さらに、多くの無症候で感染した個人の扁桃腺におけるJCV検出の幾つかの報告がある [Kato A, Kitamura 40  
45  
50

T , Takasaka T , Tominaga T , Ishikawa A , et al . ( 2004 ) Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsilar hypertrophy . J Neurovirol 10 : 244 - 249 、および Monaco MC , Jensen PN , Hou J , Durham LC , Major EO ( 1998 ) Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue : evidence for site of initial viral infection . J Virol 72 : 9918 - 9923 . ] 。この観察は、扁桃腺細胞の JC V 感染への支持として取られたが、リンパ様組織中のウイルス捕獲によっても説明することができた。これは、扁桃腺細胞中のシアル酸への JC V 結合と一致している [ Eash S , Tavares R , Stopa EG , Robbins SH , Brossay L , et al . ( 2004 ) Differential distribution of the JC virus receptor-type sialic acid in normal human tissues . Am J Pathol 164 : 419 - 428 ] 。

#### 【 0261 】

本発明によれば、 PML に対して特異的な多くの変異を考えると、 1 つ以上の機構（例えば、 2 つまたはそれ以上の機構）が、異なる PML 症例で PML の病因に影響を与える可能性が高い。本発明の幾つかの態様によれば、 PML 関連 VP1 変異は、乏突起膠細胞中のウイルス感染および複製の増加をもたらす脳白質細胞に対する JC V 向性を増加させ得る。本発明の他の態様によれば、 PML における変異は、ウイルスによる免疫回避を可能にし得る。 VP1 分子のみを対象にするポリクローナル免疫応答のうち、細胞受容体結合部位（シアル酸）を対象にする限定された数の抗体は、ウイルス感染の広がりに対する保護を提供し得る。感染防御免疫に不可欠であるエピトープ内のアミノ酸の変異は、ウイルスがその標的細胞に結合し、阻害されていない広がりを可能にさせ得る。

#### 【 0262 】

本明細書に記載される実験は、いかにある変異が PML に生じ、なぜ、 JC V の非常に高い有病率にもかかわらず、少ない割合の免疫不全患者のみが PML を発症するかを検討する。本発明の態様によれば、ウイルス系統樹における変異のクラスタリングの不在は、病原性ウイルスバリエントとして一般集団に固執するよりもむしろ、個々の患者に独立して生じることを示唆している。本発明の態様によれば、本明細書に記載される実験に基づいて、 VP1 変異は、 PML 出現の機構に非常に有意な役割を果たす。シアル酸結合に影響を及ぼす特異的変異が生じると、ウイルスを脳に蔓延させ、乏突起膠細胞に感染させる。変異ウイルスが腎臓に検出されなかったという事実は、グリカン結合の変化が、腎臓において、変異ウイルスへの選択性的な利点をいずれも提示しなかったことを示唆している。変異は、 PML の直前またはずっと以前に免疫抑制の条件下で生じ、したがって、ウイルスの脳における滞留を確立させたのかもしれない。無症候の個人の脳において、ウイルス複製が検出されなかっただけで、 PML 発症前に、区分化された進化（例えば、中枢神経内）は、 PML 患者の中枢神経における変異 VP1 の存在の主な原因となり得る。しかしながら、正常な脳における JC V 潜伏の問題はなお、論議の余地があるため、非変異ウイルスが、脳に進入し、変異が、末梢部、例えば、腎臓ではなく、脳に生じることが正式に起こり得る。

#### 【 0263 】

本発明の態様によれば、健常な免疫系は、脳におけるウイルス活性化を効果的に抑制する。しかしながら、免疫系が、このような変異したウイルスを持つある個人に不足するすぐに、ウイルスは、 PML を生じる乏突起膠細胞に積極的に蔓延し始める。また、健常な免疫系が、それらの末梢部位（例えば、腎臓）に新しく展開した変異を効率的に抑制し、新しい標的細胞を拡散させ、感染することを防ぐことが考えられる。故に、 PML 発症

10

20

30

40

50

のタイミングは、変異によって限定されるものであり得、環境または宿主遺伝因子との相互作用は、非決定的なPMLの発症に起因し得る。さらに、PMLの発症は、乏突起膠細胞中のウイルス複製を増加させる、ウイルスのさらなる選択的利点を与える場合の、ウイルス調節領域の再配列を含むウイルスのさらなる遺伝子変化とのVP1変異の相互作用によって制御され得る。

#### 【0264】

本発明の態様によれば、本明細書に記載される実施例により例示されるように、その受容体特異性に影響を及ぼすJCV VP1変異は、PML病変に関与し得る。これらの結果は、新規の抗ポリオーマウイルス治療薬およびこれらのウイルスによって引き起こされる疾患の診断の発見の機会を提供する。これらの変異が、PMLの病因、ならびにそれらが生じる経緯と理由に働く明確な役割は、異なる器官（例えば、尿、血液、CSF）から、および様々なPML患者からの試料に一致する長期的期間のVP1配列分析を含むさらなる広範な調査を必要とする。

10

#### 【0265】

本明細書に記載される、連続的試料からのVP1配列の試験は、疾患の過程を通して同じウイルス株の持続性を示した。変異したウイルスがよく見られる単独集団を提示し、時間経過を伴い維持されたため、感染の伝播に対して必要かつ十分であるように思われる。とりわけ、さらなる置換は、第1のPMLの症状の発現から生存した患者において再発した場合に必要とされた。この観察は、まず、古い変異したウイルスが、中枢神経または末梢神経のいずれかにおいて、効率的に生存し、第2に、新しい置換の参入が、新しいPMLの症状の発現を引き起こし得ることを示唆している。幾つかの実施形態においては、新しく変異したウイルスは、準最適な免疫による制御下で、ウイルス活性化の状況で生じ得、いったん出現すると、免疫系によって直ちに認識され得ない。

20

#### 【0266】

幾つかの実施形態においては、本発明の態様は、PML患者におけるCSFおよび血漿VP1配列の特定に関する。血漿に単離されたウイルスおよびCSFに単離されたウイルスは共に、この変異が分析から除外されたとしても、同様に、尿に単離されたウイルスとは明確に異なると思われる。これは、CSFおよび血漿集団が、独立して、尿から生じなかつたが、これらの集団の1つは尿集団と同一の源が起源であり、その他は、第一のものが起源であったことを示す。PML遺伝子変異を担持するVP1配列は、PML患者の尿には観察されなかつたが、腎臓におけるウイルス複製中、元来得られる変異は、腎臓部位において、優先遺伝子、または検出可能な集団であるように、常在非変異ウイルスにわたつていかなる競争上の優位性も受け取らなかつた。これは、ほとんどの変異体VP1分子から調製されるVLPが、腎臓におけるウイルス感染の部位の腎臓尿細管上皮細胞に結合する能力を失うという観察と一致している。

30

#### 【0267】

本発明の態様によれば、理論により拘束されるものではないが、変異が、受容体を含む1つまたはそれ以上の幅広く存在するシアル酸に対してその特異性を失うようにウイルスを生じる場合、変異体ウイルス（血液循環において）は、野生型ウイルスよりも、末梢における細胞の大部分に発現する多数のシアロ含有オリゴ糖擬似受容体によってトラップされることから免れる可能性が高い。したがって、変異体ウイルスは、脳、または少なくとも血液脳関門（BBB）に到達する可能性が高い。ウイルスが、末梢の障害物を擦り抜け、血液脳関門に到達すると、それでも、ウイルスは、内皮細胞層を横断して、中枢神経に達しなければならない。幾つかの実施形態においては、有意な免疫抑制を有する患者においてでさえ、PMLの極めて稀な発生は、ある変異体ウイルス粒子の出現および血液脳関門開口の存在のような独立した稀な事象の必要とされる一時的な集まりによるものであり得る。

40

#### 【0268】

VP1タンパク質における変異がウイルスが末梢循環を免れて、CNSに進入する機会を増加させることによってPML進行の一因となるという仮説は、全てのPML症例の約

50

10 %が、非変異ウイルスを含むという観察と一致している。故に、ウイルスの擬似受容体の末梢防衛を圧倒し得る高レベルのウイルス血症を考慮し、また、血液脳関門において時間的に一致した開口を考慮すると、非変異体ウイルスでさえも、CNSに進入し得る。しかしながら、ウイルスが脳に一旦進入すると、乏突起膠細胞に感染し、CNSに広がるそれらの能力において、変異体と非変異体ウイルスとの間の差異はなく、これは、進行中の脳感染時、JCVの別の標的の、CNS由来の星状膠細胞に結合するための変異体VPの保持した能力と一致する。代替として、VP1変異は、ウイルスが脳を通じて広がる幾つかの競争上の優位性を提供するため、CNSにおいて優勢になる場合、CNSにおいてウイルス複製中、生じ得る。分析した試料の大部分は、最終的な仮説が、真実であるためには、変異を含む全ての単離されたクローン、またはそのうちの95%を超える単離されたクローンを有するため、変異は、脳においてウイルス複製中、非常に早期に生じなければならない。VP1において変異がないウイルスは、CNS細胞に実際にうまく感染し得るため、変異を、CNS細胞のためにウイルス親和性の獲得によって競争上の優位性を提供しない。さらに、少なくとも場合によっては、患者における免疫抑制の条件下で、ウイルスが、非変異形態において、脳に進入し、CNS内のその活性化中、変異を得る可能性は、正式には除外することはできない。

#### 【0269】

選択の部位にかかわらず、JCV VP1置換は、ウイルスPML遺伝子の潜在性の鍵であると考えられる。ウイルスカプシドタンパク質および外膜タンパク質は、ウイルス標的細胞および感染へのウイルス付着を媒介するために重要である。故に、インフルエンザHAタンパク質における変異は、ウイルスが、シアル酸結合に対するそのわずかな特異性および動物指向性(zootropic)からヒトへの感染に転換するウイルスの能力を変化させる。同様に、これらの変異の一部は、肺葉の上部の細胞に優先的に発現したシアル酸から肺の下部に発現したシアル酸に特異性を変化させることによって1918年のインフルエンザの例によって強調されるように、ヒト集団において、増加したインフルエンザ病原性と関連することを示した。ウイルスが病原性の増加を得ることができた別の機構は、おそらくウイルスが生産的に感染しない細胞上にトラップさせる、その幅広い受容体特異性を失うことによるものである。そのような機構の最も研究が行なわれた例の1つは、別のポリオーマウイルス、マウスにおけるマウスピリオーマウイルス感染の研究に由来する。JCVの臨界PML遺伝子位置269に対して構造的にオーソロガスな位置296の変異が、シアル酸に対してウイルス特異性を劇的に変化させ、標的細胞およびRBCに結合するウイルス能力に影響を及ぼし、また、致死的な転帰をもたらす動物を通じてウイルス伝播の増加にもつながる。故に、その受容体へのウイルス結合に影響を及ぼすウイルス被覆タンパク質の変化は、例外でないウイルス病因およびヒトポリオーマウイルスを有する病原性を変化させる重要な役割を担う、極めて一般的な機構であると考えられる。

#### 【0270】

幾つかの態様においては、フェニルアミニに対する位置55および269の変異は、対象からの試料中に検出される。他の態様においては、少なくともこれらの変異が検出され、対象が、最も一般的であると考えられることを示し、これらの2つの部位は、強い選択圧のもとにあり、PMLを引き起こす最も優位であるJCVウイルスを提供することを示唆している。この観察は、これらの2つの部位での末梢細胞およびオリゴ糖を含むシアル酸へのウイルス結合を無効にする変異の能力と強い相関を持ち、ひいては、特定の機能の喪失が、他の変異よりもさらに頻繁に積極的に選択したウイルスに対して最も有利であることを示唆している。本明細書の他の箇所にさらに詳細に記載されるように、これらの部位のそれぞれは、本研究において、全ての変異の25%を占め、次に頻度が高い位置267、265、および60を有し、それぞれ、全ての症例の7.5%を有する。興味深いことに、何人かの患者からのCSF試料は、2つまたはそれ以上の異なる集団を含み、それが、同時に、2つのかかる変異を含んだウイルスがないそれ独自のPML固有の変異を担持する。したがって、本発明の幾つかの態様は、幾つかの異なる変異は、正常なウイルス複製中、独立して生じ得、それぞれが、ウイルスに、非変異ウイルスを超える競争上の

10

20

30

40

50

優位性を提供する場合、全ては、選択され得る。3つの症例、または本研究からの全ての症例のうちの約10%においては、PML関連の置換は、CSFおよび/または血漿中に見出すことができなかった。例えば、副ウイルスカプシドタンパク質VP2またはVP3における変異を含むJCVゲノムの他の遺伝子変化はまた、これらの症例において、PMLと関連するこれらのウイルスの存在を説明するために、仮説を立てられ得る。

### 【0271】

本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、決してさらなる制限と解釈されるべきではない。本出願を通じて引用された参考文献（文献参照、交付済み特許、公開特許出願および同時係属特許出願を含む）の全ての全内容は、参考することによって、本明細書に明白に組み込まれる。

10

### 【実施例】

#### 【0272】

##### 実施例1：PCRによるJCVバリアントの検出

核酸は、確立されたプロトコルを用いた生体試料（例えば、細胞溶解）から単離される。ウイルスDNAは、ゲノムDNAに組み込まれ得るか、またはより小さい実体としてなお存在したため、ゲノムDNAおよび短いDNA配列は共に、単離され、PCR分析に供される。単離する際、核酸は、PCR分析を促進する緩衝液中で再懸濁する。PCR分析を促進する緩衝液は、当業者（例えば、*Maniatis*）に知られており、また、PCR酵素の製造業者（例えば、*New England Biolabs, Beverly, MA*）より市販される。ヌクレオチドプライマーは、JCV-VP1遺伝子の増幅をもたらすように設計される。PCR増幅は、確立された実験手法であり、ヌクレオチドプライマー、ポリメラーゼ、および単一ヌクレオチド、ならびにポリメラーゼ緩衝液を添加し、アニーリング、増幅、および解離のサイクルにこの混合物を供することを含み、所望のDNA配列の増幅をもたらす。増幅する際、JCV-VP1遺伝子は、残余DNAおよび過剰単一ヌクレオチドから分離される。増幅したJCV-VP1 DNAは、配列決定され、得られたヌクレオチド配列は、ペプチド配列に翻訳される。本ペプチド配列は、続いて、バリアントパネルと比較され、どのJCV-VP1ポリペプチドバリアントが、生体試料中に存在するかを決定する。

20

#### 【0273】

##### 実施例2：ELISAを用いるJCVバリアントの検出

30

タンパク質およびペプチドは、標準実験手法（例えば、*Maniatis*）を用いて、生体試料から単離される。細胞タンパク質および非細胞成分のタンパク質は、該分析に供される。一アッセイにおいては、該試料は、本発明の1つまたはそれ以上のバリアントを含むJCV-VP1ポリペプチドの存在について調査される。サンドイッチELISAを用いて、本発明のJCV-VP1ポリペプチドに対して特異的な抗体を含むポリペプチドを検出する。該抗体は、ポリクローナル抗体をもたらす本発明のJCV-VP1ポリペプチドで動物（例えば、ウサギ）に接種することによって生成される。望ましい場合、細胞は、モノクローナル交代を生成するために、接種した動物から採取することができる。ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方の生成のための方法は、当技術分野で日常的である。JCV-VP1ポリペプチドバリアントに対する抗体は、ウェルまたは表面積当たり1つの抗体型を有する、固体表面（例えば、96ウェルプレート）上で固定化される。ポリペプチドを含む生体試料をウェルに添加し、固定化した抗体でインキュベートする。試料中に存在する任意のポリペプチドJCV-VP1バリアントは、ポリペプチドに対して特異的な抗体に結合する。インキュベーション後、該試料を除去し、固体表面を洗浄し、任意の非結合物質を除去する。次のステップとして、JCV-VP1ペプチドに対して特異的なさらなる抗体をウェルに添加する。抗体のこの第2のアリコートは、「サンドイッチ」を作製する（例えば、固体化した抗体：JCV-VP1ポリペプチド：第2の抗体）。この第2の抗体は、例えば、JCV-VP1バリアントポリペプチドの検出を可能にする、標識三次抗体を用いて検出することができる。代替として、二次抗体自体は、標識され得る。

40

50

## 【0274】

第2のELISAアッセイにおいては、生体試料は、1つまたはそれ以上のJCV-VP1バリアントポリペプチドに対する抗体の存在についてアッセイされる。このアッセイを用いて、対象が、現在、JCV-VP1バリアントに感染しているか、または今までにJC V - VP 1 バリアントに暴露したことがあるかどうかを判定することができる。JC V - VP 1 バリアントがもはや存在しないとしても、バリアントに対する抗体はなお、生体試料中に存在する場合があり、検出することができる。このELISAアッセイにおいては、JC V - VP 1 ポリペプチドを固体表面に付着させ、該生体試料は、これらのポリペプチドでインキュベートされる。これらのポリペプチドに対して特異的な抗体が、生体試料中に存在する場合、それらは、ポリペプチドに結合する。任意の非結合物質を再度除去する。結合抗体の存在は、標識二次抗体を用いて検出される。

10

## 【0275】

## 実施例3：VP1タンパク質の溶媒接触可能表面積組成物の判定

接触可能表面積の計算は、生体分子の三次元座標の知識を必要とする。JC V VP 1 ウィルス様粒子のホモジーモデルは、テンプレート(PDB ID: 1SVA)として SV40 ウィルス様粒子のCoA1の構造を用いて構成された。MODELER(A. Sali & T. L. Blundell. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol. 234, 779-815, 1993)アルゴリズムをモデル構築のために使用し、SCWRL3(A. A. Canutescu, A. A. Shelenkov, and R. L. Dunbrack, Jr. A graph theory algorithm for protein side-chain prediction. Protein Science 12, 2001-2014(2003))アプローチを側鎖位置の精密化のために使用した。アミノ酸側鎖の極性および非極性の溶媒接触可能表面積は、Lee and Richardsの方法(B. Lee B & F. M. Richards. The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility. J. Mol. Biol. 55, 379-400(1971))を用いて計算した。続いて、JC V - VP 1 バリアントのウィルス様粒子の3Dモデルが構成され、それらの側鎖の極性および非極性の溶媒接触可能表面積が、続いて、計算された。バリアント上の極性の表面積の差異は、アミノ酸側鎖ごとの基準で、バリアントの極性の溶媒接触可能表面積からコンセンサス配列の極性の溶媒接触可能表面積を差し引くことによって計算された。バリアント上の非極性の表面積の差異は、アミノ酸側鎖ごとの基準で、バリアントの非極性の溶媒接触可能表面積からコンセンサス配列の非極性の溶媒接触可能表面積を差し引くことによって計算された。計算結果を表3に示す。

20

## 【0276】

30

## 【表3】

表3.

バリエント	非極性 SA の増加	極性 SA の増加	
L55->F55	14.12	0	
K60->M60	27.35	-13.22	
K60->N60	-10.18	-3.54	
K60->E60	-5.55	-2.1	
S61->L61	49.72	-9.78	
D66->H66	25.86	-7.95	
D66->N66	15.35	-23.4	10
E69->D69	-6.01	-27.12	
N74->S74	-0.12	-30.62	
K75->R75	1.43	11.83	
N265->D265	-4.55	8.23	
N265->T265	11.51	-12.15	
S267->F267	92.2	-33.04	
S267->L267	85.2	-31.3	
S269->F269	75.44	-15.91	
S269->Y269	52.69	21	
Q271->H271	6.96	6.11	

## 実施例4：JCV配列の配列分析

20

PMLは、JCウイルス感染および感受性がある個人の複数の脳病巣における感染した乏突起膠細胞の崩壊によって引き起こされる進行性のほとんど致命的な脱髓疾患である。JCウイルスは、ヒト集団に高度に蔓延しているが、PMLは、HIV(AIDS)または免疫抑制薬によって影響を受けるものを含む、免疫不全をきたしたわずかな比率の個人にのみが排他的に患う稀な疾患である。ウイルスの蔓延と低い疾患発生率との間に非常に大きな相違を説明する、特定ウイルスおよび/または宿主固有の因子と単に免疫状態ではない何かが働いているに違いない。本発明によれば、JCウイルスカプシドタンパク質VP1の表面上の幾つかのアミノ酸は、PML患者から単離されるウイルス配列において加速進化を示すが、健常な対象から単離される配列においては示さない。本明細書に記載される例は、これらの変異の少なくとも一部が、JCウイルスに対して知られている受容体である、シアル酸の結合に関与するという有力な証拠を提供する。分子進化の統計的方法を用いて、PML患者から単離した55のJCウイルスVP1配列および健常な個人の尿から単離した253配列の総合的解析を行い、PMLのVP1配列のみに見出されるアミノ酸のサブセットは、適応進化を介して得られることが見出された。JCウイルスカプシドの三次元構造のモデリングは、これらの残基が、細胞感染に対するJCウイルス受容体のシアル酸結合部位内に位置することを示した。受容体結合のこれらの部位の一部の関与は、これらの変異を担持するVP1タンパク質からなるウイルス様粒子の血球凝集特性の著しい低下を示すことによって実証された。同時に、これらの結果は、JCウイルスの表現型を生じるさらなる悪性のPMLが、その細胞受容体に対してウイルス特異性を変化させる適応進化を介して得られることを示す。

30

40

## 【0277】

## 方法：

PML患者から単離したJCウイルスの35完全長VP1配列および健常な対象から単離したJCウイルスの253完全長VP1配列を、Genbankからダウンロードした。さらに、位置43~287の計55の配列の分析を可能にする20の不完全VP1配列を、Genbankから入手した。PML患者から単離したこれらの55VP1配列に加えて、表4はまた、Salamaによる公開から入手できる12以上の部分配列を含む[Salama, Vartanian JP, Kousignian P, Delfray Issy JF, Taoufik Y, et al. (2001) Progressive multifocal leukoencephalopathy in human

50

immunodeficiency virus type 1-infected patients: absence of correlation between JC virus neurovirulence and polymorphisms in the transcriptional control region and the major capsid protein loci. *J Gen Virol* 82: 899-907.]。

これらの例において、PML患者から単離した全てのウイルス試料は、腎臓から単離された1例を除いて、脳またはCSF組織が起源であることに留意すべきである(表4)。健常な対象から単離した全てのウイルス試料は、尿が起源であった。複数の配列アラインメントは、TCoffeeを用いて構成された

[Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302: 205-217]。

多くのPML配列は、同じ個人から単離された。ウイルス配列の進化の研究において、同じ患者の単離配列が、それらが1以上のヌクレオチドで互いに異なる限り、分析に対して認められた。しかしながら、同一の「クローン」配列は、分析から除外された。これにより、PML患者から単離した28の完全長VP1配列および42の部分VP1配列の最終セットを得た。配列の複製起点およびクローンにおける全ての情報を表4に含む。系統樹は、F84置換モデル[

Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J Mol Evol* 29: 170-179およびFelsenstein J, Churchill GA (1996) A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. *Mol Biol Evol* 13: 93-104.]を用いた、

PhyML最尤法[Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704]を用い、PHYLIPパッケージ(Felsenstein, J. 2005. PHYLIP version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle)を含む幾つかの方法を用いて、構築した。PML患者から単離したVP1配列および健常な対象から単離した配列のランダムサブセットを、さらに、PAML[

Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 13: 555-556]を用いて分析した。複数の配列進化のモデル(M0~M8)が、調べられた。尤度比検定を用いて、モデルM1とM2との間の差異を評価し、正の選択について検定した。完全長または部分的

セットのいずれかの分析において、事後確率が0.5を超えるBayes Empirical Bayesを有する残基が表5に報告される。Spidermonkey [Poon AF, Lewis FI, Frost SD, Kosakovsky Pond SL (2008) Spidermonkey: rapid detection of co-evolving sites using Bayesian graphical models. *Bioinformatics* 24: 1949-1950]を用いて、エピスタシス相互作用を分析した。Spidermonkeyは、Datammonkeyのウェブサーバーを通して起動された[Pond SL, Frost SD (2005) Datammonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon

10

20

30

40

50

a l i g n m e n t s . B i o i n f o r m a t i c s 2 1 : 2 5 3 1 - 2 5 3 3 ] 。  
【 0 2 7 8 】  
【 表 4 - 1 】

表4.

