

(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2014-502848

(P2014-502848A)

(43) 公表日 平成26年2月6日 (2014. 2. 6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569 L	4 B O 6 5
G O 1 N 33/577 (2006.01)	G O 1 N 33/577 B	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 80 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-547936 (P2013-547936)
 (86) (22) 出願日 平成24年1月6日 (2012. 1. 6)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年9月4日 (2013. 9. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/000293
 (87) 国際公開番号 W02012/093340
 (87) 国際公開日 平成24年7月12日 (2012. 7. 12)
 (31) 優先権主張番号 61/430, 822
 (32) 優先日 平成23年1月7日 (2011. 1. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

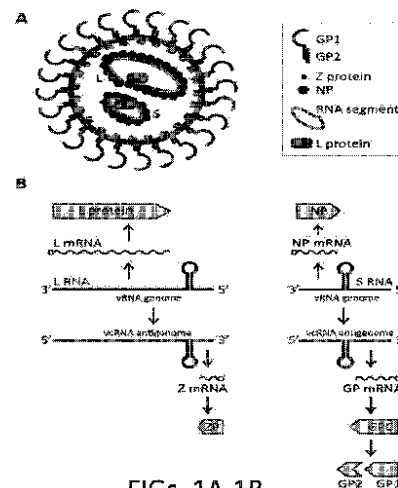
(71) 出願人 513171404
 バイオサイエンス・スロバキア
 BIOSCIENCE SLOVAKIA
 スロバキア、840 05 プラチスラバ
 、ピィ・オウ・ボックス・135、ドゥブ
 ラブスカ・チェスタ、9
 (74) 代理人 110001195
 特許業務法人深見特許事務所
 (72) 発明者 トマスコバ、ヤナ
 スロバキア、840 05 プラチスラバ
 、ピィ・オウ・ボックス・135、ドゥブ
 ラブスカ・チェスタ、9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス診断

(57) 【要約】

本開示は被験者がリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) に感染しているか否かを判断する方法を提供する。当該方法は、LCMV感染の罹患性が高い被験者からサンプルを得る工程、サンプルをLCMVを検出するための1つ以上の組成物と接触させる工程、およびLCMVを検出するための1つ以上の組成物がサンプルからのLCMVのマーカに関連付けられるか否かを判断する工程を含み、関連付けられることの検出は被験者がLCMVに感染していることを示す。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者におけるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）感染状態または活性を評価する方法であって、

評価する被験者を選択する工程を含み、前記被験者はLCMVに晒されたおよび／または増加したLCMV活性のリスクがあり、さらに

前記被験者からサンプルを得る工程、

LCMVを検出するための少なくとも1つの組成物でサンプルを接触させる工程、および

前記LCMVを検出するための少なくとも1つの組成物がサンプルからLCMVのマーカに関連付けられるか否かを判断する工程を備え、関連付けられることの検出は前記被験者がLCMVに感染しているおよび／または活性LCMVを有することを示す、方法。

10

【請求項 2】

前記判断は、前記被験者に対しておよび／または被験者に関連する医療実務者に対して、前記被験者がLCMVに感染しているおよび／または活性LCMVを有することを報告する工程を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記判断は、LCMVに感染しているおよび／または活性LCMVを有する被験者の、LCMVのレベルおよび／または活性を検出する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記被験者に対しておよび／または被験者に関連する医療実務者に対して、検出したLCMVのレベルおよび／または活性を報告する工程をさらに含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

増加したLCMV活性のリスクを有する被験者は、低酸素状態に伴う症状のリスクがある、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記被験者は妊娠している、免疫不全である、移植レシピエントである、癌を発症するリスクがある、または癌を患っている、請求項5に記載の方法。

30

【請求項 7】

LCMVを検出するための組成物は、1つ以上のLCMV核酸に特異的に結合する少なくとも1つのプライマーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも1つのプライマーは、10個以上の核酸を含み、前記10個以上の核酸は、SEQ ID NO: 1 - 51のいずれか1つのターゲット領域に対して、少なくとも80%以上の同一性を有し、前記プライマーはターゲット領域に特異的に結合する、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記プライマーは、SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, およびSEQ ID NO:73からなる群から選択される、請求項7または8のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 10】

前記プライマーは、LCMV NPをエンコードする核酸に結合する、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記プライマーは、SEQ ID NO: 58 および 59 に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 66 および 67 に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含む、請求項10に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

前記プライマーは、LCMV GPをエンコードする核酸に結合する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記プライマーは、SEQ ID NO : 60 および 61 に対して 80 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列、または SEQ ID NO : 68 および 69 に対して 80 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記プライマーは、LCMV ZPをエンコードする核酸に結合する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記プライマーは、SEQ ID NO : 62 および 63 に対して 80 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列、または SEQ ID NO : 72 および 73 に対して 80 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列を含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記プライマーは、LCMV Lをエンコードする核酸に結合する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記プライマーは、SEQ ID NO : 70 および 71 に対して 80 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列を含む、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記プライマーは、LCMV NP、LCMV GP、LCMV ZP および LCMV L のうちの 2 つ以上をエンコードする核酸に結合する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 LCMV を検出するための組成物は、少なくとも 1 つの分離された LCMV タンパク質またはその断片を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 LCMV を検出するための組成物は、少なくとも 1 つの分離されたモノクローナル抗体または抗体断片を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記抗体または断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M J 3、LMBP 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出された抗体を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記抗体または断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、LMBP 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出された抗体を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記抗体または断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M J 3、LMBP 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出された抗体と、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、LMBP 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出された抗体とを含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗体または断片は、1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の CDR 3 (SEQ ID NO : 78) を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記抗体または断片は、1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の CDR 2 (SEQ ID NO : 77) を含む、請求項 2 4 に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 26】

前記抗体または断片は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M87 の重鎖可変領域の CDR1 (SEQ ID NO: 76) を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記抗体または断片は、モノクローナル抗体 M87 の重鎖可変領域の CDR3 (SEQ ID NO: 78) を含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗体または断片は、モノクローナル抗体 M87 の重鎖可変領域の CDR2 (SEQ ID NO: 77) を含む、請求項 27 に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記抗体または断片は、モノクローナル抗体 M87 の重鎖可変領域の CDR1 (SEQ ID NO: 76) を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記抗体または断片は、SEQ ID NO: 74 と同一性を有する抗原結合ペプチドを含み、

SEQ ID NO: 74 内の相補性決定領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を含み、

SEQ ID NO: 74 内のフレームワーク領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、SEQ ID NO: 74 の対応する領域に対して、80%以上の同一性を有し、前記抗原結合ペプチドは LCMV NP に結合する、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 31】

前記抗原結合ペプチドは、抗体または抗体断片である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

サンプルにおけるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 感染状態または活性を評価するための診断キットであって、前記キットは

1つ以上の LCMV 核酸に特異的に結合する少なくとも1つのプライマーと、

少なくとも1つの LCMV タンパク質またはその断片と、

少なくとも1つの分離された LCMV 結合抗体または抗体断片と、または

そのいずれかの組合せを含む、キット。

30

【請求項 33】

前記キットは、1つ以上の LCMV 核酸に特異的に結合する少なくとも1つのプライマーを含む、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 34】

前記プライマーは、10個以上の核酸を有する少なくとも1つの核酸プライマーを含み、前記10個以上の核酸は、1つ以上の SEQ ID NO: 1-51 内の1つ以上のターゲット領域に対して、少なくとも80%以上の同一性を有し、前記プライマーは1つ以上のターゲット領域に特異的に結合する、請求項 33 に記載のキット。

40

【請求項 35】

前記プライマーは、SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, および SEQ ID NO: 73 からなる群から選択される、請求項 33 に記載のキット。

【請求項 36】

前記プライマーは、LCMV NP をエンコードする核酸に結合する、請求項 33 に記載のキット。

【請求項 37】

前記プライマーは、LCMV GP をエンコードする核酸に結合する、請求項 33 に記載のキット。

50

【請求項 38】

前記プライマーは、LCMV ZPをエンコードする核酸に結合する、請求項33に記載のキット。

【請求項 39】

前記プライマーは、LCMV Lをエンコードする核酸に結合する、請求項33に記載のキット。

【請求項 40】

前記プライマーは、LCMV NP、LCMV GP、LCMV ZPおよびLCMV Lのうちの2つ以上をエンコードする核酸に結合する、請求項33に記載のキット。

【請求項 41】

前記キットは、少なくとも1つの分離されたLCMV結合抗体または抗体断片を含む、請求項32に記載のキット。

10

【請求項 42】

前記抗体または断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM J 3、LMBP受領番号9217CBによって産出されたモノクローナル抗体を含む、請求項41に記載のキット。

【請求項 43】

前記抗体または断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM 166、LMBP受領番号9216CBによって産出されたモノクローナル抗体を含む、請求項41に記載のキット。

20

【請求項 44】

前記抗体または断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM J 3、LMBP受領番号9217CBによって産出されたモノクローナル抗体と、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM 166、LMBP受領番号9216CBによって産出されたモノクローナル抗体とを含む、請求項41に記載のキット。

【請求項 45】

前記抗体または断片は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体M87の重鎖可変領域のCDR3 (SEQ ID NO: 78)を含む、請求項41に記載のキット。

30

【請求項 46】

前記抗体または断片は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体M87の重鎖可変領域のCDR2 (SEQ ID NO: 77)を含む、請求項45に記載のキット。

【請求項 47】

前記抗体または断片は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体M87の重鎖可変領域のCDR1 (SEQ ID NO: 76)を含む、請求項46に記載のキット。

40

【請求項 48】

前記抗体または断片は、モノクローナル抗体M87の重鎖可変領域のCDR3 (SEQ ID NO: 78)を含む、請求項41に記載のキット。

【請求項 49】

前記抗体または断片は、モノクローナル抗体M87の重鎖可変領域のCDR2 (SEQ ID NO: 77)を含む、請求項48に記載のキット。

【請求項 50】

前記抗体または断片は、モノクローナル抗体M87の重鎖可変領域のCDR1 (SEQ ID NO: 76)を含む、請求項49に記載のキット。

【請求項 51】

50

前記抗体または断片は、SEQ ID NO: 74 と同一性を有する抗原結合ペプチドを含み、

SEQ ID NO: 74 内の相補性決定領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含み、

SEQ ID NO: 74 内のフレームワーク領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、SEQ ID NO: 74 の対応する領域に対して、80%以上の同一性を有し、前記抗原結合ペプチドはLCMV NPに結合する、請求項41に記載のキット。

【請求項52】

前記抗原結合ペプチドは抗体または抗体断片である、請求項51に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は2011年1月7日に出願された米国特許仮出願第61/430,822号の優先権を主張し、その全体の内容は、引用により全体がここに援用される。

【0002】

技術分野

本開示は、被験者におけるウイルスを検出するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

20

背景

特定のウイルスを確実に検出および診断するための組成物および方法は限定されている。さらに、急性のウイルス感染および慢性のウイルス感染を区別するための技術も限定されており、信頼性が低い。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

概要

本開示は、被験者におけるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)を検出するための、および/または急性LCMV感染と慢性LCMV感染とを区別するための、組成物および方法を提供する。したがって、本開示は、たとえばLCMVを特定し、LCMV感染を治療するための個別の治療を開発する(たとえば、LCMV抗ウイルス性治療のための被験者を選択し、かつ必要ならLCMV抗ウイルス治療を変える)、LCMVの蔓延を減少させ、宿主間LCMV伝達を減らし、LCMV疾病の発生および病因を減らし、およびLCMV病理状態を評価するために、用いることができる。

30

【0005】

したがって、一局面において、本開示は被験者がリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に感染したか否かを判断するための方法を提供する。当該方法は、LCMV感染の罹患性が高い被験者を選択すること、被験者からサンプルを得ること、サンプルをLCMVを検出するための1つ以上の組成物と接触させること、LCMVを検出するための1つ以上の組成物がサンプルからのLCMVのマーカと関連付けられるかどうかを判断することを含み、関連付けられることの検出は被験者がLCMVに感染していることを示す。

40

【0006】

別の局面において、本開示は被験者がリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)に感染したか否かを判断するための方法を提供する。当該方法は、LCMVに感染している被験者を選択すること、被験者からサンプルを得ること、サンプルをLCMVを検出するための1つ以上の組成物と接触させること、LCMVを検出するための1つ以上の組成物がサンプルからのLCMVのマーカと関連付けられるかどうかを判断することを含み、関連付けられることの検出は被験者がLCMVに感染していることを示す。

【0007】

50

別の局面において、本開示は被験者がリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）に感染したか否かを判断するための方法を提供する。当該方法は、被験者からサンプルを得ること、サンプルを、1つ以上のLCMV核酸もしくは1つ以上のLCMV核酸の一部に特異的に結合する1つ以上のプローブまたはプライマー、1つ以上のLCMVタンパク質またはその断片、および1つ以上のLCMVペプチドまたはLCMVペプチド断片を検出するための1つ以上の組成物（たとえば、1つ以上の抗体または抗体の断片）からなる群から選択された少なくとも2つの組成物と接触させること、ならびに2つ以上の組成物がサンプルからのLCMVのマーカに関連付けられるか否かを判断することを含み、関連付けられることの検出は被験者がLCMVに感染していることを示す。

【0008】

10

さらに他の局面において、本開示は被験者がリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）に感染したか否かを判断するための方法を提供する。当該方法は、低酸素状態を経験しているまたはリスクがある被験者を選択すること、被験者からサンプルを得ること、サンプルをLCMVを検出するための1つ以上の組成物と接触させること、およびLCMVを検出するための1つ以上の組成物がサンプルからLCMVのマーカに関連付けられるか否かを判断することを含み、関連付けられることの検出は被験者がLCMVに感染していることを示す。

【0009】

一部の実施の形態において、被験者は、たとえば、妊娠している、免疫不全である、移植レシピエントである、癌を発症するリスクがある、もしくは癌を患っている、またはそのいずれかの組合せを有し得る。一部の実施の形態において、被験者は低酸素状態を経験している、または低酸素状態の危険性があり得る。

20

【0010】

他の実施の形態において、LCMVを検出するための1つ以上の組成物は、1つ以上のLCMV核酸もしくは1つ以上のLCMV核酸の一部に特異的に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーであり得る。

【0011】

さらに他の実施の形態において、LCMVを検出するための1つ以上の組成物は、1つ以上のLCMVタンパク質またはその断片であり得る。

【0012】

30

さらに他の実施の形態において、LCMVを検出するための1つ以上の組成物は、1つ以上のLCMVペプチドまたはLCMVペプチドの断片を検出するための1つ以上の組成物（たとえば1つ以上の抗体または抗体の断片）であり得る。

【0013】

一局面において、本開示は、1つ以上のLCMV核酸もしくは1つ以上のLCMV核酸の一部に特異的に結合する1つ以上のプローブまたはプライマー、1つ以上のLCMVタンパク質またはその断片、および1つ以上のLCMVペプチドまたはLCMVペプチド断片を検出するための1つ以上の組成物（たとえば、1つ以上の抗体または抗体の断片）からなる群から選択された2つ以上の組成物を含む組成物を提供する。

【0014】

40

別の局面において、本開示は診断キットを提供し、当該キットは、少なくとも1つの分離されたLCMVポリペプチドまたはその断片、たとえばNP、GP、GPC、GPLもしくはZP抗原、またはその断片を含む。代替的に、または付加的に、当該キットはNP、GP、GPC、GPLもしくはZP抗原に結合する少なくとも1つの分離された抗体または抗体断片、またはその抗原結合断片を含むことができる。代替的に、または付加的に、当該キットは1つ以上のLCMV核酸またはその一部に特異的に結合する少なくとも1つのプローブまたはプライマー、たとえばNP、GP、GPC、GPLもしくはZP抗原をエンコードする核酸を含むことができる。場合によっては、当該キットはそのいずれかの組み合わせを含むことができる。

【0015】

50

さらに別の局面において、本開示は複数の分離されたポリペプチドを提供し、その複数のものは少なくとも2、たとえば3、4、または5種類のポリペプチドを含み、ポリペプチドは、分離されたNP抗原またはその断片、分離されたGP抗原またはその断片、分離されたGPC抗原またはその断片、分離されたGPL抗原またはその断片、および分離されたZP抗原またはその断片からなる群から選択される。場合によっては、本開示はこのような複数のポリペプチドを含む診断キットを提供する。

【0016】

さらに他の局面において、本開示は複数の分離された抗体、たとえばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を提供し、その複数のものは少なくとも2、たとえば3、4、または5種類のポリペプチドに特異的に結合する抗体を含むかまたは該抗体からなり、ポリペプチドは、分離されたNP抗原またはその断片、分離されたGP抗原またはその断片、分離されたGPC抗原またはその断片、分離されたGPL抗原またはその断片、および分離されたZP抗原またはその断片からなる群から選択される。場合によっては、本開示はこのような複数の分離された抗体を含む診断キットを提供する。

10

【0017】

さらに他の局面において、本開示は複数の分離された核酸プローブまたはプライマーを提供し、その複数のものは少なくとも2、たとえば3、4、または5種類のポリペプチドであって、NP抗原またはその断片、GP抗原またはその断片、GPC抗原またはその断片、GPL抗原またはその断片、およびZP抗原またはその断片からなる群から選択される少なくとも2つのポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブもしくはプライマーを含むかまたは該プローブもしくはプライマーからなる。場合によっては、本開示はこのような複数のプローブまたはプライマーを含む診断キットを提供する。

20

【0018】

一部の実施例において、ここに記載されている診断キットは、被験者のLCMVまたはその症状を治療するための薬、たとえば抗ウイルス薬を含むことができる。

【0019】

さらに他の局面において、本開示はLCMV感染の被験者を治療する方法を提供する。当該方法は、LCMVを罹っているまたはLCMV感染のリスクがある被験者から生体サンプルを得ること、上記の診断キット、上記の複数のポリペプチド、上記の複数の抗体、または上記の複数のプローブもしくはプライマー、またはそのいずれかの組合せを用いて、サンプルをスクリーニングして、被験者がLCMVに感染しているか否かを判断すること、ならびに患者がLCMVに感染しているのなら、LCMVまたはその症状を治療する薬、たとえば抗ウイルス薬を、被験者に投与することを含む。場合によっては、LCMV感染しているまたはそのリスクがある被験者は、低酸素状態に係わる症状を有する。場合によっては、LCMV感染しているまたはそのリスクがある被験者は、妊娠している、免疫不全である、移植レシピエントである、癌を発症するリスクがある、もしくは癌を患っている、またはそのいずれかの組合せを有する。

30

【0020】

さらに別の実施例において、本開示は被験者がLCMVに感染したか否かを判断する方法を提供する。当該方法は、LCMVに感染しているまたはそのリスクがある被験者から生体サンプルを得ること、サンプルを、上記の複数のポリペプチド、上記の複数の抗体、または上記の複数のプローブもしくはプライマー、またはそのいずれかの組合せと接触させること、および複数のポリペプチド、複数の抗体、複数のプローブもしくはプライマー、またはそのいずれかの組合せは、サンプルからのLCMVのマーカに関連付けられるか否かを判断することを含み、関連付けられることの検出はその被験者がLCMVに感染していることを示す。

40

【0021】

別の局面において、本開示は、LCMV NPに特異的に結合するモノクローナル抗体M59またはその抗原結合断片、たとえば相補性決定領域(CDR)、たとえばそのCD

50

R 3 を提供する。場合によっては、本開示はこのような抗体を含むキットを提供する。

【 0 0 2 2 】

他の局面において、本開示は L C M V N P に特異的に結合するモノクローナル抗体 M 8 7 またはその抗原結合断片、たとえば相補性決定領域 (C D R)、たとえばその C D R 3 を提供する。場合によっては、本開示はこのような抗体を含むキットを提供する。

【 0 0 2 3 】

別の局面において、本開示は L C M V G P 1 に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、たとえば相補性決定領域 (C D R)、たとえばその C D R 3 を提供する。場合によっては、本開示はこのような抗体を含むキットを提供する。

【 0 0 2 4 】

別の局面において、本開示はアミノ酸配列 R S G W G W A G S D G K T T (S E Q I D N O : 8 9) に特異的に結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体、またはその抗体の抗原結合断片、たとえば相補性決定領域 (C D R)、たとえばその C D R 3 を提供する。場合によっては、本開示はこのような抗体を含むキットを提供する。

【 0 0 2 5 】

他の局面において、本開示は L C M V Z P に特異的に結合するモノクローナル抗体 M J 3 またはその断片、たとえば相補性決定領域 (C D R)、たとえばその C D R 3 を提供する。場合によっては、本開示はこのような抗体を含むキットを提供する。

【 0 0 2 6 】

一部の局面において、本開示は被験者におけるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (L C M V) 感染または活量を評価 (たとえば、検出、判断、診断および / またはモニタ) する方法を提供する。このような方法は、評価する被験者を選択することを含むことができ、候補の被験者は L C M V に晒されている、または L C M V に感染している人間または動物に晒されている疑いがある。当該方法は、選択された被験者からサンプルを得るまたは供給すること、サンプルを L C M V を検出するための 1 つ以上の組成物に接触させること、および L C M V を検出するための 1 つ以上の組成物はサンプルからの L C M V のマーカに関連付けられるか否かを判断することを含み、関連付けられることの検出は被験者が L C M V に感染していることを示す。

【 0 0 2 7 】

一部の局面において、本開示は被験者、たとえば L C M V に感染している被験者、または L C M V 感染の源、たとえば L C M V に感染している人間または動物に晒されている疑いのある被験者における、レベル (たとえば L C M V 核酸、タンパク質、および / または活量のレベル) を含む、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (L C M V) を評価 (たとえば、検出、判断、診断および / またはモニタ) する方法を提供する。一部の実施の形態において、このような方法は、被験者を選択すること (たとえば、候補被験者)、被験者からサンプルを得るまたは供給すること、および L C M V を検出するための 1 つ以上の組成物はサンプルからの L C M V のマーカに関連付けられるか否かを判断することを含み、関連付けられることの検出は被験者が L C M V に感染していることを示す。

【 0 0 2 8 】

一部の局面において、本開示は被験者、たとえば L C M V に感染している被験者、または L C M V 感染の源、たとえば L C M V に感染している人間または動物に晒されている疑いのある被験者における、レベル (たとえば L C M V 核酸、タンパク質、および / または活量のレベル) を含む、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (L C M V) を評価 (たとえば、検出、判断、診断および / またはモニタ) する方法を提供する。一部の実施の形態において、当該方法は被験者 (たとえば、適切な被験者) からサンプルを得るまたは供給すること、サンプルを、1 つ以上の L C M V 核酸もしくは 1 つ以上の L C M V 核酸の一部に特異的に結合する 1 つ以上のプローブまたはプライマー、1 つ以上の L C M V タンパク質またはその断片、および 1 つ以上の L C M V ペプチドまたは L C M V ペプチド断片を検出するための 1 つ以上の組成物 (たとえば、1 つ以上の抗体または抗体の断片) からなる群から選択された少なくとも 2 つの組成物と接触させること、および 2 つ以上の組成物はサン

10

20

30

40

50

ルからのLCMVのマーカに関連付けられるか否かを判断することを含み、関連付けられることの検出は被験者がLCMVに感染していることを示す。

【0029】

一部の局面において、本開示は被験者、たとえばLCMVに感染している被験者、またはLCMV感染の源、たとえばLCMVに感染している人間または動物に晒されている疑いのある被験者における、レベル（たとえばLCMV核酸、タンパク質、および/または活量のレベル）を含む、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）を評価（たとえば、検出、判断、診断および/またはモニタ）する方法を提供する。一部の実施の形態において、当該方法は被験者からサンプルを得るまたは供給すること、サンプルを、LCMVを検出するための1つ以上の組成物と接触させること、およびLCMVを検出するための1つ以上の組成物はサンプルからのLCMVのマーカに関連付けられるか否かを判断することを含み、関連付けられることの検出は被験者がLCMVに感染していることを示す。

10

【0030】

一部の実施の形態において、本開示の方法は、低酸素状態および/または遊離基形成の高いレベルに伴う症状を有する、またはそのリスクがある被験者を選択することを含む。このような被験者は、たとえば妊娠している、免疫不全である、移植レシピエントである、および/または癌を発症するリスクを有する、または癌を患っているものを含む。

【0031】

一部の実施の形態において、本開示の方法はここに開示されている1つ以上の組成物を単独で、またはここに開示している他の組成物のいずれかと組合せて用いることができる。たとえば、2つ以上の組成物を組合せて使用することは同時使用に限定されず、たとえば並行に、または後で使用することを含む。一部の実施の形態において、1つの組成物を用いて観察された結果は、ここに開示されている1つ以上の他の組成物を用いて検証または確認することができる。

20

【0032】

一部の実施の形態において、本開示の方法は、1つ以上のLCMV核酸または1つ以上のLCMV核酸の一部に特異的に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーの使用を含むことができる。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、10個以上の核酸を有する核酸プローブまたはプライマーを含むことができ、ここで10個以上の核酸は1つ以上のSEQ ID NO: 1 - 51内の1つ以上のターゲット領域に対して少なくとも80%以上の同一性を有し、その1つ以上の核酸プローブまたはプライマーは当該1つ以上のターゲット領域に特異的に結合する。