非PML患者からのJCV VP1配列：

BAC66394, BAC66418, BAC66382, BAB11716, BAB11722, AAK28466, AAK28460, AAK28478, BAC66400, BAC66388, BAD06126, BAC66406,  
AAK97970, AAK97964, BAC81952, BAC81958, AAM89309, AAM89303, BAC81922, BAC81916, BAC81910, BAC81904, AAM89297,  
BAD11896, BAC81946, BAE45426, BAE45360, BAD06120, BAE45432, BAA01962, BAE45420, BAE45414, BAE45384, BAE45378, BAE45372,  
AAK98036, BAE45402, BAE45408, BAE45396, BAE45444, BAD06024, BAE75838, BAE75832, BAE75826, BAE75820, BAE75814, AAK98030,  
AAK98024, AAK98018, AAK98010, AAK98006, AAK98000, BAE45438, BAE45390, BAD06108, BAD06102, BAD06096, BAD06090, BAD06084,  
BAD06048, BAD06030, BAD06018, BAD06054, BAD06042, BAD06036, AAG30857, BAE45366, AAN85455, BAD06150, AAN85449, AAK98042,  
BAD06174, BAD06156, BAD06072, BAD06060, AAN85473, BAC81840, BAF40841, BAF40835, BAF40829, BAF40823, BAF40811, BAF40847,

【表4-2】

BAF40781, BAF40817, BAF40799, BAF40793, BAF40787, BAF40745, AAN85467, AAN85461, BAC81834, BAF40751, BAF40805, BAA01961, BAD98972, BAD98966, BAD06227, BAC66430, BAC66412, BAD91887, BAD21235, BAD27118, BAC66424, BAA01958, BAB11710, BAD21265, BAD21259, BAD21253, BAD21241, BAD21229, BAD21247, BAD21283, BAD21271, BAD21295, BAD21289, BAA01959, BAA01960, BAD11848, BAD11842, AAM89339, AAM89327, BAD11836, BAC81852, BAC81858, BAD06144, AAG37198, AAM89315, BAD06138, BAD11890, BAD11884, BAD11878, BAD11872, BAD11866, AAK97994, BAB11598, BAC81940, BAC81964, AAK97946, BAD06066, BAF40769, BAC81870, BAC81864, BAC81934, BAC66376, BAC81874, BAC81846, AAK97940, BAC81898, BAC81892, AAK97922, AAK97916, AAK97910, AAK97982, BAF40763, BAD06078, AAK97958, BAD11860, BAF40757, BAD06162, AAM89321, BAD11854, AAK97928, BAD11830, BAF40775, BAB11704, BAC81928, AAK97988, BAD11902, BAD11824, BAD06233, BAC81886, BAC81880, AAM89345, BAD06168, AAM89333, BAD06132, BAC82365, AAK97952, BAA01964, BAA01963, AAK97934, BAD06114, AAK97976, BAD21277, AAR13077, BAE02908, AAR12957, AAR02463, AAR02457, BAE03058, AAR89235, BAE02896, AAR89241, BAE02890, BAE03064, BAE03070, BAE03082, AAG34673, AAG34667, AAR89205, AAR89217, AAR13659, BAE03088, BAE03160, AAQ88264, AAR89187, AAR89283, AAK28472, AAR06661, AAR89253, AAR89247, AAR89199, AAR89193, AAR89229, AAR89223, AAR89265, AAR32743, AAR89277, BAE03166, BAE02920, BAE02914, BAE03112, BAE03106, BAE03100, BAE03094, BAE03076, BAE02944, BAE02998, BAE02992, BAE02986, BAE02980, BAE02974, BAE02968, BAE02962, BAE03016, BAE02902, BAE03040, AAR89211, AAR89271, BAE02956, BAE02938, BAE02932, BAE03148, BAE02950, BAE03004, BAE03154, BAE03142, BAE03136, BAE03130, BAE03124, BAE03118, BAE02926.

10

20

30

40

番号	DNA アクセシジョン番号	タンパク質アクセシジョン番号	DNA 源	単離物名	AA 長さ	出発 AA	患者番号
1	AF015537	AAB94036	脳	601	354	1	1
2	AB183539	BAE00111	脳	1-1	354	1	2
3	AB183540	BAE00117	脳	1-2	354	1	2
4	AB183541	BAE00123	脳	1-3	354	1	2
5	AB183542	BAE00129	脳	2-1	354	1	3
6	AB183543	BAE00135	脳	2-2	354	1	3
7	AB183544	BAE00141	脳	2-3	354	1	3
8	AB190449	BAE00147	脳	3-1	354	1	4
9	AB190453	BAE00171	脳	3-5	354	1	4
10	AB190452	BAE00165	脳	3-4	354	1	4
11	AB190451	BAE00159	脳	3-3	354	1	4
12	AB190450	BAE00153	脳	3-2	354	1	4
13	AY536239	AAT09819	CSF	SA21_01	354	1	5
14	AB212952	BAE94726	脳	ac-1	354	1	6
15	AB212953	BAE94732	脳	ac-2	354	1	7
16	D26589	BAA05636	脳	Aic-1a	354	1	8
17	AF004349	AAB62680	腎臓	GS/K	354	1	9
18	AF004350	AAB62687	脳	GS/B	354	1	9
19	D11365	BAA01967	脳	Her1-Br	354	1	10
20	AB214923	BAE02848	CSF	JVL-10	245	39	11
21	AB214924	BAE02849	CSF	JVL-11	245	39	12
22	AB214925	BAE02850	CSF	JVL-12	245	39	13
23	AB214926	BAE02851	CSF	JVL-13	245	39	14
24	AB214927	BAE02852	CSF	JVL-16	245	39	15
25	AB214928	BAE02853	CSF	JVL-17	245	39	16
26	AB214929	BAE02854	CSF	JVL-18	245	39	17
27	AB214930	BAE02855	CSF	JVL-19	245	39	18
28	AB214912	BAE02837	脳	JVL-1a	245	39	19
29	AB214913	BAE02838	脳	JVL-1b	245	39	19
30	AB214914	BAE02839	脳	JVL-1c	245	39	19
31	AB214915	BAE02840	脳	JVL-1d	245	39	19
32	AB214916	BAE02841	脳	JVL-2	245	39	20
33	AB214931	BAE02856	CSF	JVL-20	245	39	21

【表4-3】

34	AB214917	BAE02842	脳	JVL-3	245	39	22	
35	BAE02843	BAE02843	脳	JVL-4	245	39	23	
36	AB214919	BAE02844	脳	JVL-5	245	39	24	
37	AB214920	BAE02845	脳	JVL-7	245	39	25	
38	AB214921	BAE02846	脳	JVL-8	245	39	26	
39	AB214922	BAE02847	脳	JVL-9	245	39	27	
40	J02226	AAA82101	脳	Mad-1	354	1	28	
41	D11364	BAA01966	脳	Mad11-Br	354	1	29	
42	D11363	BAA01965	脳	Mad8-Br	354	1	30	
43	D11366	BAA01968	脳	NY-1B	354	1	31	10
44	AB212954	BAE94738	脳	oh-1	354	1	32	
45	AY536243	AAT09843	CSF	SA27_03	354	1	33	
46	AY536242	AAT09837	CSF	SA28_03	354	1	34	
47	AY536241	AAT09831	CSF	SA296_0	354	1	35	
48	AY536240	AAT09825	CSF	SA84_00	354	1	36	
49	D11367	BAA01969	脳	Sap-1	354	1	37	
50	D26590	BAA05637	脳	Tky-1	354	1	38	
51	AB038254	BAB11728	脳	Tky-1	354	1	39	
52	AB038255	BAB11734	脳	Tky-2a	354	1	40	
53	D26591	BAA05638	脳	Tky-2a	354	1	41	
54	D11368	BAA01970	脳	Tokyo-1	354	1	42	
55	AF030085	AAC40846	脳	Tokyo-1?	354	1	43	20
56	U21840	AAB60586	脳		133	219	44	
57	U21839	AAB60584	脳		133	219	45	
58	NA	NA	CSF	P9VP1	136	11	46	
59	NA	NA	CSF	P8VP1	136	11	47	
60	NA	NA	CSF	P7VP1	136	11	48	
61	NA	NA	CSF	P5VP1	136	11	49	
62	NA	NA	CSF	P4VP1	136	11	50	
63	NA	NA	CSF	P2VP1	136	11	51	
64	NA	NA	CSF	P1VP1	136	11	52	
65	NA	NA	CSF	P12VP1	136	11	53	
66	NA	NA	CSF	P11VP174	136	11	54	
67	NA	NA	CSF	P11VP173	136	11	54	
68	NA	NA	CSF	P11VP172	136	11	54	
69	NA	NA	CSF	P10VP1	136	11	55	30

## 結果：

JCV VP1遺伝子配列をGenBankからダウンロードし(表4)、それを用いて、健常な個人から単離した配列および明確に異なるPML患者から単離した完全長配列のランダムサブセットに対する系統樹を構築した(図4a)。図4は、PML関連ウイルスの系統的分布を示す。(A) PMLを生じるJCVウイルスの広範な系統的分布。PMLを生じるウイルスおよび健常な対象から単離したウイルスに対応する系図の枝(GI番号によって表示される)を示す。系図は、最尤法を用いて、VP1遺伝子のDNA配列に基づいて構築される。患者当たり1つの配列のみを含んだ。(B) コドン269の変異の系統的分布。系図は、PML患者から単離したウイルスのVP1遺伝子(GI番号によって表示される)を示す。Ser269コドンの変異は、テキストの挿入によって示される。枝上の丸は、LRTサポートを反映する。このコドンの変異を有する枝の誘引を避けるために、系図を構築する前に、位置269を遮蔽した。F84置換モデル[Kishino H, Hasegawa M(1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoids. J Mol Evol 29:170-179およびFelsenstein J, Churchill GA(1996) A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rat 40 50

e of evolution. Mol Biol Evol 13: 93 - 104] を用いた、PhyML最尤法 [Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52: 696 - 704.] を用いた。PHYLIP パッケージ最尤法に組み込まれた幾つかの方法の適用、系統発生的再構成の距離に基づいた方法、および最節約原理に基づいた方法により、同様の結果を得た。PML患者から単離したウイルス配列は、系統樹にクラスター化せず、試料のウイルス型および地理的起源の中で広く分布している(図4a)。これは、さらに、非常に低い集団の階層化測定  $F_{ST}$  によって支持される [Slatkin M, Maddison WP (1990) Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. Genetics 126: 249 - 260] (1.8%)。先行研究 [Zheng HY, Takasaka T, Noda K, Kanazawa A, Mori H, et al. (2005) New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Gen Virol 86: 2035 - 2045、Jobes DV, Chima SC, Ryschewitsch CF, Stoner GL (1998) Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. J Gen Virol 79 (Pt 10): 2491 - 2498、および Agostini HT, Deckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, et al. (2001) Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. J Gen Virol 82: 1221 - 1331] に一致して、PMLを生じるウイルスは、特異的なウイルス系統発生型に限定されない。

#### 【0279】

PML患者から単離されたウイルスからの配列は、PML関連の進化論的な選択圧が、ウイルスVP1遺伝子に作用しているかどうかを判定する目的で、健常な対象からのものと同様に使用した。この分析は、正の選択下で進化するコドンの存在を特定するように設計されたPAMLパッケージ [Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Comput Appl Biosci 13: 555 - 556] を使用した。PAMLは、パラメータの尤度比検定を用いて複数の進化モデルを評価する。中立進化のモデル、純化(例えば、負の)選択が可能なほぼ中立進化のモデル、ならびに幾つかのコドン位置を正の選択下で進化させる、および他のコドン位置を負の選択下でまたは中立的に進化させる異種モデルを含む幾つかのモデルを検定した(表5)。多くのさらに複雑なモデルも検査した。

#### 【0280】

健常な対象から単離されたJCVからのVP1配列の場合、中立的に進化するコドンと純化選択下のコドンの混合物を伴うほぼ中立進化のモデルは、純粋な中立モデルよりも明らかに効率が良い( $p$ 値  $7.0 \times 10^{-6}$ )。しかしながら、正の選択を有するモデルを含むさらに複雑なモデルに対する統計的支援は見出されなかった。対照的に、PML患者から単離されたVP1配列については、コドンを正の選択下で進化させることにより、モデル尤度の極めて有意な増加を得た(表5)。純化選択下で進化する部位、中立部位、および正の選択下の部位を含む部位の3つのカテゴリーを有するモデルは、中立部位および純化選択下での部位にのみ限定されるほぼ中立のモデルよりも有意に良好なデータを説明した( $p$ 値  $2.5 \times 10^{-7}$ )。さらに複雑なモデルは、コドンの3つのカテゴリーを有

する最も単純なモデルを超える有意な改善を示さなかった。

#### 【0281】

4つのコドン位置（アミノ酸55、60、267、および269に対応する）が、完全長配列のPML試料標本中の正の選択下で進化するとして特定された（表5）。PAMLによって計算された正の選択に対するベイズの事後確率（*Bayesian posterior probability*）は、これらのコドン位置において0.5を超えた。コドン269の正の選択に対する事後確率は、1近くであった。分析の力を増加させるために、部分VP1配列をPML患者から単離されたJCウイルスに追加した。部分配列の追加は、コドン265の正の選択のシグナルを示した（表5）。

#### 【0282】

#### 【表5】

表5. PML試料中の正の選択下でのコドン

変異			完全長配列セット(n=28)		部分的配列セット
			コドン43～287(n=42)		
位置	野生型	変異体	正の選択検定のP値		
			2.5x10 <sup>-7</sup>	3.5x10 <sup>-6</sup>	
55	L	F	0.82	0.94	
60	K	M,E,N	<0.5	0.94	
265	N	D,T	<0.5	0.85	
267	S	F,L	0.80	0.92	
269	S	F,Y,C	1.00	1.00	

この例においては、2つのVP1変異は、同じJCV単離株には観察されなかった。Spidermonkey [Poon AF, Lewis FI, Frost SD, Kosakovsky Pond SL (2008) Spidermonkey: rapid detection of co-evolving sites using Bayesian graphical models. Bioinformatics 24: 1949-1950]の方法による分析は、位置55と269との間および位置60と269との間にエピスタシス相互作用を示した（それぞれ、事後確率0.88および0.70を有する）。これは、「収穫遮減」エピスタシス相互作用に反映し得、例えば、その後の変異は、有益ではなく、单一の変異のバックグラウンドにとって有害になる可能性がある。

#### 【0283】

これらの5つのコドンの全ての置換は、明らかにPMLと関連する。PML患者から単離されたJCウイルスの少なくとも52%（または部分配列を含む、69の配列のうちの36の配列）は、これらの変異の少なくとも1つを有するのに対して、これらの置換は、健常な対象からの253の完全長ウイルス配列には、観察されなかった（表6）。

#### 【0284】

10

20

30

40

【表6】

表6. JCVP 1配列のアミノ酸変動性

位置	対照	非PML			PML		
		置換を有する配列(合計)	置換を有する配列の%	変異	置換を有する配列(合計)	置換を有する配列%	変異
8	G	4 (253)	2	4A	0 (32)	0	
37	I	8 (253)	3	8V	0 (64)	0	
52	D	1 (253)	0	1N	0 (64)	0	
55	L	0 (253)	0		10 (64)	16	10F
60	K	1 (253)	0	1R	4 (64)	6	2M 1E 1N
61	S	0 (253)	0		5 (64)	8	1L 4P
64	D	0 (253)	0		6 (64)	9	5H 1N
69	E	5 (253)	2	5D	2 (64)	3	2D
70	S	2 (253)	1	2G	0 (64)	0	
74	N	6 (253)	2	6S	12 (64)	19	12S
75	K	2 (253)	1	2R	2 (64)	3	2R
107	T	0 (253)	0		1 (64)	2	1N
113	I	59 (253)	23	59L	18 (64)	28	18L
115	V	1 (253)	0	1E	0 (64)	0	
117	T	23 (253)	9	23S	15 (64)	23	15S
123	S	0 (253)	0		3 (64)	5	3C
128	T	25 (253)	10	25A	18 (64)	28	18A
129	H	0 (253)	0		1 (64)	2	1R
131	N	1 (253)	0	1K	0 (64)	0	
134	A	186 (253)	74	186G	59 (64)	92	59G
153	E	1 (253)	0	1K	0 (52)	0	
158	V	5 (253)	2	5L	3 (52)	6	3L
164	T	177 (253)	70	176K 1M	48 (52)	92	48K
167	D	1 (253)	0	1H	0 (52)	0	
171	F	1 (253)	0	1Y	0 (52)	0	
185	E	1 (253)	0	1D	0 (52)	0	
192	K	2 (253)	1	2E	0 (52)	0	
223	V	0 (253)	0		1 (56)	2	1A
258	D	1 (253)	0	1Y	0 (56)	0	
265	N	0 (253)	0		4 (56)	7	3D 1T
267	S	0 (253)	0		4 (56)	7	3F 1L
269	S	2 (253)	1	1A 1T	13 (56)	24	9F 3Y 1C
271	Q	0 (253)	0		1 (56)	2	1H
277	R	1 (253)	0	1K	0 (56)	0	
287	R	1 (253)	0	1K	0 (56)	0	
310	D	1 (253)	0	1N	0 (56)	0	
320	Q	1 (253)	0	1H	0 (56)	0	
321	I	134 (253)	53	134V	32 (34)	88	30V
332	Q	184 (253)	73	184E	33 (34)	91	31E
345	R	20 (253)	8	20K	8 (34)	18	6K

濃い陰影付けてハイライト表示した残基は、PML群と非PML群の間で明確に異なり、正の選択に対して、0.5を越えるBayes Empirical Bayesの事後確率を有する（表5）。薄い陰影付けてハイライト表示した残基は、PML群と非PML群の間で明確に異なる。

## 【0285】

PML試料中の正の選択の最も強いシグナルは、位置269のアミノ酸をコードするコドンに対して検出された。図4bは、芳香族残基フェニルアラニンおよびチロシンへのSer269の複数の独立した変異は、PML関連ウイルスからのVP1に観察されたことを示す。複数の独立した変異の存在は、変異バリエントの系統が、ブートストラップ分析の90%を超える支援およびPhyML [Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52:696-704]により実施される尤度比検定の支援を有する複数の分歧によって分離されるため、系統発生的再構成のアーチファクトではない。これらの系統は、JCウイルスの異なる、以前に特定された、系統発生型に対応し、多様な地理的位置のものである[Jobes DV, Chima

10

20

30

40

50

SC, Ryschkevitsch CF, Stoner GL (1998) Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 10): 2491-2498 および Agostini HT, Deckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, et al. (2001) Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J Gen Virol* 82: 1221-1331]。

## 【0286】

PML患者から単離されたVP1配列および健常な対象から単離された配列のランダムサブセットは、さらに、PAML [Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 13: 555-556]を用いて分析された。 10

## 【0287】

純粹な中立モデル(M0)、ほぼ中立なモデル(M1)、正の選択を有するモデル(M2)、およびさらに複雑なモデル(M3~M8)を含むPAMLに組み込まれる配列進化の複数のモデルを検査した。尤度比検定(LRT)を用いて、モデルM1とM2との間の差異を比較し、正の選択について検定した。3つのデータセットにおける、正の選択に対するP値を、それぞれのコドン位置に対するベイズの事後確率と共に示す。0.5を越えるBayes Empirical Bayesの事後確率を有する残基を示す。 20

## 【0288】

実施例5：シアル酸結合部位に集合する特定された変異

方法：

JCV VP1タンパク質の五量体単位の相同モデルは、テンプレートとして、MPyV VP1(タンパク質データバンクID: 1VPS [Stehle T, Harrison SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *Embo J* 16: 5139-5148])の構造を用いて、MODELER [Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779-815]と共に構築された。NeuNAc-(2,3)-Gal-(1,3)-[(2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc四糖類のモデルは、MPyV VP1 [Stehle T, Harrison SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *Embo J* 16: 5139-5148]と共に構築された。JCV VP1 / NeuNAc-(2,3)-Gal-(1,3)-[(2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc四糖類のモデルは、CHARMM [Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, et al. (1983) CHARMM: A program for macromolecular energy minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* 4: 187-217]において、広範囲に精密化され、PyMOL可視化ソフトウェア(The PyMOL Molecular Graphics System (2002) Delano Scientific, Palo Alto, CA, 40

USA. www.pymol.org)を用いて分析された。

【0289】

結果：

本発明の態様によれば、5つの特定されたアミノ酸位置の機能的な役割は、MPyV VP1 / オリゴ糖複合体 [Stehle T, Harrison SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J* 16: 5139-5148] の結晶構造に基づく NeuNAc-(2,3)-Gal-(1,3)-[(2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc四糖類に結合したJCウイルスVP1の三次元構造の分子モデルを構成することによって評価することができる。図5aに示される構造モデルは、全てのPAMLを特定したアミノ酸が、シアル酸結合部位でVP1タンパク質の表面上にクラスター化され、シアル酸結合に関与する可能性があることを示唆している。図5は、JCV VP1 / NeuNAc-(2,3)-Gal-(1,3)-[(2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc四糖類複合体の構造モデルである。(A) NeuNAc-(2,3)-Gal-(1,3)-[(2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc四糖類と複合したJCV VP1塩基性五量体のモデル。JCV VP1の5つの鎖の表面を示す。中心的なシアル酸の結合に必須のRGモチーフを示す。PAMLによって確認されるPML関連の変異残基(L55、K60、S265、S267、S269)を示す。PMLに単離された試料に特有のさらなる変異(S61、D66、S123、H129、V223、およびQ271)も示す。(B) NeuNAc-(2,3)-Gal-(1,3)-[(2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc四糖類 / JCV VP1複合体のクローズアップ写真。JCV VP1のS269と同等であることが予想されるMPyV VP1のV296の位置をメッシュで示す。さらに、幾つかの実施形態においては、L55F、K60M、S267F、およびS269F置換は、相互作用の親和性の低下をもたらすモデル化单糖類で立体的衝突を誘発し得る。シアル酸への親和性は、インフルエンザウイルス、マウスピリオーマウイルス、およびマウス微小ウイルスの複数の研究において、ウイルス病原性に関連した[Srinivasan A, Viswanathan K, Raman R, Chandrasekaran A, Raguram S, et al. (2008) Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2800-2805, Bauer PH, Cui C, Liu WR, Stehle T., Harrison SC, et al. (1999) Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. *J Virol* 73: 5826-5832、およびNam HJ, Gurda-Whitaker B, Gan WY, Ilaria S, McKenna R, et al. (2006) Identification of the sialic acid structures recognized by minute virus of mice and the role of binding affinity in virulence adaptation. *J Biol Chem* 281: 25670-25677]。特に、JCウイルスに近親のマウスピリオーマウイルスの病原性が、本研究におけるPMLを生じるウイルス単離体中で最も強力な正の選択のシグナルを示したヒトJCウイルスにおける位置269に対してオーソロガスな位置である、位置296[Bauer PH, Bronson RT, Fung SC, Freund R, Stehle T, et al. (1995) Genetic and structural analysis of a virulence determinant in 10 20 30 40 50

polyomavirus VP1. J Virol 69: 7925 - 7931] の VP1 アミノ酸置換にマップされた。図 5 b に示されるように、ヒト JC ウィルスのシリコン 269 およびマウスピリオーマウィルスのバリン 296 は、シアル酸結合ポケットの同一の位置を占める。