30

【0033】

一部の実施の形態において、本開示の方法は、1つ以上のSEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73に対して80%以上の同一性を有する1つ以上の核酸配列からなる群から選択された1つ以上のプローブまたはプライマーを含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の方法は、SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73からなる群から選択された1つ以上のプローブまたはプライマーを含むことができる。

40

【0034】

一部の実施の形態において、本開示の方法は、LCMV NPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーの使用を含むことができる。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 58および59、もしくはSEQ ID NO: 58および59に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 66および67、もしくはSEQ ID NO: 66および67に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含むことができる。

【0035】

50

一部の実施の形態において、本開示の方法は、LCMV GPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーの使用を含むことができる。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 60および61、もしくはSEQ ID NO: 60および61に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 68および69、もしくはSEQ ID NO: 68および69に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含むことができる。

【0036】

一部の実施の形態において、本開示の方法は、LCMV ZPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーの使用を含むことができる。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 62および63、もしくはSEQ ID NO: 62および63に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 72および73、もしくはSEQ ID NO: 72および73に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含むことができる。

10

【0037】

一部の実施の形態において、本開示の方法は、LCMV Lをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーの使用を含むことができる。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 70および71、またはSEQ ID NO: 70および71に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含むことができる。

【0038】

20

一部の実施の形態において、本開示の方法はLCMV NP、LCMV GP、LCMV ZPおよびLCMV Lのうちの2つ以上をエンコードする核酸の使用を含むことができる。

【0039】

一部の実施の形態において、本開示の方法は以下の使用を含むことができる：SEQ ID NO: 58および59、もしくはSEQ ID NO: 58および59に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 66および67、もしくはSEQ ID NO: 66および67に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV NPに結合する；SEQ ID NO: 60および61、もしくはSEQ ID NO: 60および61に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 68および69、もしくはSEQ ID NO: 68および69に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV GPに結合する；SEQ ID NO: 62および63、もしくはSEQ ID NO: 62および63に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 72および73、もしくはSEQ ID NO: 72および73に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV ZPに結合する；SEQ ID NO: 70および71、またはSEQ ID NO: 70および71に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV Lに結合する。

30

【0040】

40

一部の実施の形態において、本開示の方法は、1つ以上のLCMVタンパク質またはその断片の使用を含む。

【0041】

一部の実施の形態において、本開示の方法は、1つ以上の抗体または抗体の断片の使用を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM J 3、LMBP受領番号9217CBと同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM J 3、LMBP

50

受領番号 9 2 1 7 C B によって産出されたモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出されたモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体と、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体とを含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出されたモノクローナル抗体と、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出されたモノクローナル抗体とを含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は以下を備えることができる：保守的アミノ酸置換を全く含まない（たとえばゼロ）もしくは少なくとも1つ（たとえば、1、2、3、4、5、10未満、20未満、30未満、50未満、または100未満）含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 3 (S E Q I D N O : 7 8)、および/または保守的アミノ酸置換を全く含まない（たとえばゼロ）もしくは少なくとも1つ（たとえば、1、2、3、4、5、10未満、20未満、30未満、50未満、または100未満）含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 2 (S E Q I D N O : 7 7)、および/または保守的アミノ酸置換を全く含まない（たとえばゼロ）もしくは少なくとも1つ（たとえば、1、2、3、4、5、10未満、20未満、30未満、50未満、または100未満）含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 1 (S E Q I D N O : 7 6)。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、S E Q I D N O : 7 4 と同一性を有する抗原結合ペプチド（たとえば、抗体および/または抗原結合抗体断片を含む）を含むことができ、S E Q I D N O : 7 4 内の相補性決定領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を含み、S E Q I D N O : 7 4 内のフレームワーク領域に対応するアミノ酸配列の領域は、S E Q I D N O : 7 4 の対応する領域に対して80%以上の同一性を有し、および/または抗原結合ペプチドは L C M V N P に結合する。

【 0 0 4 2 】

一部の局面において、本開示は、1つ以上の L C M V 核酸もしくは1つ以上の L C M V 核酸の一部に特異的に結合する1つ以上のプローブまたはプライマー、1つ以上の L C M V タンパク質またはその断片、および1つ以上の抗体または抗体の断片の組合せ（たとえば、1つ、2つまたは3つ）を含む。一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、10個以上の核酸を有する1つ以上の核酸プローブまたはプライマーを含むことができ、10個以上の核酸は1つ以上の S E Q I D N O : 1 - 5 0 内の1つ以上のターゲット領域に対して80%以上の同一性を有し、それにより1つ以上の核酸プローブまたはプライマーは、1つ以上のターゲット領域に特異的に結合する。一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73のうちの1つ以上に対し

て80%以上の同一性を有する1つ以上の核酸配列からなる群から選択されている。一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73からなる群から選択される。一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、LCMV NPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO:58および59、もしくはSEQ ID NO:58および59に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO:66および67、もしくはSEQ ID NO:66および67に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列から選択される1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。

10

20

30

40

50

【0043】

一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、LCMV GPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO:60および61、もしくはSEQ ID NO:60および61に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO:68および69、もしくはSEQ ID NO:68および69に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含む。

【0044】

一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、LCMV ZPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO:62および63、もしくはSEQ ID NO:62および63に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO:72および73、もしくはSEQ ID NO:72および73に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含む。

【0045】

一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、LCMV Lをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO:70および71、もしくはSEQ ID NO:70および71に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含む。

【0046】

一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、LCMV GPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、LCMV NP、LCMV GP、LCMV ZPおよび/またはLCMV Lのうちの2つ以上をエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。

【0047】

一部の実施の形態において、ここに記載される組成物の1つ以上のプローブまたはプライマーは、LCMV GPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、以下を含む1つ以上のプローブまたはプライマーを含む: SEQ ID NO:58および59、もしくはSEQ ID NO:58および59に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO:66および67、もしくはSEQ ID NO:66および67に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV NPに結合する; SEQ ID NO:60および61、もしくはSEQ

Q I D N O : 6 0 および 6 1 に対して 8 0 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列、または S E Q I D N O : 6 8 および 6 9、もしくは S E Q I D N O : 6 8 および 6 9 に対して 8 0 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列であって、ここでプライマーは、L C M V G P に結合する；S E Q I D N O : 6 2 および 6 3、もしくは S E Q I D N O : 6 2 および 6 3 に対して 8 0 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列、または S E Q I D N O : 7 2 および 7 3、もしくは S E Q I D N O : 7 2 および 7 3 に対して 8 0 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列であって、ここでプライマーは、L C M V Z P に結合する；S E Q I D N O : 7 0 および 7 1、または S E Q I D N O : 7 0 および 7 1 に対して 8 0 % 以上の同一性を有する 1 対の核酸配列であって、ここでプライマーは、L C M V L に結合する。

10

【 0 0 4 8 】

一部の局面において、本開示は、1 つ以上の抗体を含む組成物を含む。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーの Ghent University の Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーの Ghent University の Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出されたモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーの Ghent University の Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーの Ghent University の Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出されたモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーの Ghent University の Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体と、ベルギーの Ghent University の Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体とを含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーの Ghent University の Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出されたモノクローナル抗体と、ベルギーの Ghent University の Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出されたモノクローナル抗体とを含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、以下を含むことができる：1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 3 (S E Q I D N O : 7 8)、1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 2 (S E Q I D N O : 7 7)、および / または 1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 1 (S E Q I D N O : 7 6)。

20

30

40

【 0 0 4 9 】

一部の実施の形態において、本開示の組成物に含まれる抗体または抗体の断片は、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 3 (S E Q I D N O : 7 8)、および / またはモノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 2 (S E Q I D N O : 7 7)、および / またはモノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 1 (S E Q I D N O : 7 6) を含むことができる。

【 0 0 5 0 】

50

一部の実施の形態において、本開示の組成物に含まれる抗体または抗体の断片は、SEQ ID NO: 74と同一性を有する抗原結合ペプチド（たとえば、抗体および/または抗原結合抗体断片を含む）を含むことができ、SEQ ID NO: 74内の相補性決定領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を含み、SEQ ID NO: 74内のフレームワーク領域に対応するアミノ酸配列の領域は、SEQ ID NO: 74の対応する領域に対して80%以上の同一性を有し、および/または抗原結合ペプチドはLCMV NPに結合する。

【0051】

一部の局面において、本開示は診断キットを含む。一部の実施の形態において、このような診断キットは以下を含むことができる：、少なくとも1つの分離したLCMVポリペプチドまたはその断片であって、LCMVポリペプチドは、NP、GPもしくはZP抗原またはその断片である；NP、GPもしくはZP抗原またはその抗原結合断片に結合する1つ以上の分離された抗体または抗体の断片；および/または1つ以上のLCMV核酸もしくはその一部に特異的に結合する1つ以上のプローブまたはプライマー；および/またはその組合せ。

10

【0052】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットは、1つ以上のプローブまたはプライマーを含むことができ、これは10個以上の核酸を有する1つ以上の核酸プローブまたはプライマーを含み、ここで10個以上の核酸は1つ以上のSEQ ID NO: 1-51内の1つ以上のターゲット領域に対して少なくとも80%以上の同一性を有し、それにより1つ以上の核酸プローブまたはプライマーは、1つ以上のターゲット領域に特異的に結合する。一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれるプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73のうちの1つ以上に対して80%以上の同一性を有する1つ以上の核酸配列からなる群から選択されるプローブまたはプライマーを含む。一部の実施の形態において、ここに本開示の診断キットに含まれるプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73からなる群から選択されるプローブまたはプライマーを含む。

20

30

【0053】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれるプローブまたはプライマーは、LCMV NPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。一部の実施の形態において、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 58および59、もしくはSEQ ID NO: 58および59に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 66および67、もしくはSEQ ID NO: 66および67に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含むことができる。

【0054】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれるプローブまたはプライマーは、LCMV GPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。たとえば、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 60および61、もしくはSEQ ID NO: 60および61に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 68および69、もしくはSEQ ID NO: 68および69に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含むことができる。

40

【0055】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれるプローブまたはプライマーは、LCMV ZPをエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマ

50

ーを含む。一部の実施の形態において、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 62および63、もしくはSEQ ID NO: 62および63に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 72および73、もしくはSEQ ID NO: 72および73に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含むことができる。

【0056】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれるプローブまたはプライマーは、LCMV Lをエンコードする核酸に結合するプローブまたはプライマーを含む。一部の実施の形態において、このようなプローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 70および71、もしくはSEQ ID NO: 70および71に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列を含むことができる。

10

【0057】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれるプローブまたはプライマーは、LCMV NP、LCMV GP、LCMV ZPおよびLCMV Lのうちの2つ以上をエンコードする核酸に結合する1つ以上のプローブまたはプライマーを含む。

【0058】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれるプローブまたはプライマーは、以下を含む: SEQ ID NO: 58および59、もしくはSEQ ID NO: 58および59に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 66および67、もしくはSEQ ID NO: 66および67に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV NPに結合する; SEQ ID NO: 60および61、もしくはSEQ ID NO: 60および61に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 68および69、もしくはSEQ ID NO: 68および69に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV GPに結合する; SEQ ID NO: 62および63、もしくはSEQ ID NO: 62および63に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列、またはSEQ ID NO: 72および73、もしくはSEQ ID NO: 72および73に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV ZPに結合する; および/またはSEQ ID NO: 70および71、またはSEQ ID NO: 70および71に対して80%以上の同一性を有する1対の核酸配列であって、ここでプライマーは、LCMV Lに結合する。

20

30

【0059】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットは、1つ以上の分離された抗体または抗体断片を含む。一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれる分離された抗体または抗体断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM J 3、LMBP受領番号9217CBと同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれる分離された抗体または抗体断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM J 3、LMBP受領番号9217CBによって産出されたモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれる分離された抗体または抗体断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM 166、LMBP受領番号9216CBと同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれる分離された抗体または抗体断片は

40

50

、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体と、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体とを含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれる分離された抗体または抗体断片は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出されたモノクローナル抗体と、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)に寄託されたハイブリドーマM 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出されたモノクローナル抗体とを含むことができる。

10

【 0 0 6 0 】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれる分離された抗体または抗体断片は、以下を含むことができる：1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体M 8 7の重鎖可変領域のCDR 3 (S E Q I D N O : 7 8)、および/または1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体M 8 7の重鎖可変領域のCDR 2 (S E Q I D N O : 7 7)、および/または1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体M 8 7の重鎖可変領域のCDR 1 (S E Q I D N O : 7 6)。

20

【 0 0 6 1 】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれる分離された抗体または抗体断片は、モノクローナル抗体M 8 7の重鎖可変領域のCDR 3 (S E Q I D N O : 7 8)、および/またはモノクローナル抗体M 8 7の重鎖可変領域のCDR 2 (S E Q I D N O : 7 7)、および/またはモノクローナル抗体M 8 7の重鎖可変領域のCDR 1 (S E Q I D N O : 7 6)を含むことができる。

【 0 0 6 2 】

一部の実施の形態において、本開示の診断キットに含まれる分離された抗体または抗体断片は、S E Q I D N O : 7 4 と同一性を有する抗原結合ペプチド(たとえば、抗体および/または抗原結合抗体断片を含む)を含むことができ、S E Q I D N O : 7 4 内の相補性決定領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を含み、S E Q I D N O : 7 4 内のフレームワーク領域に対応するアミノ酸配列の領域は、S E Q I D N O : 7 4 の対応する領域に対して80%以上の同一性を有し、および/または抗原結合ペプチドはL C M V N P に結合する。

30

【 0 0 6 3 】

一部の局面において、本開示は複数の分離されたポリペプチドを含み、この複数のものは、分離されたNP抗原またはその断片、分離されたGP抗原またはその断片、分離されたGPC抗原またはその断片、分離されたGPL抗原またはその断片、および分離されたZP抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも2つのポリペプチドを含む。一部の実施例において、本開示の複数のものは、分離されたNP抗原またはその断片、分離されたGP抗原またはその断片、分離されたGPC抗原またはその断片、分離されたGPL抗原またはその断片、および分離されたZP抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも3つのポリペプチド、分離されたNP抗原またはその断片、分離されたGP抗原またはその断片、分離されたGPC抗原またはその断片、分離されたGPL抗原またはその断片、分離されたZP抗原またはその断片、分離されたNP抗原またはその断片、分離されたGP抗原またはその断片、分離されたGPC抗原またはその断片、分離されたGPL抗原またはその断片、および分離されたZP抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも4つのポリペプチドを含むことができる。一部の実施の形態において、このような複数のものはキットとして提供できる、またはキット内に含むことができる。

40

50

【 0 0 6 4 】

一部の局面において、本開示は複数の分離された抗体または抗体の断片を含み、複数のものは N P 抗原またはその断片、G P 抗原またはその断片、G P C 抗原またはその断片、G P 1 抗原またはその断片、および Z P 抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも 2 つのポリペプチドに特異的に結合される抗体またはその断片を含む。

【 0 0 6 5 】

一部の局面において、本開示は複数の分離された抗体または抗体の断片を含み、複数のものは N P 抗原またはその断片、G P 抗原またはその断片、G P C 抗原またはその断片、G P 1 抗原またはその断片、および Z P 抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも 3 つのポリペプチドに特異的に結合される抗体またはその断片を含む。

10

【 0 0 6 6 】

一部の局面において、本開示は複数の分離された抗体または抗体の断片を含み、複数のものは N P 抗原またはその断片、G P 抗原またはその断片、G P C 抗原またはその断片、G P 1 抗原またはその断片、および Z P 抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも 4 つのポリペプチドに特異的に結合される抗体またはその断片を含む。

【 0 0 6 7 】

一部の局面において、本開示は複数の分離された抗体または抗体断片を含み、複数のものは N P 抗原またはその断片、G P 抗原またはその断片、G P C 抗原またはその断片、G P 1 抗原またはその断片、および Z P 抗原またはその断片に特異的に結合される抗体または断片を含む。

20

【 0 0 6 8 】

一部の実施の形態において、本開示の複数のものは、ベルギーの Ghent University of Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、このような抗体または抗体の断片は、ベルギーの Ghent University of Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出されたモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の複数のものは、ベルギーの Ghent University of Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の複数のものは、ベルギーの Ghent University of Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出されたモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の複数のものは、ベルギーの Ghent University of Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体と、ベルギーの Ghent University of Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体とを含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の複数のものは、ベルギーの Ghent University of Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出されたモノクローナル抗体と、ベルギーの Ghent University of Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出されたモノクローナル抗体とを含むことができる。

30

40

【 0 0 6 9 】

一部の実施の形態において、本開示の複数のものは、S E Q I D N O : 7 4 と同一性を有する抗原結合ペプチドを含むことができ、S E Q I D N O : 7 4 内の相補性決定領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含み、S E

50

Q I D N O : 7 4 内のフレームワーク領域に対応するアミノ酸配列の領域は、S E Q I D N O : 7 4 の対応する領域に対して 8 0 % 以上の同一性を有し、および / または抗原結合ペプチドは L C M V N P に結合する。

【 0 0 7 0 】

一部の局面において、本開示の複数のものは診断キットとして提供（たとえば、販売、販売に供せられる、市場に出される、出荷される、保管される、および / またはパッケージ化される）または診断キット内に含まれるものとして提供できる。

【 0 0 7 1 】

一部の局面において、本開示の複数のものは、N P 抗原またはその断片、G P 抗原またはその断片、G P C 抗原またはその断片、G P 1 抗原またはその断片、および Z P 抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも 2 つのポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブまたはプライマーを含むことができる。一部の実施例において、本開示の複数のものは、N P 抗原またはその断片、G P 抗原またはその断片、G P C 抗原またはその断片、G P 1 抗原またはその断片、および Z P 抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも 3 つのポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブまたはプライマーを含むことができる。一部の実施例において、本開示の複数のものは、N P 抗原またはその断片、G P 抗原またはその断片、G P C 抗原またはその断片、G P 1 抗原またはその断片、Z P 抗原またはその断片からなる群から選択された少なくとも 4 つのポリペプチドをエンコードするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブまたはプライマーを含むことができるを含むことができる。一部の実施の形態において、本開示の複数のものは、N P 抗原またはその断片、G P 抗原またはその断片、G P C 抗原またはその断片、G P 1 抗原またはその断片、および Z P 抗原またはその断片をエンコードするヌクレオチド配列に特異的に結合するプローブまたはプライマーを含むことができる。

10

20

【 0 0 7 2 】

一部の局面において、本開示の複数のものは、診断キットとして提供（たとえば、販売、販売に供せられる、市場に出される、出荷される、保管される、および / またはパッケージ化される）または診断キット内に含まれるものとして提供できる。一部の実施の形態において、このような診断キットは、被験者の L C M V またはその症状を治療するための 1 つ以上の（たとえば 1、2、3、4、5 以上）の薬（たとえば医薬）をさらに含むことができる。一部の実施の形態において、1 つ以上の薬は、抗ウイルス薬である。

30

【 0 0 7 3 】

一部の実施の形態において、本開示は L C M V 感染に対して被験者を治療する方法を提供し、当該方法は、L C M V を罹っているまたは L C M V 感染のリスクがある被験者から生体サンプルを得ること、請求項 1 に記載の方法を用いて、サンプルをスクリーニングして、被験者が L C M V に感染しているか否かを判断すること、ならびに患者が L C M V に感染しているのなら、L C M V またはその症状を治療する薬を、被験者に投与することを含む。一部の実施の形態において、本開示の治療方法は、低酸素状態に伴う症状を有する、またはそのリスクがある被験者を選択することを含む。このような被験者は、たとえば妊娠している、免疫不全である、移植レシピエントである、および癌を発症するリスクを有する、または癌を罹っているものを含む。

40

【 0 0 7 4 】

一部の局面において、本開示は、L C M V N P に特異的に結合するモノクローナル抗体 M 5 9 またはその断片を提供する。

【 0 0 7 5 】

一部の局面において、本開示は、L C M V N P に特異的に結合するモノクローナル抗体 M 8 7 またはその断片を提供する。

【 0 0 7 6 】

一部の局面において、本開示は、L C M V G P 1 に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片を提供する。

50

【 0 0 7 7 】

一部の局面において、本開示は、アミノ酸配列 R S G W G W A G S D G K T T (S E Q I D N O : 8 9) に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 7 8 】

一部の局面において、本開示は、L C M V Z P に特異的に結合するモノクローナル抗体 M J 3 またはその断片を提供する。

【 0 0 7 9 】

一部の局面において、本開示は、ここに記載の 1 つ以上の抗体の抗原結合断片を提供する。

【 0 0 8 0 】

一部の局面において、本開示はここに記載の 1 つ以上の抗体の相補性決定領域 (C D R) を提供する。一部の実施の形態において、C D R は C D R 3 である。

【 0 0 8 1 】

一部の局面において、ここに開示されている 1 つ以上の抗体または抗体結合断片は、診断キットとして (たとえば、販売、販売に供せられる、市場に出される、出荷される、保管される、および / またはパッケージ化される)、または診断キット内に含まれるものとして提供できる。

【 0 0 8 2 】

一部の局面において、本開示はベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 8 3 】

一部の局面において、本開示は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B によって産出されたモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 8 4 】

一部の局面において、本開示は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M J 3、L M B P 受領番号 9 2 1 7 C B の細胞を提供する。

【 0 0 8 5 】

一部の局面において、本開示は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B と同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 8 6 】

一部の局面において、本開示は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B によって産出されたモノクローナル抗体を提供する。

【 0 0 8 7 】

一部の局面において、本開示は、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) に寄託されたハイブリドーマ M 1 6 6、L M B P 受領番号 9 2 1 6 C B の細胞を提供する。

【 0 0 8 8 】

一部の局面において、本開示は、以下を含む分離された抗体または抗体断片を提供する : 1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 3 (S E Q I D N O : 7 8)、および / または 1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 2 (S E Q I D N O : 7 7)、および / または 1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 1 (S E Q I D N O : 7 6)。

【 0 0 8 9 】

一部の局面において、本開示は、以下を含む分離された抗体または抗体断片を提供する

10

20

30

40

50

：モノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 3 (S E Q I D N O : 7 8) 、
および / またはモノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 2 (S E Q I D N
O : 7 7) 、および / またはモノクローナル抗体 M 8 7 の重鎖可変領域の C D R 1 (S E
Q I D N O : 7 6) 。

【 0 0 9 0 】

一部の局面において、本開示は、S E Q I D N O : 7 4 と同一性を有する抗原結合
ペプチド（たとえば、抗体または抗体断片）を提供し、S E Q I D N O : 7 4 内の相
補性決定領域に対応するアミノ酸配列内の領域は、1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含み
、S E Q I D N O : 7 4 内のフレームワーク領域に対応するアミノ酸配列の領域は、
S E Q I D N O : 7 4 の対応する領域に対して 8 0 % 以上の同一性を有し、および /
または抗原結合ペプチドは L C M V N P に結合する。

10

【 0 0 9 1 】

特に定義しない限り、ここに用いられるすべての技術的および科学的用語は、本発明が
属する技術分野の当業者にとって一般に理解される意味と同じ意味を有する。本発明で使
用するために方法および材料がここに記載されているが、当該技術分野において既知の他
の適切な方法および材料も用いることができる。材料、方法および実施例は例示的なもの
であり、限定する意図はない。ここに言及されている出版物、特許出願、特許、配列、デ
ータベース入力および他の引例は、その全体が引用によりここに援用される。相反する場
合、定義を含む本明細書が支配する。

【 0 0 9 2 】

20

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および図面から、ならびに請求項か
ら、明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 9 3 】

【図 1 A】図 1 A は、L C M V ビリオンおよびウイルス複製戦略の外側膜貫通糖タンパク
質 1 および 2 (G P 1 および G P 2) 、Z タンパク質、N P、R N A および L タンパク質
を含む、L C M V の構造を示す図である。

【図 1 B】図 1 B は、L C M V 寿命サイクルを概略的に示す図である。

【図 2】図 2 i - 2 v i は、選択された L C M V 株 / 分離株の S セグメントの上の N P ゲ
ノム領域のヌクレオチド配列の配置を示す図である。

30

【図 3】図 3 i - 3 v i は、選択された L C M V 株 / 分離株の S セグメントの上の G P (
すなわち G P C、G P 1 および G P 2 を含む) ゲノム領域のヌクレオチド配列の配置を示
す図である。