#### 【0290】

位置 61、66、123、129、223、および 271 は全て、PML 試料に限定され（表 6）、シアル酸結合ポケットとぴったり合う（図 5 b）。それらの残基は、小規模な試料サイズのため、PAML 分析によって検出されず、PML の発症は、症例の大部分においてシアル酸結合に関与するアミノ酸に対する正の選択を伴うことが見込まれる。分析の系統樹の長さが短く、ひいては、正の選択を検出するための力を制限する [Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z (2001) Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. Mol Biol Evol 18: 1585 - 1592 and Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z (2002) Accuracy and power of bayes prediction of amino acid sites under positive selection. Mol Biol Evol 19: 950 - 958]。短い系図を用いた正の選択を検出するための尤度比検定は、保守的であり [Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z (2001) Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. Mol Biol Evol 18: 1585 - 1592]、Bayes Empirical Bayes 分析は、制限された力しかない [Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z (2002) Accuracy and power of bayes prediction of amino acid sites under positive selection. Mol Biol Evol 19: 950 - 958]。故に、さらなる PML に特異的な VP1 変異も正に選択することができる。残基 107 の変異はまた、PML 試料中にのみ見出される。しかしながら、それは、PAML による正の選択の証拠を示さず、シアル酸結合ポケットに位置しない。

#### 【0291】

実施例 6 : JC V 变異体およびシアル酸結合

方法：血球凝集アッセイおよびウイルス様粒子

血球凝集アッセイは、前述のように行われた [Chapagain ML, Nguyen T, Bui T, Verma S, Nerurkar VR (2006) Comparison of real-time PCR and hemagglutination assay for quantitation of human polyomavirus JC. J Virol J 3: 3 および Padgett BL, Walker DL (1973) Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis 127: 467 - 470]。簡潔に述べると、ヒト O 型血液を 2 回洗浄し、約 0.5% の最終濃度で、Alsever 液 (20 mM クエン酸ナトリウム、72 mM NaCl、100 mM グルコース、酢酸で pH 6.5 に調整) 中で懸濁した。VLP の連続 2 倍希釈液を Alsever 液中に調製し、等量の RBC を 96 ウェル「U」底マイクロタイタブレートのそれぞれのウェルに添加し、4 度 3 ~ 6 時間インキュベートした。最低 HA 濃度は、RBC をさらに凝集した VLP タンパク質の最低濃度である。

#### 【0292】

JC ウィルス株 BAE 00117、AAT 09831、および AAQ 88264 から V

10

20

30

40

50

P1タンパク質をコードする遺伝子が、合成的に作製され、SF9細胞中のバキュロウイルス発現のpFASTBACバキュロウイルス発現系への移動のためにGateway pDEST8 (Invitrogen) シャトルベクターにクローニングされた。5リットルの培養液からの約100グラムの凍結細胞ペレットからVLPの精製を実施した。細胞は、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>を含有する500 mLのPBS中で再懸濁した。細胞懸濁液をMicrofluidics Microfluidizerに2回通過させることによって、細胞を分離する。細胞残屑を、8000 XGで15分間沈殿させることによって除去した。上清の容量をPBS / CaCl<sub>2</sub>を用いて720 mLに調整し、5 mL 40 %

スクロースクッショングロードした。ウイルス様粒子は、SW28ローターにおいて、100,000 XGで5時間、スクロースクッショングロードを通して2回沈殿させた。VLP沈殿物をPBS / CaCl<sub>2</sub>中で再懸濁し、37 °Cで1時間、0.25% デオキシコール酸塩で処理し、続いて、4 °Cで1時間、4 M NaCl / 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>を添加した。沈殿した物質を、8000 XGで15分間の遠心分離により除去した。得られた上清を濃縮し、Pelicon-2500,000 MWCO膜 (Millipore) を通して限外濾過することによって緩衝液交換を行った。濃縮したVLPを、Optiprep (Sigma) の25~40% ステップ勾配の中心に適用し、タイプ50.2ローターにおいて、190,000 gで17時間バンド化した。VLPバンドを収集し、次いで、濃縮し、300,000 MWCO膜を用いてAmicon搅拌細胞中で緩衝液交換を行った。VLPの性質をゲル電気泳動法および電子顕微鏡法によって判定した(図6)。タンパク質濃度をMicro BCAアッセイ (Pierce) によって判定した。ハーバードメディカルスクールの細胞生物学部で電子顕微鏡法を行った。VLP試料は、炭素グリッド上に置かれ、水で簡単に洗浄し、酢酸ウラニルで陰性に染色し、乾燥させた。グリッドを、視察し、Technai G2 Spirit BiOTWIN TEM上に画像化した。

#### 【0293】

##### 結果：

これらの置換が、VP1カプシドによってシアル酸結合において果たす役割を実験的に検証するために、ウイルス様粒子(VLP)は、異なる天然に存在するウイルスによってコードされるVP1タンパク質から組み換え技術によって產生された。VLPは、PAMLによって特定された正の選択の2つの最も強いシグナル、位置269のフェニルアラニン(F269)を有するものと、位置55のフェニルアラニン(F55)を有する別のもののうちの1つによるウイルスVP1配列をコードする置換から生成された。対照として使用された2つの異なるVP1遺伝子は、特定されたPML関連変異の、健常な対象からのもの(WT)およびPML患者からの別のもの(Mad-1)のいずれも持たない(表7)。

#### 【0294】

10

20

30

30

## 【表7】

表7. VLPの間のJCV VP1配列のアミノ酸の変動性

	55	74	75	117	128	134	158	164	269	321	332	345
野生型1 AAQ88264	L	N	K	T	T	A	V	T	S	I	Q	R
55F AAT09831	F	N	K	T	T	A	V	T	S	I	Q	R
野生型2(Mad-1) P03089	L	N	R	S	T	G	L	K	S	V	E	K
269F BAE00117	L	S	K	S	A	G	V	K	F	V	E	K

赤血球(RBC)のウイルス赤血球凝集は、ポリオーマウイルスによるシアル酸結合の信頼性のある測定であることが示されている [Freund R, Garcea RL, Sahli R, Benjamin TL (1991) A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. J Virol 65: 350-355 and Liu CK, Wei G, Atwood WJ (1998) Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. J Virol 72: 4643-4649]。血球凝集アッセイにおいて、全て4つのVLPを検定した。際立って、F55およびF269バリアントは共に、いずれの対照VLPよりも8000倍以上低いHA活性を示した(表7A)。具体的に、F55バリアントは、検定した最高濃度の200 μg/mLでさえ、ヒトO型RBCを完全に凝集できずF269バリアントは、25 μg/mLを超える濃度で血球凝集を生じた場合、非常に低いHA活性を示した。同時に、L55およびS269を担持するバリアント(WTおよびMad-1)は、対応して、0.375 ng/mLおよび6.25 ng/mLまで下がった濃度で、RBCの血球凝集を生じた。この例において、F55変異は、その対応する野生型バリアント(WT)との単一のアミノ酸差異を有する。したがって、血球凝集の変化は、このアミノ酸置換に特異的に起因し得る。位置269の変化に加えて、F269変異バリアントは、その対応する対照バリアント(Mad-1)とは異なる2つのさらなるアミノ酸位置を有する。それらのアミノ酸変化は共に、PML特異的ではなく、血球凝集の差異を説明する可能性は低い。Mad-1単離は、PML患者が起源であるが[Padgett BL, Walker DL, Zurhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH (1971) Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet 1: 1257-1260]、それは、RBCを血球凝集する能力とうまく相關するPML特異的変異のいずれも含んでいない。このPML単離におけるPML遺伝子変異の欠如は、VP1変異がPML発症をもたらす唯一の機構ではないことを示唆している。

10

20

30

40

50

【0295】

【表7A】

表7A. ウイルス様粒子（VLP）によるRBCの血球凝集において非常に重要な役割を果たす  
VP1タンパク質中の残基55および269

ウイルスバリアント	最低 HA VLP 濃度、ng/mL
野生型 1	0.08
55F	>200,000
野生型 2 (Mad-1)	6.25
269F	50,000

10

20

20

200 μg / mL から開始するVLP の連続希釈液を用いて、材料および方法に記載されるように、血球凝集を行った。VLP をO型RBCに添加し、4℃で3時間インキュベートした。凝集は、懸濁液からのRBCの沈降によって形成される丸い沈殿物の欠如によって可視化される。E55は、位置55にフェニルアラニンを有するVP1バリアント(AATT09831)であり、F269は、位置269にフェニルアラニンを有するVP1バリアント(BAE0011)である。野生型(AAQ88264)およびMad-1(P03089)は、それぞれ、位置55にロイシンおよび位置269にセリンを有するVP1バリアントである。

【0296】

タンパク質配列は、ClustalWを用いて整列され、残りの配列とは少なくとも1つの配列が異なるアミノ酸を、示されたそれらの位置で示す。

【0297】

実施例7：変異型JCVは、ガングリオシドへの減少した結合を有する。

【0298】

ガングリオシドELISA：

メタノール中の1mg / mLで、以下のガングリオシドを調製した：アシアロGM1(ヒト)、モノシアロGM1(ヒト)、GM2(ヒト)、GM3(ウシ)、GM4(ヒト)、ジシアロGD1a(ウシ)、GD1b(ヒト)、GD2(ヒト)、GD3(ウシ)、トリシアロGT1b(ウシ)。American Radiochemicalsから購入されたGM2を除いて、全てのガングリオシドをCalbiochemから購入した。

30

【0299】

ガングリオシドを、メタノール中で0.1mg / mLまで希釈し、0.1mL / ウェルのELISAプレート(Corning 9018)を添加し、このメタノールを一晩蒸発させた。翌日、このプレートを、0.25mL / ウェル Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を有する1×PBS、1% BSA(Fraction V)、0.1% Tween-20を用いて、1時間遮断した。次いで、このプレートは、氷上に移動させ、全ての間接的なインキュベーションを+4℃で行った。

40

【0300】

VLPを、遮断緩衝液中0.03mg / mLで調製し、この緩衝液をプレートから除去し、VLPを0.1mL / ウェル添加した。このプレートを、氷上で60~90分間インキュベートした。抗JCV VP1(クローンPAB597)を、遮断緩衝液中0.002mg / mLで調製した。このプレートを、0.25mL / ウェルの遮断緩衝液で洗浄し、抗VP1を0.1mL / ウェル添加した。このプレートを、氷上で45~60分間インキュベートした。HRPコンジュゲートヤギ抗マウスIgG(H+L)(Jackson Immuno Research)を、遮断緩衝液中1:5,000に調製した。このプレートを、氷

50

上で30分間インキュベートした。このプレートを洗浄し、0.1mL 1-Step Turbo TMB (Thermo Scientific Pierce) で展開させた。色の展開をモニターし、0.1mL 2N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> を添加して、反応を停止させた。次いで、プレートを、450nmで、分光光度計 (Molecular Devices) 上で読み取った。

#### 【0301】

それぞれのガングリオシドは、対照ウェル (HRP 抗マウス IgG のみ、PAB597 および HRP 抗マウス IgG ) を有した。バックグラウンド対照は、HRP 抗マウス IgG のみを表す。それぞれの実験用ウェルは、式 (実験用 - バックグラウンド) / バックグラウンドを用いて計算された。

10

#### 【0302】

野生型 JCV の結合は、種々のガングリオシドに対して評価された。図 7 は、野生型 JCV が幾つかのグリカンに結合するが、全てには結合しないことを示す。選択されたガングリオシドの構造を図 8 に示し、野生型 JCV に結合するそれらの能力を示す。

#### 【0303】

図 9 は、F55 変異および F269 変異が、Neu5Ac (2-3) および (2-6) グリカンに結合することができないことを示す。選択されたガングリオシドの構造を図 10 に示し、変異型 JCV に結合するそれらの能力を示す。

20

#### 【0304】

図 11 は、選択されたガングリオシドに結合する JC V に対する WT および変異の能力を比較する。

20

#### 【0305】

実施例 8：変異型 JC V は、グリア細胞株に結合するが、リンパ球に結合しない。

#### 【0306】

VLP 染色のフローサイトメトリー分析；

以下の細胞を使用した：SVG-A (Walter Atwood からの贈答品)、ドナーからの単離された末梢単核細胞。Accutase を用いて、付着細胞を剥離し、回収し、洗浄した。静脈血を健常なドナーから採血し、PMBC を、Ficoll-Hypaque Plus (Amersham Biosciences) における遠心分離を伴う標準プロトコルを用いて単離した。

30

#### 【0307】

全ての染色は、カルシウムおよびマグネシウム、1% ウシ血清アルブミン (画分 V ) 、2 mM アジ化ナトリウムを含有する PBS 緩衝液中の氷上で行われた。

#### 【0308】

細胞 (1 ~ 5 × 10<sup>5</sup> 細胞 / 試料) を、0.05mL の総容量の FACS 緩衝液中に希釈された 10 μg / mL VLP で、96V 型底ウェルプレート中で、氷上で 60 ~ 90 分間インキュベートした。細胞を、0.15mL の FACS 緩衝液で洗浄し、2000 rpm (約 800 × g) で 5 分間遠心分離を行った。VLP 結合は、0.05mL 中の 0.002 mg / mL で 45 ~ 60 分間、抗 JC V VP1 (クローン PAB597) で細胞を染色することによって検出し、続いて、洗浄ステップ、およびさらに 30 ~ 45 分間に 0.05 mL / 試料中で 1 : 100 に希釈した Alexa Fluor 488 抗マウス IgG (H + L) (Invitrogen) による検出が続いた。細胞を洗浄し、0.05 mL Cytofix/Cytoperm (BD) で 15 ~ 25 分間固定し、洗浄し、0.2 mL FACS 緩衝液で再懸濁した。該試料を FACS Calibur 上で分析した。

40

#### 【0309】

変異型 JC V (269F) は、リンパ球に結合しない。しかしながら、変異体 JVC はなお、グリア細胞株に結合することができる (図 12)。野生型 JC V および陰性対照も示す。

#### 【0310】

50

### 実施例 9：変異特異的抗 J C V 抗体の生成

抗 J C V V P 1 血清を生成するウサギの免疫付与のために、P B S 緩衝液中のウイルス様粒子 (V L P) の形態で、0.5 mg の V P 1 タンパク質は、ウサギの背部に 10 のスポット (.05 mg / スポット) に皮下注射した。一次免疫は、2週間間隔で、2回のブーストが続き、この後、血清を収集し、抗 V P 1 活性についてアッセイした。

#### 【0311】

競合 E L I S A による抗変異型 J C V 抗体の検出：

A : 269 F - V L P の免疫性を与えられたウサギからの抗血清または抗野生型 - M A D 1 の免疫性を与えられた V L P ウサギの血清は、100 ug / mL の野生型 - M A D 1 - V L P を用いて、または用いずにプレインキュベートされ、次いで、269 F - V L P で被覆されたプレートでインキュベートされた。ペルオキシダーゼでコンジュゲートした抗ウサギを用いて、結合抗体を示した。  
10

#### 【0312】

B : 55 F - V L P の免疫性を与えられたウサギからの抗血清または抗野生型の免疫性を与えられた V L P ウサギの血清は、100 ug / mL の野生型 - V L P を用いて、または用いずにプレインキュベートされ、次いで、55 F - V L P で被覆されたプレートでインキュベートされた。ペルオキシダーゼでコンジュゲートした抗ウサギを用いて、結合抗体を示した。

#### 【0313】

ウサギは、変異型 J C V に対して特異的な抗体の生成をもたらす F 269 および F 55 J C V 変異 V P 1 - V L P で注射した。競合 E L I S A は、変異特異的 J C V 抗体が、野生型 J C V 抗体と区別することができるることを示した（図 13）。アッセイ構造を図 14 に例示する。抗体は、プレート上に捕獲された変異 V L P (F 55 あるいは F 269) に結合する。非変異 V L P と、分子の「骨格」に対して行なわれる全ての抗体を吸収する競合を行い、プレートに結合させるために、変異エピトープに対抗する抗体（試料中にそのようなものが存在する場合）のみをプレートに結合させ、検出するように残した。  
20

#### 【0314】

また、変異型 J C V - V L P に結合するそれらの能力について、変異型 J C V および野生型 J C V 抗体を比較した。E L I S A プレートを、F 269 および F 55 変異型 J C V ポリペプチドで被覆し、野生型 J C V 抗体および変異型 J C V 抗体をプレートに付加した（図 15 および 16）。変異抗体および野生型 J C V 抗体は、被覆された E L I S A プレートに結合する。野生型 J C V (J C V - 471 および J C V - M A D 1) の付加により、野生型 J C V 抗体の結合の消失をもたらしたが、変異抗体は、E L I S A プレートに結合したままであった。さらに、J C V ウィルスの付加により、結合野生型抗体の消失をもたらしたが、変異抗体は、E L I S A プレートに結合したままであった。  
30

#### 【0315】

実施例 10：一部の患者における、ウイルス免疫回避機構としての J C V - V P 1 変異 V P 1 タンパク質中に 269 F 変異を担持する患者からの血清および抗野生型 - M A D 1 の免疫性を与えられた V L P ウサギ血清（陽性対照として）は、100 ug / mL の野生型 - M A D 1 - V L P を用いて、または用いずにプレインキュベートされ、次いで、269 F - V L P で被覆されたプレートでインキュベートされた。被覆された 269 F 変異 V L P に結合する抗体を検出するために、ペルオキシダーゼでコンジュゲートした抗ヒトまたはウサギ抗体を用いて、結合抗体を示した。  
40

#### 【0316】

図 17 は、F 269 変異ウイルスを有する患者が、野生型ウイルスに対して抗体応答を生じるが、F 269 変異ウイルスに対して生じないことを示す。

#### 【0317】

図 18 は、（上）非変異 V L P を用いて免疫性を与えられたウサギは、変異することができた部位（この場合、S 269）への抗体をもたらすことを示す。この場合、幾つかの相違があるスライド 16（上記の挿入）における概略図と同様に、実験を行い、変異 V L  
50

Pの代わりに、非変異VLPをプレート上に被覆し、血清中の抗体結合は、変異(F55あるいはF269)タンパク質)と競合するため、非変異AAエピトープへの抗体のみが、プレートに結合したままであった。(下)健常な志願者の試料を用いた同じ実験を示す。表8中の結果は、何人かの異なる志願者の試料を用いた同様の実験に基づく。表8は、PMLを患っていない人が、PML変異に対する抗体を有し得ることを示す。これは、シアル酸結合部位における幾つかの残基に対して特異的な抗体を担持する人もいれば(例えば、患者29は、L55およびS269への抗体を有する)、1つの部位、L55またはS269に対してのみ抗体を有する人もおり、さらにはいずれの部位に対する抗体を有さない人もいるということを示す。本発明の態様によれば、シアル酸結合部位の残基に対して抗体を有さない、またはこれらの残基にのみ抗体を有する個人は、中和抗体からの保護が少ないため、JCV回避変異に対してより弱い可能性がある。

10

20

30

【0318】

【表8】

表8

患者ID	VLP EC50, 希釀	L55	S269
9	24820	+	+
19	81850	-	-
22	14150	-	+
29	6034	+	+
31	802500	-	-
33	870400	-	-
39		-	+
42	4161	-	+
49	5506	-	-
51	51480	-	-
59	2802	-	-
60	2423	-	-

実施例11：進行性多病巣性白質脳症(PML)に罹患している患者の脳脊髄液(CSF)および血漿からのJCウイルス(JCV)VP1は、シアル酸結合に関与するアミノ酸残基の特異的変異を担持する。

【0319】

本明細書に記載されるように、PMLは、現在、AIDS関連の2番目に多い死因である。他の日和見感染とは違って、それは、長期成功的治療の開始直後、またはその治療中のいずれか、HART治療を行なった患者にも生じる。一次感染後、原因物質のJCVは、尿道中に持続性の良性感染を起こし、健常な人の30%において、尿に排出される。JCV再活性化およびPMLをもたらす機構は、はっきりしないが、主要なJCVカプシドタンパク質のVP1が、細胞のシアル酸残基との結合を通して、細胞への進入に関与することが知られており、最近、VP1アミノ酸置換が、PMLにおいて報告されている。

40

【0320】

全JCV-VP1領域を増幅し、クローン化(試料当たり2~48のクローン、平均23)し、26人のPML患者(HIV感染に罹患する20人)のCSF、ならびに11対の血漿および6対の尿試料から配列決定した。9人の患者からの、連続的CSF(n=7)または血漿(n=2)試料も分析された。JCV-DNAは、リアルタイムPCRによって測定された。三次元モデリングを用いて、VP1構造上の変異をマッピングした。

【0321】

50

## D N A 抽出およびV P 1 増幅 :

D N Aは、Q I A a m p B l o o d キット ( Q i a g e n ) を用いて、2 0 0 μ L のC S F 、血漿、または尿から抽出し、最終容量の5 0 μ L に溶出した。

全J C V - V P 1 領域を、以下のプライマーを用いて、入れ子P C R によって増幅した。

アウター( 2 0 2 7 b p )

V P 1 - L F G C A G C C A G C T A T G G C T T T A C ( 配列番号 5 5 )

V P 1 - L R G C T G C C A T T C A T G A G A G G A T ( 配列番号 5 6 )

インナー( 1 2 3 3 b p )

V P 1 - S F C C T C A A T G G A T G T T G C C T T T ( 配列番号 5 7 )

V P 1 - S R A A A A C C A A A G A C C C T ( 配列番号 5 8 )

P C R 反応混合物は、5 μ L の1 0 × P C R 緩衝液、4 mM のそれぞれのd N T P 、0 . 7 μ M のプライマーV P 1 - L F およびV P 1 - L R ( 第1ラウンド ) およびプライマー- V P 1 - S F およびV P 1 - S R ( 第2ラウンド ) 、1 . 2 5 ユニットのP l a t i n u m T a q H F ( I n v i t r o g e n ) および総容量の5 0 μ L で1 μ L の抽出されたD N A から構成された。サイクルパラメータは、自動化温度サイクリング( A p p l i e d B i o s y s t e m s )において、( 第1ラウンドおよび第2ラウンドの両方に對して ) 9 4 で2 0 秒間、5 8 で3 0 秒間、6 8 で9 0 秒間の3 0 サイクルであった。

## 【 0 3 2 2 】

アウタープライマーを用いた第1の増幅後、2 . 5 μ L の増幅した産物を第1の反応混合物から第2の反応混合物に移した。インナープライマーを用いて増幅した後、1 0 μ L の第2の混合物からの増幅した産物を、0 . 5 μ g / m L の臭化工チジウムを含有する2 % アガロースゲル上で電気泳動させた。その結果を、紫外線照明下で写真に撮り、期待されたb p 長のD N A 断片に対応する帯が存在する場合、陽性と見なされた。

## 【 0 3 2 3 】

## V P 1 P C R クローン作成 :

増幅産物をQ i a g e n 精製キットで精製した。A のもの

を、T a q ポリメラーゼ ( A - オーバーハング反応 ) によって除去したc l e a n e d u p P C R 産物の末端に添加し、クローニングは、T O P O T A クローニングキット ( I n v i t r o g e n ) で行なった。クローン化したV P 1 P C R 産物を含有するコロニーからのM i n i - p r e p D N A ( Q i a g e n ) を調製した。

## 【 0 3 2 4 】

## V P 1 の配列決定 :

2 ~ 4 8 のクローンを、それぞれの試料 ( 中央値2 3 ) に対して配列決定した。V P 1 配列の翻訳後、アミノ酸変異は、P M L および非P M L の症例からのV P 1 配列の大規模な選択と比較することによって特徴付けられた。試料に対して1を超えるクローンに存在している変異のみを考慮した。

## 【 0 3 2 5 】

## J C V - D N A の定量化のためのリアルタイムP C R :

J C V D N A は、以前に説明されたように、リアルタイムP C R によって、C S F 、血漿、および尿試料において定量化した ( B o s s o l a s c o S , C a l o r i G , M o r e t t i F , B o s c h i n i A , B e r t e l l i D , M e n a M , G e r e v i n i S , B e s t e t t i A , P e d a l e R , S a l a S , S a l a S , L a z z a r i n A , C i n q u e P . P r o g n o s t i c s i g n i f i c a n c e o f J C v i r u s D N A l e v e l s i n c e r e b r o s p i n a l f l u i d o f p a t i e n t s w i t h H I V - a s s o c i a t e d p r o g r e s s i v e m u l t i f o c a l l e u k o e n c e p h a l o p a t h y . C l i n I n f e c t D i s . 2 0 0 5 M a r 1 ; 4 0 ( 5 ) : 7 3 8 - 4 4 . ) 。

## 【 0 3 2 6 】

10

20

30

40

50

**患者 :**

PML患者は、a) 対のCSFおよび血漿、または尿試料、あるいはb) 連続的CSF試料、リアルタイムPCRによって検出可能なJCV-DNAを有する全てのいずれかの有効性に基づいて選択された。試料は、1993年～2008年に、サンラファエロ病院、感染クリニック(Clinic of Infectious Diseases, San Raffaele Hospital, Milano)の患者から採血した。試料アリコートは、本試験のためのレトロスペクティブ分析まで -80°で保存された。JCV-VP1は、合計30人のPML患者からの合計26のCSF試料、11の血漿試料、および6つの尿試料から成功裏に増幅された。

## 【0327】

10

**臨床試料の分析 - 研究計画 :**

## 1. CSF配列の分析 :

CSF配列は、26人の患者を検査し(表9)、変異の型および頻度、ならびに患者との相関変数を分析した。

## 【0328】

## 2. 同じ患者の対の試料からの配列の分析 :

対のCSF/血漿/尿試料(「三重試料」)を、2人の患者において検査を行なった。CSF/血漿、CSF/尿、および血漿/尿の対をそれぞれ、6人、1人、および3人の患者において検査を行なった。三重項および対から得た配列を比較した。

## 【0329】

20

## 3. 連続的試料からの配列の分析 :

連続的なCSFまたは血漿試料はそれぞれ、5人、および2人の患者から入手した。これらの試料は、PMLの診断寸前(ベースライン)、その後、異なる時間で採取された。それぞれの患者から、17～477日のタイムフレームにわたって採取された2～3つの試料を分析した。これらの患者のうち5人の患者は、PMLに対して進行性の経過があった。1人の患者は、HAARTの開始後、ウイルス学的応答を経験した。1人の患者は、シタラビンによる治療後、臨床的およびウイルス学的回復があったが、6ヶ月後、PMLの再発があり、シタラビンの使用を中止した。

## 【0330】

30

## 【表9】

表9. JCV-VP1分析を行なった26人のPML患者の特徴

HIV状態(陽性:陰性)	20 : 6
年齢の中央値	37
性別(男:女)	18 : 8
JCV DNA複製/mL(中央値、IQR)	22,351 (6416 - 1,178,877)
進行中のHAART(患者数)*	6
発症者対生存者(患者数)	18 : 2

40

\* HIV関連のPMLに罹患している患者のみを指す

**臨床試料の分析 - 結果 :**

## 1. CSF配列の分析 :

VP1 PML固有の変異は、PMLに罹患していない患者の尿には、通常存在しない

50

変異として定義された。これらの変異または欠失は、それらの地理的分布に従って、V P 1配列を区別するV P 1遺伝子型を決定する位置の変異を含まない。

【0331】

8つの異なるP M L固有の変異または欠失のうちの1つは、26人の患者のうちの24人(92%)のC S Fにおいて特定された。これらは、J C V V P 1アウターループのうちの1つにおいて、アミノ酸置換を含んだ(表10)。

【0332】

症例の全てにおいて、同じ試料からのほぼ全てのクローンは、変異または欠失を含んだ。5人の患者において、2つの異なる変異または欠失が、同じクローン(n=2)あるいは異なるクローン(n=3)のいずれかにおいて特定された。

10

【0333】

【表10】

表10. PMLに罹患している患者のC S FにおけるJ C V V P 1変異

患者	V P 1ループ	V P 1変異または欠失(aa)	患者数
HIV陽性(n=20)	<b>BC</b>	51-52欠失	1
		55F	5
		55F + 271H *	1
		61L	1
		61L + 55欠失*	1
	<b>DE</b>	122R	2
		122R + 125-127欠失	1
		122R + 2V **	1
	<b>HI</b>	265D	2
		267F + 61L *	1
		169F	2
		0	2
HIV陰性(n=6)	<b>BC</b>	55F	4
	<b>HI</b>	265H	1
		269F	1

20

30

40

B C、D E、およびH I J C V V P 1ループは、S V 4 0 のV P 1ループへのaa配列の類似性によって定義され(Chang D, Liou ZM, Ou WC, Wang KZ, Wang M, Fung CY, Tsai RT. Production of the antigen and the antibody of the J C virus major capsid protein V P 1. J Virol Methods 1996 May; 59(1-2): 177-87)、以前は、X線結晶学によって判定された(Liddington RC, Yan Y, Moulaï J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. Nature 1991 Nov 28; 354(6351): 278-84)。

50

\* 変異 / 欠失のいずれかが、異なるクローン（15および4クローン中の55F + 271H、18および4クローン中の61L + 55欠失、15および4クローン中の267F + 61L）に存在した。\*\* 変異 / 欠失は共に、それぞれのクローンに存在した。

#### 【0334】

より高いCSF JCV DNAレベルは、DEループの変異を有するもの、または変異を有さないものよりもBCおよびHIループの変異を有する患者において見出された（図19）。変異の型とCD4細胞数、血漿HIV-1 RNAレベル、または生存時間との間の相関関係は、HIV関連のPMLに罹患している患者において観察されなかった。

#### 【0335】

2. 対の試料からの配列の分析：

10

2つのCSF / 血漿 / 尿の三重試料の分析は、CSFおよび血漿において、同じVP1 PML固有の変異を示したが、PML変異は、対応する尿配列には存在しなかった（表11）。同様に、同一のPML固有の変異は、CSF / 血漿の対を有する6人の患者からのCSFおよび血漿配列において見出された（表12）が、CSFあるいは血漿のいずれかのみではなく、CSF / 尿の対を有する1人の患者または血漿 / 尿の対を有する3人の患者の尿配列では見出されなかった（表13）。

#### 【0336】

#### 【表11】

表11. PMLに罹患している患者からの対のCSF／血漿／尿試料におけるJCV VP1変異

20

Pt Lab ID	試料の種類	PML 変異	
1	CSF	269F	
	血漿*	269F	
	尿	0	
2	CSF	269F	
	血漿	269F	
	尿	0	

#### 【0337】

#### 【表12】

30

表12. PMLに罹患している患者からの対のCSF／血漿試料におけるJCV VP1変異

Pt Lab ID	試料の種類	PML 変異	
3	CSF	269F	
	血漿*	269F	
4	CSF	269F	
	血漿	269F	
5	CSF	122R	
	血漿	122R	
6	CSF	0	
	血漿	0	
7	CSF	55F	
	血漿	55F	
8	CSF	269F	
	血漿	269F	

#### 【0338】

40

## 【表13】

表13. PMLに罹患している患者からの対のCSF／尿または血漿／尿試料におけるJCV  
VP1変異

Pt Lab ID	試料の種類	PML 変異	
9	CSF	55F	
	尿	0	
10	血漿	122R	
	尿	0	
11	血漿**	55F	
	尿	0	
12	血漿	0	
	尿	0	

10

## 3. 連続的試料からの配列の分析：

連続的CSFまたは血漿試料の分析は、進行性疾患を患う7人の患者においてPML固有の変異、およびCSFにおいて、JCV DNAの安定した、または増加を示した（表14および15）。

## 【0339】

ウイルス学的応答を経験した患者において、第1のCSF試料に存在する主なPML変異は、第2のCSF試料がJCV DNAレベルの低下を示すことをもはや見出されなかつたが、この後続の試料において、以前に若干示された変異の出現が観察された。

20

## 【0340】

PMLの再発を経験していた患者において、PMLの第1の症状の発現の臨床的およびウイルス学的回復から数ヶ月後、2つの異なる変異は、2つの症状の発現中、採取したCSF試料に存在した。

## 【0341】

## 【表14】

表14. 連続的CSF試料を有する患者におけるPML変異

30

Pt Lab ID	第1の試料後の日数	PML 変異	
A	0	55F	
	17	55F	
	92	55F	
B	0	269F	
	208	265D	
C	0	265D	
	56	265D	
D	0	55F	
	66	55F	
E	0	122R+2V**	
	477	122R+2V**	
F	0	51-52欠失	
	230	51-52欠失	
G	0	61L+53-55欠失*	
	63	53-55欠失	

40

## 【0342】

## 【表15】

表15. 連続的血漿試料を有する患者におけるPML変異

Pt Lab ID	第1の試料後の日数	PML 変異
H	0	269F
	21	269F
I	0	267Y
	56	267Y

表14および15、注記：

\* 変異 / 欠失のいずれかが、異なるクローン（15および4クローン中の55F + 271H、18および4クローン中の61L + 55欠失、15および4クローン中の267F + 61L）に存在した。

\*\* 変異 / 欠失は共に、それぞれのクローンに存在した。

## 【0343】

JCV - VP1の分子モデリング：

JCV VP1 / 四糖類複合体の分子モデリング：

JCV VP1タンパク質の五量体単位の相同モデルは、テンプレートとしてMPyV VP1（タンパク質データバンクID：1VPS）の構造を用いて、MODELERと共に構築された。NeuNac - (2,3) - Gal - (1,3) - [(2,6) - NeuNac] - Glc - NAc四糖類のモデルは、MPyV VP1に結合したNeuNac - (2,3) - Gal - (1,3) - [(2,6) - NeuNac] - Glc - NAc四糖類のモデルは、CHARMMにおいて、広範囲に精密化され、PyMOL可視化ソフトウェア（The PyMOL Molecular Graphics System (2002) Delano Scientific, Palo Alto, CA, USA. <http://www.pymol.org>）を用いて分析された。

## 【0344】

したがって、野生型ウイルス（健常な人の尿に存在する）と比較して、8つの特異的な单一の変異または欠失のうちの1つは、26人の患者中24人（92%）のそれぞれからのほぼ全てのCSFクローンに特定された。VP1の3つのアウターループのうちの1つにおいて、これらが与えた置換または欠失は、最も高い頻度で、残基55（55F、7人の患者、27%）および269（269F、6人の患者、23%）を含む。対の血漿は、常に、同じCSF変異を示したが、尿においては、変異は特定されなかった。変異は、進行性疾患を患有する7人の患者からの連続的試料中に維持され、CSFにおいて、JCV DNAを安定した、または増加した。それらは、2人の患者：新しい変異が発生した、PML回復および再発を経験している1人、および以前は微量であった異なる変異バリエントが出現した、CSF JCV DNAが低下した1人において、失われた。三次元モデリングによって、全ての変異した残基は、VP1におけるシアル酸細胞受容体結合部位内、またはそこに近接してクラスター化された。

## 【0345】

したがって、このデータに基づいて、PMLに罹患している患者において、CSFおよび血漿から見出されたが、尿には見出されないJCVは、PML固有のVP1置換を担持する。これらの置換は、疾患の進行中、維持される。それらは、シアル酸細胞受容体と結合する重要な部位で、VP1のBC、DE、またはHI外部ループを含む。したがって、PMLにおいて、CSFおよび血漿からあって、尿からではないJCVは、細胞結合に対する重要部位にVP1置換を担持し、これは、疾患中、維持される。これらの所見は、モデルを支持し、それによって、JCVは、脳に持続し、最終的にPMLをもたらす部位からの遷移中、適応変化を得る。

10

20

30

40

50

**【 0 3 4 6 】**

実施例 1 2 : V P 1 のシアル酸結合ポケットにおける残基  
モデル化したシアル酸含有糖からの 1 2 オングストローム内の残基（本明細書の実施例に記載される）を、表 1 6 に列記する。

**【 0 3 4 7 】****【 表 1 6 - 1 】**

表 1 6 .

MET	48
GLY	49
ASP	50
PRO	51
ASP	52
GLU	53
HIS	54
LEU	55
ARG	56
GLY	57
MET	57
GLY	58
PHE	58

10

20

**【 0 3 4 8 】**

【表 16 - 2】

GLN	59	
SER	59	
LYS	60	
PRO	60	
SER	61	
ILE	62	
PRO	63	
SER	63	
ILE	64	
SER	65	10
SER	65	
ASP	66	
LEU	66	
THR	67	
THR	67	
GLU	68	
PHE	68	
GLU	69	
GLY	69	
GLY	70	
SER	70	
ASP	71	20
GLN	71	
SER	72	
TYR	72	
PRO	73	
TYR	73	
ASN	74	
GLY	74	
LYS	75	
TRP	75	
ASP	76	
SER	76	
ARG	77	30
MET	77	
GLY	78	
LEU	78	
ILE	79	
PRO	79	
ASN	80	
LEU	81	
ALA	82	
THR	83	
SER	84	
ASP	85	
THR	86	40
GLU	87	
ASP	88	
SER	89	
PRO	90	
GLY	91	

【0 3 4 9】

【表 16 - 3】

ASN	92	
ASN	93	
THR	94	
LEU	95	
PRO	96	
ASN	120	
VAL	121	
HIS	122	
SER	123	
ASN	124	10
GLY	125	
ASP	130	
ASN	131	
GLY	132	
ALA	133	
ALA	134	
ASP	137	
VAL	138	
HIS	139	
GLY	140	
PHE	141	
ASN	142	20
LYS	143	
THR	150	
LYS	151	
GLY	152	
ILE	153	
SER	154	
PHE	159	
ASN	160	
TYR	161	
ARG	162	
THR	163	
THR	164	30
TYR	165	
PRO	166	
ASP	167	
ASP	180	
GLN	180	
ARG	182	
THR	183	
LYS	184	
TYR	185	
LYS	186	
GLU	187	
GLU	188	
VAL	190	40
GLN	206	
MET	262	
PHE	263	
THR	264	

【0 3 5 0】

## 【表 16 - 4】

ASN	265
ARG	266
SER	267
GLY	268
SER	269
GLN	270
GLN	271
TRP	272
ARG	273
TRP	288
ARG	289
VAL	290
THR	291
ARG	292
ASN	293
TYR	294
ASP	295
VAL	296
VAL	296
HIS	297
HIS	298
TRP	299
ARG	300

10

20

30

実施例 13：PML 患者の CSF および血漿は、PML 関連の VP-1 変異を担持するが、尿は、PML 関連の VP-1 変異を担持しない。

## 【0351】

PML 関連の変異が、PML 患者の CSF において、特異的に選択されたかどうかを調査するために、初めに、7人の患者からの対の CSF および尿配列を分析した（表17）。それぞれの患者において、CSF JCV-VP1 は、尿由来の配列には存在しなかったアミノ酸置換を担持した。そうでなければ、CSF および尿配列は、個人の患者内で同一であり、参照株（同じウイルスサブタイプ）と比較して、同一の多形によって特徴付けられた。PML 関連の CSF 変異は、コドン 55、60、267、269、また、コドン 122 も含んだ。13人の患者から入手される血漿 VP1 配列（表17）は、全ての場合において、対応する CSF 由来の配列に同一であり、同じ PML 関連の置換を担持した。

## 【0352】

表17. PML 患者からの対の尿、CSF、および血漿試料に由来する配列における JCVP1 アミノ酸置換

## 【0353】

## 【表17】

表17.

	マトリク ス	JCV サブタ イプ	PML 関連の置 換
1	尿 CSF 血漿	1B 1B 該当なし	なし L55F 該当なし
2	尿 CSF 血漿	Mad-1 Mad-1 該当なし	なし H122R; A2V 該当なし
4	尿 CSF 血漿	1A 1A 1A	なし H122R H122R
5	尿 CSF 血漿	Mad-1 Mad-1 Mad-1	なし S269F S269F
6	尿 CSF 血漿	Undet. CONS Undet.	なし S267Y S267Y
7	尿 CSF 血漿	1B 1B 1B	なし S269F S269F
8	尿 CSF 血漿	1A 1A 1A	なし S269F S269F
9	尿 CSF 血漿	該当なし Undet. Undet.	該当なし S269F S269F
10	尿 CSF 血漿	該当なし 2B 2B	該当なし S269F S269F
11	尿 CSF 血漿	該当なし 4v164K 4v164K	該当なし なし なし
12	尿 CSF 血漿	該当なし 1A 1A	該当なし L55F L55F
13	尿 CSF 血漿	該当なし 4v128A345 K 4v128A345 K	該当なし L55F L55F
14	尿 CSF 血漿	該当なし 1Bv117T 1Bv117T	該当なし S269F S269F
16	尿 CSF 血漿	4v164K 該当なし 4v164K	なし 該当なし L55F

10

20

30

40

U、尿；CSF、脳脊髄液；P、血漿。\*置換が特定されない場合、カラム値は、置換がない、クローニング数／検査されたクローニング数を指す。

## 【0354】

実施例14：PML患者のCSF JCVは、細胞結合に重要な部位に位置する幾つ

50

かの変異または欠失のうちの 1 つを一貫して担持する。

### 【 0 3 5 5 】

インビオでの V P 1 P M L 関連の置換の型および頻度を定義するために、より大きな患者群における C S F 由来 V P 1 配列を分析した。1つの主な P M L 関連の変異または欠失は、40人の患者のうちの37人(90%)において特定された(表18)。V P 1 遺伝子は、材料および方法に記載されるように、クローン化され、多くのクローンに対して配列決定した。変異は、Genebankにおいて報告されるように、整合した尿試料からのいずれかの V P 1 配列への配列(利用可能な場合)を、非 P M L 個人の尿から単離された460の配列( $n = 460$ )と比較することによって特定された。一部の患者において、変異 H 1 2 2 R を特定した。一部の患者において、変異 2 8 3 I を特定した。一部の患者において、変異 A 2 V を特定した。一部の患者において、欠失 5 0 ~ 5 1 を特定した。一部の患者において、欠失 5 0 ~ 5 1 を特定した。一部の患者において、欠失 5 4 ~ 5 5 を特定した。一部の患者において、欠失 1 2 3 ~ 1 2 5 を特定した。一部の患者において、欠失 1 2 5 ~ 1 3 4 を特定した。一部の患者において、欠失 1 2 6 ~ 1 3 4 を特定した。

10

### 【 0 3 5 6 】

最も頻度の高い変化は、コドン 5 5 および 2 6 9 を含み、それぞれ、25%の患者において特定された。既に報告されている置換に加えて、コドン 5 5、6 0、6 1、および 2 6 5、2 6 7、2 6 9 で、幾つかの他の P M L 関連の変異または欠失は、新たに特定され、Genebank からの尿由来配列と比較することによって証明されるように、非多型 V P 1 コドンを含む。全てのこれらの新たに特定された変異はまた、臨界 V P 1 結合部位に位置する(表18)。図20は、J C V V P 1 / NeuNac - (a 2 , 3 ) - G a 1 - (b 1 , 3 ) - [(a 2 , 6 ) - NeuNac] - G 1 c - N A c 四糖類複合体の構造モデルである。(A) J C V V P 1 の5つの鎖の表面を示す。中心的なシアル酸の結合に必須の R G モチーフを示す。また、P M L 関連の変異残基(L 5 5、K 6 0、S 2 6 5、S 2 6 9)を示す。また、P M L に単離された試料に特有のさらなる変異(S 6 1、D 6 6、Q 2 7 1)および(P 5 1、D 5 2、H 1 2 2、S 1 2 3、N 1 2 4、G 1 2 5、Q 1 2 6、A 1 2 7)も示す。(B) 図20Aのクローズアップ写真。J C V V P 1 の S 2 6 9 と同等であることが予想される M P y V V P 1 の V 2 9 6 の位置をメッシュで示す。

20

### 【 0 3 5 7 】

### 【 表 1 8 - 1 】

表18. PML患者のC S F における、J C V V P 1 PML関連の a a 置換および欠失

	JCV VP1 サブタイプ	PML関連の置換または欠失
--	---------------	---------------

### 【 0 3 5 8 】

30

40

【表 18 - 2】

	JCV VPI サブタイプ	PML 関連の置換または欠失
1	4v-164K	なし
2	1Av-128S	なし
4	2B	50~51 欠失 D66G N124S
5	1B	L55F
6	1A	L55F
7	3	L55F Q271H
8	1B	L55F
9	1A	L55F
10	4v-128A345K	L55F
16	1B	S61L 54~55 欠失
18	1A	H122R
19	1A	H122R A2V
17	1B	123~125 欠失
20	4v-128A	N265D
21	4v-128A	N265D
23	1B	S267F S61L Q271H
24	2B	S267F
25	Undet.	S269F

10

20

30

40

【0 3 5 9】

【表18-3】

	JCV VP1 サブタイプ	PML 関連の置換または欠失
27	1B	S269F
31	2B	L55F
34	2B	N265H
36	2B	S269F
37	1Bv117T	S269F
38	1B	S269F
39	1A	S269F

10

20

30

40

Undet.、判定されず；Cons.、コンセンサス；v、バリアント

a. 位置 295 まで利用可能な配列

実施例 15：異なるコンパートメントから単離された JCV ウィルス間の関係

3つのコンパートメント（腎臓、血漿、および CSF）におけるウィルス集団間の関係を調査するために、3人の患者における全て3つのコンパートメントからの個別に配列決定されたクローニングによって示される VP1 配列の集団変異を分析した。PML の発症と推定上関連するアミノ酸変化を除いて、全て3つのコンパートメントの優性の VP1 遺伝子型は、常に同一である。全ての観察された配列変異は、低頻度の单一ヌクレオチドバリアントによるものであった。これは、ウイルスを生じる PML が、腎臓において既存の常在集団が起源であることを示唆している。

#### 【0360】

3つのコンパートメントにおけるウィルス集団間の関係は、共有した低頻度の多型の程度によって特徴付けることができる。2つまたはそれ以上のクローニングにおいて観察された单一のヌクレオチドバリアントを分析した。3人全ての患者において、遺伝子変異の大部分は、1を超える配列に存在する対立遺伝子のバリエーションが、单一のコンパートメントにおいて観察される場合、個々のコンパートメントに閉じ込められた。したがって、ウィルス集団は、高度に構造化される。

#### 【0361】

3人の患者のうちの2人において、一部の対立遺伝子バリエーションは、CSF 集団と血漿集団との間で共有され、CSF 集団と腎臓集団、または血漿集団と腎臓集団との間ではバリエーションは、共有されなかった。これらの2人の患者のそれぞれにおいて、同じ PML 関連の変異は、CSF および血漿からのクローニングにおいて観察された。これらのデータは、推定上、腎臓事象からの1回限りの回避のため、CSF および血漿集団の単一起源と一致している。このシナリオでは、CSF 集団と血漿集団との間で共有された配列変異は、腎臓の外側の PML 関連の変異の固定後に生じた（同じ部位での独立した複数の変異の可能性が低いと仮定して）。CSF 集団と血漿集団の間で共有した VP1 配列変異は、コンパートメント間のウイルス転移の存在を示し得る。また、腎臓の外側の常在ウイルス集団が、まず、1つのコンパートメント（CSF あるいは血漿のいずれか）に構築され、遺伝子変異を蓄積し、次いで、第2のコンパートメントに感染するという段階的な感染のシナリオと一致する。