【図 4】図 4 は、選択された L C M V 株 / 分離株の L セグメント上の Z P ゲノム領域のヌ
クレオチド配列の配置を示す図である。

【図 5】図 5 i - 5 i i は、選択された L C M V 株 / 分離株の N P 抗原のアミノ酸配列の
配置を示す図である。

【図 6】図 6 i - 6 i i は、選択された L C M V 株 / 分離株の G P 抗原のアミノ酸配列の
配置を示す図である。

【図 7】図 7 は、選択された L C M V 株 / 分離株の Z P 抗原のアミノ酸配列の配置を示す
図である。

40

【図 8】図 8 A - 8 D は、ここに開示されている方法で使用する、抗体に基づく例示的な
アッセイを示す図である。

【図 9】図 9 は、ここに開示されている方法で使用する、RNA に基づく例示的なアッセイ
を示す図である。

【図 1 0 A】図 1 0 A は、低酸素状態は L C M V 遺伝子発現を上方制御することを示すヒ
ストグラム図であり、誘導倍率は酸素正常状態コントロールとの比較を基に定められ、値
は 4 回行なわれた 3 つの別個の実験の平均を表わし、エラーバーは標準偏差を示し、ここ
で * P 0 . 0 2、* * * P 0 . 0 0 1 (低酸素状態 (H Y) 対酸素正常状態 (N
O)) となる図である。

50

【図10B】図10Bは、DMOG治療はLCMV遺伝子発現を上方制御することを示すヒストグラムであり、値は2つの実験のうちの1つの代表的実験における3倍の決定の平均を表わし、エラーバーは標準偏差を示し、ここで* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (DMOG対DMOGなし)となる図である。

【図10C】図10Cは、低酸素状態はLCMVタンパク質発現を上方制御することを示す免疫プロットの画像であり、アクチンはロードおよび転送効率のコントロールとして示され、HIF-1アルファの検出は、低酸素状態に対する細胞誘導のためのコントロールとして働き、同様の結果を有する少なくとも3つの独立した実験の1つの代表的なものが示される図である。

【図10D】図10Dは、RLM-RACEによって解析された、酸素正常状態および低酸素状態下のさまざまなLCMV遺伝子の相対的発現レベルを示す棒グラフ図である。

【図11A】図11Aは、RT-PCRによって検出された、酸素正常状態(NO)下で培養されたHeLa-MX細胞からの媒体および低酸素状態(HY)下で培養された細胞からの媒体におけるLCMVゲノムの存在を確認するゲルの画像図である。

【図11B】図11Bは、RT-PCRによって解析された、パッセージ(P)1、P3、P5およびP10でのHeLa-MX細胞からの媒体を用いて感染した細胞のLCMV遺伝子発現を示すゲルの画像図である。

【図11C】図11Cは、HeLa-MX細胞からの媒体を用いて感染した細胞の画像であり、細胞はLCMV用に染色され、核染色も用いられ、細胞はP1、P3およびP10で染色され、20の倍率が用いられ、データは2つの独立した実験を表わす図である。

【図12A】図12Aは、抗体重鎖の可変領域の配列を特徴付けるために用いられたプロトコルを示す図である。

【図12B】図12Bは、MAb M87の重鎖の可変領域のアミノ酸配列を示す図であり、黄色の色の付いた箇所はシグナルペプチド配列を示し、緑の色の付いた箇所は超可変領域を示す図である。

【図12C】図12Cは、MAb M87の重鎖の構造を示す図である。

【図13】図13は、自然流産した女性の血清の抗NP抗体の存在を確認する免疫プロットの画像であり、ヒト血清の抗NP抗体は免疫沈澱によって検出された図である。

【図14】図14は、腎臓腫瘍(A)および陰性のコントロール(B)におけるウイルスNPの免疫組織化学的検出を示す画像であり、図14Cは、免疫沈澱およびNP特異モノクローナル抗体を用いた後の免疫プロットによる、ヒトRCC被験者からの組織におけるLCMV NPの免疫検出を示す免疫プロットの画像であり、HT = 健康な組織、TT = 腫瘍組織、HMX = HeLa/MX (陽性コントロール)、H = HeLa (陰性コントロール)とした図である。

【図15】図15Aおよび15Bは、M87抗体とM59抗体との競合的結合研究結果を示すグラフ図である。

【図16】図16は、NP断片へのNP特異抗体のエピトープ結合を示す線グラフ図である。

【図17】図17は、精製された組換タンパク質のSDS-PAGE分析を示すゲルの画像であり、レーン1は精製されたLCMV-NP抗原であり、レーン2は精製された陰性コントロール抗原であり、約62kDa (レーン1)のLCMV-NP抗原のタンパク質バンドが検出されたことを示す図である。

【図18】図18A - 18Bは、LCMV PCR産出物の電気泳動を示すアガロースゲルの画像図である。

【図19】図19A - 19Bは、シングルプレックスフォーマットにおけるLCMV MX NP およびGP遺伝子のリアルタイム検出を示す線グラフ図である。

【図20】図20は、デュプレックスフォーマットにおけるLCMV MX NP およびGP遺伝子のリアルタイム検出を示す線グラフ図である。

【図21】図21A - 21Bは、シングルプレックスフォーマットにおけるLCMV ARM NP およびGP遺伝子のリアルタイム検出を示す線グラフ図である。

10

20

30

40

50

【図 2 2】図 2 2 は、デュプレックスフォーマットにおける L C M V A R M N P および G P 遺伝子のリアルタイム検出を示す線グラフ図である。

【図 2 3】図 2 3 A - 2 3 D は、L C M V リアルタイム P C R 解析の感度を示す線グラフであり、一連の希釈された L C M V 感染細胞で混ぜられた血液サンプルは、シングルプレックス (A 、 B) およびデュプレックス (C 、 D) フォーマットでリアルタイム P C R 解析によってテストされた図である。

【図 2 4】図 2 4 は、リアルタイム P C R で分析された、低酸素状態および酸素正常状態下での L C M V M X N P および G P 遺伝子発現を示す棒グラフ図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 9 4 】

10

詳細な説明

本開示は、持続している L C M V は低酸素状態によって再活性化されるという驚くべき発見にとりわけ基づいている。このようなウイルス再活性化は弱い被験者、たとえば妊娠している、免疫障害を持っている、移植レシピエントである、癌を発症する危険を有する、もしくは癌に罹っている者を含むがこれらに限定されない被験者において、臨床的にその兆候が現われ得る。したがって、本開示は L C M V 、たとえば再活性 L C M V を確実に検出するための組成物および方法を提供する。

【 0 0 9 5 】

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (L C M V) は、アレナウイルス科の原型メンバーであり、エンベロープを持ったビリオンおよび二等分された一本鎖 R N A ゲノムを有する (図 1 参照) 。両方のセグメント (小さい [S] および大きい [L]) は互いに対向する配向において 2 つのオープンリーディングフレームを有し、アンピセンスコーディング戦略を用いる (Meyer 他、2 0 0 2 年) 。 S R N A は、主ウイルスタンパク質核タンパク質 (N P) および糖タンパク質前駆体 (G P - C) をエンコードし、これは末梢糖タンパク質 1 (G P 1) および膜貫通糖タンパク質 2 (G P 2) に共同並進的に切断される (Southern et al, Virology, 157(1): 145-55 (1987)) 。 L R N A セグメントは、R N A - 依存 R N A ポリメラーゼ (L) および規制リングフィンガ Z タンパク質 (Z P) をエンコードする (Buchmeier Curr Top Microbiol Immunol. 262: 159-73 (2002); Salvato, Virology 173, 1-10 (1989)) 。

20

【 0 0 9 6 】

30

ウイルス複製は負の極性の 3 R N A ゲノムアームの L ポリメラーゼ駆動転写で始まり、後で N P および L ポリメラーゼに翻訳される m R N A を産出する。これらのウイルスタンパク質は、R N A ゲノムがウイルス c R N A に転写される支援を行ない、新しいゲノム R N A 分子の合成ならびに G P C および Z P に翻訳されるサブゲノム m R N A のテンプレートとして働く。この二段階の複製戦略は、ウイルスの持続性の確立を促し、これは R N A ゲノムである N P および L ポリメラーゼからなるウイルスリボ核タンパク質によって維持できるが、糖タンパク質の発現がないまたは制限されることによる成熟ビリオン産出がない場合である (van der Zeijst et al, J Virol 48:249-61 (1983); Buchmeier, 2003) 。 L C M V はさまざまな種から得られる多様な細胞の種類に持続的感染を簡単に起こし、重大な細胞機能を乱さないが、非本質的な表現型の特徴を変える (Oldstone, Curr Top Microbiol Immunol. 263:83-117 (2002); Peters et al, Supra) 。

40

【 0 0 9 7 】

L C M V は種 M u s m u s c u l u s のげっ歯類に伴って世界中で広がっている。人間は感染したげっ歯類またはペット (動物の唾液、尿および糞便のウイルスに汚染されたエアゾールを吸入することにより) 直接または間接的に接触した後気道を通して一般に感染する。免疫適格の個人では、L C M V は穏やかなインフルエンザ型兆候から稀には重症の脳炎の病を引き起す (Jahrling and Peters, 1992, Buchmeier et al, 2007) 。妊娠中でのこのウイルスの感染は自然流産や奇形に繋がっている (Jamieson et al, 2006, Meritet et al, 2009) 。より驚くべきことに、感染したドナーからの移植された臓器を介して免疫不全のレシピエントにうつされた L C M V 感染の致命的な事例が最近報告されており、こ

50

の一見無害に見えるウイルスへの注意が喚起された(Fischer et al, 2006, Amman et al, 2007)。

【0098】

急性感染は成熟GP1およびGP2の産出を含み、慢性/持続性感染は未熟なGPCの産出を示すが、糖タンパク質の成熟した形はないかまたは減少し、NPは急性および慢性/持続性状況で産出され、同様にZPも急性および慢性/持続性状況で産出されるが、その発現は低酸素状態による再活性化によって増加する(Buchmeier, 2003年、Tomaskova他、未出版データ)。この事実はLCMVを検出する今までの試みで見過ごされていたが、低酸素状態に応じてGP、NPおよびZPの産出および感染性ビリオンの形成の相対的な増加を示す当方の研究データによって、最近呼び起されており、これは胚発生、心臓および脳虚血、癌などを含む、多くの生理学および病理学的状況に伴っている。さらにLCMV「再活性化」は免疫抑制(移植目的のために、化学療法による、および他の状況)によって起こることが知られており、さらにウイルスGP、NPおよびZPの増加した発現に伴う。

10

【0099】

今まで、LCMV検出、LCMV急性および/または慢性感染のスクリーニングおよび診断のための確実な方法は、臨床研究所での定例的使用に対して利用可能ではなく、スクリーニング/診断されるべきターゲット(リスク)母集団はない。なぜなら包括的な疫学データがないからである。既存の解析(たとえば、免疫蛍光検査法、ELISA、補体結合、およびRT-PCR測定を含む)は、十分な感度および再現性を示さず、急性と慢性/持続性感染との区別ができず、たまに発生した状況または他のウイルスが検出できない場合に適用されるだけである。さらに、既存の解析は、NP、GP、ZP(または代替的にGCPおよびGP1)およびZP-派生オリゴヌクレオチドまたはポリペプチドを組合せてウイルスおよび/またはウイルス特異抗体を検出しないので、感染が他の態様で証明された場合でも、LCMVの感染の検出に失敗する。したがって、正確で、感度があり、かつ再現可能な定例的解析の利用性が強く望まれている。

20

【0100】

LCMV検出用の組成物

本開示に含まれる組成物は、生体サンプルのLCMVの1つ以上のマーカを特異的に検出することができる生体的および合成材料を含む。

30

【0101】

LCMVのマーカは、たとえば1つ以上または少なくとも1つ(たとえば、1、2、3、4、5個以上、2、3、4または5個の組合せを含む)のLCMV核酸(たとえばLCMV mRNAおよび/またはLCMVゲノムDNA/RNAであって、1つ以上のLCMVペプチドをエンコードするLCMV(たとえばLCMV GP(1および/または2)、Zタンパク質、NP、および/またはLタンパク質))、および/またはLCMVタンパク質またはペプチド(たとえば、1、2、3、4、5個以上、2、3、4または5個の組合せを含む)、LCMV GP(1および/または2)、Zタンパク質、NP、および/またはLタンパク質)を含むことができる。たとえば、場合によっては、LCMVのマーカは、LCMV GPおよび/またはLCMV NP核酸および/またはタンパク質を含むことができる。場合によっては、LCMVのマーカは、マーカの一部をターゲット化することにより、含むかまたは検出することができる。場合によっては、LCMVマーカの一部は、たとえば、1つ以上のLCMV株または分離株間で保たれる核酸の領域を含むことができる。たとえば、検出用の適切な部分は、図2から図4において保存されていると特定される領域を含むことができる(たとえば、1つ以上のSEQ ID NO: 1-57)。代替的に、または付加的に、適切な部分は1つ以上の明確なLCMV株(たとえば1つ以上のSEQ ID NO: 1-57)における領域に対して、50%以上の同一性(たとえば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%の同一性)を有するLCMV核酸内の領域を含むことができる。場合によっては、適切な部分は1つ以上のSEQ ID NO: 1-51によってエンコ

40

50

ードされたタンパク質の領域に対して50%以上の同一性（たとえば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%の同一性）を有するLCMVタンパク質内の領域を含むことができる。場合によっては、適切な部分は1つ以上のSEQ ID NO: 52 - 57の領域に対して50%以上の同一性（たとえば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%の同一性）を有するLCMVタンパク質内の領域を含むことができる。

【0102】

このような1つ以上または少なくとも1つのLCMV核酸またはその部分の特異的に検出するのに適する組成物は、核酸プローブまたはプライマーを含むが、これらに限定されない。適切なプローブまたはプライマーを設計および合成する方法は当該技術分野において既知である。場合によっては、1つ以上または少なくとも1つのLCMVのマーカーを検出するのに用いることができる核酸プローブまたはプライマーは、たとえば10個以上の核酸（例えば10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000個の核酸、または1000個以上の核酸）を含有する核酸プローブまたはプライマーを含むことができ、たとえば10個以上の核酸は、1つ以上のLCMVマーカー（たとえば1つ以上のSEQ ID NO: 1 - 51内）のターゲット領域に対して50%以上の同一性（たとえば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%の同一性）を有し、その核酸プローブまたはプライマーはターゲット領域（たとえば1つ以上のSEQ ID NO: 1 - 51内）に特異的に結合する。場合によっては、プローブまたはプライマーは、緊縮結合状態（たとえば、低い緊縮、中間緊縮、または高い緊縮）下でのターゲット領域に結合（たとえば、特異的に結合）できる。低い、中間の、および高い緊縮の雑種形成条件として適格な雑種形成条件は、当該技術分野において既知である。相補的核酸配列は特異的に雑種形成可能であるためにそのターゲット核酸に対して100%相補である必要がないことは当該技術分野において理解されている。本発明の相補的核酸配列は、増幅またはターゲット部が起こるようターゲット配列に対する配列またはその一部の結合が起こった場合に特異的に雑種形成可能である。場合によっては、複数のプローブまたはプライマーを用いて、サンプル（「サンプル」または「生体サンプル」の用語は、被験者（ヒトまたは動物）から得られる組織または体液のサンプルを指すが、血液、血清、プラズマ、組織生検および外科的試験片、唾液、尿、脳脊髄液などを含むが、これらに限定されない。生体サンプルは、インビトロで培養された細胞および培養された媒体を含む。サンプルは、加熱、遠心分離、沈殿などによって、分析の前に処理されてもよい）における同じLCMV核酸を検出することができる。このような場合、プローブは同じLCMV核酸の重なっている部分を検知、または同じLCMV核酸の重なっていない部分を検知することができる。代替的に、または付加的に、複数のプローブまたはプライマーを用いて、サンプルの明確なLCMV核酸を検出することができる。場合によっては、1つ以上または少なくとも1つのLCMVマーカーを検出するために用いることができる核酸プローブまたはプライマーは、たとえば、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59（たとえばSEQ ID NO: 58および59の組合せであって、LCMV NPを検出）、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61（たとえばSEQ ID NO: 60 - 61の組合せであって、LCMV GPを検出）、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63（たとえばSEQ ID NO: 62 - 63の組合せであって、LCMV ZPを検出）、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67（たとえばSEQ ID NO: 66 - 67の組合せであって、LCMV NPを検出）、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69（たとえばSEQ ID NO: 68 - 69の組合せであって、LCMV GPを検出）、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71（たとえばSEQ ID NO: 70 - 71の組合せであって、LCMV Lを検出）、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73（たと

10

20

30

40

50

例えばSEQ ID NO: 72 - 73の組合せであって、LCMV Zを検出)のうちの1つ以上または少なくとも1つを含むことができる。場合によっては、1つ以上または少なくとも1つのLCMVマーカを検出するために用いることができる核酸プローブまたはプライマーは、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59 (たとえばSEQ ID NO: 58および59の組合せであって、LCMV NPを検出)、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61 (たとえばSEQ ID NO: 60 - 61の組合せであって、LCMV GPを検出)、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63 (たとえばSEQ ID NO: 62 - 63の組合せであって、LCMV ZPを検出)、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67 (たとえばSEQ ID NO: 66 - 67の組合せであって、LCMV NPを検出)、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69 (たとえばSEQ ID NO: 68 - 69の組合せであって、LCMV GPを検出)、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71 (たとえばSEQ ID NO: 70 - 71の組合せであって、LCMV Lを検出)、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73 (たとえばSEQ ID NO: 72 - 73の組合せであって、LCMV Zを検出)に対して、50%以上 (たとえば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%)の配列相同性または同一性を有する核酸プローブまたはプライマーを含むことができる。場合によっては、1つ以上または少なくとも1つのLCMVマーカを検出するために用いることができる核酸プローブまたはプライマーは、この実施例2に記載されているプローブまたはプライマーを1つ以上含むことができる。

10

20

【0103】

場合によっては、1つ以上または少なくとも1つのLCMV核酸またはその部分を検出するのに適する方法は、たとえばRT-PCRおよび/またはRLM-RACE (たとえば、この実施例2に記載されている)を含むことができる。

【0104】

代替的に、または付加的に、LCMVのマーカは1つ以上のLCMVペプチド (たとえば、ポリペプチドまたはタンパク質を含む)、およびLCMVを検出するための方法は、たとえば1つ以上のLCMVペプチドの検出を含むことができる。

【0105】

「ポリペプチド」および「タンパク質」の用語は、アミノ酸残基のポリマーまたはオリゴマーを指し、完全長タンパク質、断片、ペプチド、オリゴペプチド、マルチマーなどを含む。当該用語は翻訳後の変質 (グリコシル化、リン酸化、アセチル化など)、や天然配列に対する削除、追加、置換、突然変異 (自然突然変異および自然変異)、たとえば産物が所望の活性を維持する限りにおいて)、たとえばここに開示されている1つ以上のLCMVペプチドをも含む。

30

【0106】

場合によっては、LCMVペプチドは完全長LCMVペプチドまたはLCMVペプチドの断片、たとえばここに開示されているLCMVペプチドの断片であり得る (たとえば、1つ以上のSEQ ID NO: 1 - 51によってエンコードされたペプチドもしくはペプチド断片、または1つ以上のSEQ ID NO: 52 - 58、もしくは1つ以上のSEQ ID NO: 52 - 58の断片/部分)。適切な断片は、1つ以上のLCMV株または分離株の間で保存されるアミノ酸の領域を含むことができる。たとえば、適切な断片は図5から図7において保存されていると同定されている領域、またはSEQ ID NO: 1 - 51 (たとえば、1つ以上のSEQ ID NO: 1 - 51によってエンコードされたペプチドを含む)を含むことができる。代替的に、または付加的に、適切な断片は、1つ以上の異なるLCMV株の領域に対して50%以上の同一性 (たとえば、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、または100%の同一性)を有するLCMVアミノ酸内の領域を含むことができる。場合によっては、適切な断片は少なくとも3個のアミノ酸 (たとえば、3から10個のアミノ酸)を含むことができる。代替的にまたは付加的に、適切な断片は3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1

40

50

1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, または100個以上のアミノ酸を含むことができる。場合によっては、適切な断片は抗原またはエピトープを含むことができる。「抗原」はLCMV抗体を結合する1つ以上のエピトープを含み、LCMVの分離株/株のいずれかから得られる、さまざまなLCMVポリペプチドおよびその断片(天然、組換、または合成)を指す。さらに、抗原は基準のLCMV抗原分子(完全長またはその断片)とLCMV抗原の再活性化を損なわない別の抗原/タンパク質/ペプチドとの融合タンパク質であり得る。抗原は免疫原性組成物の成分であってもよく、実質的に精製されないかまたは精製される(存在しているサンプルの50%以上をなす)、または分離(別個のおよび異なる形)であるサンプル(感染細胞、全細胞溶解液、タンパク質抽出物を含むがこれらに限定されない)であり得る。

10

【0107】

NP抗原の用語は、LCMVのヌクレオカプシドタンパク質に由来する抗原を指す(たとえば、任意のLCMV株および分離株を含む)。LCMVのさまざまなNP抗原のヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列は既知である(図2および図5、SEQ ID NO: 1-11および31-40)。付加的な配列は先の文献に特定されているように(以下参照) Genbankに寄託されている。本解析で有用な代表的免疫反応性のNP抗原は、LCMVのMX株に由来する融合タンパク質である。これはいくつかのエピトープを含み、この抗原を結合する抗体はArmstrong株からのNP抗原で交差反応し得る。

20

【0108】

リボ核タンパク質またはRNPの用語は、NP抗原にカバーされているウイルスゲノムRNAセグメント(Sおよび/またはL)の複合体を指す。このようなRNPは感染細胞内のLCMV感染の際に形成され、細胞外空間に放たれ得る。

【0109】

GP抗原の用語は、LCMV(任意のLCMV株および分離株を含む)の糖タンパク質に由来する抗原を指す。LCMVのさまざまなGP抗原のヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列は既知である(たとえば、図3および図6、SEQ ID NO: 12-23および41-51参照)。付加的な配列は先の文献に特定されているように(以下参照) Genbankに寄託されている。本解析で有用な代表的免疫反応性のGP抗原は、LCMVのMX株に由来する融合タンパク質である。これはいくつかのエピトープを含み、この抗原を結合する抗体はArmstrong株からのGP抗原で交差反応し得る。

30

【0110】

GPC抗原の用語は、前駆体であって、GP抗原の未熟な形であり、持続性または異常な感染において典型的である。これはGP1およびGP2のGPC切断の領域(断片)に跨るエピトープを含み、GPCの特異的認識にのみ該当する。LCMVのさまざまなGPC抗原の配列は既知である(図3および図6、SEQ ID NO: 12-23および41-51参照)。

【0111】

GP1抗原の用語は、急性感染で一般的なエンベロープ抗原の成熟外部サブユニットを意味する。GP1のC末端領域(断片)のエピトープを含み、これはGPCに晒されない。LCMVのさまざまなGPL抗原のアミノ酸配列が既知である。

40

【0112】

ZP抗原の用語は、LCMVのZタンパク質に由来する抗原を指す。LCMVのさまざまなZP抗原のヌクレオチドおよび対応するアミノ酸配列は既知である(図4および図7、SEQ ID NO: 24-30および52-57参照)。付加的な配列は先の文献に特定されているように(以下参照) Genbankに寄託されている。本解析で有用な代表的免疫反応性のZP抗原は、LCMVのMX株に由来する融合タンパク質である。これはいくつかのエピトープを含み、この抗原を結合する抗体はArmstrong株からのZP抗原で交差反応し得る。

【0113】

50

エピトープの用語は、特異的 B 細胞および / または T 細胞が反応する、抗原の部位を意味し、生体サンプルにある L C M V 抗体と反応し、抗体の産出を促す。この用語は「抗原決定基または抗原部位」と入れ替えて用いることができる。エピトープは独自の整合したまたは線形の態様で組合せられた 3 から 5 個以上のアミノ酸を含むことができる。

【 0 1 1 4 】

免疫原性組成物の用語は、少なくとも 1 つの免疫原ポリペプチド（たとえば、N P、G P、Z P および / またはリボ核タンパク質（R N P））を指す。

【 0 1 1 5 】

一部の実施の形態において、L C M V のペプチドマーカは、診断用に、たとえば、生体サンプルにおける L C M V に対する抗体を検出するために、用いることができる。

10

【 0 1 1 6 】

抗原はさらに診断で用いるためのポリクローナルおよびモノクローナル抗体を産出するためにも用いることができる。ポリクローナル抗体は、分離された、もしくは実質的に精製された L C M V 抗原を、または免疫原組成物の一部として（すなわち感染細胞の形で）、哺乳類、たとえばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ラマ、ウマなどに投与することによって産出することができる。免疫性が与えられた抗原からの血清を集めて、抗体をさらに精製することができる。ポリクローナル抗体を産出および処理するための技術は当該技術分野において既知である。

【 0 1 1 7 】

抗体の用語は最も広い意味で用いられ、具体的には、たとえば単一のモノクローナル抗体（作動、拮抗、および中和抗体、免疫性が取除かれた、マウス、キメラ、またはヒト化抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、単一鎖抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、免疫結合体および抗体断片を網羅する。

20

【 0 1 1 8 】

ここで用いられる「モノクローナル抗体」の用語は、実質的に均質の抗体の母集団から得られた抗体を指す、すなわち、少量存在し得る自然に起こる突然変異を除き、母集団を含む個々の抗体は同じである。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原部位に向けられる。さらに、異なる決定基（エピトープ）に向けられる異なる抗体を含むポリクローナル抗体決定基とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対して向けられる。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体に汚染されることなく合成できることで有利である。「モノクローナル」という修飾語により、抗体が実質的に均質な抗体の母集団によって得られる特性を示し、特定の方法による抗体の産出を必要とするものとして解釈されてはならない。たとえば、本発明に従い用いられるべきモノクローナル抗体は、Kohler et al, Nature, 256:495 (1975) によって初めて記載されたハイブリドーマ（マウスまたはヒト）方法によって、または組換え D N A 方法（たとえば、米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号参照）によって作成することができる。「モノクローナル抗体」は Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) および Marks et al, J. Mol. Biol, 222:581-597 (1991) に記載されている技術を用いてファージ抗体ライブラリから分離できる。

30

【 0 1 1 9 】

「抗体断片」または「抗原結合断片」は、完全な抗体の一部、好ましくは抗原結合またはその可変領域を含む。抗体断片の例は、完全長ではない抗体、F a b、F a b₂、F (a b)₂、および F v 断片；二重特異性抗体、線形抗体、単一鎖抗体分子；単一鎖抗体、単一ドメイン抗体分子、融合タンパク質、組換えタンパク質、および抗体断片から形成された多数特異的抗体を含む。

40

【 0 1 2 0 】

対象の抗原、たとえば L C M V 抗原またはマーカを「結合する」抗体は、その抗体が抗原を発現している細胞をターゲット化する際に治療または診断エージェントとして有用であるよう、その抗原を十分な親和性で結合可能な抗体である。抗体が L C M V 抗原またはマーカを結合するものであるのなら、一般に他の抗原に対して L C M V 抗原またはマーカ

50

を優先的に結合し、非特異的 F c コンタクトといった偶発的結合や他の抗原に共通の翻訳後の変形に結合するものを含まず、他のタンパク質と著しく交差反応しないものである。対象の抗原を結合する抗体を検出するための方法は、当該技術分野において周知であり、FACS、細胞 ELISA およびウェスタンブロットといった分析を含むが、これらに限定されない。

【0121】

ヒトでない（たとえばマウスの）免疫グロブリンの「ヒト化」および／または「キメラ」フォームは、特定のキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（たとえば、Fv、Fab、Fab₂、F(ab)₂または抗体の他の抗原結合配列）を含む抗体を指し、ヒト抗マウス抗体（HAMAs）、ヒト抗キメラ抗体（HACAs）、またはヒト抗ヒト抗体（HAHAs）反応が、元の抗体と比べて減少する結果となり、所望の効果を再現するのに必要な前記非ヒト免疫グロブリンに由来する必要な部分（たとえば、CDR、抗原結合領域、可変ドメインなど）を含みながら、前記非ヒト免疫グロブリンに匹敵する結合特性を同時に保持する。大部分において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエント抗体の相補性決定領域（CDR）からの残基は、所望の特異性、親和性および容量を有する、マウス、ラットまたはウサギといった非ヒト種（ドナー抗体）の CDR からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンの Fv フレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト FR 残基に置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体または挿入された CDR もしくは FR 配列のどちらにも見出されない残基を含み得る。これらの修飾は抗体パフォーマンスをさらに精製および最適化するために行なわれる。一般に、ヒト化抗体は少なくとも 1 つ、および典型的には 2 つの可変ドメインのうちの実質的にすべてを含み、CDR 領域のすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリンのものと対応し、FR 残基のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリン共通配列のものである。ヒト化抗体は任意に免疫グロブリン不変部領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含む。場合によっては、ここに開示されている抗体はヒト化することができる。

【0122】

本願において、ハイブリドーマ細胞株、およびそれから産出されるモノクローナル抗体は、その内部的名称、たとえば M59、M87、M166 および MJ3、またはその寄託名称 LMBP 9216CB (M166) および LMBP 9217CB (MJ3) で呼ばれる。

【0123】

ここで用いられる「免疫接合」は、レポータ部分に化学的にまたは生体的に結合される、抗体または抗体断片といった任意の分子を意味する。抗体はそのターゲットに結合できる限りにおいて、分子に沿ったどの場所でもレポータ部分にリンクすることができる。

【0124】

モノクローナル抗体は、上記のように、LCMV 抗原またはその断片での免疫化の後、生成することができる。正常な B 細胞を含む免疫が付けられた動物の脾臓は、Kohler および Milstein (1975 年) が開発したプロシージャによって本質的にミエローマ細胞に融合させることができ、生成したハイブリドーマをスクリーニングして、さまざまな免疫検出方法を用いて特異的抗体を産出することができる。特異的モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ媒体の形で、またはタンパク質 A/G セファロース上の親和クロマトグラフィによって精製された形で得ることができる。抗体分子断片、たとえば F(ab)₂、Fv、および sFv 分子は、既知の技術を用いて産出することができる。代替的に、ファージ表示システムを用いてインビトロでモノクローナル抗体分子母集団を同定および伸長させて、および／または抗体の免疫学的特性を向上させることができる。

【0125】

1 つ以上の LCMV ペプチドまたは LCMV ペプチド断片を特異的に検出するのに適する組成物は、抗体および／または抗体断片を含むが、これに限定されない。場合によっては、「抗体」の用語は、ある分子、その断片（Fab₂、Fab、Fv、sFv、ミニ体、および他の機能性断片）、そのハイブリッド（キメラ）または二重特異性変異体であ

って、対象の抗原および／またはエピトープに特異的に結合するものを指す。この用語は、ポリクローナルおよびモノクローナルの調製の両方によって得られる抗体を含む。場合によっては、抗体または抗体断片はヒト化することができる。

【 0 1 2 6 】

場合によっては、１つ以上のＬＣＭＶペプチドまたは断片を検出するための組成物は、たとえばここに開示されている１つ以上の抗体、たとえば１つ以上のＭ８７、Ｍ５９、Ｍ１６６および／またはＭＪ３の、重鎖および／または軽鎖可変領域、またはその部分を含む（たとえば、からなる、本質的に～からなる、または備える）ことができる。たとえば、組成物は、Ｍ８７、Ｍ５９、Ｍ１６６およびＭＪ３の重鎖および軽鎖可変領域またはその部分を含むことができる。代替的に、組成物はＭ８７、Ｍ５９、Ｍ１６６およびＭＪ３の重鎖可変領域またはその一部、ならびにＭ８７、Ｍ５９、Ｍ１６６およびＭＪ３の軽鎖可変領域またはその一部を含み、重鎖可変領域および軽鎖可変領域は同じ抗体から由来しない。場合によっては、組成物はＭ８７、Ｍ５９、Ｍ１６６および／またはＭＪ３のうちの１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）を１つ以上含むことができる（たとえば、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３のうちの１つ以上の）。たとえば、異なる抗体からのＣＤＲを組合せることができる。

10

【 0 1 2 7 】

場合によっては、１つ以上のＬＣＭＶペプチドまたは断片を検出するための組成物は、抗体Ｍ８７（すなわち、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７４）の重鎖可変領域、またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７４に対して５０％以上の同一性（たとえば、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％の同一性）を有するアミノ酸配列を含む（たとえば、からなる、本質的に～からなる、または備える）ことができる。場合によっては、１つ以上のＬＣＭＶペプチドまたは断片を検出するための組成物は、たとえば、以下に記載される、少なくとも１つ（たとえば１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０未満、４０未満、５０未満、または１００未満）の保守的アミノ酸置換を含む抗体Ｍ８７（すなわち、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７４）の重鎖可変領域を含む（たとえば、からなる、本質的に～からなる、または備える）ことができる。たとえば、場合によっては、組成物は抗体Ｍ８７（すなわち、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７４）の重鎖可変領域を含むことができ、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３に対応する領域は、少なくとも１つ（たとえば１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０未満、４０未満、５０未満、または１００未満）の保守的アミノ酸置換を含むことができ、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２および／またはＣＤＲ３に対応するものの外の領域（たとえばフレームワーク領域（すなわち、ＦＲ１、ＦＲ２、および／またはＦＲ３））は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７４の対応する領域に対して５０％以上の同一性（たとえば、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％、９９％、または１００％の同一性）を有する。場合によっては、１つ以上のＬＣＭＶペプチドまたは断片を検出するための組成物は、抗原Ｍ８７（すなわち、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７４）の重鎖可変領域のＣＤＲ３、および／またはＭ８７（すなわち、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７４）の重鎖可変領域のＣＤＲ２、および／またはＭ８７（すなわち、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：７４）の重鎖可変領域のＣＤＲ１を含むことができ、ＣＤＲ３、２、１のいずれかは、任意に少なくとも１つ（たとえば１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、３０未満、４０未満、５０未満、または１００未満）の保守的アミノ酸置換を含む（たとえば、からなる、本質的に～からなる、または備える）ことができる。

20

30

40

【 0 1 2 8 】

場合によっては、１つ以上のＬＣＭＶペプチドまたは断片を検出するための組成物は、ＬＭＰＢ ９２１６ＣＢ（Ｍ１６６）および／またはＬＭＢＰ ９２１７ＣＢ（ＭＪ３）を含む（たとえば、からなる、本質的に～からなる、または備える）ことができる。

50

【0129】

ここで用いられる、「細胞」、「細胞株」および「細胞培養」の表現は置き換え可能に用いられ、これらの表現すべては子孫を含む。すべての子孫は、故意のまたは故意でない突然変異により、DNA内容において正確に同一でないかもしれないことは理解されるであろう。元の形質転換された細胞でスクリーニングされた同じ機能または生体活性を有する突然変異体子孫が含まれる。これは異なる名称が意図されているコンテキストから明らかとなる。

【0130】

1つ以上のLCMVペプチドまたはLCMVペプチド断片を特異的に検出するのに適切な他の組成物は、抗原結合ペプチドを含むことができる。このようなペプチドは、1つ以上のLCMVペプチドまたはLCMVペプチド断片に特異的に結合する。場合によっては、このようなペプチドはここに開示されている抗体（たとえば、1つ以上のCDR1、CDR2、CDR3）の相補性決定領域（CDR）を含むことができる。

【0131】

場合によっては、1つ以上の抗体は、1つ以上の保守的アミノ酸置換を挿入することにより、修飾することができる。

【0132】

「必須ではない」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型配列から変えることから変えることができる（その活性をなくすまたは実質的に変えることがない）残基である。「必須の」アミノ酸残基は、ポリペプチドの野生型配列から変えられると、ポリペプチド活性をなくすまたは実質的になくすことをもたらす残基である。

【0133】

「保守的アミノ酸置換」は、アミノ酸置換が類似した側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらファミリーは、基本側鎖を有するアミノ酸（たとえば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖（たとえばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極側鎖（たとえばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、無極性の側鎖（たとえばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（たとえばトレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（たとえばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。

【0134】

一部の実施の形態において、ここで用いられる「必須」アミノ酸残基は、必須アミノ酸の保守的置換を含む。一般に、「必須の」アミノ酸残基は、アルファヘリックスの相互作用面で見出される。

【0135】

アルファヘリックスの「相互作用面」は、他のアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基を含む。この場合、相互作用面は、LCMVで相互作用するアミノ酸を含む。ペプチドの相互作用面を同定するための方法は当該技術分野において既知である（たとえば、Brogia et al, Protein sci., 14(10):2668-81, 2005; Hammond et al., J. Pharm. Sci., 98(1):4589-603, 2009; Ng and Yang, J. Phys. Chem. B., 111(50): 13886-93, 2007; およびBird et al, PNAS USA, 197: 14093, 2010参照）。一部の実施の形態において、ここに記載の任意のペプチドのアミノ酸配列は、相互作用面の残基がSAH-p53-8のものと同じであるか、またはその保守的置換である限り、変形することができる。

【0136】

一部の実施の形態において、1つ以上のLCMVペプチドまたはLCMVペプチド断片を特異的に検出するのに適する組成物は、たとえば、アミノおよび/またはカルボキシル末端ラベルまたは部分（たとえば、検出可能な部分）を含むよう、変形することができる。例示的部分は、蛍光部分（たとえば、蛍光プローブ（たとえばフルオレセインまたはローダミン））、金属キレート化基、放射性同位体または放射性同位体をキレート化できる

10

20

30

40

50

部分（たとえば、メルカプトアチセルトリグリシン、またはR e、I nもしくはYの放射性同位体にキレート化された1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロデカン - N, N, N, N - テトラ酢酸（D O T A））、ターゲット化された部分、ビオチン部分、t a tタンパク質、親和標識、脂肪酸由来アシル基、および他の態様ではペプチドにない他の検出可能な部分、および/またはここに開示されている方法に存在する他のペプチド（たとえば、天然のペプチド）、または使用されるべき他のペプチド（たとえば、L C M Vペプチドもしくはその断片、またはL C M Vペプチドもしくはその断片を検出するためのペプチド）を含むが、これらに限定されない。アミノおよび/またはカルボキシル末端部分を有するペプチドを調製するための方法は、型通りのものであり、当該技術分野において既知である。「標識」は、放射性同位体、蛍光染料、化学発光の染料、発色団、金属イオン、金属塩類、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害剤、アダプター（ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン）などといった検出可能な分子を指す。

10

20

30

40

50

【0137】

当業者なら、2つの核酸またはアミノ酸の特定をどのように決定するかについては理解しているであろう。たとえば、同定が最も高いレベルにあるよう、2つの配列を並べた後に、同定を計算することができる。たとえば、核酸の同定は、Zuker, Science 244:48-52 (1989); Natl. Acad. Sci. USA 86:7706-10 (1989); および Jaeger et al, Methods Enzymol. 183 :281-306 (1989)で開示されているアルゴリズムを用いて定めることができる。これは、少なくとも核酸整合に関するその試料について、ここに引用により援用する。任意の方法を典型的に用いることができ、特定の状況では、これらさまざまな方法の結果は異なることは理解されるべきであるが、当業者なら、これら方法の少なくとも1つの方法で求められる同定のレベルがわかれば、配列は示される同定を有するものであり、ここに開示されることを当業者なら理解するであろう。

【0138】

本発明のペプチドは、当業者にとって周知である化学合成方法によって作成することができる。たとえば、Fields et al, Chapter 3 in Synthetic Peptides: A User's Guide, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, 第77頁参照。こうして、ペプチドは固相合成の自動化されたメリフィールド技術を用いて合成することができ、- N H₂はたとえばApplied Biosystems Peptide Synthesizerモデル430Aあるいは431で、側鎖保護アミノ酸を用いてt - B o cまたはF m o c化学作用のどちらかで保護される。

【0139】

ここに記載されているペプチドを作成する1つの態様として、固相ペプチド合成（S P P S）を用いることである。C末端アミノ酸は、リンカー分子を有する酸に不安定な結合を介して、交差結合ポリスチレン樹脂に接続される。この樹脂は合成に用いられる溶媒には溶けないので、過剰な試薬および副産物を洗い流すのは相対的に簡単かつ速くなる。N末端基はF m o c基で保護され、これは酸において安定しているが、塩基によって除去可能である。側鎖官能基は塩基が安定している、酸不安定基で保護される。

【0140】

在来の化学の連結反応を用いて、個々の合成ペプチドを結合することにより、より長いペプチドを作成することができる。代替的に、周知の組換えDNA技術によって、より長い合成ペプチドを合成することができる。このような技術は詳細なプロトコルでもって周知の基準マニュアルに示される。本発明のペプチドをエンコードする遺伝子を構成するために、アミノ酸配列は逆翻訳されて、アミノ酸配列をエンコードする核酸配列を得るが、これは好ましくは遺伝子が発現するべき有機体に最適なコドンに伴う。次に、合成遺伝子が作成され、これはペプチドをエンコードするオリゴヌクレオチドおよび必要なら他の調節要素を合成することによって典型的に作成される。合成遺伝子は適切なクローンベクトルに挿入され、宿主細胞へ移入される。次にペプチドは選択された発現システムおよび宿主に適する適切な条件下で発現される。ペプチドは精製され、標準の方法で特徴付けられる。

【 0 1 4 1 】

ペプチドは、たとえばAdvanced Chemtechから入手可能な高いスループットのマルチチャンネル組合せ測定系シンセサイザを用いて、高いスループットの組合せ測定系の態様で作成できる。

【 0 1 4 2 】

ペプチドはさらに多様なシステムと昆虫、哺乳類、バクテリア、ウイルス、および酵母発現系ならびに細胞を含む宿主細胞とで発現（たとえば、組換え発現）でき、すべては当該技術分野において周知である。

【 0 1 4 3 】

上記のシステムで使用する適切な宿主細胞のいくつかも既知である。たとえば、哺乳類細胞株は、細胞培養収集から得られる不死化細胞株、たとえばCHO、HeLa、COS、MDCKなどを含むが、これらに限定されない。

【 0 1 4 4 】

調製の後、定例の方法を用いてペプチドを解析し、たとえばその配列、結合親和性、および安定性を（インビトロおよびインビボで）確認することができる。

【 0 1 4 5 】

一部の実施の形態において、ここに開示されている1つ以上の組成物は、固体支持体に取り付けることができる。「固体支持体」の用語は、巨大分子、たとえば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチドを接続することができる固体表面を指すが、マイクロプレートウェル、セファロース/アガロースマトリックス、磁気ビーズ、スライドガラス、ナイロン、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース膜、シリカプレートなどを含むが、これらに限定されない。さらに、固体支持体は、細胞表面で晒されるまたは細胞質内に存在するLCMV抗原を含む培養されたまたは組織の試料における感染細胞によって表わすことができる。

【 0 1 4 6 】

「免疫複合体」の用語は解析設定において抗体を抗原に結合することによって形成される分子複合物を指す。さらに生体サンプルにおいてウイルスリボ核タンパク質および免疫グロブリンを含む自然に発生する多重分子合成物を指す。

【 0 1 4 7 】

診断方法

本開示はサンプルにおけるLCMVを検出する方法を示し、ここに開示されているLCMVを検出するための組成物を1つ以上用いる（たとえば、1つ以上のプローブもしくはプライマー、および/または1つ以上のLCMVペプチドもしくはLCMVペプチド断片、および/または1つ以上のLCMVペプチドもしくはLCMVペプチド断片を検出するための1つ以上の組成物（たとえば、1つ以上の抗体または抗体断片）を用いる。

【 0 1 4 8 】

LCMV抗原/エピトープに対する抗体を用いて、生体サンプルにおけるLCMVタンパク質またはリボ核タンパク質の存在を検出することができ、これはたとえば異なる免疫学的測定法または分子方法と組合せられた免疫学的測定法を用いて行なう。免疫学的測定法は1つ以上の抗体を使用することができ、プロトコルは異なるフォーマットを含むことができ、これは直接反応、挟持、競合、免疫沈澱、免疫プロットティングなどを含む。さらに、免疫PCRフォーマットにおける増幅プロシージャと組合せることができ、増幅テンプレートはウイルスRNAによって、または抗体/抗原もしくはディテクタに結合されたオリゴヌクレオチドによって表わされる。このようなプロシージャは当該技術において既知である。

【 0 1 4 9 】

診断分析は、ウイルス抗原または抗ウイルス抗体のどちらかを検出し得る。解析は、免疫沈澱（IP）、免疫プロット法（IB）、IBと組合せたIP、酵素標識免疫測定法、ビオチン/アビジン型アッセイ、PCR、免疫PCRなどを含み得る。検出は一般に蛍光、化学発光、放射性の標識、酵素標識、もしくは色素分子、または増幅用のオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドといったラベルの曝露を含んで、標識が付けられた産出物を生成する。

【0150】

解析は抗原 - 抗体複合体が結合される固体支持体（キャプチャなしまたはキャプチャあり）から液相の結合されていない抗体または抗原の分離を含む。次に、抗原 - 抗体複合体は、ラベルと相互作用または接合されたディテクタで検出される。

【0151】

典型的に、固体支持体は最初はキャプチャと反応させられる。次に、固定化されていない成分は洗浄により取除かれ、固体支持体 - 結合成分は適切な条件下で生体サンプルと接触させられる。結合されていない材料を取除くための洗浄の後、第2のバインダ部分、すなわちディテクタは、適切な結合状態の後加えることができる。ディテクタの存在は、当該技術分野において周知の技術を用いて検出することができる。代替的に、ディテクタは標識の付けられた競合分子と同時に加えられて、競合の度合はサンプルに存在するディテクタの量を示すことができる。

【0152】

図8および図9に示されるように、アッセイのいくつかの異なる変形を行なうことができる。図8は、LCMV抗原または抗体のどちらかを用いる例示的免疫検出テストの組成物を示す。

【0153】

Aシリーズのアッセイでは、個々のウイルス抗原またはその混合は、生体サンプルからの抗/LCMV抗体が結合するキャプチャとして働き、次にさまざまなディテクタまたはその組合せで検出される。A1変異体では、標識が直接付けられているタンパク質A/Gによって表わされる。A2変異体では、ディテクタは直接標識が付けられている二次的抗ヒト（または抗マウスまたは他の動物スピーシーズに特異の）IgGまたはIgMによって表わされる。A3変異体では、ディテクタ抗体はビオチンで接合され、これはアビジン/ストレプトアビジンによってさらに結合され、次に標識 - 接合ビオチンで示される。A4変異体では、二次的抗体がオリゴヌクレオチドで結合され、これは標識の付けられたトリヌクレオチドの存在下で対応するプライマーによって増幅することができる。A5変異体では、二次的抗体はビオチンで接合され、これはアビジン/ストレプトアビジンとオリゴヌクレオチドで結合されたビオチンと反応させられ、これは標識の付けられたトリヌクレオチドの存在下で対応するプライマーによって増幅することができる。

【0154】

Bシリーズのアッセイでは、NP、GP（たとえばGPC、GP1）および/またはZPに特異的な抗体は固相に取付けられ、生体サンプルからのLCMV抗原が結合するキャプチャとして働き、次に競合しない抗体または抗体/関連ディテクタで検出される。B1変異体では、ディテクタは標識で直接接合されるLCMV抗原 - 特異抗体によって表わされる。B2変異体では、ディテクタは直接標識が付けられている抗ヒト（または抗マウスまたは他の動物スピーシーズに特異の）IgGまたはIgMによって表わされる。B3変異体では、ディテクタ抗体はビオチンで接合され、これはアビジン/ストレプトアビジンによってさらに結合され、次に標識 - 接合ビオチンで示される。B4変異体では、二次的抗体がオリゴヌクレオチドで結合され、これは標識の付けられたトリヌクレオチドの存在下で対応するプライマーによって増幅することができる。B5変異体では、二次的抗体はビオチンで接合され、これはアビジン/ストレプトアビジンとオリゴヌクレオチドで結合されたビオチンと反応させられ、これは標識の付けられたトリヌクレオチドの存在下で対応するプライマーによって増幅することができる。

【0155】

一部の実施の形態において、当該方法は被験者を選択することを含む（「被験者」は本明細書において動物、ヒト、またはヒトではないものを示すために用いられている。ヒトおよび獣医の用途両方が意図される。この用語は、たとえばヒトといった哺乳類、他の霊長類、ブタ、ハツカネズミやラットといったげっ歯類、ラビット、モルモット、ハムスター、メウシ、ウマ、ネコ、イヌ、ヒツジおよびヤギを含む）。たとえば、LCMV感染の

10

20

30

40

50

リスクがある被験者またはLCMVを罹っていると疑われる被験者を選択することができる。代替的にまたは付加的に、LCMVによって引起される害により晒されやすくなる状況または疾病を有する被験者を選択することができる。このような被験者は、妊娠する予定のあるまたは妊娠している被験者、免疫不全被験者、移植レシピエント、および癌を発症するリスクのあるまたは癌を患っている被験者を含むことができる。一部の実施の形態において、被験者が低酸素症を示すことが知られる症状を有する被験者が選択される。

【0156】

一部の実施の形態において、選択の後、サンプルを被験者から得ることができる。そのサンプルはここに開示されているLCMVを検出するための1つ以上の組成物（たとえば1つ以上のプローブもしくはプライマー、および/または1つ以上のLCMVペプチドまたはLCMVペプチド断片）、および/または1つ以上のLCMVペプチドまたはLCMVペプチド断片を検出するための1つ以上の組成物（たとえば1つ以上の抗体または抗体断片）と接触させられる。場合によっては、当該方法は被験者にLCMVが検出された場合には、LCMV感染の治療、または治療を被験者に推奨することを含むことができる。

10

【0157】

当該方法は、治療の効能を定めるために、治療の途中および後で患者をモニタまたは評価すること、および必要なら治療の効果を向上させるために治療を調整することを含むことができる。

【0158】

キット

20

本開示は、ここに開示されているLCMVを検出するための1つ以上の組成物を含むキットを示す。当該キットは、組成物および組成物を用いる方法に関連する情報材料をも含むことができる。この情報材料は、ここに開示されている組成物および方法に関連する記述的、指示的、または販売に関する、または他の材料であり得る。