#### 【0362】

1/3の患者は、コンパートメント間の共有した多型の異なる画像を提示する。2つの

50

バリアントは、CSFと腎臓との間を共有し、3つのバリアントは、血漿と腎臓との間を共有し、1つのバリアントは、全て3つのコンパートメント間を共有した。CSFから単離された全てのクローンおよび血漿から単離されたクローンの大部分は、同じPML関連の変異(S269F)を持つ。しかしながら、血漿から単離された3つのクローンは、異なるPML関連の変異(S267F)があった。これらのクローンは、優性のPML関連の変異を欠いた。

#### 【0363】

患者3のCSFおよび血漿の複数の逐次感染の可能性を除外することはできないが、これらの観察は、腎臓からの1回限りの回避後、CSF集団および腎臓集団の單一起源のシナリオと必ずしも矛盾しない。患者3のデータは、穏やかな選択の一掃の一例であり得る。強固な選択の一掃と違って、穏やかな選択の一掃は、完全には既存の遺伝的変異を排除しない。穏やかな一掃シナリオは、有効な集団の大きさおよび変異率( $N_e \times mu$ )の産物がある産物を超える場合、可能性が非常に高い。この場合においては、有益な変異(または等しいまたは同等の選択的優位性の幾つかの有益な変異)の複数の例は、異なるハプロタイプのバックグラウンドにおける元の集団に存在する可能性がある。穏やかな一掃後、全ての配列は、有益な変異を持つが、集団は、多様型のままである。S269F変異およびS267F変異の複数の例は、回避および固定が生じる前に、腎臓集団に存在し、続いて、穏やかな一掃シナリオが、血漿集団にS269FおよびS267F VP1バリアントの共存をもたらし、3つ全てのコンパートメント間の変異を共有した可能性がある。

10

20

#### 【0364】

##### 実施例16：臨床転帰との様々な変異の相関関係

個々のPML関連のVP1置換が、臨床的に有意な、例えば、患者および臨床状況に従って異なった選択をする、または異なる疾患転帰と関連するかどうかを評価するために、それらの存在を、多くの変数と相關させた。

30

#### 【0365】

VP1置換、または位置122～134を含む置換がないJCウイルスは、他の位置( $p = 0.013$ 、Mann-Whitney検定)を含む置換、例えば、異なるVP1置換を持する位置50～61( $p = 0.02$ )あるいは265～269( $p = 0.036$ )のいずれかの置換を有するウイルスと比較する場合、CSFにおいて、有意に低いDNAレベルで存在することが観察された。

30

#### 【0366】

##### 実施例17：PML関連の変異は、RBCを凝集させるVP1の能力を減退させる。

#### 【0367】

PML関連の変異が、疾病病因に働く役割を理解するために、ウイルス受容体結合におけるこれらの変異の幾つかの効果を調査した。JCVが、シアル酸構造(Lieu)に結合することが知られているため、これらの構造を発現するRBCの血球凝集を生じるウイルス能力は、その受容体とのウイルスの相互作用のモデルとして幅広く使用されている。

#### 【0368】

主要なJCVカプシドタンパク質VP1から調製したウイルス様粒子(VLP)は、それらの細胞受容体とのポリオーマウイルスの相互作用を調査する良好なモデルとして幅広く使用されている。ウイルスカプシドと同様に、VLPは、電子顕微鏡法で証明されるように(データは示さず)、ウイルスカプシド構造を形成する。次に、「野生型」あるいは様々な「変異体」VP1分子のいずれかから調製されるVLPの結合を調査した。PML中、積極的に選択されたことを示す多くのPML関連の変異は、点変異として、单一のウイルスバックグラウンド(JCV3型)からのVP1分子の骨格に導入され、赤血球(RBC)を血球凝集する(例えば、結合する)、それらの能力を比較した。1A型(例えば、Mad-1)ウイルスから調製されるVLPと同様に、3型ウイルスのVP1分子から調製されるVLPは、RBCの血球凝集を生じさせることができ、それらは、760pg/mLの低濃度で、生じる。しかしながら、最も高い頻度で起こる変異55F、267F

40

50

、位置 269 (F または Y) の変異のうちの 1 つを担持する VLP は、100,000 倍以上の活性の低下に対応する、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  の最高の試験濃度でさえ、血球凝集を生じなかった。血球凝集はなお、60E、265D、および 271H 变異体 VLP を伴うが、200 ~ 25,000 倍の活性の喪失に対応する非常に高濃度でのみ、見掛けられた。66H 变異体 VLP の結合のみが、強く影響されず、血球凝集において、わずか 3 倍の低下を示した（最低の血球凝集濃度として  $3000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）。66H あるいは 271H 变異のいずれも、本実施例において分析された配列の中に観察されなかつたが、これらの变異は、Genbank からの配列の分析に基づいて、PML 関連であると特定される。血球凝集を生じる VLP の能力におけるこの变異効果は、变異が、細胞受容体に結合するウイルスの能力を無効にすることによってウイルス受容体特異性を変化させ得ることを示唆している。

10

## 【0369】

実施例 18：PML 関連の变異は、異なる血液群からの RBC を血球凝集する能力を失う。

## 【0370】

PML 関連の变異を担持する VLP は、異なる血液群からの RBC を血球凝集する能力を失う。血球凝集アッセイのために、赤血球 (RBC) を、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  から開始する様々な VLP の連続 2 倍希釈液でインキュベートした。最低 HA 濃度は、RBC をさらに凝集した VLP タンパク質の最低濃度である。血球凝集は、前述のように、ウイルス感染によって検査が行なわれた。全ての血球凝集反応は、2 重に行なわれた。最低 HA 濃度に対する平均値 + / - 標準偏差は、4 つの異なる血液群ドナー (A型、B型、O型、および AB型) からの血球凝集の結果に基づいて計算される。 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  の最低血球凝集濃度を示す VLP は、試験した最高の VLP 濃度（例えば、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）で血球凝集を生じなかつた。

20

## 【0371】

実施例 19：PML 関連の变異は、VP1 のガングリオシド特異性を変化させる。

## 【0372】

JCV VP1 受容体をさらに分析するために、異なるガングリオシドへの様々な变異体 VLP の結合の特異性を調査した。ガングリオシドは、複合スフィンゴ糖脂質の一群であり、1 つまたはそれ以上のシアル酸 (N-アセチルノイロミン酸、NeuNAc) を含むオリゴ糖鎖は、セラミドに付着し、細胞膜への構造を固定する。これらのガングリオシドに結合する VLP は、ELISA 様形式において測定され、ガングリオシドは、抗原と同種の ELISA プレートに被覆され、続いて、VLP を添加し、結合は、VP1 固有のモノクローナル抗体で検出された。3 型「野生型」JCV VLP を用いて、ガングリオシドを全く有さないウェルへの VLP の結合によって産生されたバックグラウンドと比較した場合、8 ~ 12 倍以上のシグナルの増加を有する、最も強い結合が、GD1b、GD2、および GT1a に観察された（図 21）。VP1 の PML 特異的变異は、シアル化ガングリオシドに対するウイルスカプシドタンパク質 VP1 の特異性をなくす、または大きく変化させる。96 ウェルプレート上で被覆されたガングリオシドのアレイへの VLP の結合は、VP1 固有のマウス抗体および抗マウス IgG HRP 標識化抗体を有するガングリオシドに結合する VLP の検出を含む 2 つのステッププロセスで検出され、続いて、TMB 溶液を用いて展開させた。特定のガングリオシドへの VLP 結合は、同じガングリオシドの存在下で、VLP を用いずに、および抗体のみで得たものと比較して、存在した特定の VLP を用いて得られた光学濃度の増加の割合として、以下のように計算された。 $100 * (OD_{450} (+VLP) - OD_{450} (-VLP)) / OD_{450} (-VLP)$ 。ガングリオシドの図式的構造は、様々な VLP によって結合されるコア結合構造を示すことが示される。行なわれた 4 つの実験のうちの 1 つの代表的な実験を示す。このガングリオシドの特異性は、1A 型「野生型」ウイルス Mad-1 に対して前述されるものと一致している。アシアロ - GM1 および GD1a に対する VLP の結合は、はるかに弱いが、なお、バックグラウンドを超えて有意であるが、他のガングリオシドへの結合は、ガ

30

40

50

ングリオシドがないバックグラウンドと比較して非常にわずかであった。結合パターンに基づいて、野生型ウイルスによって結合される主要な「コア」構造は、結合に欠かせない Neu5Ac(2-8)-Neu5Ac(2-3) のジシアル酸モチーフを有する、四糖類 GalNAc(1-4)[Neu5Ac(2-8)-Neu5Ac(2-3)]Gal(1-4)Gal 構造からなることは明らかである。

### 【0373】

しかしながら、全ての変異体 VLP の結合は、「野生型」分子とは大幅に異なった。具体的には、図 21 に見られるように、VLP 変異体 55F、60E、267F、269F、および 269Y は、全てのシアル化したガングリオシドへの結合を完全に失うが、それでも、アシアロ化した GM1 構造（例えば、アシアロ-GM1）への変化しない結合を示す。さらに、66H、265H、および 271H 等のその他は、元来の変異しない VLP 分子よりもさらに広範囲のガングリオシド結合を示した。

10

### 【0374】

#### 実施例 20：様々な細胞標的への VLP の結合

血球凝集および直接ガングリオシド結合アッセイからの結果は共に、PML 関連の変異が、ウイルス受容体の特異性、特に、シアル化したオリゴ糖構造に結合するウイルス能力を変化させることを示唆している。したがって、次に、特定の受容体結合におけるこれらの変異が与えた変化が、いかにその主張される標的細胞に結合する JCV の能力に影響を及ぼすかについて調査した。ウイルス細胞サイクルにとって重要であると報告された 3 つの主要な細胞型：腎臓上皮細胞、リンパ球、および CNS 細胞への上記の野生型および変異体 VLP の結合を測定した。一次ヒト腎臓近位尿細管上皮細胞（HRPTEC）を、非変異ウイルスへのウイルス無症候性が持続する部位からの細胞として選択された。初代ヒト B リンパ球もまた、CNS への末梢部位からウイルスの拡散には欠かせないことが示唆されている細胞型、ならびに他のリンパ球様細胞、例えば、初代 T リンパ球およびリンパ球細胞株 Jurkat として選択された。リンパ球様細胞の増殖感染は、明白には示されていないが、リンパ球が、それらのシアル酸構造を介して JCV に結合することが示され（Atwoodら）、したがって、インビトでのウイルスを潜在的に担持し得る。初代ヒト胎児星状膠細胞およびヒトグリア細胞株 SVG-A もまた、PML 中、CNS 感染に対するモデル細胞型として使用された。星状膠細胞の感染は、PML 患者において十分に文書化されており、これらのグリア細胞型は共に、インビトロで JCV によって感染させることができる。

20

### 【0375】

VPI の PML を生じる変異体は、腎臓および血液細胞への結合能力を失うが、グリア細胞に結合する。グリア細胞株 SVG-A (A)、初代ヒト星状膠細胞 (B)、ヒト脳微小血管細胞 (C)、腎臓尿細管上皮細胞 (D)、または末梢血単核細胞 (E および F) 細胞は、まず、異なる VLP (X 軸上に示される) でインキュベートし、抗 VPI 抗体でさらにインキュベートし、続いて、蛍光標識抗体で染色した。T-リンパ球 (E) および B-リンパ球 (E) への VLP の結合は、ヒト CD3 および CD20 マーカーに対して特異的な抗体で PBMC を共染色し、対応する集団にゲーティングした後、評価された。VLP の存在下で、抗 VPI 抗体で染色した細胞の平均蛍光強度 (MF) の比は、VLP の不在下で、検出抗体でのみ染色した細胞のバックグラウンド MF と比較して、それぞれの VLP に対してプロットした。平均 MF 比 + / 標準偏差は、幾つかの独立した実験からの結果に基づいて、計算される (N は、グラフ上に示される)。「野生型」VPI から作製された VLP は、バックグラウンド染色を 2 倍以上上回る上記の細胞型の全てに強力に結合した。しかしながら、変異体 VLP の結合は、変異したアミノ酸の細胞型および位置の両方に依存した。具体的には、最も頻度の高い PML 関連の変異 55F、267F、269F、および 269Y は、腎臓尿細管上皮細胞および全てのリンパ球細胞への VLP の結合を無効にするが、初代星状膠細胞もしくはグリア細胞株 SVG-A への結合はなくさない。CNS 細胞型は共に、これらの変異 (SVG-A 細胞に結合するが、初代星状膠細胞には結合しない 55F を除く) を担持する VLP に、今なお強く結合した。60E、

30

40

50

66H、および271Hを担持するVLPは、腎臓上皮細胞およびリンパ球細胞を含む全ての細胞型に、今なお結合したが、271Hの結合は、強く減退した。

#### 【0376】

実施例21：PML関連の変異を担持するVLPは、シアル酸非依存の様式でグリア細胞に結合する。

#### 【0377】

細胞へのウイルスの結合は、シアル酸依存性であることが前に示されている（例えば、Atwood et al）が、データが、ほとんどのPML関連の変異が、ガングリオシドを含むシアル酸へのVLPの結合をなくすことを示すので、次に、細胞への変異体VLPの結合が、それでも、シアル酸依存性であるかどうかを試験した。それを行なうために、SVG-AあるいはJurkat細胞のいずれかを、ノイラミニダーゼで処理し、細胞表面からシアル酸を除去した。ノイラミン酸（例えば、Sambucus nigra Lectin (SNA) およびMaackia amurensis lectin (MAA)）の様々な配座に対して特異的なレクチンでの細胞の染色は、シアル酸除去におけるノイラミニダーゼ処理の有効性を証明した。グリア細胞へのVP1のPMLを生じる変異体の結合は、シアル酸非依存性である。グリア細胞株SVG-A細胞またはリンパ球細胞株Jurkatsは、まず、37で60分間、2-3,6ノイラミニダーゼで事前に処理するか、または模擬処理し、続いて、本明細書に記載されるように、指示されたVLPを用いて4でインキュベートし、検出抗体で染色した。

10

#### 【0378】

SVG-A細胞およびJurkat細胞の両方への3型野生型VLPの結合は、シアル酸依存性であり、これは、Mad-1ウイルス（例えば、1A型野生型）に対して前に示されることを確認する。しかしながら、SVG-A細胞への、K60E変異体VLPではないが、全ての試験したVLPの結合は、これらの細胞へのこれらの変異体の結合が、シアル酸非依存性であることを示唆しているノイラミニダーゼ処理によって影響を及ぼさなかつた。興味深いことに、Jurkat細胞（例えば、K60E、D66H、N265D、およびQ271H）に、今もなお結合することができたこれらの変異体は、ノイラミニダーゼにより処理したJurkat細胞への結合を減退することによって証明されるよう、シアル酸依存性の様式に結合した。

20

#### 【0379】

要約した表19から理解され得るように、Jurkat細胞へのVLPの結合は、主にシアル酸媒介であると思われ、シアル化したガングリオシドへのいずれの結合を示さない変異体VLPは、Jurkat細胞に結合せず、シアル酸依存性の様式でJurkat細胞にも結合する。ガングリオシドへの直接結合に基づいて、その観察がN265D変異体であるという1つの注目すべき例外は、非常に幅広いシアル酸結合を得られるように思われるが、それでも、Jurkat細胞へのその結合を失うことである。上記の結果に基づいて、VLP結合の結果は、血球凝集の結果から判断されるように、RBCへのVLP結合と一致している。

30

#### 【0380】

要約すれば、PML関連の変異は、RBC、腎臓尿細管上皮細胞、およびリンパ球細胞を含む、大部分の異なる末梢細胞型へのウイルスのシアル酸依存性結合をなくすと考えられる。CNS固有のグリア細胞への変異体ウイルスの結合は、大部分は、影響を受けず、シアル酸依存性であると考えられる。

40

#### 【0381】

## 【表19】

表19. 様々なアッセイ間のVLP結合の相関関係

	HA	SA	HRPTEC	Jurkat	星状膠細胞	SVG-A	SA 依存性	
							Jurkat	SVG-A
野生型 3	+++	++	+++	+++	+++	+++	あり	あり
L55F	-	-	-	-	+/-	+++	なし	なし
K60E	-	-	+++	++	++++	+++	あり	部分的
D66H	++	+++	+++	+++	+++++	+++	部分的	なし
N265D	+	++++	-	-	+++	++++	なし	なし
S267F	-	-	-	-	++	++	なし	なし
S269F	-	-	-	-	++	+++	なし	なし
S269Y	-	-	-	-	++	+++++	なし	なし
Q271H	+/-	+++	+	+	+++	+++++	あり	なし

10

## 【0382】

実施例13～21に従って、以下の方法および材料を用いた。

20

## 【0383】

## 患者および試料

本研究は、倫理審査委員会によって承認された。PML患者の大規模コホートからの、インビオでのPML関連の変異の存在および進化を調査するために、1992年～2009年に、サンラファエロ病院、感染クリニックに従い、40人の患者が、初めに、対のCSF、血漿、または尿試料が入手可能であり、リアルタイムPCR (Bossolasco) によって決定される、JCV DNAを含む者から選択された。VP1は、最終的に、これらの患者のうちの14人において、少なくとも2つの異なる型の試料から増幅された。

30

## 【0384】

続いて、CSFのみ入手可能な、リアルタイムPCRによってCSFに検出されたJCV DNAを有する43人の追加のPML患者を選択した。JCV VP1は、これらの患者のうちの28人から成功裏に増幅された。故に、14人の患者からの試料および合計40人の患者からのCSF由来配列を研究することができた。

30

## 【0385】

## JCV VP1 PCR

## DNA抽出およびVP1増幅

DNAは、QIAamp Blood Kit (Qiagen) を用いて、200 μLのCSF、血漿、または尿から抽出し、最終容量の50 μLに溶出した。VP1は、全VP1遺伝子（完全VP1 PCR）の側面にあるプライマーを用いるか、あるいは、この方法による増幅が、成功しない場合、より短いVP1領域（短い断片VP1 PCR）を別個に増幅したセミネスト化PCRアッセイのいずれかによって、増幅された。

40

## 【0386】

完全VP1 PCRは、2027 bp断片を増幅するアウタープライマーのVP1-LFおよびVP1-LR、ならびに1233 bp長の断片を増幅するインナープライマーのVP1-SFおよびVP1-SRを用いたネスト化アッセイから構成された。PCR反応混合物は、5 μLの10X PCR緩衝液、4 mMのそれぞれのdNTP、0.7 μMのプライマーVP1-LFおよびVP1-LR（第1ラウンド）およびプライマーVP1-SFおよびVP1-SR（第2ラウンド）、1.25ユニットのPlatinum Taq HF (Invitrogen)、および総容量の50 μLに1 μLの抽出されたDNA（第1ラウンド）または2.5 μLの増幅産物（第2ラウンド）から構成された。サイ

50

クルパラメータは、自動化温度サイクリング (Applied Biosystems)において、(第1ラウンドおよび第2ラウンドの両方に対して) 94 で20秒間、58で30秒間、68で90秒間の30サイクルであった。

#### 【0387】

短い断片PCRは、797 bp断片を増幅するプライマーVP1-1およびVP1-4a(第1ラウンド)を使用したセミネスト化PCRから構成され、続いて、481 bp長の断片を増幅するプライマーVP1-1およびVP1-2a、または490長の断片を増幅するプライマーVP1-1.5およびVP1-4aを用いて、2つのセミネスト化シタッセイが続く(Zheng)(表20)。PCR反応混合物は、2.5 μLの10×PCR緩衝液、200 μMのそれぞれのdNTP、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 μMプライマー、および1.25ユニットのAmpliTaq Gold DNA Polymerase(Applied Biosystems)から構成された。第1ラウンドにおいては、4 μLの抽出したDNAを、総容量の25 μLに添加し、サイクルパラメータは、自動化温度サイクリング(Applied Biosystems)において、94で20秒間、55で30秒間、68で90秒間の20サイクルであった。この第1ステップのPCR産物は、ExoSAP-IT PCR Clean-upキットで精製し、プロトコルは、単一のピペットステップ(酵素混合付加物)、37での30分間のインキュベーション、続いて、80でさらに15分間、酵素不活性化から構成される。セミネスト化PCRの第2ラウンドにおいては、4 μLの清浄したPCR産物を、総容量の25 μLに添加し、サイクルパラメータは、自動化温度サイクリング(Applied Biosystems)において、94で20秒間、62で30秒間、68で90秒間の40サイクルであった。

#### 【0388】

両方のアッセイを用いて、インナープライマーを用いて増幅した後、10 μLの第2の混合物からの増幅産物を、0.5 μg/mL 袖化エチジウムを含有する2%アガロースゲル上で電気泳動させた。その結果を、紫外線照明下で写真に撮り、期待されたbp長のDNA断片に対応する帯が存在する場合、陽性と見なされた。

## 【表20】

表20. JC V-VPに対する、完全長のネスト化PCRに使用されたプライマーのヌクレオチド配列および短い断片のセミネスト化PCR

## 【0358】

名称	配列	N t. 番号*	
VP1-LF	GCAGCCAGCTATGGCTTTAC	(配列番号55)	10
VP1-LR	GCTGCCATTCAATGAGAGGAT	(配列番号56)	
VP1-SF	CCTCAATGGATGTTGCCCTT	(配列番号57)	
VP1-SR	AAAACCAAAGACCCCT	(配列番号58)	
VP1-1 9)	TTGACTCAATTACAGAGGTAGAAT	(配列番号5	20
VP1-4a	AGAAATTGGTAGGGTTTTAAC	(配列番号60)	
VP1-2a	AGGTACGCCATTGTCCTGTGTTTC	(配列番号61)	
VP1-1.5 2)	GTGCAGGGCACCAAGCTTCAATT	(配列番号6	

\*M ad-1株 (ref) による

30

## 【0389】

## VP1 PCRクローニングおよび配列決定

増幅産物をQiagen精製キットによって精製した。Aのものを、Taqポリメラーゼ(A-オーバーハング反応)によって除去したcleaned up PCR産物の末端に添加し、クローニングは、TOPOTAKローニングキット(Invitrogen)で行なった。クローン化したVP1 PCR産物を含有するコロニーからのMiniprep DNA(Qiagen)を調製した。2~48のクローンを、それぞれの試料(中央値23)に対して配列決定した。VP1配列の翻訳後、アミノ酸変異は、PMLおよび非PMLの症例からのVP1配列の大規模な選択と比較することによって特徴付けられた。試料に対して1を超えるクローンを示す変異のみを考慮した。

40

## 【0390】

## JC V-DNAの定量化に対するリアルタイムPCR

JCV-DNAは、前述されるように、リアルタイムPCRによって、CSF、血漿、および尿試料において定量化した(Bossolasco Set al. 2005)。

。

## 【0391】

## 血球凝集アッセイ

O型+ドナーからの赤血球(RBC)を2回洗浄し、約0.5%の最終濃度で、Alsievier液(20mM クエン酸ナトリウム、72mM NaCl、100mM グルコース、酢酸でpH 6.5に調整)中で懸濁した。100μg/mLのVLPから開始する

50

連続2倍希釈液を Alsever 液中に調製し、等量の RBC を 96 ウェル「U」底マイクロタイタプレートのそれぞれのウェルに添加し、4 度で 3 ~ 6 時間インキュベートした（24回の2倍希釈を行なった）。最低 HA 濃度は、RBC をさらに凝集した VLP タンパク質の最低濃度である。

#### 【0392】

##### ガングリオシド E L I S A

特定のガングリオシド（メタノール中で再懸濁）を、一晩マイクロタイタープレート（10 μg）に被覆させた。このプレートを遮断した（1% BSA [Fraction V]、0.1% Tween-20、Ca++、Mg++ を有する PBS）。VLP を、遮断緩衝液中の 30 μg / mL で調製し、添加した（100 μL / ウェル）。全てのインキュベーションを氷上で行なった。90 分後、このプレートを遮断緩衝液で洗浄した。VLP 結合は、抗 VP1（2 μg / mL で PAB597）および HRP - 抗 - mIgG（1 : 100）の結合を含む 2 つのステッププロセスで検出した。プレートは洗浄し、TMB Turbo E L I S A 溶液で展開した。反応を、酸で停止させ、プレートを 450 nm で、分光光度計上で読み取った。

10

#### 【0393】

##### 細胞に結合する VLP のフローサイトメトリー分析

細胞を付着させ、収集した（SVGA、Jurkat、ヒト星状膠細胞、ヒト腎臓近位尿細管上皮）。まず、試料（1 ~ 5 × 105 細胞）を、氷上で 60 ~ 90 分間 50 μL の容量で、FACS 緩衝液（1% BSA [Fraction V]、2 mM アジ化ナトリウム、Ca++、Mg++ を有する PBS）中の VLP（10 ~ 30 μg / mL）でインキュベートした。細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、60 分間抗 - VP1（PAB597 2 μg / mL）でさらにインキュベートし、続いて、洗浄し、Alexa Fluor 488 - 抗 - mIgG（1 : 100）でさらに 30 ~ 45 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、Cytotifix / Cytoperm で 20 分間固定し、続いて、最終洗浄し、FACS 緩衝液中で再懸濁した。細胞を BD FACSCalibur 上で分析した。必要に応じて、適切な対照および他の抗体（イソタイプ対照、GM1、アシアロ GM1、GD1a、GT1b）およびレクチン（Peanut Agglutinin (PNA)、Sambucus Nigra Lectin (SNA)、Maackia Amurensis Lectin II (Mal II)）を用いた染色。場合によっては、細胞を 2 - 3 ノイラミニダーゼ、2 - 3, 6 ノイラミニダーゼ、または PNGase F で事前に処理し、それらの細胞表面糖構造を変化させた。

20

30

30

#### 【0394】

前述の本明細書は、当業者が本発明を実施できるようにするために十分であると見なされる。実施例は、本発明の一態様の単なる説明として意図されており、その他の機能的に同等の実施形態も本発明の範囲内であるため、本発明は、提供された実施例によってその範囲が限定されるものではない。本明細書において示され説明されたものに加えて、本発明の様々な改変が、当業者であれば前述の説明から十分明らかとなり、それらは添付の請求項の範囲内に含まれる。本発明の利点および目的が、必ずしも本発明の各実施態様に包含されるわけではない。

40

#### 【0395】

本明細書を通して引用される全ての参考文献、特許、および公開特許出願の内容は、参照することにより、その全体が本明細書に組み込まれる。

〔 図 1 〕

	10	20	30	40	50	60	70	80
JCV VP1	MAPTIEKKEG KOPDVKPPLL IKGVEYVTEK KGVSQTSCEP CLFPLPFNGD PHELFNFSR SISIDSPES DSNPMLPC							
SV40 COAI	-----PEPKER----- EPQVQVLLP KIGEYVTEK KGVSQTSCEP CLFPLPFNGD PHELFNFSR SISIDSPES DSNPMLPC							
	90	100	110	120	130	140	150	160
JCV VP1	YSVANIPILPH INDLSCCGC LHMNPWAEV EYCTTMLV VHSQNGAED NGAKVQPCV SFHFTSGE ALEJGQYVHN							
SV40 COAI	YSVANIPILPH INDLSCCGC LHMNPWAEV EYCTTMLV VHSQNGAED NGAKVQPCV SFHFTSGE ALEJGQYVHN							
	170	180	190	200	210	220	230	240
JCV VP1	YTKRPTOPI FPPRATVQQD PDRHETRRLK DOKKAPTCWZ WPCPDTCMTR YTFPCLLACG ENPVPVHLIY NTATVFLDE							
SV40 COAI	YTKRPTOPI FPPRATVQQD QMNTWHRK DOKKAPTCWZ WPCPDTCMTR YTFPCLLACG ENPVPVHLIY NTATVFLDE							
	250	260	270	280	290	300	310	320
JCV VP1	FUGVGLKGD GLALVSDVCG GMHNTGSSQG OMGRSLPRTY VQLEKRSVKN PIPSFILSTO LINKEITRVQ GQPMHQAG							
SV40 COAI	FGVGLKGD GLALVSDVCG GMHNTGSSQG OMGRSLPRTY VQLEKRSVKN PIPSFILSTO LINKEITRVQ GQPMHQAG							
	330	340	350					
JCV VP1	IKEVWPSG RDPGDPDMV RYVQEVKA TML							
SV40 COAI	VERVIEVSDG RDPGDPDMV RYVQEVKA TML							

Fig. 1

【 図 2 】

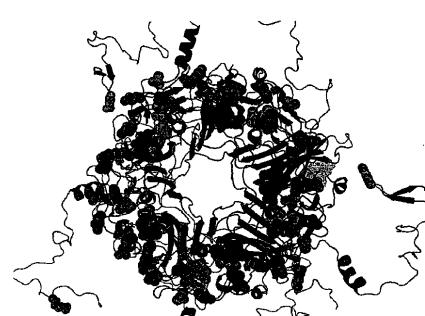


Fig. 2

〔 义 4 B 〕

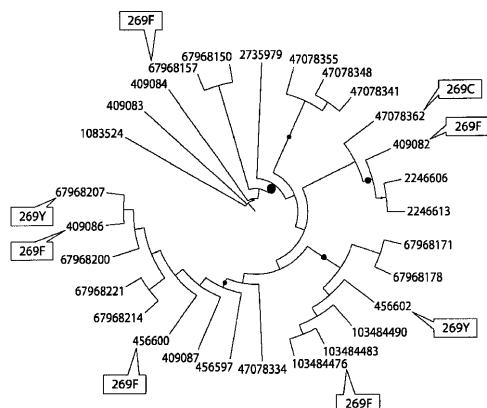


Fig. 4B

( 5 A )

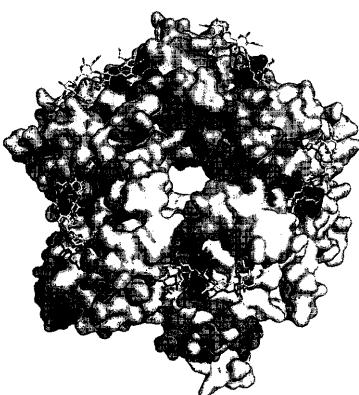


Fig. 5A

〔 図 5 B 〕



Fig. 5B

〔図20A〕

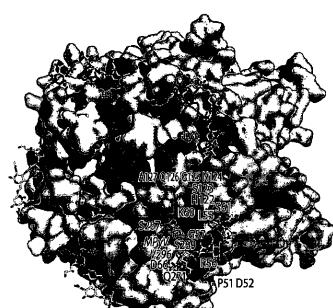


Fig. 20A

【図20B】

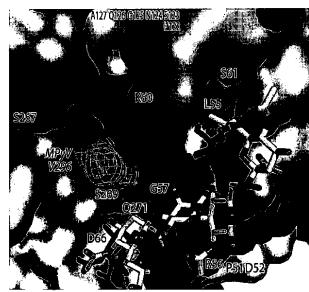


Fig. 20B

## 【図3-1】

## 【図3-1】

PML 対象の脳試料からの VP1:

```
>AAB60584 gi|1161319|gb|AAB60584.1| VP1
NVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQRGLSRYFKVQLRKRRVKN
PYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDRYGQLQTKML
```

(配列番号 3)

```
>AAB60586 gi|1161322|gb|AAB60586.1| VP1
NVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQRGLSRYFKVQLRKRRVKN
PYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDRYGQLQTKML
```

(配列番号 4)

```
>AAB62687 gi|2246615|gb|AAB62687.1| VP1 [JC ウィルス]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHFRGFSKSISISDTFE
SDSPNPKDMILPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQAHNDNGAGKPVQ
GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
NENTRYFGTGTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQRGLS
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
```

(配列番号 5)

```
>AAB94036 gi|2735983|gb|AAB94036.1| VP1 [JC ウィルス]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHFRGFSKSISISDTFE
SDSPNPKDMILPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
NENTRYFGTGTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
```

(配列番号 6)

```
>BAA01965 gi|425206|dbj|BAA01965.1| VP1 [JC ポリオーマウィルス]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHFRGFSKSISISDTFE
SDSPNPKDMILPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFFSVGGEALELQGVLFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
NENTRYFGTGTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
```

(配列番号 7)

```
>BAA01966 gi|425207|dbj|BAA01966.1| VP1 [JC ポリオーマウィルス]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHFRGFSKSISISHTFE
SDSPNPKDMILPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTSLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFFSVGGEALELQGVLFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
NENTRYFGTGTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
```

(配列番号 8)

```
>BAA01967 gi|425208|dbj|BAA01967.1| VP1 [JC ポリオーマウィルス]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHFRGFSKSISISDTFE
SDSPNPKDMILPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTSLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFFSVGGEALELQGVLFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
NENTRYFGTGTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
```

(配列番号 9)

【図3-2】

【図3-2】

>BAA01968 gi|425209|dbj|BAA01968.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVD SITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVVFNYRTKYPDGTFIPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYL SAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRDGQPMYGM DAQVEEVRVSEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQT KML  
(配列番号 10)

>BAA01969 gi|425210|dbj|BAA01969.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVD SITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVVFNYRTKYPDGTFIPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYL SAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRDGQPMYGM DAQVEEVRVSEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQT KML  
(配列番号 11)

>BAA01970 gi|425211|dbj|BAA01970.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVD SITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVVFNYRTKYPDGTFIPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYL SAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRDGQPMYGM DAQVEEVRVSEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQT KML  
(配列番号 12)

>BAA05636 qi|538231|dbj|BAA05636.1| VP1 (カプシドタンパク質)[JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVD SITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVVFNYRTKYPDGTFIPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYL SAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRDGQPMYGM DAQVEEVRVSEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQT KML  
(配列番号 13)

>BAA05637 qi|538234|dbj|BAA05637.1| VP1 (カプシドタンパク質)[JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVD SITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVVFNYRTKYPDGTFIPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYL SAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRDGQPMYGM DAQVEEVRVSEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQT KML  
(配列番号 14)

>BAA05638 qi|538238|dbj|BAA05638.1| VP1 (カプシドタンパク質)[JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVD SITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVVFNYRTKYPDGTFIPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYL SAVDVCGMFTNRSGYQQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRDGQPMYGM DAQVEEVRVSEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQT KML  
(配列番号 15)

【図3-3】

【図3-3】

&gt;BAB11728 gi|9796436|dbj|BAB11728.1| VP1 カプシドタンパク質[JC ポリオーマウイルス]

MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
 SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPQ  
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGТИFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR  
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS  
 RYFKVQLRKRKRNPKNPYPISSLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
 YGQLQTKML

(配列番号 16)

&gt;BAB11734 gi|9796443|dbj|BAB11734.1| VP1 カプシドタンパク質[JC ポリオーマウイルス]

MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
 SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPQ  
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGТИFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR  
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGYQQWRGLS  
 RYFKVQLRKRKRNPKNPYPISSLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
 YGQLQTKML

(配列番号 17)

&gt;BAE00111 gi|67968154|dbj|BAE00111.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]

MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
 SDPSKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQAAHDNGAGKPQ  
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGТИFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR  
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQWRGLS  
 RYFKVQLRKRKRNPKNPYPISSLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDK  
 YGQLQTKML

(配列番号 18)

&gt;BAE00117 gi|67968161|dbj|BAE00117.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]

MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
 SDPSKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQAAHDNGAGKPQ  
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGТИFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR  
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS  
 RYFKVQLRKRKRNPKNPYPISSLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDK  
 YGQLQTKML

(配列番号 19)

&gt;BAE00123 gi|67968168|dbj|BAE00123.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]

MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
 SDPSKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQAAHDNGAGKPQ  
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGТИFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR  
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLS  
 RYFKVQLRKRKRNPKNPYPISSLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDK  
 YGQLQTKML

(配列番号 20)

&gt;BAE00127 gi|67968173|dbj|BAE00127.1| VP2 [JC ポリオーマウイルス]

MGAALALLGDLVATVSEAAAATGFSVAEIAAGEAAATIEVEIASLATVEGITSTSEAI<sub>A</sub>IGLTPETYA  
 VITGAPGAVAGFAALVQTGGS<sub>A</sub>IAOLGYRFFADWDHKVSTVGLFQQPAMALQLFNPEDYYDILFPGV  
 NAFVNNIHYLDPRHWGPSLFSTISQAFWNLVRDDLPSLTSQEIQRR<sub>T</sub>QKL<sub>F</sub>VESLARFLEETTWAI<sub>V</sub>NS  
 PVNLYNYISDYYSLSPVRPSMVRQVAQREGTYISFGHSYTQS<sub>I</sub>DDADSIQEV<sub>T</sub>QRLDLKTPNVQSGEF  
 IEKSIAPGGANQRSAPOWMLPLLGLYGT<sub>V</sub>PALEAYEDGPNNKKRKEGPRASSKTSYKRRSRSSRS

(配列番号 21)

【図3-4】

【図3-4】

>BAE00129 gi|67968175|dbj|BAE00129.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDELTGNIILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVFNYRTKYPDGTFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTAKML  
(配列番号 22)

>BAE00135 gi|67968182|dbj|BAE00135.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLTPEMGPDEHLRGFSKLISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDELTGNIILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVFNYRTKYPDGTFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLDAVDVCGMFTNRSGSQQRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTAKML  
(配列番号 23)

>BAE00141 gi|67968189|dbj|BAE00141.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDELTGNIILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVFNYRTKYPDGTFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLDAVDVCGMFTNRSGSQQRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTAKML  
(配列番号 24)

>BAE00147 gi|67968204|dbj|BAE00147.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDELTGNIILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVFNYRTKYPDGTFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLDAVDVCGMFTNRSGSQQRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTAKML  
(配列番号 25)

>BAE00153 gi|67968211|dbj|BAE00153.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDELTGNIILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVFNYRTKYPDGTFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLDAVDVCGMFTNRSGSQQRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTAKML  
(配列番号 26)

>BAE00159 gi|67968218|dbj|BAE00159.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLTPEMGPDEHLRGFSMSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDELTGNIILMWEAVTLKTEVIGVTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGEALELQGVFNYRTKYPDGTFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLDAVDVCGMFTNRSGSQQRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQVEEVRFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTAKML  
(配列番号 27)

## 【図3-5】

【図3-5】

>BAE00165 gi|67968225|dbj|BAE00165.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTKRKGERKDPQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVD SITEVECFLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHCNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFSSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYL SAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS  
RYFKVQLRKR RVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGM DAQVEEVRFEGTEELPGPDMMRYVDR  
YGQLQT KML  
(配列番号 28)

>BAE00171 gi|67968232|dbj|BAE00171.1| VP1 [JC ポリオーマウイルス]  
MAPTKRKGERKDPQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVD SITEVECFLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHCNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFSSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYL SAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS  
RYFKVQLRKR RVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGM DAQVEEVRFEGTEELPGPDMMRYVDR  
YGQLQT KML  
(配列番号 29)

>BAE02837 gi|68445619|dbj|BAE02837.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHVFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR  
(配列番号 30)

>BAE02838 gi|68445621|dbj|BAE02838.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISHTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHVFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR  
(配列番号 31)

>BAE02839 gi|68445623|dbj|BAE02839.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISNTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHVFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR  
(配列番号 32)

>BAE02840 gi|68445625|dbj|BAE02840.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
FLTPEMGPDEHLRGFSSESISISHTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHVFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR  
(配列番号 33)

>BAE02841 gi|68445627|dbj|BAE02841.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
VLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHVFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
DNLYLSAVDVCGMFTNRFGSQWRGLSRYFKVQLRKRR  
(配列番号 34)

【図 3 - 6】

【図3-6】

>BAE02842 gi|68445629|dbj|BAE02842.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGDPDEHLRGFSMSISISDTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQHWRLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 35)

>BAE02843 gi|68445631|dbj|BAE02843.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISISHTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQHWRLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 36)

>BAE02844 gi|68445633|dbj|BAE02844.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQHWRLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 37)

>BAE02845 gi|68445635|dbj|BAE02845.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQHWRLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 38)

>BAE02846 gi|68445637|dbj|BAE02846.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQHWRLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 39)

>BAE02847 gi|68445639|dbj|BAE02847.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQHWRLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 40)

PML 対象の非脳試料からの VP1:

>AAB62680 gi|2246607|gb|AAB62680.1| VP1 [JC ウィルス]  
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTGVDSITEVECFLTPEMGDPDEHLRGFSKSISISDTFE  
 SDSPNKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQAHNGAGKPVQ  
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQHWRLS  
 RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQVEEVRFEGTEELPGDPDMRMRYVDR  
 YGQLQTAKML  
 (配列番号 41)

【図3-7】

【図3-7】

>AAT09819 gi|47078338|gb|AAT09819.1| VP1 [JC ウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHRLGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ  
GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSDLVCGMFTTRSGSQQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQIEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTCKML  
(配列番号 42)

>AAT09825 gi|47078345|gb|AAT09825.1| VP1 [JC ウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHRLGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAAKPVQ  
GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTTYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSDLVCGMFTNRSGSQQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQIEEVRVFEGTEQLPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTCKML  
(配列番号 43)

>AAT09831 gi|47078352|gb|AAT09831.1| VP1 [JC ウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHFRGFSKSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAAKPVQ  
GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTTYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSDLVCGMFTNRSGSQQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQIEEVRVFEGTEQLPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTCKML  
(配列番号 44)

>AAT09837 gi|47078359|gb|AAT09837.1| VP1 [JC ウイルス]  
MAPTRKGERKDPVQVPKLLIRGGVELEVKTGVDSITEVECFLPEMGPDEHRLGFSNSISISDTFE  
SDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAAKPVQ  
GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTTYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR  
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKGDNLYLSDLVCGMFTNRSGSQQWRGLS  
RYFKVQLRKRRVKNPYPISFLTDLINRRTPRVDGQPMYGMADAQIEEVRVFEGTEQLPGDPDMMRYVDR  
YGQLQTCKML  
(配列番号 45)

>BAE02848 gi|68445641|dbj|BAE02848.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
FLPEMGPDEHRLGFSKSISISDTFESDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
VLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKG  
DNLYLSAVDVCGMFTDRSGSQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
(配列番号 46)

>BAE02849 gi|68445643|dbj|BAE02849.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
FLPEMGPDEHFRGFSKSISISDTFESDSPNKDMGPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVLCKG  
DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
(配列番号 47)

【図3-8】

【図3-8】

>BAE02850 gi|68445645|dbj|BAE02850.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNPKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTDRSGSQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 48)

>BAE02851 gi|68445647|dbj|BAE02851.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNPKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VLGVTTLMNVHCNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 49)

>BAE02852 gi|68445649|dbj|BAE02852.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNPKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 50)

>BAE02853 gi|68445651|dbj|BAE02853.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNPKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VLGVTTLMNVHCNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 51)

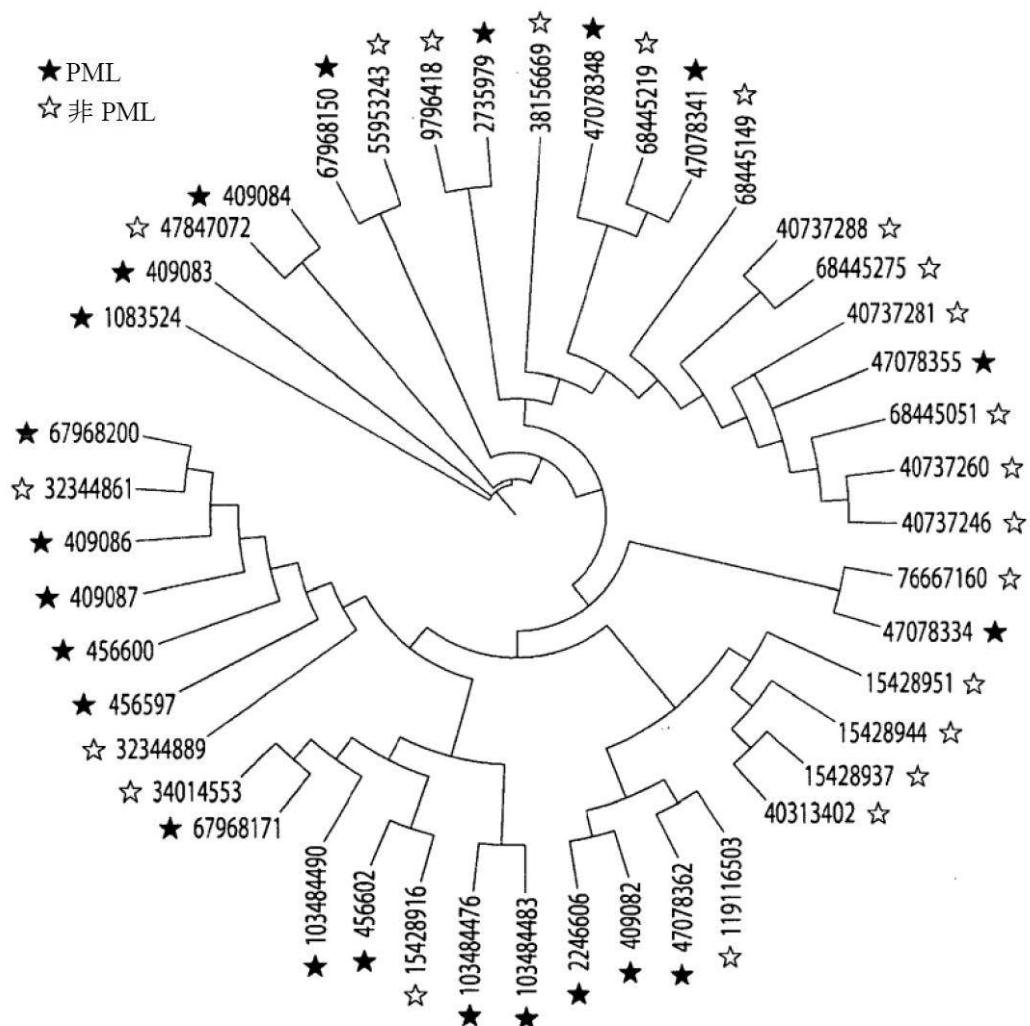
>BAE02854 gi|68445653|dbj|BAE02854.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGPDEHFRGFSKSISISDTFESDSPNPKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 52)

>BAE02855 gi|68445655|dbj|BAE02855.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNPKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 53)

>BAE02856 gi|68445657|dbj|BAE02856.1| VP1 タンパク質[JC ポリオーマウイルス]  
 FLTPEMGPDEHLRGFSKSISISDTFESDSPNPKDM LPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE  
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ  
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG  
 DNLYLSAVDVCGMFTDRSGSQQWRGLSRYFKVQLRKRR  
 (配列番号 54)