【0159】

キットの情報材料はその形は制限されていない。多くの場合、情報材料（たとえば指示）は印刷物、たとえば印刷された文字、図面、および/またはラベルや印刷された紙の写真で提供される。しかし、情報材料は他のフォーマット、たとえば点字、コンピュータ読取可能材料、映像記録、またはオーディオ記録で提供される。もちろん、情報材料はフォーマットの任意の組合せで提供することができる。

30

【0160】

化合物に加えて、キットの組成物は他の成分、たとえば溶剤または緩衝剤、安定剤、保存料、および/またはここに記載されている症状または疾患を治療する第2の薬剤を含むことができる。代替的に、他の成分は、その化合物とは異なる組成物または容器で、キットに含むことができる。このような実施の形態において、キットは薬剤および他の成分を混合するための指示、および1つ以上の化合物を他の成分とともに使用する指示を含むことができる。

【0161】

ここに開示されている配列はオンラインで公開されている、たとえばNational Center for Biotechnology Information (NCBI)のウェブサイト(ncbi.nlm.nih.gov参照)で、さらに以下の文献において公開されている：

40

LCMV strain MX GPC gene, NCBI Accession no. EU195888 (EU195888.1) and Tomaskova, J et al, Virus Genes, 37:31-38 (2008);

LCMV strain MX NP gene, NCBI Accession no. Y16308 (Y16308.1) and Reiserova, L. et al, Virology 257:73-83 (1999);

LCMV strain MX Z gene, NCBI accession no. AJ131281 (AJ131281.1) and Gibadulinova, A. et al, Acta Virol., 42:369-374 (1998);

LCMV strain Armstrong 53b - S segment, NCBI accession no. M20869 (M20869.1) and Salvato, M. et al, Virology, 164:517-522 (1988);

LCMV strain Armstrong 53b -LS segment, NCBI accession no. AY847351 (AY847351.1)

50

) and Grande-Perez, A. et al, J. Virol., 79: 10451-10459 (2005);
 LCMV strain CH-5692 - S segment, NCBI accession no. AF325214 (AF325214.1);
 LCMV strain CH-5692 - L segment, NCBI accession no. DQ868484 (DQ868484.1);
 LCMV strain CH-5871 - S segment, NCBI accession no. AF325215 (AF325215.1) and Asper, M. et al., Virology, 284:203-213 (2001);
 LCMV strain Traub - S segment, NCBI accession no. DQ868487 (DQ868487.1);
 LCMV strain Traub - L segment, NCBI accession no. DQ868488 (DQ868488.1) and Emonet, S. et al, Genetic comparisons and evolution of 6 LCMV strains;
 LCMV strain LE GPC gene, NCBI accession no. EF164923 (EF164923.1) and Meritet, J.F. et al., Human Fetal Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection with a New Genomic Variant;
 LCMV strain M1 - S segment, NCBI accession no. AB261991 (AB261991.1);
 LCMV strain M2 - S segment, NCBI accession no. AB261990 (AB261990.1) and Ike, F. et al, Comp. Med. 57:272-281 (2007);
 LCMV isolate Marseille #12 - S segment, NCBI accession no. DQ286931 (DQ286931.1);
 LCMV isolate Marseille #12 - L segment, NCBI accession no. DQ286932 (DQ286932.1) and Emonet, S. et al, Emerging Infect. Dis., 13:472-475 (2007);
 LCMV strain WE - S segment, NCBI accession no. M22138 (M22138.1) and Romanowski, V. et al, Virus Res., 3:101-114 (1985);
 LCMV strain WE - S segment, NCBI accession no. AF004519 (AF004519.1) and Djavani, M. et al, Virus Genes, 17: 151-155 (1998);
 LCMV strain Bulgaria - S segment, NCBI accession no. GQ862982 (GQ862982.1);
 LCMV strain Bulgaria - S segment, NCBI accession no. GQ862981 (GQ862981.1) and Palacios, G. et al, Genetic diversity of Lymphocytic choriomeningitis viruses;
 LCMV strain Y - S segment, NCBI accession no. DQ1 18959 (DQ1 18959.1) and Compton, S.R., Lymphocytic choriomeningitis virus strain Y; および
 NCBI accession nos. FJ607019-FJ607038, 13-JUL-2010, Albarino, C.G. et al, Emerging Infect. Dis., 16: 1093-1100 (2010).

【実施例】

【0162】

本発明は以下の実施例においてさらに記載されており、これはクレームに記載の本発明の範囲を限定するものではない。

【0163】

実施例1：LCMVの多種多様な株/分離株間に配列保守領域が存在する

多様な地理的および時間的な源から集められた29 LCMV株の最近のゲノム分析は、これらのウイルスが多種多様であることを示した。いくつかの異なる系列があるが、分離について時間や場所の相関は少ない(Albarino他2010年)。既知のLCMV分離株すべてのSおよびLセグメント配列は、3つ(Lセグメント)または4つ(Sセグメント)の異なる遺伝子グループまたは系列で分散された。Sセグメント系列間では25%までのヌクレオチド変異、およびLセグメント系列間では28%の変異が観察された。このヌクレオチド変異は、Z、L、GPCおよびNPタンパク質のアミノ酸配列においてそれぞれ18%、13%、10%、および6%の変異に翻訳される(Albarino他2010年)。しかし、異なる株/分離株間でかなりの配列同一性の領域があり(図2から図7参照)、さ

らに抽出された抗原は L C M V - 特異抗体に対して交差反応を示した。

【 0 1 6 4 】

これらの観察は、適切な分子および免疫検出技術を用いて複数の L C M V 株および / または分離株を検出できることを裏付ける。

【 0 1 6 5 】

実施例 2 : 低酸素状態は持続性感染から L C M V を再活性化させる

L C M V M X 株 (H e L a - M X) で持続的に感染させられた H e L a 細胞は 4 8 時間、正常酸素状態 (2 1 % O 2) または低酸素状態 (2 % O 2) でインキュベートされた。H e L a - M X 細胞の別の母集団は、酸素正常状況下で 2 4 時間 1 m M の D M O G (低酸素を模倣するエージェント) で処理された。

10

【 0 1 6 6 】

R T - P C R

細胞内の総 R N A は、メーカーの指示に従い InstaPure 試薬で抽出された。逆転写は任意の七量体プライマーを用いて M - M u L V 逆転写構造で行なわれた。ウイルス遺伝子発現のレベルは、定量リアルタイム P C R によって分析され、これは POWER SYBR (登録商標) Green PCR Master Mix および以下の遺伝子特異プライマーを用いて、StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.) で行われた :

NP (246 base pair (bp) PCR product):

Forward: 5' - GATCAGAAACAGTTCAAACAGGACT-3' (SEQ ID NO: 58)

Reverse: 5' - GTCCACACTTTGTCTTCATACTCT-3' (SEQ ID NO:59) GP (25 lbp PCR product):

20

Forward: 5' - AACCAGTGCAGAACTTTTAGAGGTA-3' (SEQ ID NO: 60)

Reverse: 5' - GCAAGTCTTCTAGTGAGGAACCTTTG-3' (SEQ ID NO:61) ZP (272bp PCR product):

Forward: 5' - CCTGTGAGAGTACAGAGACAAACCT-3' (SEQ ID NO:62)

Reverse: 5' - GATATCTTCAGCTTGGTTGGTAATG-3' (SEQ ID NO:63) -actin (236bp PCR product):

Forward: 5' - CCAACCGCGAGAAGATGA-3' (SEQ ID NO: 64)

Reverse: 5' - GATCTTCATGAGGTAGTCAGT-3' (SEQ ID NO:65)

各遺伝子について、- アクチンを内因的コントロールとして用いて、酸素正常コントロールからの値との比較で誘導倍率が定められた。

30

【 0 1 6 7 】

図 1 0 A および図 1 0 B に示されるように、低酸素状況および D M O G は、R T - P C R で評価されたように、酸素正常状況に対して、テストされたすべての L C M V タンパク質 (すなわち、N P、Z P および G P) をエンコードする mRNA の発現を増加させた。コントロール (- アクチン) では変化が観察されなかった。

【 0 1 6 8 】

低酸素状態は転写レベルでウイルス遺伝子に影響することを証明するために、5' c D N A 末端 (R L M - R A C E) の R N A リガーゼを介在した迅速増幅は GeneRacer 法を用いて行なわれ、これは 5' 標識転写の選択的増幅を可能にし、標識のないゲノム / 抗ゲノム L C M V R N A テンプレートをなくす。

40

【 0 1 6 9 】

M X L C M V の 5' 標識転写の選択的増幅は、メーカー (Invitrogen, Life Technologies) の指示に従い GeneRacer T M キットを用いて行なわれた。酸素正常状態および低酸素状態の H e L a - M X 細胞から分離された R N A の R L M - R A C E で用いられた L C M V - M X 遺伝子特異プライマーを以下に挙げる :

NP gene

5' RACE reverse primer: CAAGGTCGGCAGCGAGAGACATCA (SEQ ID NO:66)

5' RACE nested reverse primer: AGAAGGCTAGTTGCGTCCTTGATG (SEQ ID NO:67)

GP gene

50

5' RACE reverse primer: GGCTGAACATGCATTGGGCATTGT (SEQ ID NO:68)

5' RACE nested reverse primer: TAGGAGAAGGAAGCTGACCAATGC (SEQ ID NO:69)

L gene

5' RACE reverse primer: TCCTGGACACACAACCTCCGGACTCTA (SEQ ID NO: 70)

5' RACE nested reverse primer: ACAGCCACTTTTGTCTGCACTGTC (SEQ ID NO:71)

Z gene

5' RACE reverse primer: CTTCGTAGGGAGGTGGTGGGCTTG (SEQ ID NO:72)

5' RACE nested reverse primer: AGTTCAGTGGACCGAGATAGGTGGT (SEQ ID NO:73)

- アクチンは、キットに含まれるプライマーを用いた内部基準および R L M 品質のコントロールとして用いられた。もたらされる P C R 断片は 1 . 5 % のアガロースゲルで行なわれ、その特異性はシーケンシングにより、および独立した遺伝子特異プライマーでの再度増幅により、検証された。個別の P C R 産出物に対応するバンドの強度は、Syngene 社からの GeneTools Software で評価された。遺伝子特異 P C R 産出物の量は、対応する - アクチン内部基準の強度に対する各 L C M V - 特異バンドの強度の比率として、準定量的に表わされた。キットに含まれる商業 H e L a 総 R N A は、C I P および T A P 酵素の活性に対するコントロールとして、 - アクチン増幅のために用いられた。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 0 】

図 1 0 D に示されるように、低酸素状態 (2 % O₂) 対酸素正常状態の H e L a - M X 細胞から分離された総 R N A で行なわれた R L M - R A C E の準定量評価結果は、低酸素状態がウイルス転写に影響することを示唆する上記 R T - P C R データ (図 1 0 A 参照) と一致していた。

【 0 1 7 1 】

免疫プロットティング

1 0 0 万の H e L a - M X はペトリ皿にプレートされ、一晚定着するために放置され、次に酸素正常状態および低酸素状態下で 4 8 時間インキュベートされた。細胞は溶解バッファ (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate および 1x Complete protease inhibitor cocktail [Roche, Mannheim, Germany] in PBS) で分裂され、総タンパク質濃度はメーカーの指示に従い B C A アッセイ (Pierce, Rockford, IL, USA) によって定められた。総タンパク質抽出物 (1 0 0 μ g / レイン) は減少条件下で S D S / P A G E によって分けられ、P V D C 膜 (ImmobilonTM, Millipore, Billerica, MA, USA) 上にプロットされ、特異抗体を用い検出され、この検出は、N P (マウスモノクローナル抗体 M 5 9)、Z タンパク質 (マウスモノクローナル抗体 M J 3)、G P 1 (抗ペプチドポリクローナルの抗体)、西洋ワサビペルオキシターゼで接合された適切な二次的抗体が付属する H I F - 1 アルファまたはアルファアクチンに対して、行なわれた。すべての免疫プロットは E C L 検出システムで展開された。

【 0 1 7 2 】

図 1 0 C に示されるように、低酸素状態は酸素正常状態に比べて、テストされたすべての L C M V タンパク質 (すなわち、N P、Z P および G P) の発現レベルを増加させた。コントロール (アクチン) では変化は観察されなかった。

【 0 1 7 3 】

実施例 3 : 低酸素状態によって活性化された L C M V は感染性を有する。

4 8 時間酸素正常状態または低酸素状態で培養された H e L a - M X からのフィルタ処理された媒体を用いて感染していない H e L a 細胞を感染させた。これらの細胞は次に酸素正常状態で培養され、パッセージされ、次にウイルス複製のために評価された。

【 0 1 7 4 】

酸素正常状態 (N O) および低酸素状態 (H Y) 下で培養された H e L a - M X 細胞からの媒体での L C M V ゲノムの存在は、R T - P C R 法によって確認された (図 1 1 A 参照)。さらに、示されている媒体で感染された H e L a 母集団の感染の広がり、最初の 5 つのパッセージにおいて、次に 1 0 のパッセージにおいて R T - P C R 分析が行なわれた (図 1 1 B)。感染の進行は、2 0 倍の倍率で、レシピエント細胞におけるウイルスタ

ンパク質の免疫蛍光検出によってもモニタリングされた(図11C)。実験は2回繰返され、その都度同様の結果が示された。図11Aから図11Cに示されるように、低酸素状態はLCMVの感染性を増加させる。

【0175】

実施例2および実施例3に示されるデータは、培養(実施例1)におけるウイルスNP、ZおよびGP(GP1の発現を含む)遺伝子およびタンパク質の発現を増加させ、感染性ウイルス粒子の形成を引起することを示す(実施例2)。

【0176】

これらのデータは、低酸素状態のリスクを有する被験者におけるLCMVの診断検出が低酸素状態ウイルス遺伝子、抗原に対する抗体の抗原、およびその組合せでの理由を裏付ける。

10

【0177】

実施例4: LCMV NPに特異的に結合する抗体の発生

マウスモノクローナル抗体M59、M166およびM87はLCMV NPに特異的である。これらの抗体はハイブリドーマ技術(KohlerおよびMilstein 1975年)を用いて調製された。

【0178】

BALB/cマウスは 5×10^6 HeLa-MX細胞の3回のドーズで免疫が付けられ、その脾細胞はNS-Oミエローマ細胞で融合された。ハイブリドーマは、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含むDMEM-HAT媒体で選択され、差異ELISAによってNPに対する特異的再活性化についてスクリーニングされ、これはHeLaおよびHeLa-MX細胞の抽出物を抗原として用いた。陽性のハイブリドーマ培養は、希釈を制限することによってクローン化され、伸長され、MAbs産出のために用いられた。

20

【0179】

M59、M166およびM87はすべてLCMV MXからNPを結合し、他のLCMV株のNPと交差反応した。

【0180】

実施例4A: M166の寄託

マウスモノクローナル抗体M166を発現するハイブリドーマ細胞株は、受領番号LMBP 9216CBとして、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) (Universiteit Gent, Vakgroep Moleculaire Biologie-Plasmidicollectie (BCCM(登録商標)/LMBP)に寄託された。

30

【0181】

実施例4B: M87可変領域配列の特徴付け

M87重鎖のアミノ酸配列は以下のように定められ、図12Aに示される。RNAは100万のM87ハイブリドーマ細胞から分離され、任意の六量体プライマーを用いて逆転写された。重鎖可変領域はもたらされるcDNAから増幅され、これはシグナルペプチド/リーダシーケンスに相補であるよう設計された変性フォワードプライマーと(図12参照)、定量ドメインのCH1領域に相補な逆プライマーとが用いられた。増幅は忠実性が高いポリメラーゼを用いて行なわれ、予期される大きさ(cca 400bp)のPCR産物物は電気泳動によって分けられ、ゲルから分離された。線形PCR単位複製配列はpJet1.2ベクトルに結紮され、次にコンピテント大腸菌に形質転換された。結果の形質転換された細胞はスクリーニングされ、選択されたコロニーは制限酵素切断およびシーケンシングによって検証された。M87重鎖可変領域の配列は次のように定められた:

40

mdsrlnlvflvliikgvqcqvqlvesggglvqpggsrklscaasgftfssfgmhwwrqapekglewvayissgsstlhyadtvkgrftisrdnplmtlflqrnkplslcygllgsrnlshrllsqndtpirlsigpwklgi (SEQ ID NO: 74)

M87重鎖可変領域(SEQ ID NO: 74)内において、mdsrlnlvflvliikgvqc(SEQ ID NO: 75)はシグナルペプチド配列であり、gftfssfgmhww(SEQ ID NO: 76)はCDR1であり; issgsstlhyadtvkgrft(SEQ ID NO: 77

50

）はCDR2であり、hrllsqndtpirlsigp (SEQ ID NO: 78) はCDR3ある。
SEQ ID NO: 74の注釈の付いているものは、図12B - 図12Cにある。

【0182】

実施例5: LCMV GP1に特異的に結合される抗体の生成

LCMV MX GP1に対するポリクローナル抗体は以下のように育成された。

【0183】

潜在的B細胞エピトープは、いくつかの利用可能なプログラムを利用して、GPC LCMV MXの全配列を用いて同定された。GP1の領域内でマッピングされるペプチド RSGWGWAGSDGKTT (SEQ ID NO: 41のaa 205-218) (SEQ ID NO: 89) は、GP1特異ポリクローナル抗体の産出のために選択された。親和性精製ウサギポリクローナル抗体は、免疫沈澱およびウエスタンブロッティングによってテストされた。

10

【0184】

実施例6: LCMV ZPに特異的に結合される抗体の生成

マウスモノクローナル抗体MJ3はLCMV ZPに特異的に結合する。ハイブリドーマ技術(とりわけKohlerおよびMilstein)を用いて抗体が生成された。簡単に説明すると、BALB/cマウスは 5×10^6 HeLa-MX細胞の2回のドーズで免疫が付けられ、グルタチオンセファロース4Bに結合される100 μ gのGST-Zタンパク質で高められた。脾細胞のSp2/Oミエローマ細胞との融合は3日後行なわれた。ハイブリドーマはDMEM-HAT媒体で選択され、ハイブリドーマによって産出されたモノクローナル抗体は、ELISAおよび免疫ブロッティングにより、GST-Z対GSTおよびHeLa-MX対非感染HeLa細胞におけるZタンパク質に対する特異的再活性についてスクリーニングされた。ハイブリドーマ培養(MJ3)は制限された希釈でサブクローン化され、伸長され、MAb産出に用いられた。

20

【0185】

MAb MJ3は異なる免疫検出方法を用いてZタンパク質と反応することが示された。

【0186】

実施例6A: MJ3の寄託

マウスモノクローナル抗体MJ3を発現するハイブリドーマ細胞株は、受領番号LMBP 9217CBとして、ベルギーのGhent UniversityのBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM) (Universiteit Gent, Vakgroep Moleculaire Biologie-Plasmidicollectie (BCCM(登録商標)/LMBP)に寄託された。

30

【0187】

実施例7: ヒト被験者における抗LCMV NP抗体の検出

血清サンプルは以下から取得された: (i) 診断された原因のない自然流産の女性; (ii) 満期妊娠の女性; および (iii) 腎細胞癌(RCC)腫瘍を持った腫瘍患者。ヒト血清の抗LCMV抗体は、免疫沈澱およびNP特異モノクローナル抗体での免疫ブロッティングによって分析された。

【0188】

本実施例で用いられるアプローチは非常に感度がよく、急性および慢性/持続性感染の際に産出されたNP特異抗体の検出を可能にする。簡単にいうと、タンパク質G-セファロース(50%スラリー)はPBSで洗浄され、HeLa-MX細胞からの全細胞溶解液と混合されて非特異結合タンパク質をpreclearする。10%FCSを含有する190 μ lのBPSの中の10 μ lのヒト血清が、100 μ lのpreclearされた細胞抽出に加えられた。免疫複合体は一晩4で形成させた。結果の免疫複合体は4で1時間、洗浄されたタンパク質G-セファローススラリーを30 μ l加えることによって沈殿された。ビーズはPBSで5回洗浄され、SDS-PAGEに晒され、ポリ塩化ビニリデンチフルオリドメイン膜上に移された。膜は西洋ワサビペルオキシターゼで接合された精製MAbでプローブされた。付加的洗浄工程の後、免疫プロットはECL検出システムを用いて視認された。

40

【0189】

50

表 1 A - 表 1 B に示されるように、流産した女性の N P 抗体の血清有病率はコントロールと比較して 19.4% 高かった。

【0190】

表 1 A : 自然流産を経験したヒト女性被験者における抗 L C M V N P 抗体の検出

【0191】

【表 1 A】

	流産した女性		流産していない女性	
	人数	%	人数	%
陽性血清	34	75,6	18	56,2
陰性血清	11	24,4	14	43,8
合計	45	100	32	100

10

【0192】

検出された抗体は図 1 3 において免疫プロットとしても示されている。

表 4 に示されるように、N P 抗体の非常に高い血清有病率は、R C C 腫瘍を持つ患者でも観察された。

【0193】

表 1 B : R C C 腫瘍の被験者における抗 L C M V N P 抗体の検出

20

【0194】

【表 1 B】

	腫瘍患者	
	人数	%
陽性血清	25	89,3
陰性血清	3	10,7
合計	28	100

30

【0195】

実施例 7 B : タンデム質量分析によるヒト血清における N P 特異抗体の検出

免疫沈澱および N P 特異モノクローナル抗体での後の免疫プロッティングにより、N P に対して陽性であると示された 1 つのヒト血清は、実施例 7 に記載されているように免疫沈澱された。洗浄の後、免疫複合体はクエン酸塩バッファ (pH 3) で溶出された。溶出物の最終 pH は 1 M の T r i s pH 8.5 を添加することにより調整された。その後、免疫複合体を含む溶出物はタンデム質量分析を受けた。簡単に説明すると、サンプルは減縮 (10 mM ジチオスレイトール)、アルキル化され (55 mM ヨードアセタミド) および 50 重炭酸アンモニウムの中で 20 μ g / ml トリプシンによって一晚 37 で消化された。結果のペプチドはマイクロプレートに移され、凍結乾燥によって乾かされた。抽出されたペプチド混合物は、20 μ l の 2% 水中アセトニトリルの中で、0.1% のギ酸が添加されて溶解され、上記のように (Henrychova et al, 2008)、nanoAcquity UPLC システム (Waters, Milford, MA) によって分離された。データ取得は、同時に 3 M S / M S イベントまで集められた分離値においてデータに依存する態様で行なわれた。データは Protei nLynx Global Server v. 2.4 (Waters) で処理され、バックグラウンド除去法 (5 次多項式およびしきい値 35%)、平滑化 (Savitzky Golay、3 つのチャンネルにわたり 2 回)、およびセントロイディング (トップ、80%、最小の半値幅 4) で処理された。結果のデータは以下の条件に基づき UniProt_LCMV データベースに対してサーチがかけられた: C y s のカルバミドメチル化、可変 M d 酸化、1 つの欠失亀裂を有するトリプシンの断片、ペプチド質量許容差 50 p p m、および断片質量許容差 0.05 D a。結果は、同じシリーズ

40

50

からの3個以上連続する断片イオンの同定により確認された。理論的配列に対して少なくとも2つの一致するペプチドを有するたんぱく質割り当ては陽性の同定であると考えられた。

【0196】

表2に示されるように、分析されたサンプルはLCMV NPと同定された。

表2：UPLC-MSによる免疫複合体におけるNPの同定

【0197】

【表2】

サンプル	受領番号	記述	mW (Da)	pi (pH)	PLGS スコア	ペプチド
MSE3	C3VVN3	Nucleoprotein OS Lymphocytic choriomeningitis virus	62399	8,6614	65,510	4
2. processing	Q9YPM1	Glycoprotein 1 Fragment OS Lymphocytic choriomeningitis virus strain WE	15535	8,4294	282,26	1
	C3VVN3	Nucleoprotein OS Lymphocytic choriomeningitis virus	62399	8,6614	66,551	3
MSE5	Q86867	S RNA product protein Fragment OS Lymphocytic choriomeningitis virus	1596	6,2774	250,47	1

10

20

【0198】

この結果は、テストされたヒト血清はNP特異抗体を含むことを明確に証明した。

実施例8：ヒトRCC被験者の組織内におけるLCMV抗原の免疫検出

LCMV抗原は、免疫化学によってRCC試料で検出された。簡単に説明すると、切取られた組織は4%の中性緩衝ホルマリン内に固定され、標準の組織学の手続に従いパラフィンに包埋された。4つのμm部分はポリリシンが上塗りされたスライド上に置かれ、脱ろうされ、水で戻された。スライドはまずターゲット抽出液で5分間125で組織前処理プロシーダを受けた（パスカル圧力室、Dako Cytomation、カーペンテリア、CA）。残りの免疫染色手続は、Dako Cytomation EnVision(r)+ System-HRP (DAB)を用いて、以下のメーカーの指示に従い、行なわれた：a) ペルオキシターゼおよびタンパク質ブロック（各10分）；b) NP（希釈されていないハイブリドーマ媒体）またはPBS（陰性コントロール）に対して特異的であるプライマリ抗原M59でインキュベートされ；c) 抗体希釈で1：1000に希釈されたペルオキシターゼ-接合ヤギ抗-マウス抗体で30分インキュベートされた。染色は、3,3'-ジアミノベンジジンを発色性基質として1分間DAB溶液で視認された。スライドは、ステップaの後10分間0.1% Tween-20を用いてPBSで洗浄され、ステップbおよびcの後10分間2回洗浄され、さらにDABの視認の後蒸留水で3回洗浄された。インキュベーションおよび洗浄はすべて室温で行なわれた。最後に、当該部分はMayerのヘマトキシリンで対比染色され、5分洗浄され、DePeX (Serva, Heidelberg, Germany)に取付けられた。染色された部分はLeica DM4500B顕微鏡で検査され、Leica DFC480カメラで写真が撮られた。