【図4A】

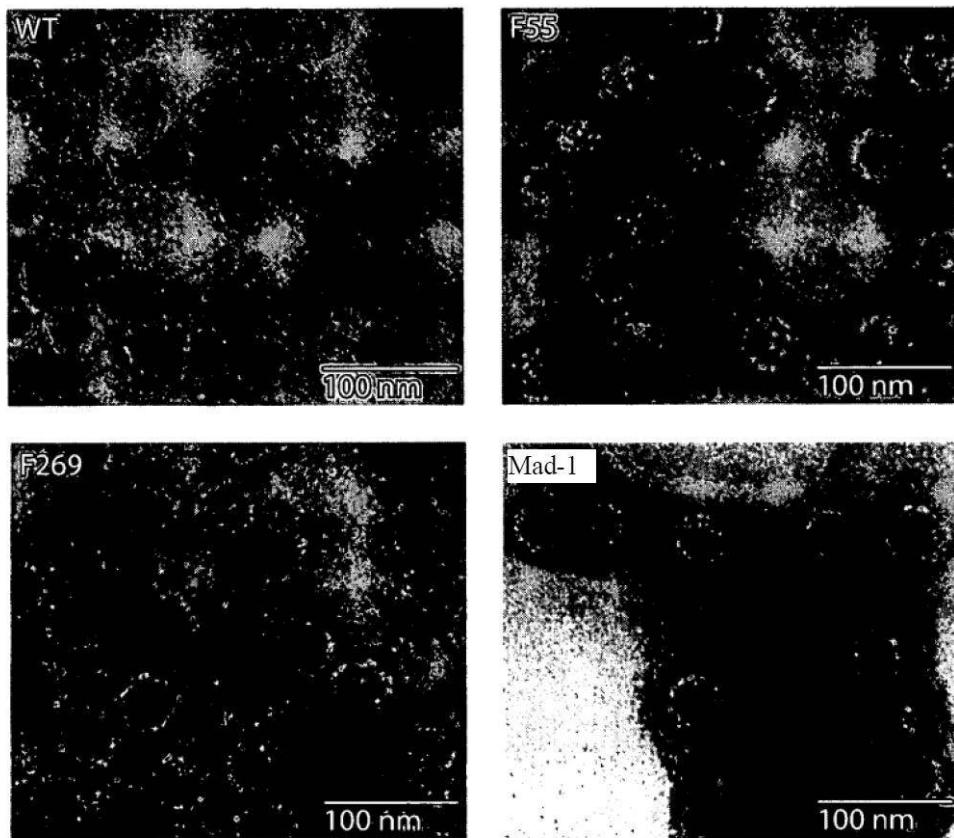
【図4A】



【図6】

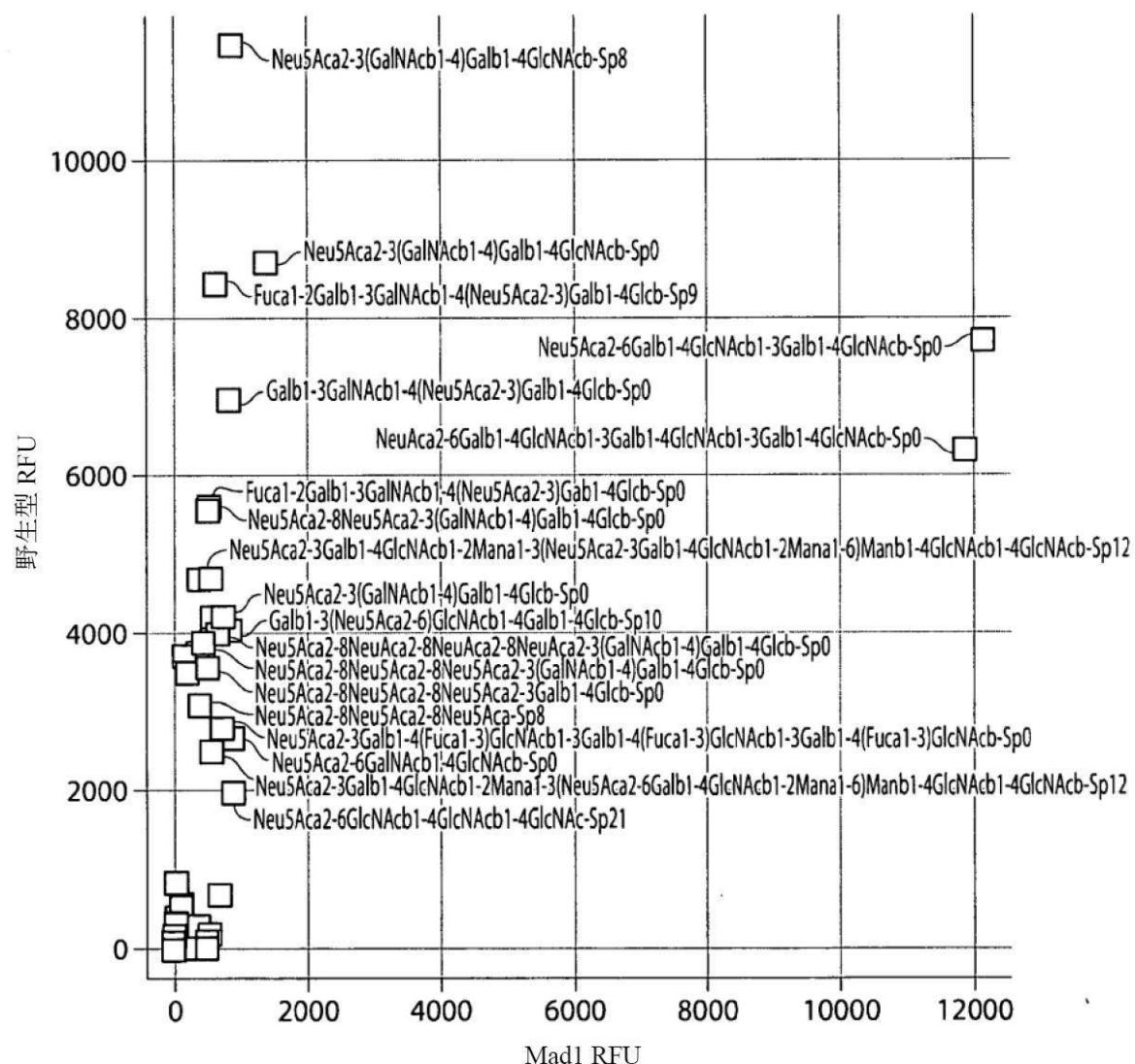
【図6】

血球凝集アッセイにおいて使用されるウイルス様粒子(VLP)の  
電子顕微鏡写真



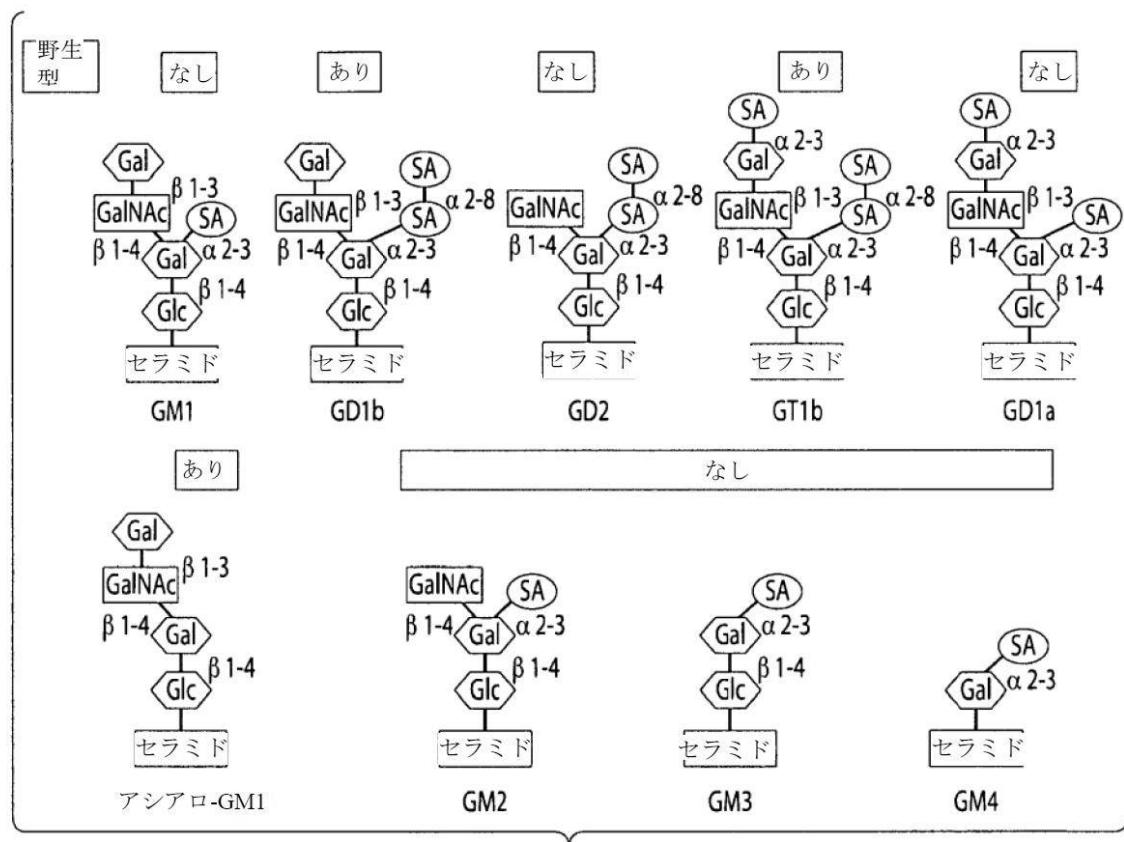
【図7】

【図7】



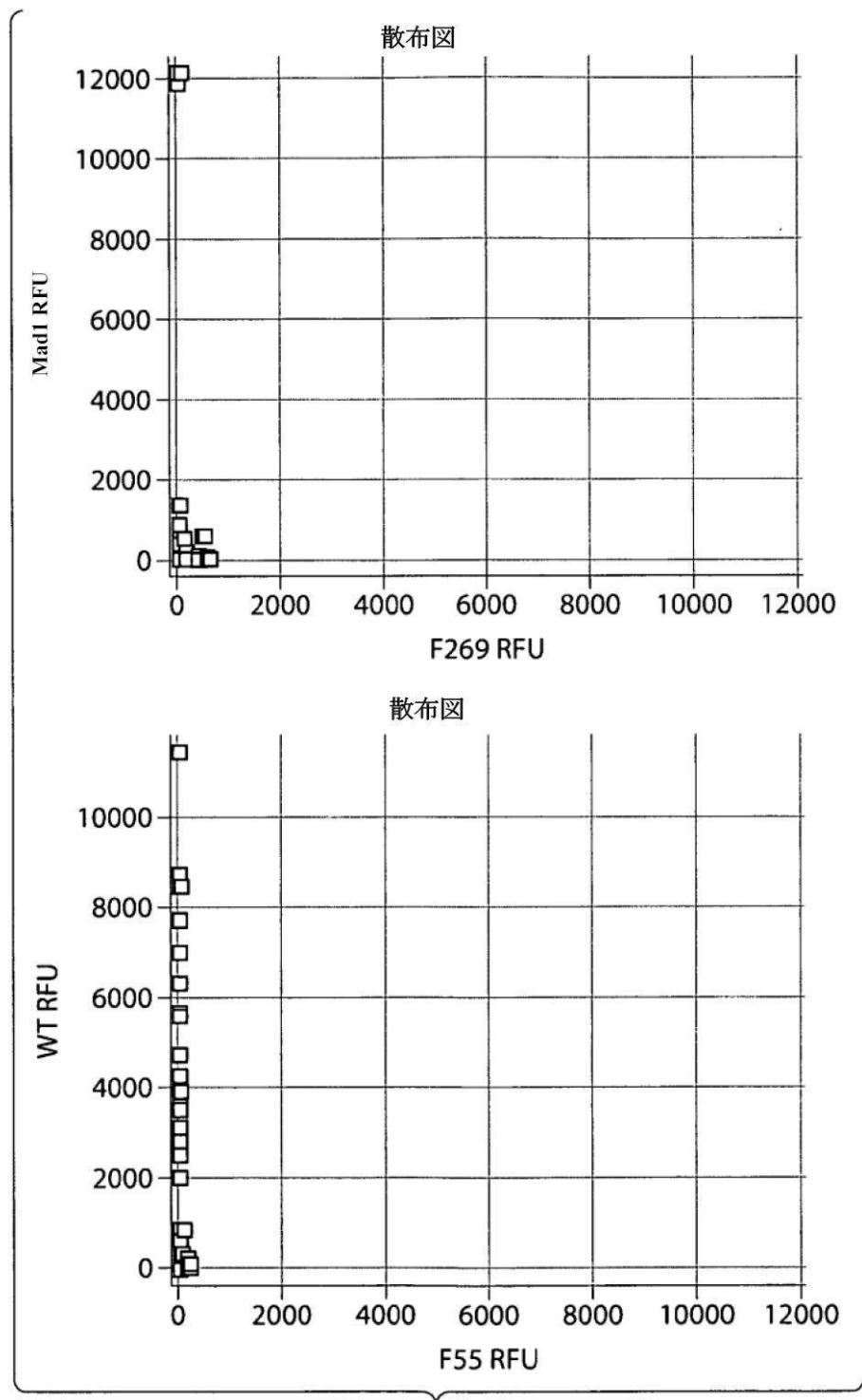
【図8】

【図8】



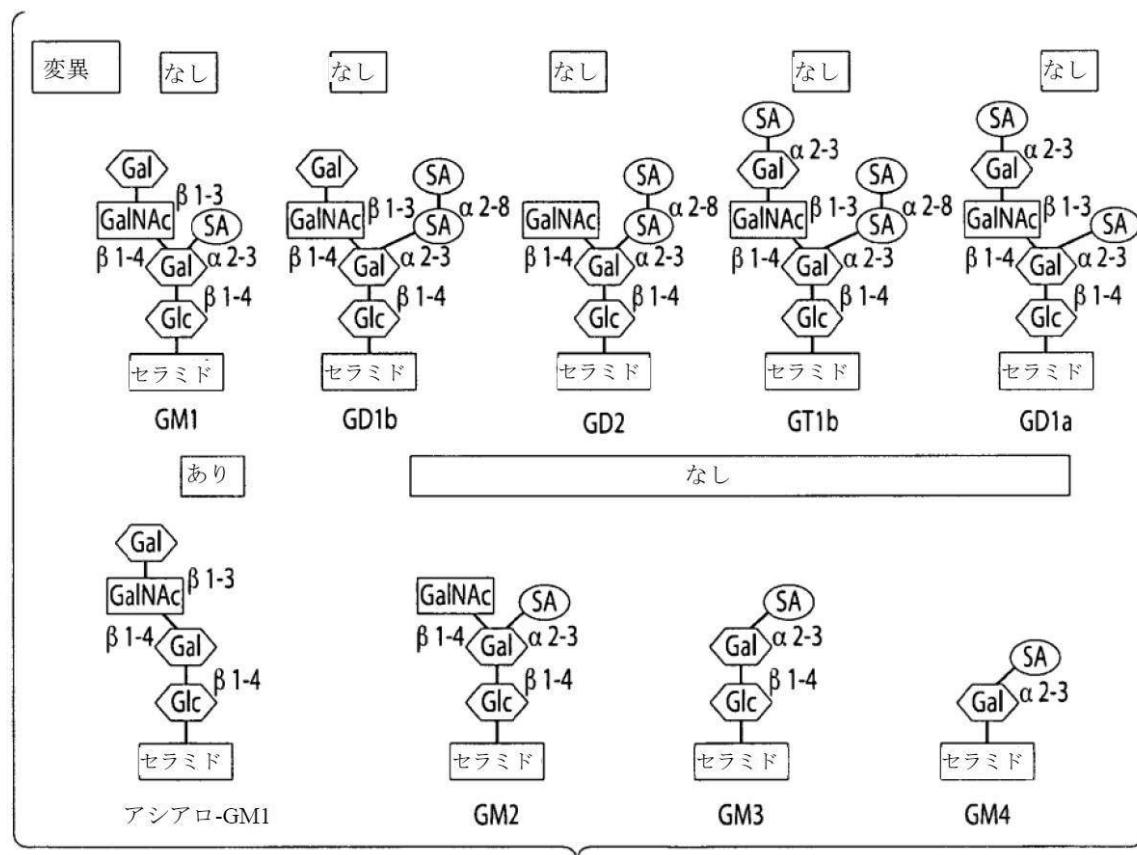
【図9】

【図9】



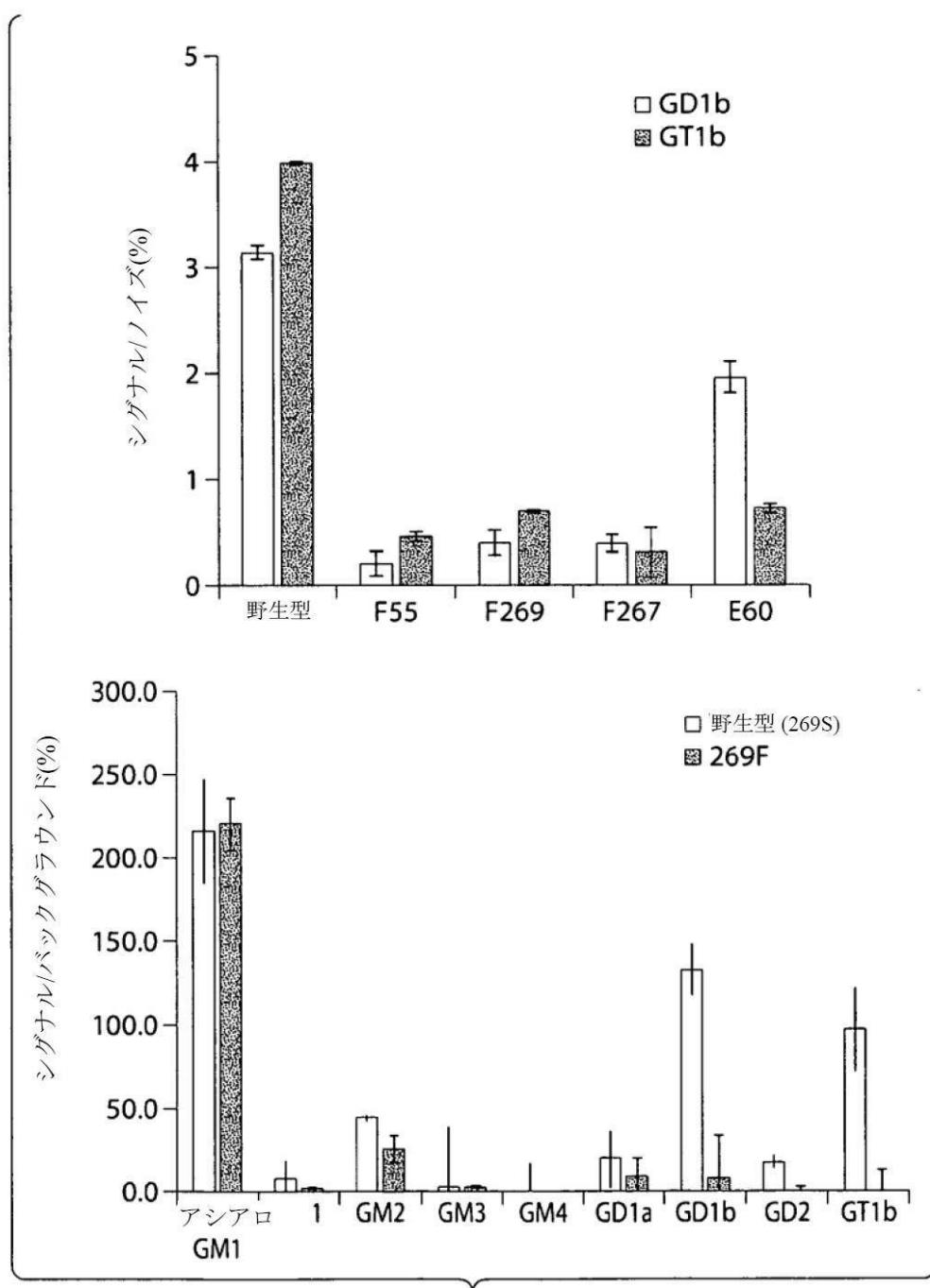
【図10】

【図10】



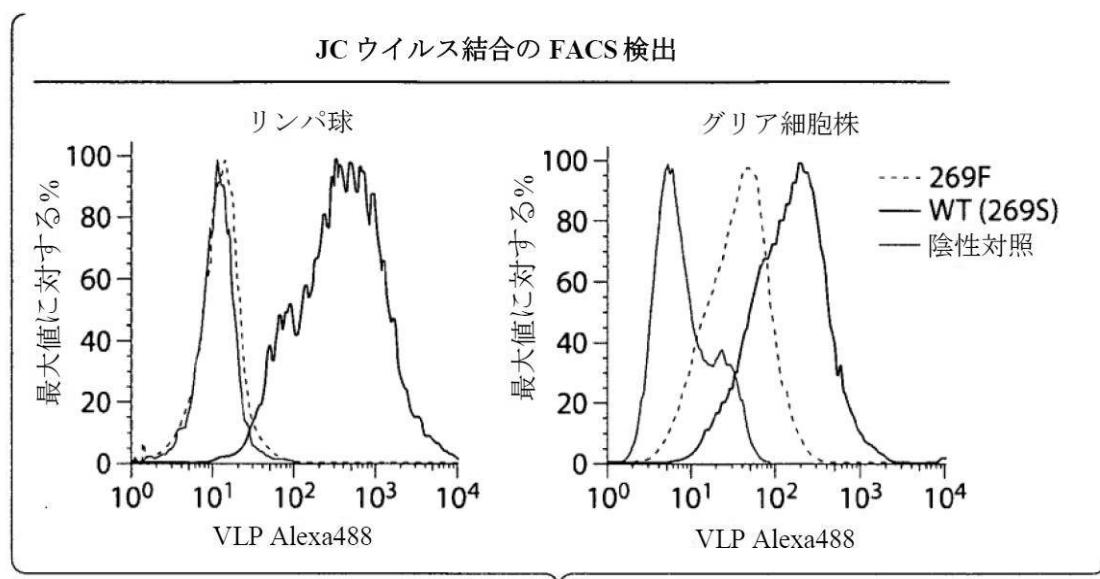
【図 11】

【図11】



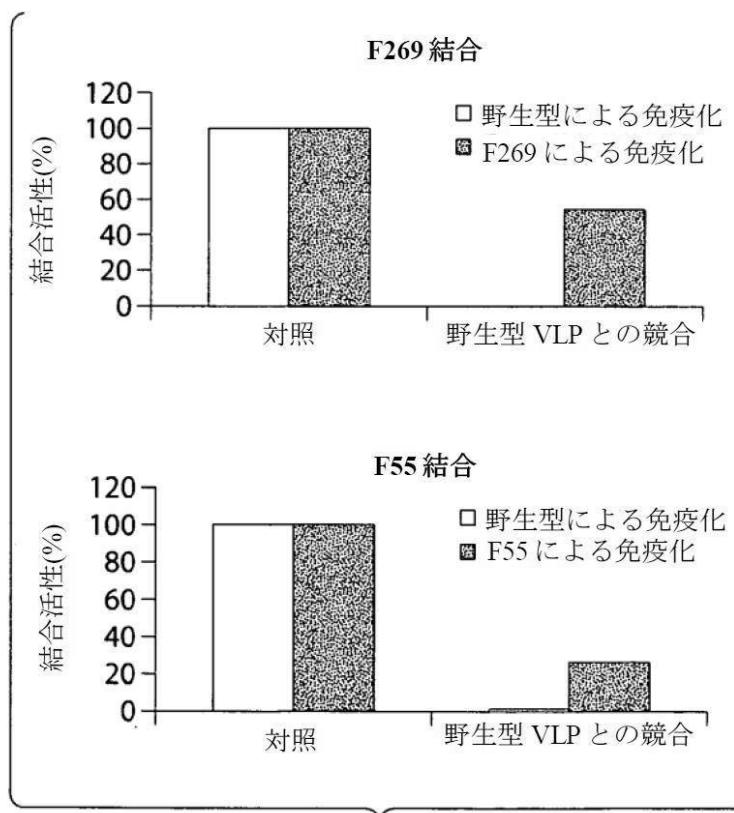
【図 1 2】

【図 1 2】



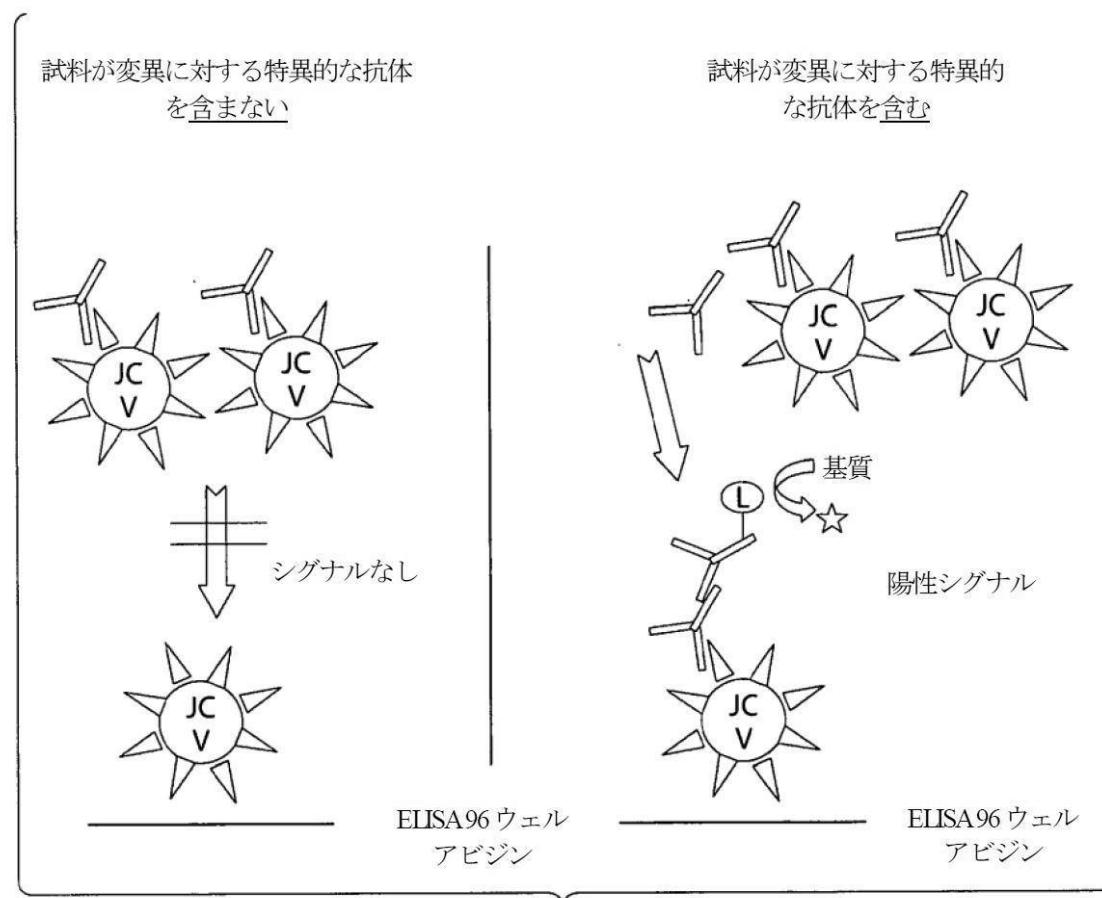
【図 1 3】

【図 1 3】



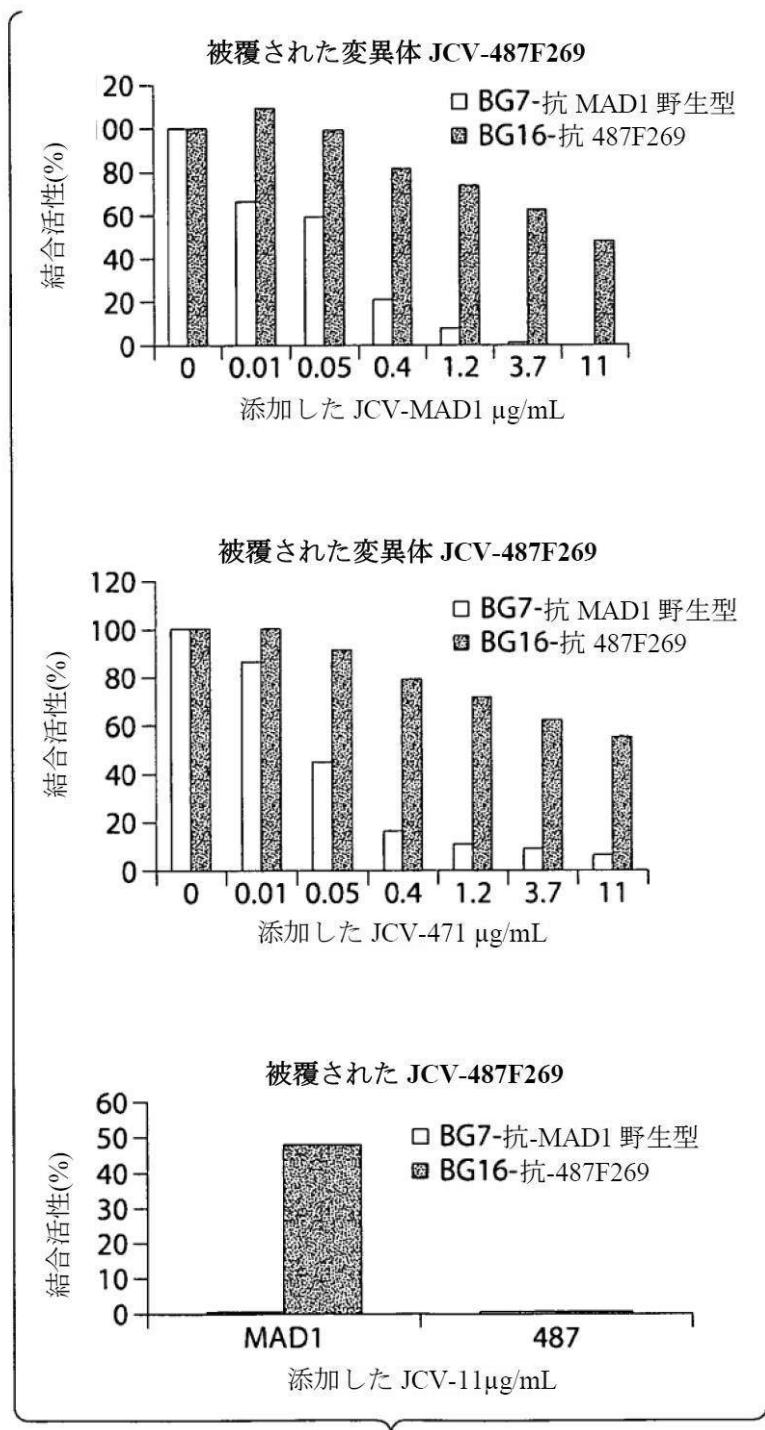
【図14】

【図14】



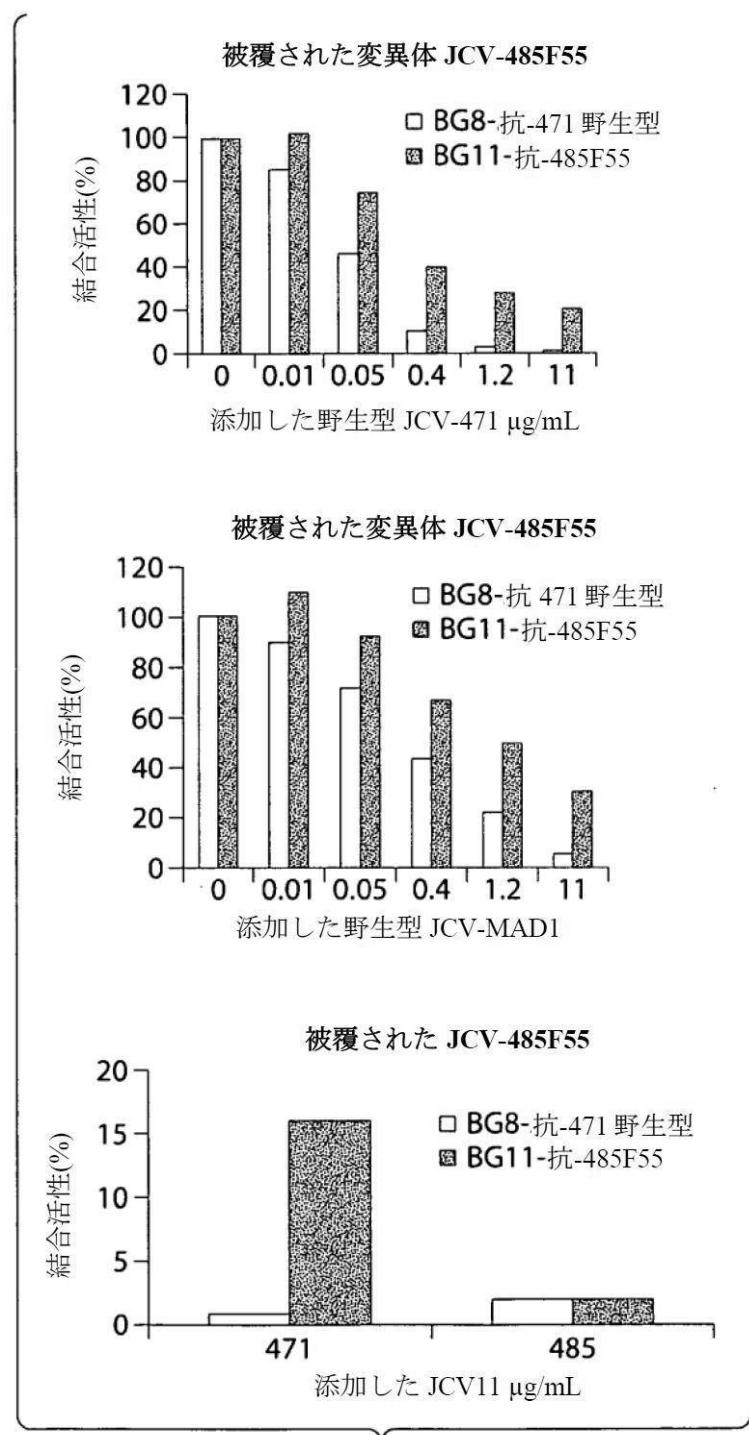
【図15】

【図15】



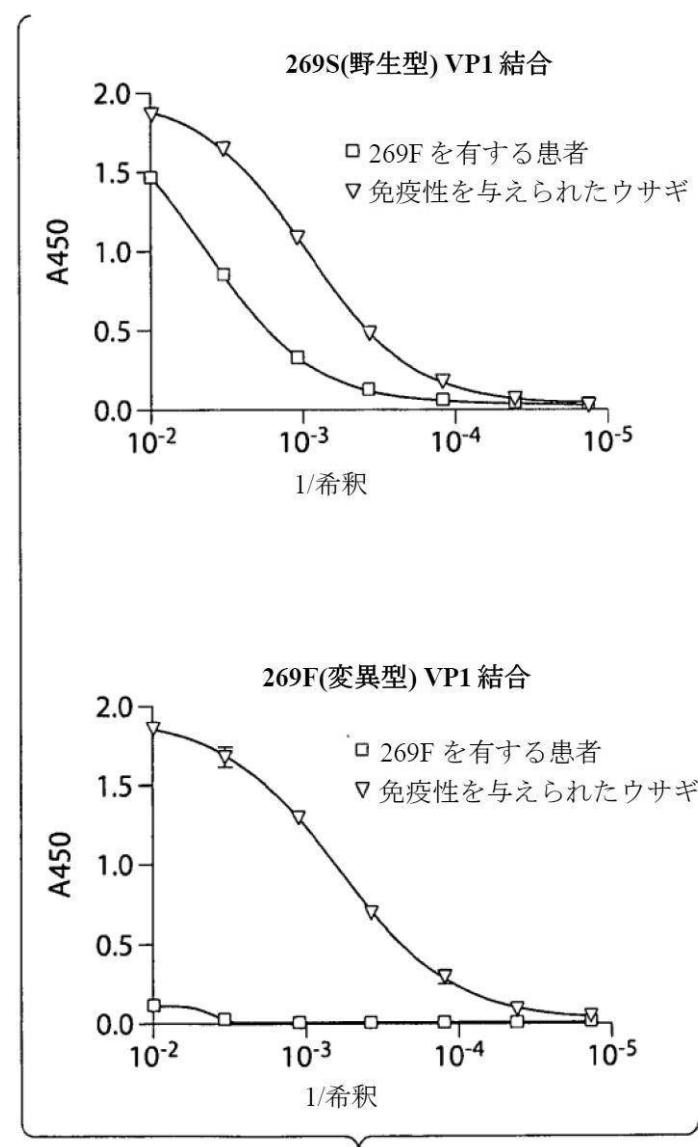
【図 16】

【図16】



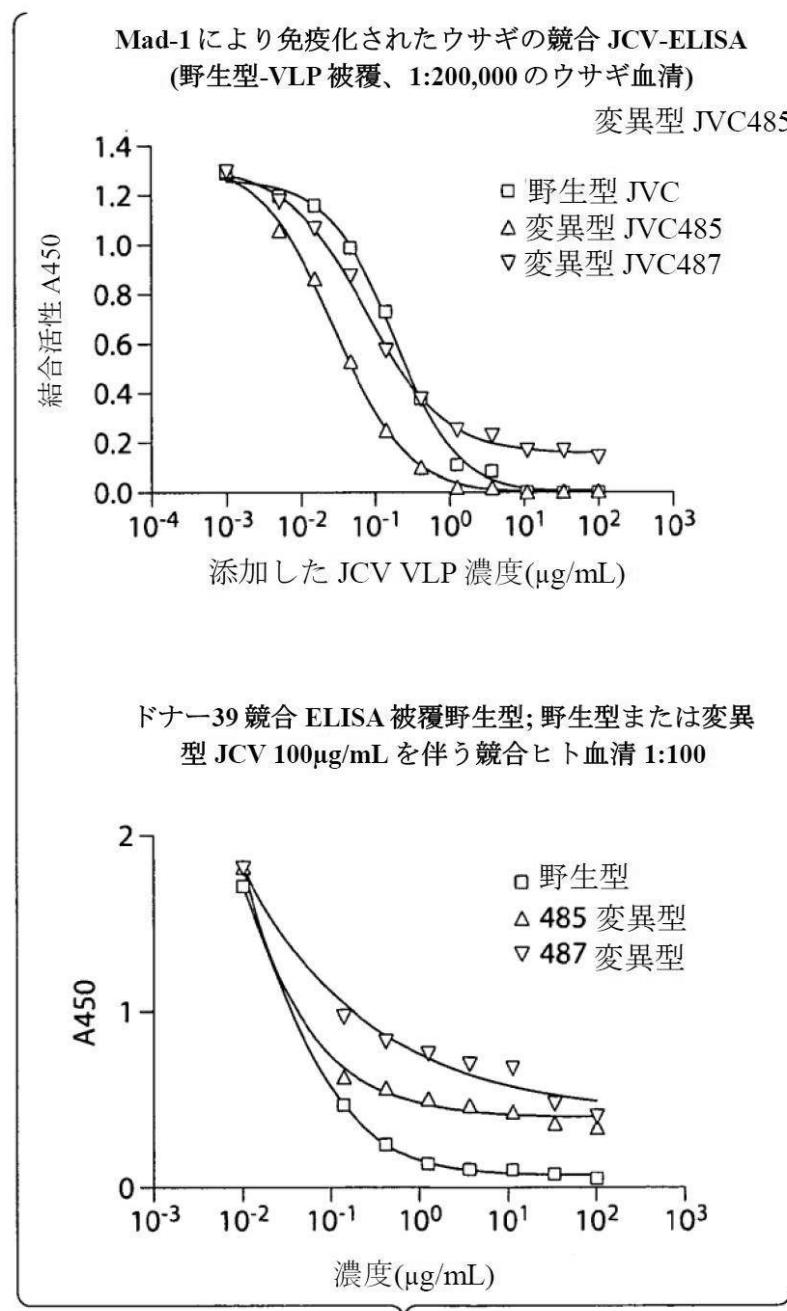
【図17】

【図17】



【図 18】

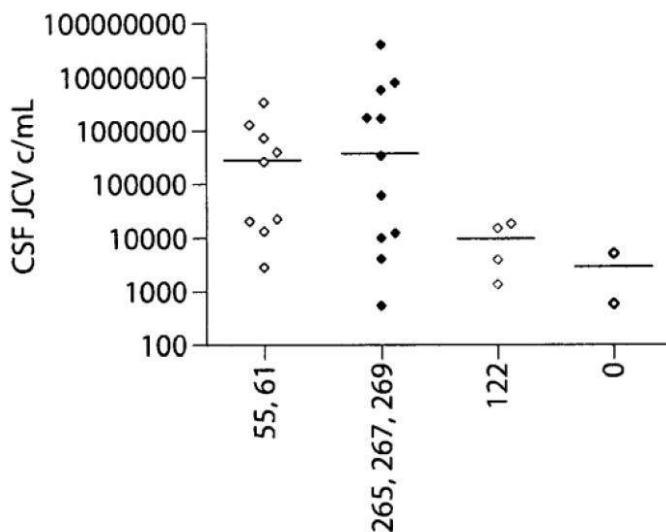
【図18】



【図19】

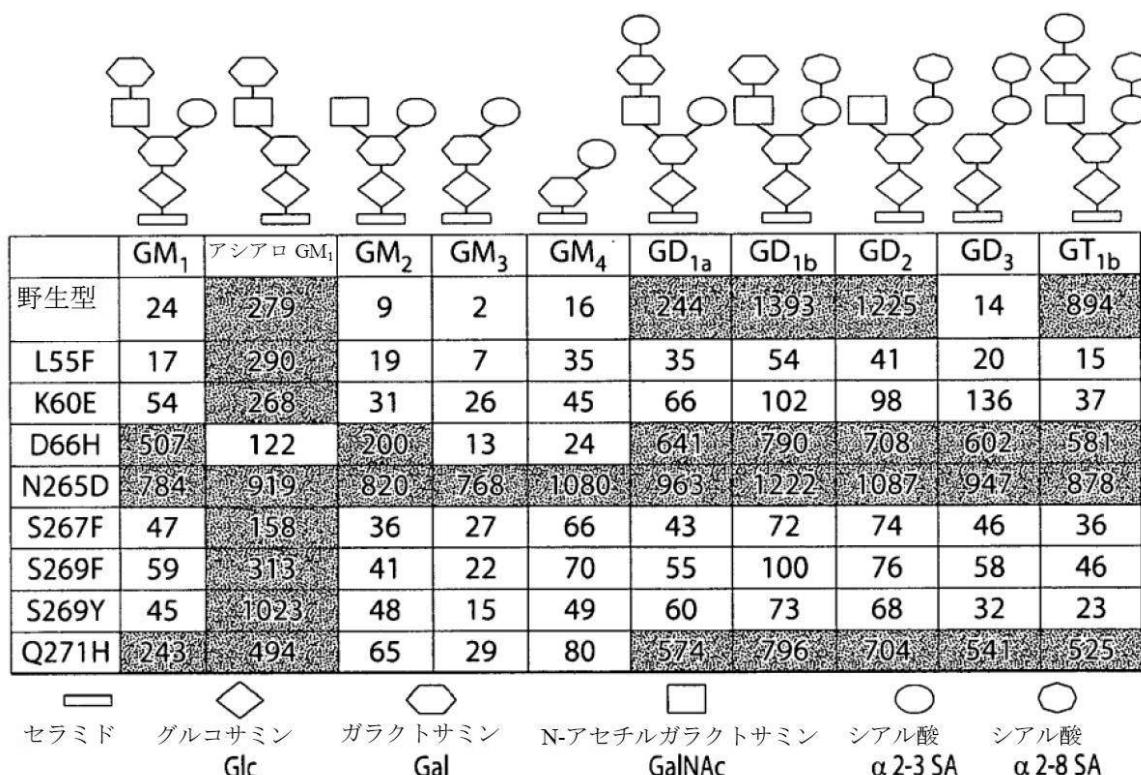
【図19】

## 変異型による CSF JCV DNA



【図21】

【図21】



【配列表】

2012517017000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 10/00342
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 33/48, 33/53 (2010.01) USPC - 436/501, 63, 94 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 436/501, 63, 94		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 436/501, 63, 86, 94 (text search)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (UPST, PGPB, JPAB, EPAB); Google Scholar Search terms: JC polyomavirus or JC virus (JCV), VP1 capsid protein, VP1 loop mutation at amino acid 122, 2,66, VP1 deletions at amino acids 50-51, 54-55, 123-125, detection, diagnostic, progressive multifocal leukoencephalopathy (PMV), Immunocompromised		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STONER et al. "Capsid Protein VP1 Deletions in JC Virus from 2 AIDS Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy". J. Neurovirol.; June 1995; Vol. 1, No 2; Pages 189-194. Especially abstract, pg 191 fig 3, pg 191 right col para 1.	1-5
A	ZHENG et al. "New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy." J. Gen. Virol.; July 2005; Vol. 86, Pt 7; Pages 2035-2045. Especially abstract, pg 2042 table 5.	1-5
A	US 2008/0131028 A1 (HANDA et al). 5 June 2008 (05.06.2008). Especially claim 6.	1-5
A	AGOSTINI et al. "JC Virus (JCV) Genotypes in Brain Tissue from Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML) and in Urine from Controls without PML: Increased Frequency of JCV Type 2 in PML". IN: J. Infect. Dis.; July 1997; Vol. 176; pg. 1-8. Abstract, Fig. 2	1-5