30

40

【0199】

図14A-Bに示されるように、LCMV抗原はRCC被験者からの組織内で検出された。

【0200】

さらに、LCMV抗原は、免疫沈澱およびNP特異抗体M87での免疫プロットティングにより、RCC試料に検出された。簡単に説明すると、100mgの凍結組織試料は、プロテアーゼの抑制剤(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)を含む氷冷溶解バッファ(1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 50 mM Tris, pH 7.5; 0.5% Nonidet P-40; 50mM NaF

50

)で均質化された。不溶解の物質は4 で15分間12,000gの遠心分離で除去された。MAb M87(1.5ml培養媒体)は、RTで2時間PBS内においてタンパク質G-セフローゼの50%懸濁液30μlに結合された。組織タンパク質の抽出物(200μl)は20μlの50%懸濁液G-セフローゼでpre-clearされて、添加されてMAbを結合した。免疫複合体は一晚4 で形成させられた。ビーズはPBSで6回洗浄され、SDS-PAGEを受け、フッ化ポリビニリデン膜上に移された。膜は西洋ワサビペルオキシターゼで結合された精製MAb M87でプローブされた。付加的洗浄工程の後、免疫プロットはECL検出システムを用いて視認された。

【0201】

図14Cに示されるように、LCMV NPはMAb 87を用いてRCC被験者からの組織に検出された。

【0202】

実施例9：NP特異モノクローナル抗体の分析

NP LCMVに特異なマウスモノクローナル抗体M59、M166およびM87は、ハイブリドーマ技術(KohlerおよびMilstein1975年)によって調製された。簡単に説明すると、BALB/cマウスは 5×10^6 HeLa-MX細胞の3回のドーズで免疫が付けられ、その脾細胞はNS-Oミエローマ細胞で融合された。ハイブリドーマは、ヒボキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含むDMEM-HAT媒体で選択され、差異ELISAによってNPに対する特異的再活性化についてスクリーニングされ、これはHeLaおよびHeLa/MX細胞の抽出物を抗原として用いた。陽性のハイブリドーマ培養は、希釈を制限することによってクローン化され、伸長され、MAbs産出のために用いられた。M59、M166およびM87の各々は、他のLCMV株のNPと交差反応することが示された。

【0203】

MAbsイソタイプは、親和性精製ラビット抗マウスIgG1,IgG2a,IgG2b,IgG3,IgMおよびIgA抗体(Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents, Sigma)を用いて、メーカーの指示に従いELISAによって定められた。M89およびM166 MAbは、IgG2aイソタイプであり、M87 MAbはIgG1イソタイプであることがわかった。

【0204】

抗体はさらに異なる免疫検出方法でテストされた。M59は、ELISA、免疫沈澱および免疫化学においてNPと反応することがわかった。M166は、ELISA、IFAおよび免疫沈澱においてNPと反応することがわかった。M87は、ELISA、免疫沈澱、IFAおよび免疫プロットングにおいてNPに結合することがわかった。これらのデータは、抗体がNP分子の異なるエピトープを認識し、M59およびM166は立体構造のエピトープに向けられており、M87は線形エピトープに結合することを示唆する。これらの抗体の差異エピトープ特異性は、競合結合アッセイによって証明された。

【0205】

簡単に説明すると、MAはまずタンパク質A/Gセファロース上の親和クロマトグラフィで精製され、メーカーの指示に従いNH₂-LC-ビオチン(Pierce)で標識が付けられた。HeLa-MX細胞からの抽出物は、標識の付けられた50%最大結合のMAbに対応する濃度で、マイクロプレートウェルで吸着された。被覆されたプレートは洗浄され、PBSで10%のFCSで飽和された。30μlの精製MAbの一連の5倍希釈と30μlの定量のビオチン化されたMAbとが添加され、4 で一晚培養された。プレートは洗浄され、ペルオキシターゼの標識が付けられたストレプトアビジン(Pierce)はディテクタとして用いられた。

【0206】

結果は図15Aおよび15Bに示される。これらは、M87とM59のMAbの間の競合結合の検査を示す図である。ビオチン標識精製抗体(*)は、標識の付けられていない競合抗体の増加する量の存在下で結合させられた。標識の付けられていない競合物の存在下での標識の付けられた抗体の結合の程度は、競合物がない結合に対するパーセンテージ

10

20

30

40

50

で表わされた。希釈 0 は標識の付けられていない競合抗体の $10 \mu\text{g}$ / ウェルに対応する。これらの結果は同族の競合しか示さないが、標識の付けられた競合物の結合に対する異種阻害は観察されず、M A b は重ならないエピトープに結合することを示唆していた。

【0207】

実施例 10：低酸素状態へのウイルスの反応：パラダイムとしての L C M V アレナウイルス

ウイルス感染細胞の生理学的コンテキストは、ウイルス子孫の増幅および広がり著しい影響を与える。ウイルスが宿主細胞に強く依存し、かつ一般にはその生活機能を損なわない持続的感染の際、低酸素状態といった小さい環境のストレスは、親密なウイルス-宿主関係を壊してウイルス病因を拡大させ得る。累積した証拠は、H I F 転写ファクタによって支配される低酸素状態によって誘起される分子反応は、D N A ステージを通るウイルスの遺伝子発現を変調させ、プロモータに H R E を含み、核内で複製されることを示唆している。我々は、低酸素状態が持続性細胞質 R N A ウイルス感染の出方に影響することを初めて示すことができた。モデルとして、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (L C M V) を用いた。これはその保全性を乱すことなく異なる細胞タイプで持続し、ほとんど不顕性の感染を引起すものである。したがって L C M V は害がないと考えられているが、L C M V に関連した流産や移植レシピエントでの致命的な L C M V 感染は、危険性があることを警告している。L C M V の M X 株はヒト H e L a 細胞において持続したモードで複製し、細胞外の伝染性ビリオンがなければ細胞間態様で広がる。M X 感染 H e L a 細胞を慢性低酸素状態に晒すと、高められたウイルス R N A 転写をもたらし、H I F - 1 依存機構によってより高いレベルのウイルスタンパク質をもたらした。低酸素状態はさらに感染性ビリオンの形成を高め、これは細胞のない媒体を介して L C M V 感染を伝染させる可能性がある。この低酸素状態によって誘起された L C M V の「再活性化」は、たとえば発育している胎児や無症候性のドナーから移植を受けるものにとって、健康を損なう結果をもたらし得る。

【0208】

実施例 11：組換え L C M V - N P 断片のクローン化および発現

L C M V (M X) - N P c D N A の 3 つの重なる断片は、プラスミド p B l u e s c r i p t - N P をテンプレートとして用いて P C R によってクローン化され、括弧内の数字は M X 株の公開された N P 配列に対する場所を示す (G e n B a n k 受領番号 Y 1 6 3 0 8、Reiserova 他 2 0 0 1 年)。

【0209】

アミノ酸 1 - 2 0 5 を含む断片 I は、以下のプライマーを用いて増幅された：NPMXF1S5'-CCGAATTCATGTCTCTGTCCAAGGAAGTCA-3' (46-67) (SEQ ID NO:79) および NPMXF1A 5'-GGCTC GAGGTAAAGCAGACCAAGGTCTGTG-3' (660-639) (SEQ ID NO:80);

アミノ酸 1 9 8 - 3 9 1 を有する断片 I I は、以下のプライマーで増幅された：NPMXF2 S5'-GGGAATTCCTCACAGACCTTGGTCTGCTTT-3' (637-658) (SEQ ID NO:81) および NPMXF2A5'-CCC TCGAGCACTGGATCATTGAACCTACCC-3' (1218-1197) (SEQ ID NO:82);

アミノ酸 3 8 4 - 5 5 8 を含む断片 I I I は、以下のプライマーを用いて増幅で得られた：NPMXF3S5'-CCGAATTCGAGGGTAGGTTCAATGATCCAG-3' (1195-1226) (SEQ ID NO:83) および NPMXF3A5'-CCTCGAGTTAGAGTGTCAACATTTGGTC-3' (1722-1700) (SEQ ID NO:84)。すべてのプライマーは、それぞれ E c o R I および X h o I 限定部位 (下線部分) で設計された。P C R 反応は、上記のプライマーおよび E X T D N A ポリメラーゼ (Finnzymes, Oy, Finland) を用いて行なわれた。9 4 °C で 3 分間の最初の変性後、増幅プログラムは以下のとおり設定された：9 4 °C で 3 0 秒の変性、6 0 °C で 4 0 秒のアニーリング、1 分 2 0 秒の間 7 2 °C で伸長が合計 3 5 サイクル実施し、最後に 7 2 °C で 7 分の伸長。P C R 産物は Wizard (登録商標) SV Gel & PCR clean-Up System (Promega, USA) を用いて 1 . 2 % アガロースゲルで精製され、E c o R B で線形され、T - A クローン化用に t T が後ろに付いた pBluescript SK(+) (Stratagene, USA) (+) に、または p G E M (登録商標) - T ベクトル (Promega, USA) に、サブクローン化された。次にこの 3 つの断片は、E c o

R I および X h o I 制限酵素を用いて、グルタチオン S - トランスフェラーゼとインフレーションで、p G X - 4 T - 1 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) にクローン化された。G S T 融合タンパク質を産出するために、確認されたプラスミド構成 (pGEX-4TI-NPI, pGEX-4TI-NPII, pGEX-4TI-NPIII として示される) は、E. coli BL21-CodonPlus (DE3)-RI PL (Stratagene, USA) 競合細胞に形質転換され、0.2 mM の I P T G (Sigma-Aldrich, USA, USA) で 3 時間誘起された。

【0210】

実施例 12 : G S T 標識付き融合タンパク質の精製

大腸菌の誘起培養物は、遠心分離でペレット化され、氷冷溶解バッファ S T E (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA in 1x PBS) で再度懸濁され、0.4 mg / ml の最終濃度のリゾチーム (Serva, Germany) で 15 分間氷の上でインキュベートされた。細菌細胞 (2 x 30 秒) の音波処理の前に、1.5 % の最終濃度の S T E において 10 % の Sarcosyl (Sigma-Aldrich, USA, USA) および 5 mM の最終濃度の 1 M の D T T (Sigma-Aldrich, USA, USA) が細胞懸濁液に加えられた。溶解されない材料は 4 で 15 分間 12,000 g の遠心分離で除去された。S T E、pH 8 で平衡化されたグルタチオンセファロース 4 B (Amersham Pharmacia Biotech) の 50 % のスラリーの適切な量は、バクテリア溶解物に添加され、4 の穏やかな攪拌で一晩インキュベートされた。次の日、グルタチオンセファロース 4 B に結合した融合タンパク質は氷冷 S T E、pH 8 で洗浄され、室温で 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 mM において 15 mM 減縮グルタチオン (Merck) で希釈された。精製サンプルにおける融合タンパク質のイールドは SDS-PAGE で、および B S A の規定された濃度と比較した視認で決定された。

【0211】

実施例 13 : N P - I g G E L I S A - 1

マイクロプレートウェルは、一晩 37 で、0.05 M ナトリウム炭酸塩 - 重炭酸塩バッファ (pH 9.6) で希釈された精製融合タンパク質 GST-NPI, GST-NPII, GST-NPIII および GST (50 ng/well) で上塗りされた。P B S + 0.1 % T w e e n 20 で 10 % のスキムミルクでブロックした後、上塗りされたウェルは血清サンプル (50 ml 部分標本) でインキュベートされ、これは二段階で希釈され、1:20 のブロッキング溶液で開始され、室温で 1 時間インキュベートされた。プレートは P B S - 0.1 % T w e e n 20 で 4 回洗浄され、室温で 45 分間ブロッキング溶液内において 1:3500 に希釈されたペルオキシターゼ接合ヤギ抗ヒト I g G (Sigma) でインキュベートされた。洗浄の後、基質溶液 (10 ml の Mc Ilweine buffer pH 5.5 (100 mM の Na₂HP0₄, 40 mM の クエン酸), 10 mg の o - フェニレンジアミン (Sigma)、10 μ l の 30 % H₂O₂) が各ウェルに添加され、暗い所で 5 から 10 分間インキュベートされた。2 M H₂SO₄ を加えることにより反応が止められ、光学濃度が吸収について 492 nm で測定された。陰性の抗原被覆ウェルの O D を対応するウェルの O D から引算することにより、調整 O D が計算された。

【0212】

実施例 14 : 陽性ヒト血清による組換え発現した GST-、NPI、GST-NPII、および GST-NPIII のエピトープマッピング

N P 特異血清抗体によって認識された N P 上のエピトープを決定するために、実施例 13 で記載されているプロトコルに従い E L I S A が実行された。免疫沈澱法によって陽性であると確認された 15 個の血清サンプルが用いられた。

【0213】

図 16 に示されるように、抗 N P 血清抗体は、N P の断片 I I I (アミノ酸 384 - 558 を含む) にあるエピトープを優先的に認識したが、少量の抗体は断片 I I (アミノ酸 198 - 391) にあるエピトープとも反応した。

【0214】

実施例 15 : N P - I g G E L I S A - 2

核タンパク質 (N P) 特異血清 A b s の検出は以下の方法によって行なわれた。96 - ウェルポリスチレンプレートは、一晩 4 で 0.05 M ナトリウム炭酸塩 - 重炭酸塩バッ

ファ (pH 9.6) で希釈された、濃度 $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ の NP 特異モノクローナル抗体 M87 でコーティングされた。プレートは、 0.1% Tween 20 (PBS-T) で PBS にて 10% のミルク (ウェル当たり $200 \mu\text{l}$) で 1.5 時間ブロックされ、後でブロッキング溶液において $1:300$ に希釈された細胞溶解物 (LCMV MX で持続的に感染した HeLa 細胞および感染していない HeLa 細胞) で 1 時間インキュベートされた。平衡プレート上に、ヒト血清サンプルはブロッキング溶液において $1:20$ および $1:60$ に希釈された。希釈された血清サンプルのウェル当たり合計 $50 \mu\text{l}$ が NP 飽和プレートに移され、 1 時間インキュベートされた。最後に、プレートはブロッキング溶液で $1:35000$ に希釈された HPR 接合ヤギ抗ヒト IgG (Fc 特異) Ab (SIGMA) で 45 分間インキュベートされた。HPR は OPD カラー反応によって検出され、これは $50 \mu\text{l}$ の $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ を加えることによって止められた。光学濃度が吸収について 492 nm で測定された。すべての工程は室温で行なわれた。各工程の間、プレートは PBS-T で 4 回洗浄された。調整された OD は、陰性の抗原被覆ウェルの OD を対応するウェルの OD から引算することにより、計算された。

【0215】

代替的に、濃度 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ で精製された組換え LCMV NP が抗原として用いられた。

【0216】

適切な内部陽性および陰性コントロールを見つけるために、ヒト血清は免疫沈澱および NP 特異モノクローナル抗体 (実施例 7 参照) での後の免疫プロットングにより分析された。後で、血清の 1 つは陰性のコントロールとして選択され、別のものは後のテストの陽性コントロールとして選択された。免疫沈澱テストでは陰性であるとされた 25 個の血清は後で NP ELISA で分析され、得られた調整された OD 値は、内部陽性コントロールのパーセントの正值性 (PP) として表わされた。これは、 2 つの複製物の平均調整 OD 値を、陽性コントロールの 4 つの複製物の調整された OD 値のメディアン値で割って、 100 を掛けた計算によって得られた。ELISA カットオフ値であって、陽性および陰性の血清サンプルのしきい値として働く値は、この 25 個のサンプルプラス 2 つの標準偏差で得られた平均値 PP として決定された。

【0217】

この方法を用いて、カットオフ値は 4.2% であると決定され、これは以降の計算に用いられた。

【0218】

実施例 16: NP - i g G ELISA - 2 によるヒトサンプルにおける抗 LCMV - NP 抗体の検出

血清サンプルは以下から取得された: (i) 診断された原因のない自然流産の女性; (ii) 満期妊娠の女性; および (iii) 腎細胞癌 (RCC) 腫瘍を持った腫瘍患者。ヒト血清の抗 LCMV 抗体は、実施例 15 に記載されている条件下でテストされ、PP 値が決定され、表 3 に示される。

【0219】

表 3: 自然流産を経験したヒト女性被験者における抗 LCMV NP 抗体の検出

【0220】

10

20

30

40

【表 3】

	流産した女性		流産していない女性	
	人数	%	人数	%
陽性血清	11	23,9	13	11,8
陰性血清	35	76,1	97	88,2
合計	46	100	110	100

10

【0221】

表 3 に示されるように、流産を経験した女性の N P 抗体の血清有病率は、コントロールに対して 12.1% 高かった。表 4 に示されるように、R C C 腫瘍を持つ患者でも N P 抗体の非常に高い血清有病率が観察された。

【0222】

表 4 : R C C 腫瘍を持つ被験者における抗 L C M V N P 抗体の検出

【0223】

【表 4】

	腫瘍患者	
	人数	%
陽性血清	23	37
陰性血清	39	63
合計	62	100

20

【0224】

実施例 17 : H i s - L C M V - N P を発現した組換バキュロウイルスの生成

H i s - L C M V - N P を発現した組換バキュロウイルスは、Bac-to-Bac(R) Baculovirus Expression System (Invitrogen) を用いて生成された。組換ドナーベクトルを構成するために、H e L a / M X 細胞からの c D N A が用いられた。開始コドンおよび終止コドンを有する完全な N P 遺伝子は以下のプライマーを用いて P C R で増幅された : NPMXF1S5'-CCGAATTCATGTCTCTGTCCAAGGAAGTCA-3' (46-67) (SEQ ID NO: 85) および NPMXF3A5'-CCTCGAGTTAGAGTGTCCACAACATTTGGTC-3' (1722-1700) (SEQ ID NO: 86)。プライマーは、それぞれ E c o R I および X h o I 限定部位 (下線部分) で設計された。括弧内の数字は M X 株の公開された N P 配列に対する場所を示す (G e n B a n k 受領番号 Y 1 6 3 0 8、Reiser ova 他 2 0 0 1 年)。

30

40

【0225】

P C R 反応は、遺伝子特異プライマーを用いて、Phusion High Fidelity PCR Master M I X (Thermo Scientific) で行なわれた。P C R プロトコルは、98℃ で 2 分間の後、以下が 35 サイクル行われた : 98℃ で 30 秒の変性、58℃ で 40 秒のアニーリング、および 72℃ で 2 分の伸長、そして最後に 72℃ で 7 分の伸長があった。増幅産物は E c o R I および X h o I を用いて消化され、pFastBac HT A ベクトルにクローン化された。挿入された L C M V - N P D N A はシーケンスされ、プロモータの下流の適切な配向において、元の配列と同じであることが確認された。確認された組換ドナープラスミド (pFastBac HT-LCMV-NP) E. coli DH10Bac 競合細胞に基質変形された。組換バクミド D N A への成功した転換は、p U C / M 1 3 および遺伝子特異プライマーの組合せを用いて P C R で確

50

認められた。対象の遺伝子を含む組換えバクミドDNAは、SF9昆虫細胞の移入のために用いられた。最後に、His-LCMV-NPを過剰発現するバキュロウイルスクローンが3つの連続したブランク精製の後得られた。

【0226】

実施例18：His-LCMV-NPの発現および精製

His-LCMV-NP発現する組換えバキュロウイルスで感染したSF9細胞は、26で96時間インキュベートされた。細胞は次に収穫されてPBSで3回洗浄された。細胞はPBSで1%のNP40で再度懸濁され、15分間氷の上で放置され、10,000rpmで10分間遠心分離された。ペレットは異なる濃度の尿素溶液で連続的に処理された。まず、ペレットはPBSで1%のNP40の1M尿素で懸濁され、超音波処理され、8,000rpmで5分間遠心分離された。次に、ペレットはPBSで洗浄され、PBS内で2Mの尿素で懸濁された。懸濁液が超音波処理されかつ遠心分離された後、ペレットはPBSで洗浄され、PBS内において8Mの尿素で懸濁された。懸濁液は超音波処理され、遠心分離され、上澄みはLCMV-NP抗原として用いられた。コントロール抗原は、LCMV-NP遺伝子を含まないバキュロウイルスで感染したSF9細胞から産出された。抗原のタンパク質濃度は、ブラッドフォードタンパク質アッセイ(Bio-Rad Laboratories)を用いて決定された。His-LCMV-NPの発現および精製効率は、クーマシーブルーで染色された後、10%SDS-PAGEゲルで分析された(図17参照)。

10

【0227】

実施例19：組み換えLCMV-GP1のクローン化および発現

20

MX株(GenBank受領番号EU195888, Tomaskova et al. 2008)の公開されたGPC配列に従うGP1配列(アミノ酸1から265)に対応する配列は、以下のプライマーを用いてPCRで増幅された：GPSBamHI 5'-TTGGATCCTGTCAAACTTTGTCCCA CACAAAG-3'(54-77)(SEQ ID NO: 87)およびGP1AcoRI 5'-AGAATTCTCATCATCTAGTGAGGAAGTTTGTCTTT TC-3'(863-840)(SEQ ID NO:88)。このように、BamHIおよびEcoRI制限サイト(下線部分)が導入された。PCR反応は上記のプライマーおよびGoTaq(登録商標)Flexi DNA Polymerase(Promega, Madison, WI, USA)を用いて行なわれた。95で2分間の最初の変性の後、増幅プログラムは次のように設定された：95で30秒変性、60で30秒アニーリング、72で45秒の伸長が合計35サイクル行なわれ、最後に72で7分間行なわれた。PCR産物はNucleoSpin Extract IIキット(Macherey-Nagel)を用いて1%アガロースゲルで精製され、BamHIおよびEcoRI制限酵素を用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼとインフレイムで、pGX-4T-1にクローン化された。GST融合タンパク質を産出するために、確認されたプラスミド構成(pGEX-4TI-GP1として示される)は、E. coli DH5 競合細胞に形質転換され、37で0.75mMのIPTG(Sigma-Aldrich, USA, USA)で3時間誘起された。大腸菌の誘起培養物は、遠心分離でペレット化され、氷冷溶解バッファSTE(10mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA in 1x PBS)で再懸濁され、0.4mg/mlの最終濃度のリゾチーム(Serva, Germany)で15分間氷の上でインキュベートされた。細菌細胞(5×15秒)の音波処理の前に、1.7%の最終濃度のSTEにおいて10%のSarcosyl(Sigma-Aldrich, USA)および0.5mMの最終濃度の1MのDTT(Sigma-Aldrich, USA)が細胞懸濁液に加えられた。音波処理の後、10%のTriton X-100 (AppliChem)がSTEにおいて最終濃度2.5%に加えられ、氷の上で15分インキュベートされた。溶解されない材料は4で15分間10,000rpmの遠心分離で除去された。誘起されたサンプルにおける融合タンパク質のイールドはSDS-PAGEで、およびBSAの規定された濃度と比較した視認で決定された。

30

40

【0228】

実施例20：GPL-IGG ELISA

96-ウェルポリスチレンプレートは約4μgの組換えGST-GPLおよび/またはGST/mlを含む溶解物で37で一晩コートされた。その後、プレートは0.1%Tween(PBS-T)でPBSにおいて10%のミルク(ウェル当たり200μl)で1.5時間ブロックされた。平衡プレート上に、血清サンプルはブロッキング溶液内におい

50

て 1 : 2 0 で予め希釈され、2重の希釈系が行われた。ウェル当たり合計 5 0 μ l の希釈された血清サンプルは、G P L - および G S P - 飽和プレートに移され、1 時間インキュベートされた。最後に、プレートはブロッキング溶液で 1 : 3 5 0 0 0 に希釈されたヤギ抗ヒト IgG (Fc-specific) Ab (SIGMA) で 4 5 分間インキュベートされた。H P R は O P D カラー反応によって検出され、これは 5 0 μ l の 2 M H₂SO₄ を加えることによって止められた。光学濃度が吸収について 4 9 2 n m で測定された。すべての工程は室温で行なわれた。各工程の間、プレートは P B S - T で 4 回洗浄された。調整された O D は、陰性の抗原被覆ウェルの O D を対応するウェルの O D から引算することにより、計算された。