A,P	SUNYAEV et al. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). [online] [retrieved 30 March 2010] PLoS Genet February 2009 (ePub 6 February 2009) Vol 5 No 2 Pages e1000368. Available on the Internet: <URL: http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1000368>.	1-5
L	GenBank accession number ABH10590; [online]; downloaded from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/111559200 on 4 April 2010. Cited to indicate the requirement for Applicants to modify Claim 1 to better specify the invention.	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  4 April 2010 (04.04.2010)	Date of mailing of the international search report  11 MAY 2010	
Name and mailing address of the ISA/US  Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		<b>International application No.</b> PCT/US 10/00342
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 6-22 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3.	<input type="checkbox"/> 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.	<input type="checkbox"/> 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.:	
<b>Remark on Protest</b>		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No. PCT/US 10/00342
--

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L	GenBank Accession number BAA22741. [online]; downloaded from <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2522144">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2522144</a> on 4 April, 2010. Cited to indicate the requirement for Applicants to modify Claim 1 to better specify the invention.	1
L	GenBank Accession number ABP33189. [online]; downloaded from <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/145046518">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/145046518</a> on 5 April, 2010. Cited to indicate the requirement for Applicants to modify Claim 1 to better specify the invention.	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2009)

---

フロントページの続き

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

(72)発明者 ゴレリク， レオニド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02171, クインシー, パーカー アベニュー 21  
6

(72)発明者 ルゴフスコイ， アレクセイ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01801, ウォバーン, センター ストリート 24  
F ターム(参考) 4H045 BA10 CA01 EA53