【 0 2 2 9 】

実施例 2 1 : L C M V 検出のアッセイ

10

L C M V の検出を示すために、以下のアッセイが行なわれた。

【 0 2 3 0 】

M X 株を用いた L C M V 検出

L C M V 検出のために、蛍光検出システムに基づき二重のラベルが付けられたオリゴヌクレオチドプローブ (TaqMan) でリアルタイム P C R が用いられた。L C M V ゲノムの 2 つの特異領域が増幅された：核タンパク質エンコード遺伝子 (N P) の断片および糖たんぱく質エンコード遺伝子 (G P) の断片。増幅はシングルプレックスフォーマット (N P または G P) およびデュプレックスフォーマット (N P + G P) の両方で行なわれた。感染していない H e L a 細胞の R N A から逆転写された c D N A および分子グレードウォーターが陰性のコントロールとして含まれた。各ターゲットに対して、1 % アガロースゲル上には 1 個の P C R 産物の存在のみが確認された (図 1 8 参照)。

20

【 0 2 3 1 】

図 1 9 A - 1 9 B に示されるように、L C M V はシングルプレックスフォーマットで検出された。図 2 0 に示されるように、L C M V はさらにデュプレックスフォーマットで検出された。各反応は独自の N P および G P ヌクレオチド配列および 2 つの T a q M a n プローブ用に 2 組の P C R プライマーを含んでおり、各々は 2 つの増幅産物の一方に特異的であり、異なって色が付いた蛍光団で標識が付けられた。H E X 標識 T a q M a n (N P に特異) および F A M 標識 T a q M a n の蛍光シグナルは、それぞれ緑色および灰色でプロットされた。

【 0 2 3 2 】

30

A R M 株を用いた L C M V 検出

異なる L C M V 株の検出アッセイの容易性は、L C M V A R M 株を用いてテストされた。図 2 1 および図 2 2 に示されるように、増幅産物はシングルプレックスフォーマット (N P または G P) およびデュプレックスフォーマット (N P + G P) の両方でうまく検出された。アッセイの安定性は、用いられたプローブによって覆われている領域下のオリゴヌクレオチドが一致していない存在下でも、同じプローブがアンプリコン検出に適しているので、確認された。プライマーおよびプローブ配列は、M X 株の配列と完全に一致するように設計されていた。M X 株と A R M 株との配列の違いは、N P プローブ / ターゲット領域において 4 つの一致しないオリゴヌクレオチドと、G P プローブ / ターゲット領域において 2 つの一致しないヌクレオチドとをもたらした。これにも係わらず、両方の T a q M a n プローブによって有効な増幅シグナルが生成された。陰性コントロールとしてグレードウォーターが加えられた。

40

【 0 2 3 3 】

実施例 2 2 : L C M V 検出用のアッセイの感度

q P C R の分析的感度は、標準ウイルス株 M X の一連の希釈をテストすることにより分析された。健康な個人からの血液は、R N A 抽出を標準化するために、かつ P C R の分析的感度を検出するために、L C M V 感染細胞の一連の希釈 (1 0 5 、 1 0 3 、 1 0 、 1 、 0 . 5 、 0 . 2 5 感染細胞) でスパイクされた。一連の希釈は、Dulbecco変調Eagle成長媒体で調整された。健康な血液のサンプルは、これらの希釈の各々でスパイクされた。健康な個人からの血液とグレードウォーターが陰性のコントロールとして含まれた。

50

【 図 2 i v 】

[illegible]

FIG. 2iv

【 図 2 v i 】

[illegible]

FIG. 2vi

FIG. 2v

【 図 3 i i 】

[illegible]

FIG. 3ii

【 図 3 i v 】

[illegible]

FIG. 3iv

【 図 3 v i 】

ME TCCAAAGCCACCGCTTGGACGGCAAGAAATTGCGTTGAGGGCTTTTAAAGTTCC 1545
 WE TCCAAAGCCGCTGTGCTTGGACCAAGAGGAGCTGGATGTTGGTGTCTCAAGGTTCC 1546
 MEAAK116 CCGCAAGCCGCTGTGCTTGGACCAAGAGGAGCTGGATGTTGGTGTCTCAAGGTTCC 1547

FIG. 3v

[illegible]

FIG. 3v

【 図 5 i 】

[illegible]

FIG. 4

【 図 6 i 】

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

FIG. 6i

【圖 7】

[illegible]

```

00000000: 50505050505050505050505050505050  00
00000004: 50505050505050505050505050505050  00
00000008: 50505050505050505050505050505050  00
0000000c: 50505050505050505050505050505050  00
00000010: 50505050505050505050505050505050  00
00000014: 50505050505050505050505050505050  00
00000018: 50505050505050505050505050505050  00
0000001c: 50505050505050505050505050505050  00

```

FIG. 7

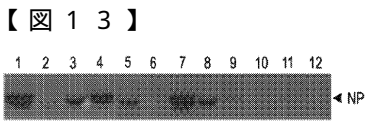
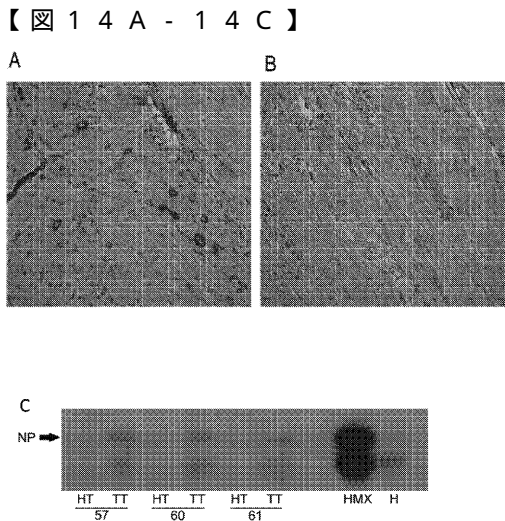


FIG. 13



FIGs. 14A-14C

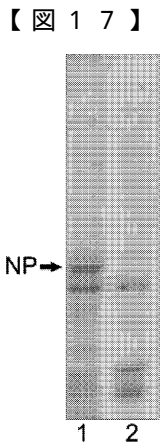
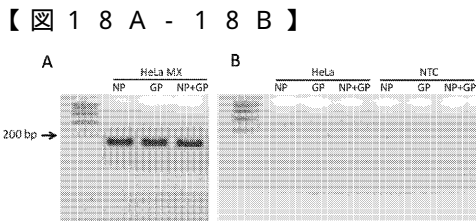
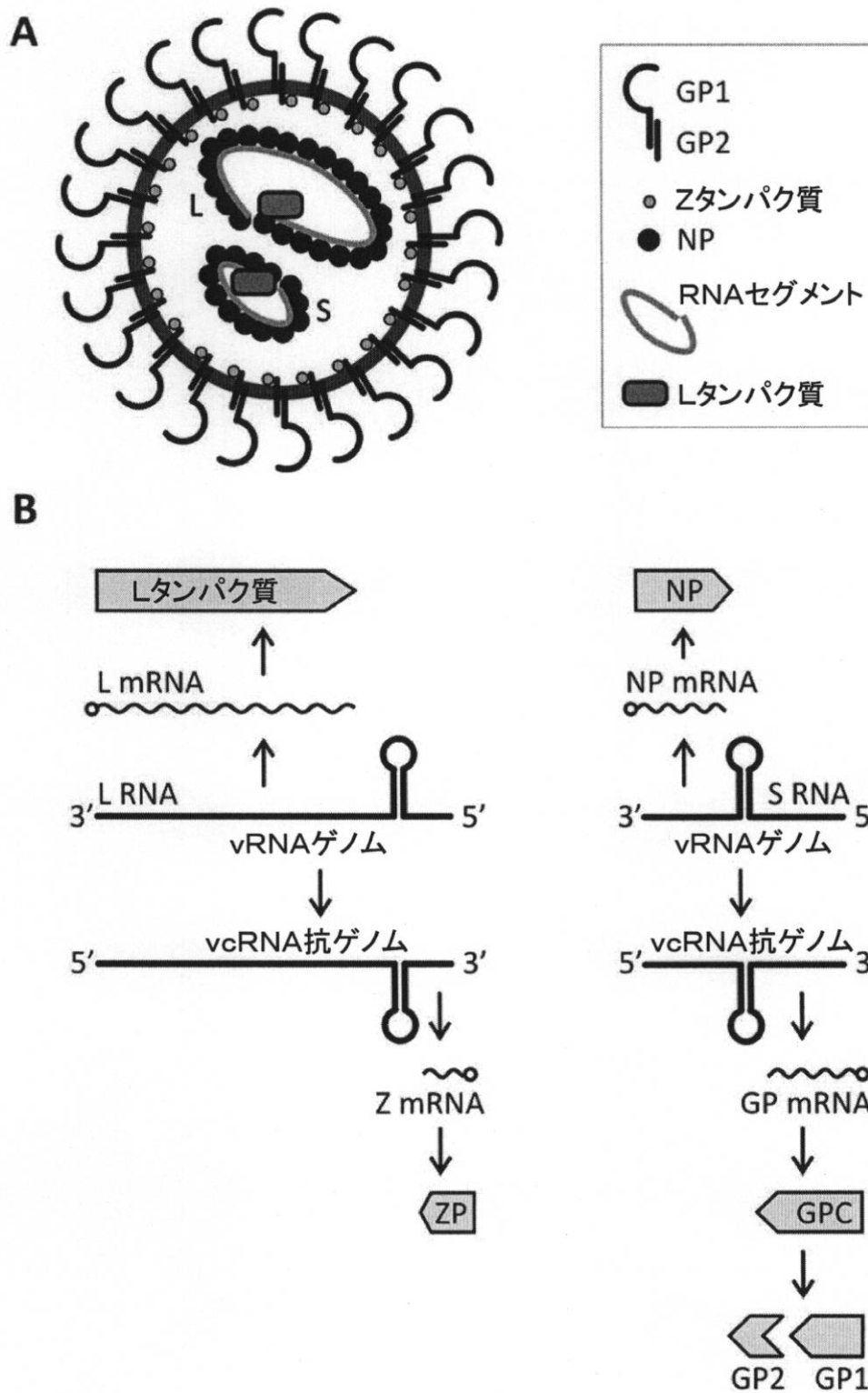


FIG. 17



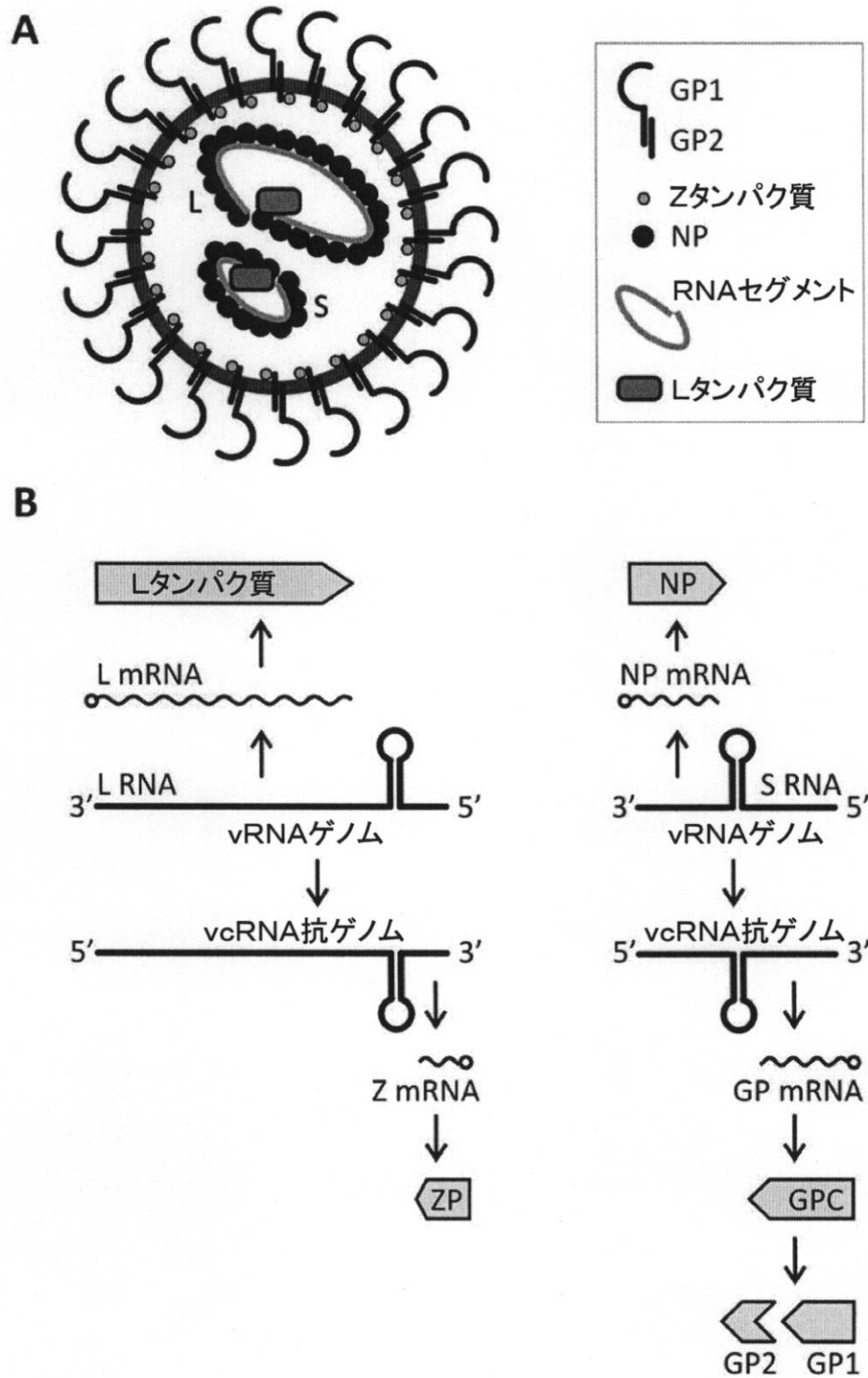
FIGs. 18A-18B

【図 1 A】



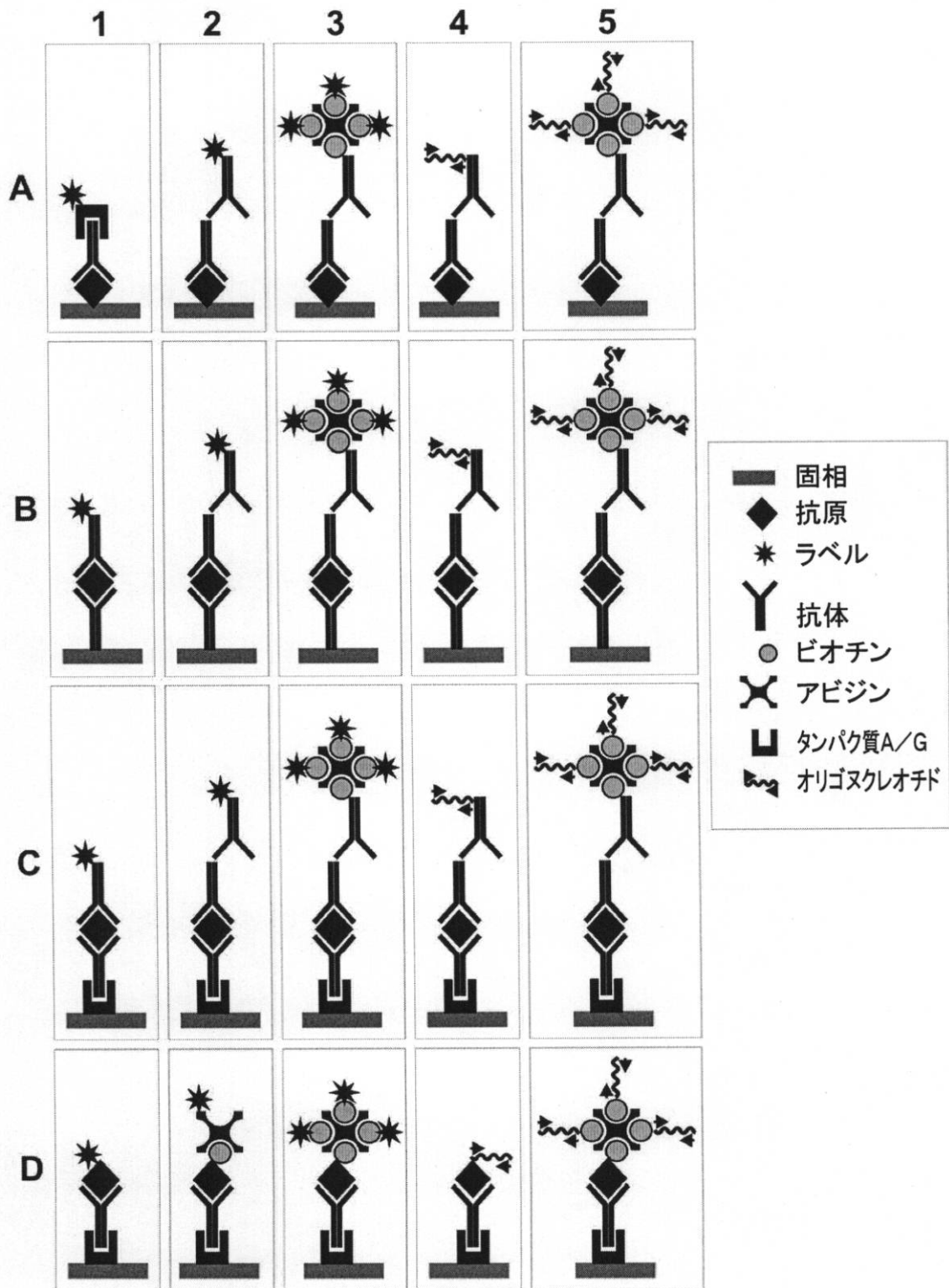
FIGs. 1A-1B

【図 1 B】



FIGs. 1A-1B

【 図 8 】



FIGs. 8A-8D

【 図 9 】

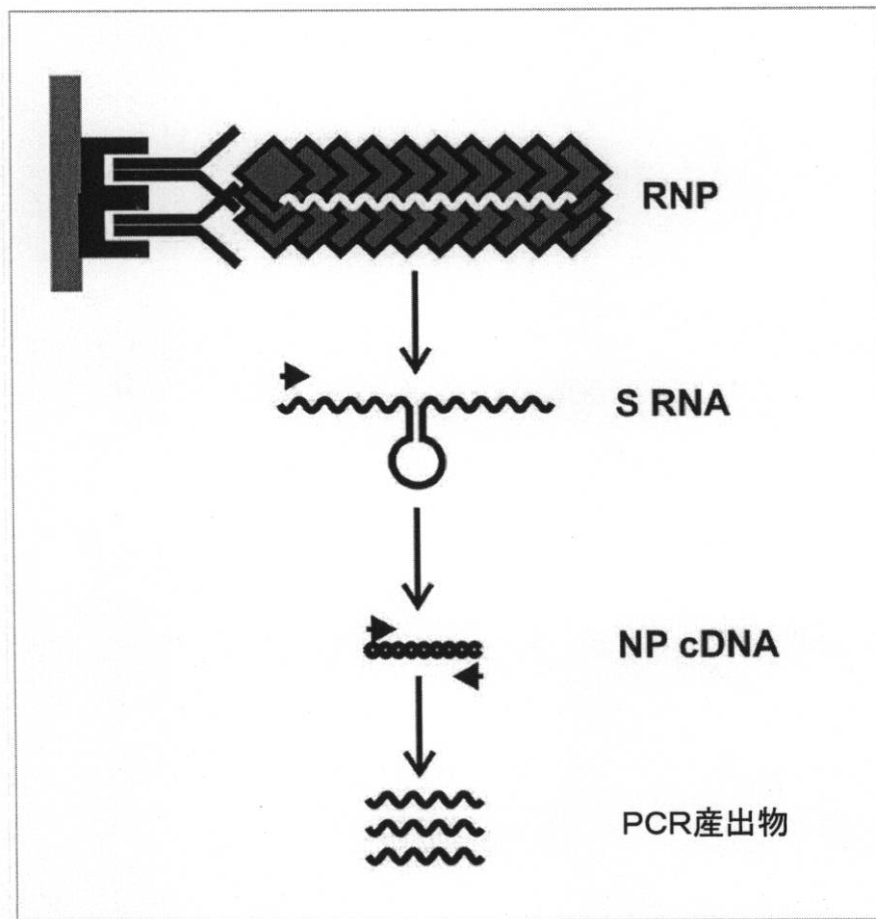
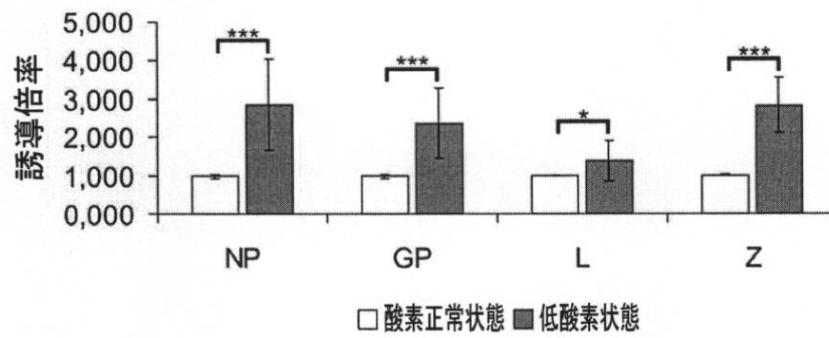


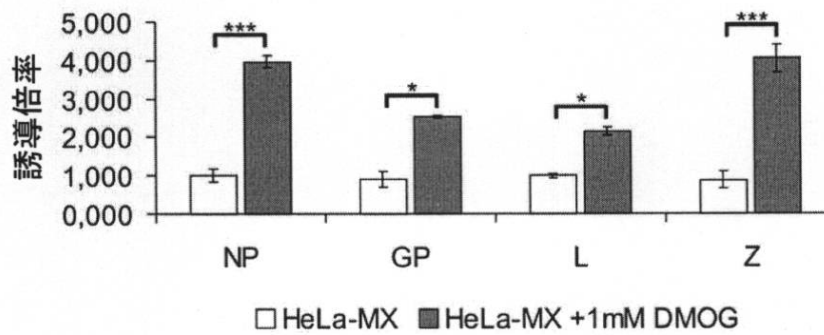
FIG. 9

【図 10A】

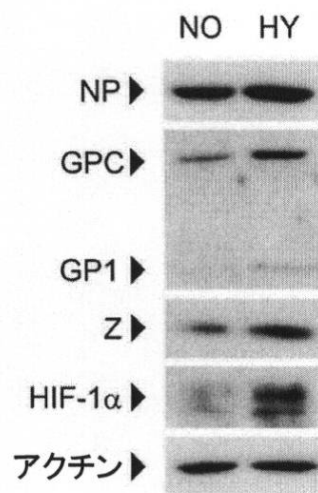
A



B



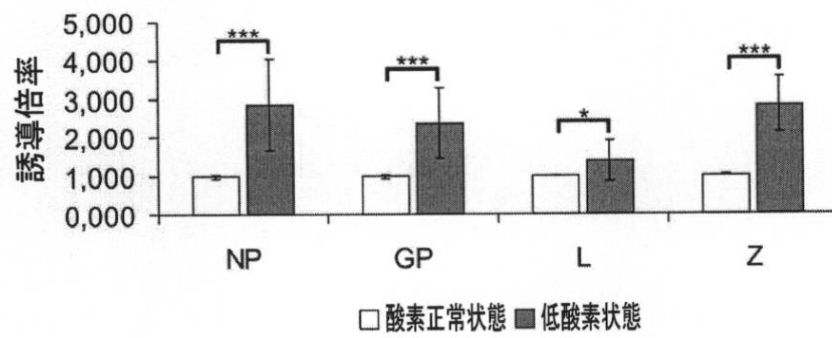
C



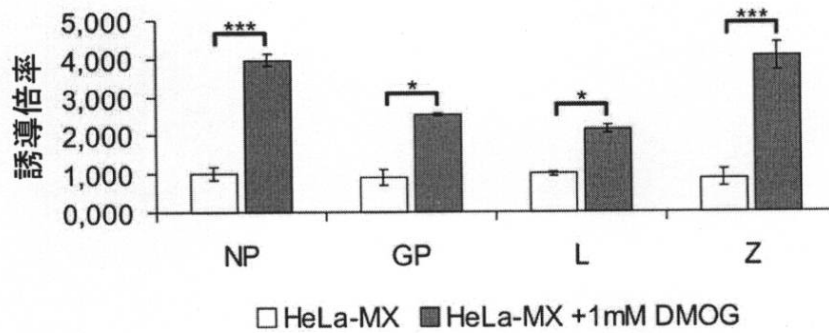
FIGs. 10A-10C

【図 10B】

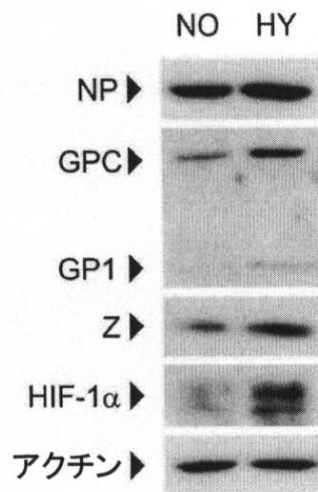
A



B



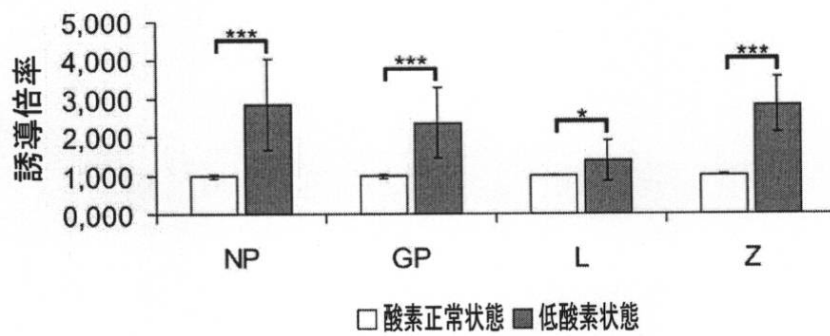
C



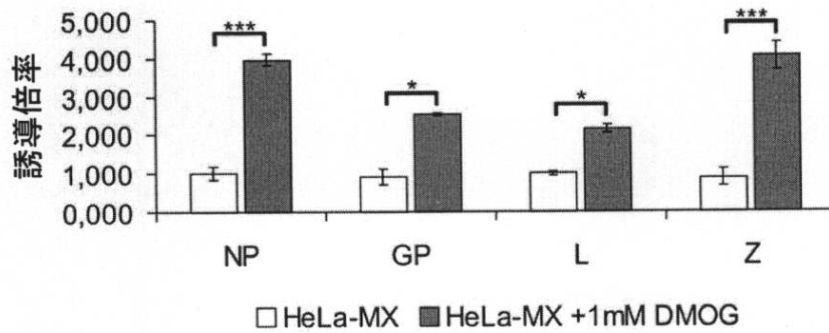
FIGs. 10A-10C

【図 10C】

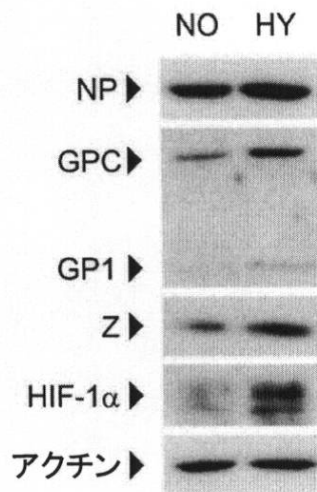
A



B

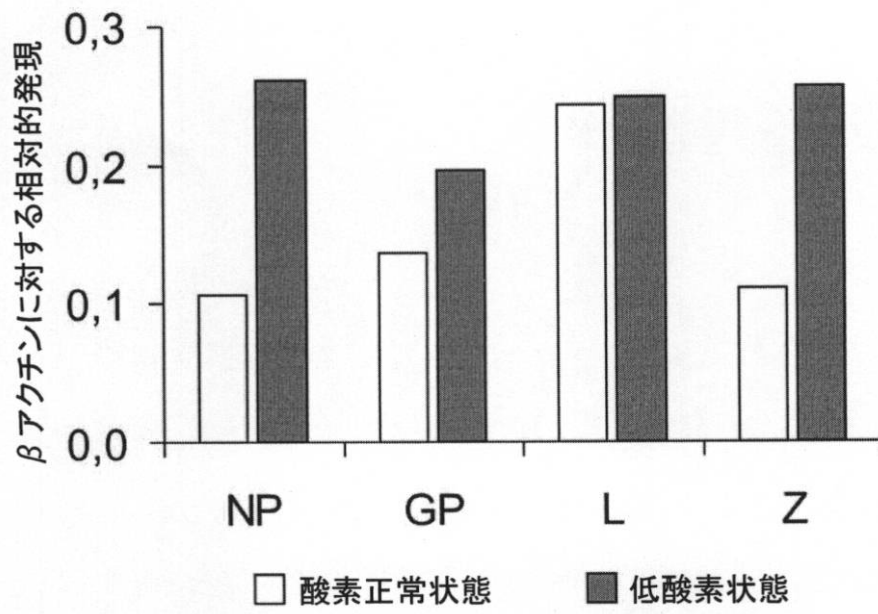


C



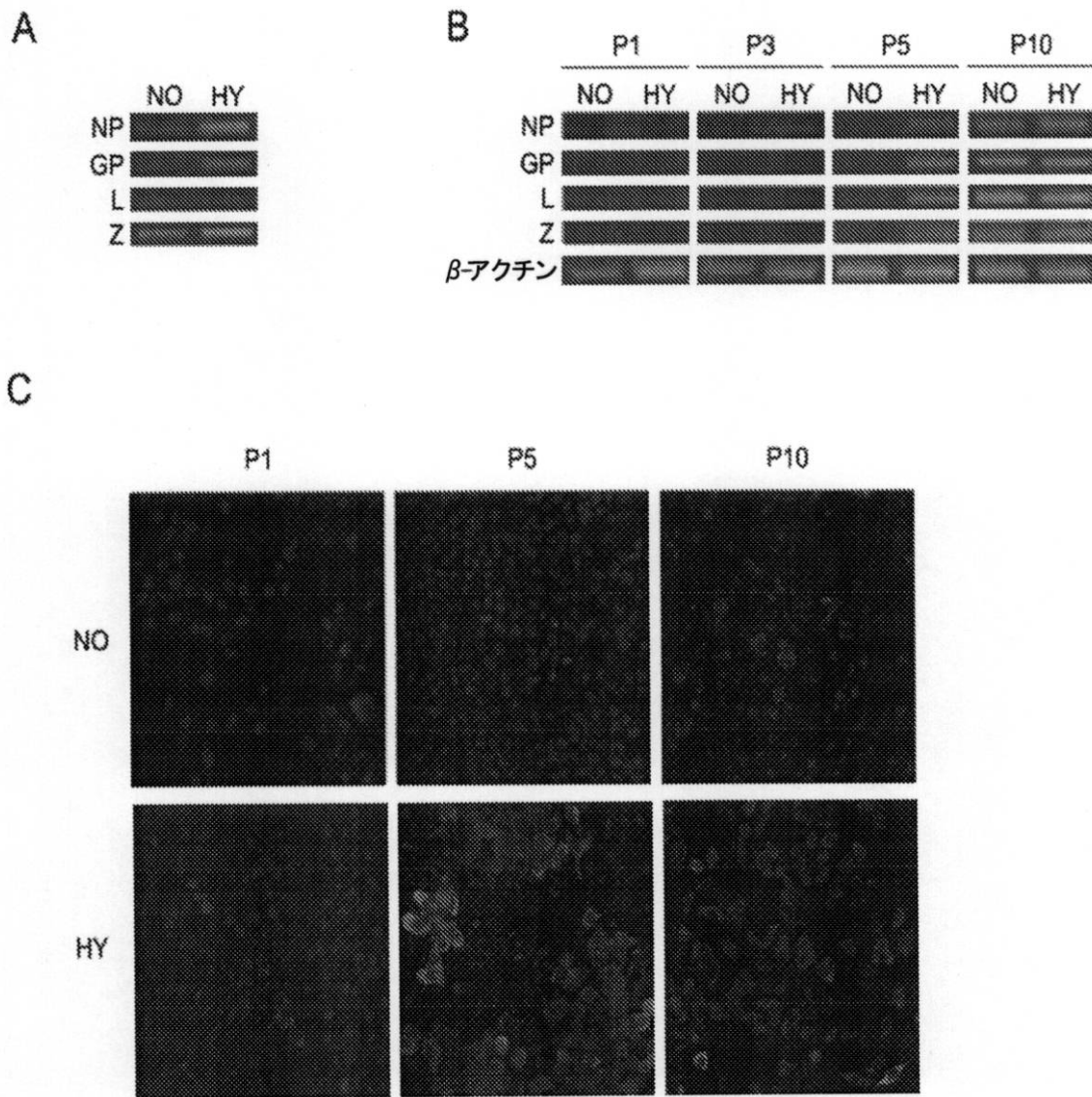
FIGs. 10A-10C

【図 10D】



FIGs 10D

【図 11B】



FIGs. 11A-11C

【図 1 2 A】

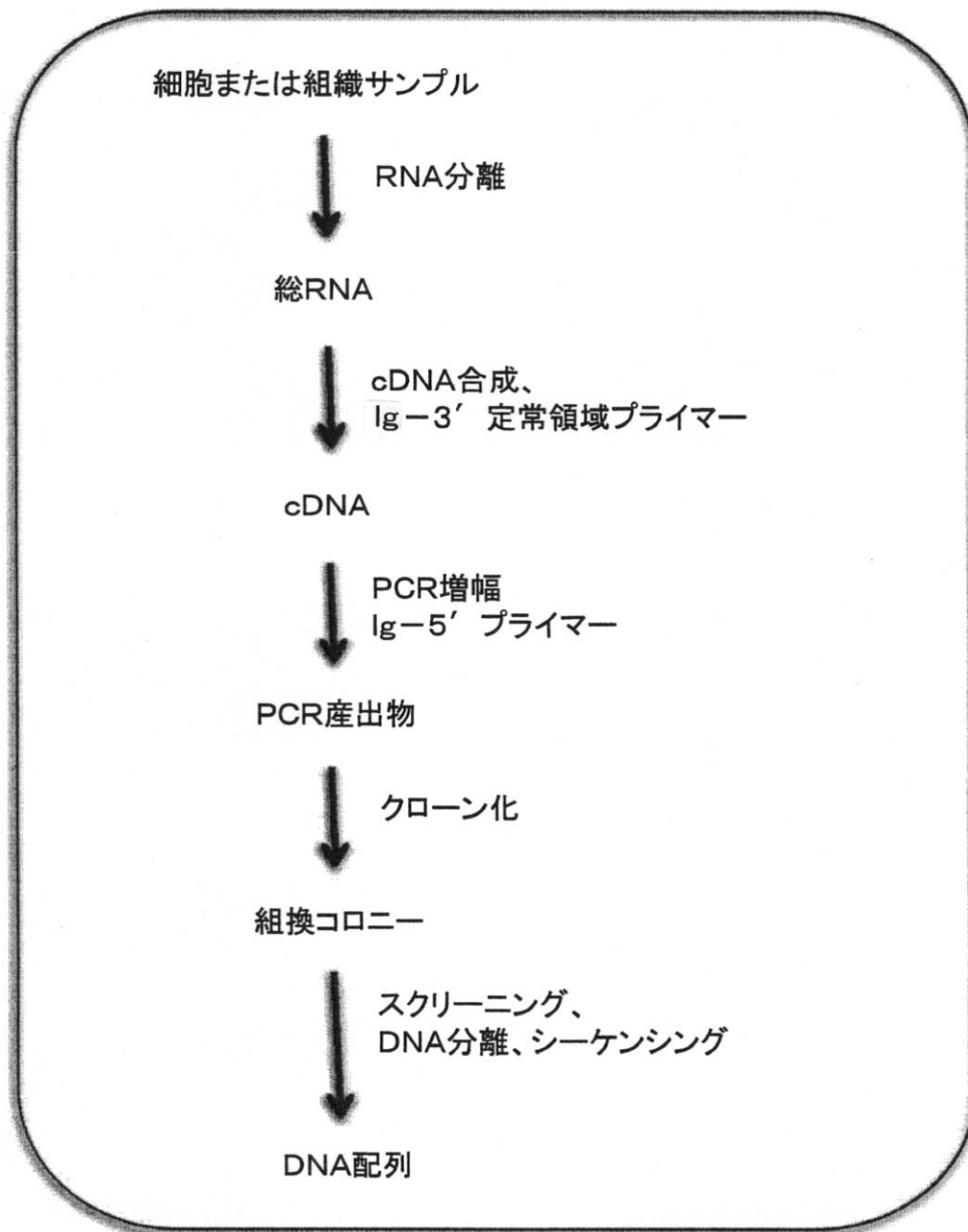


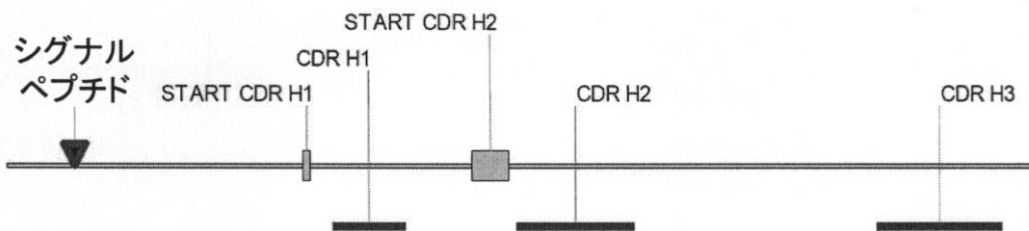
FIG. 12A

【図 1 2 C】

B.

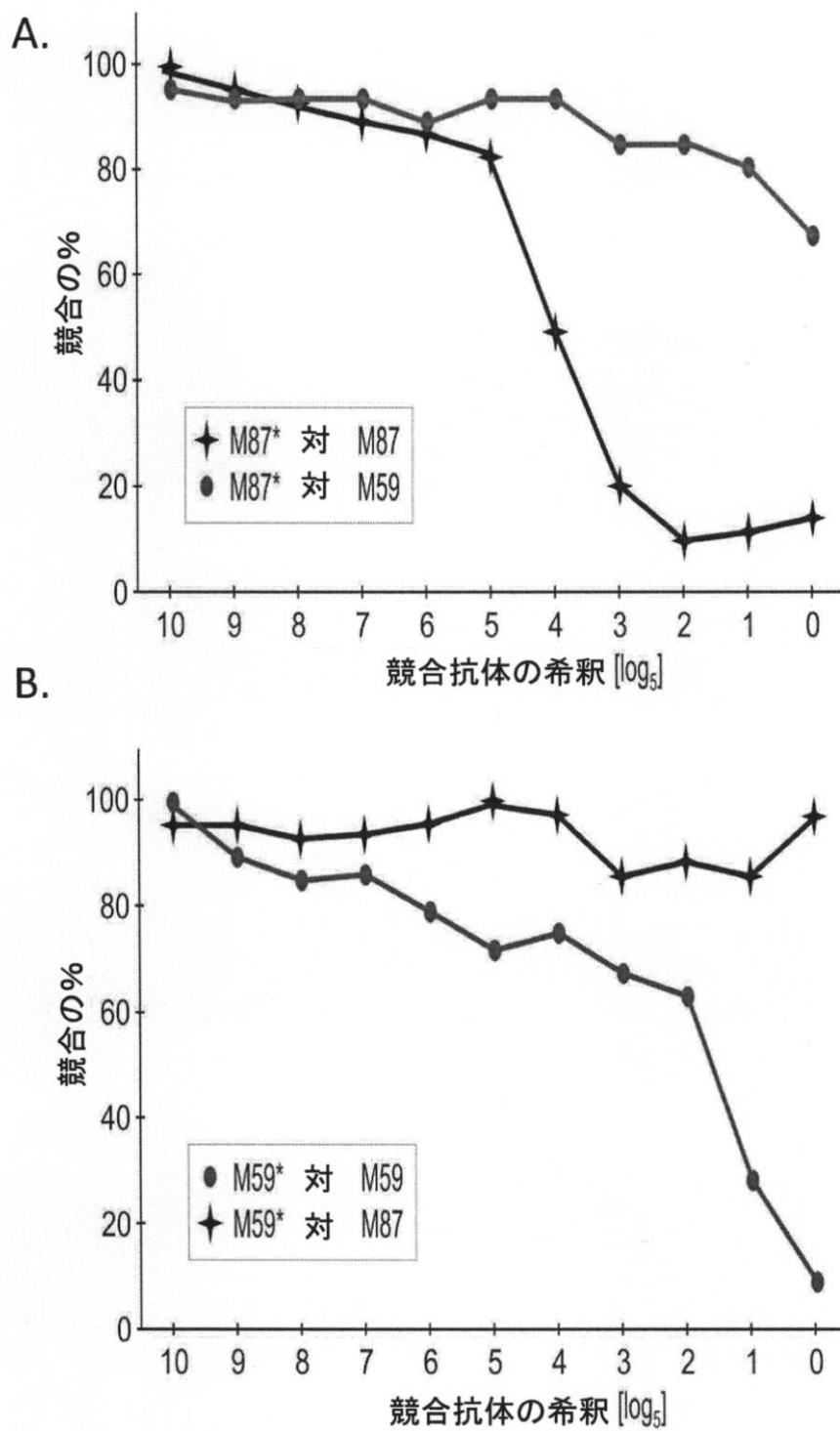
1	MDSRLNLVFL	VLILKGVQCD	VQLVESGGGL	VQPGGSRKLS	CAASGFTFSS
51	FGMHWVRQAP	EKLEWVAYI	SSGSSTLHYA	DTVKGRFTIS	RDNPKNTLFL
101	QMKLPSLCYG	LLGSRNLSHR	LLSQNXTPIR	LSIGPWKLGI	

C.



FIGs. 12B-12C

【図 15】



FIGS. 15A and 15B

【図 16】

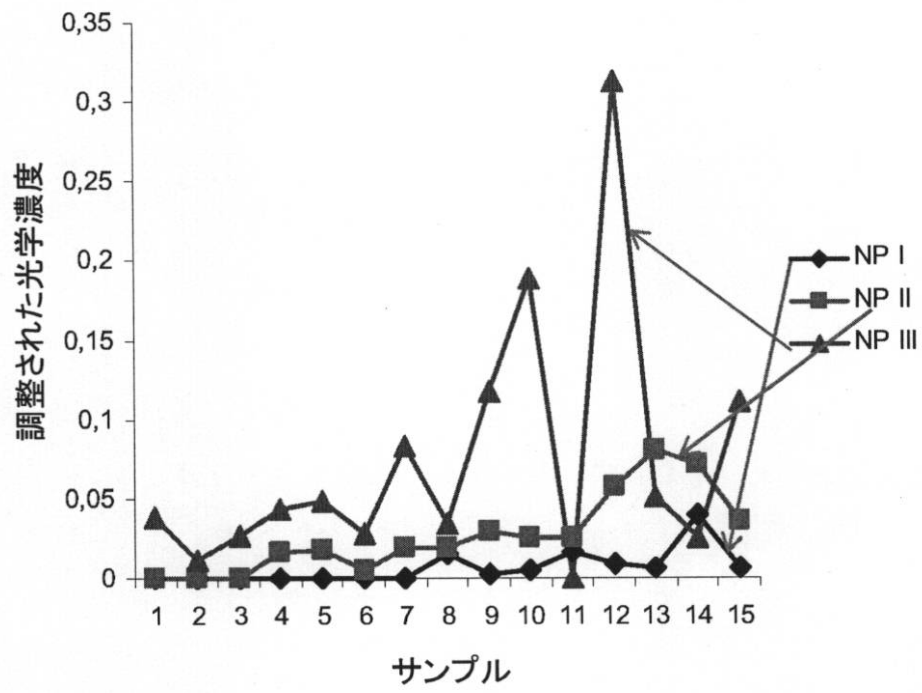
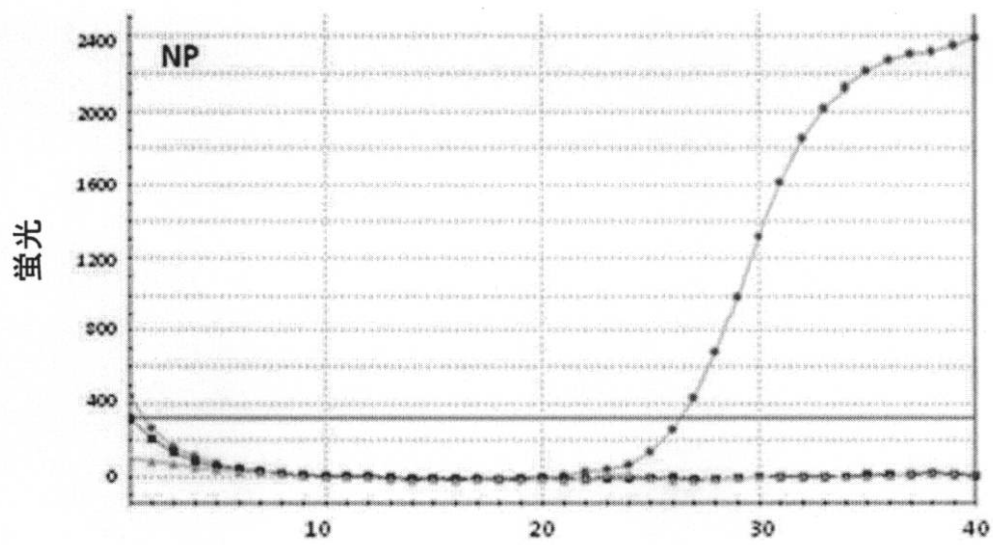


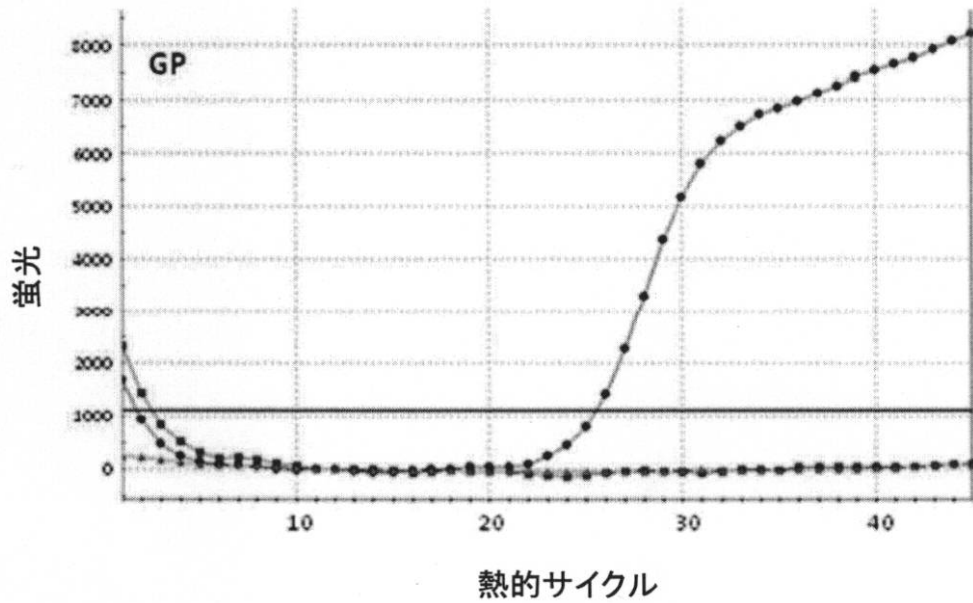
FIG. 16

【図 19】

A



B



FIGs. 19A-19B

【図 20】

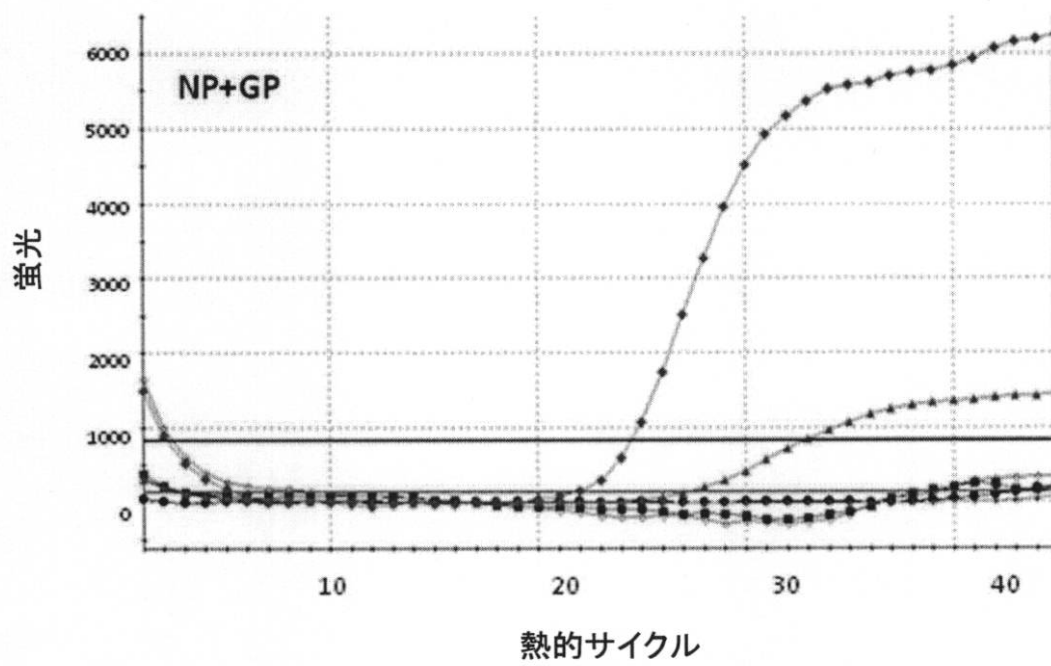
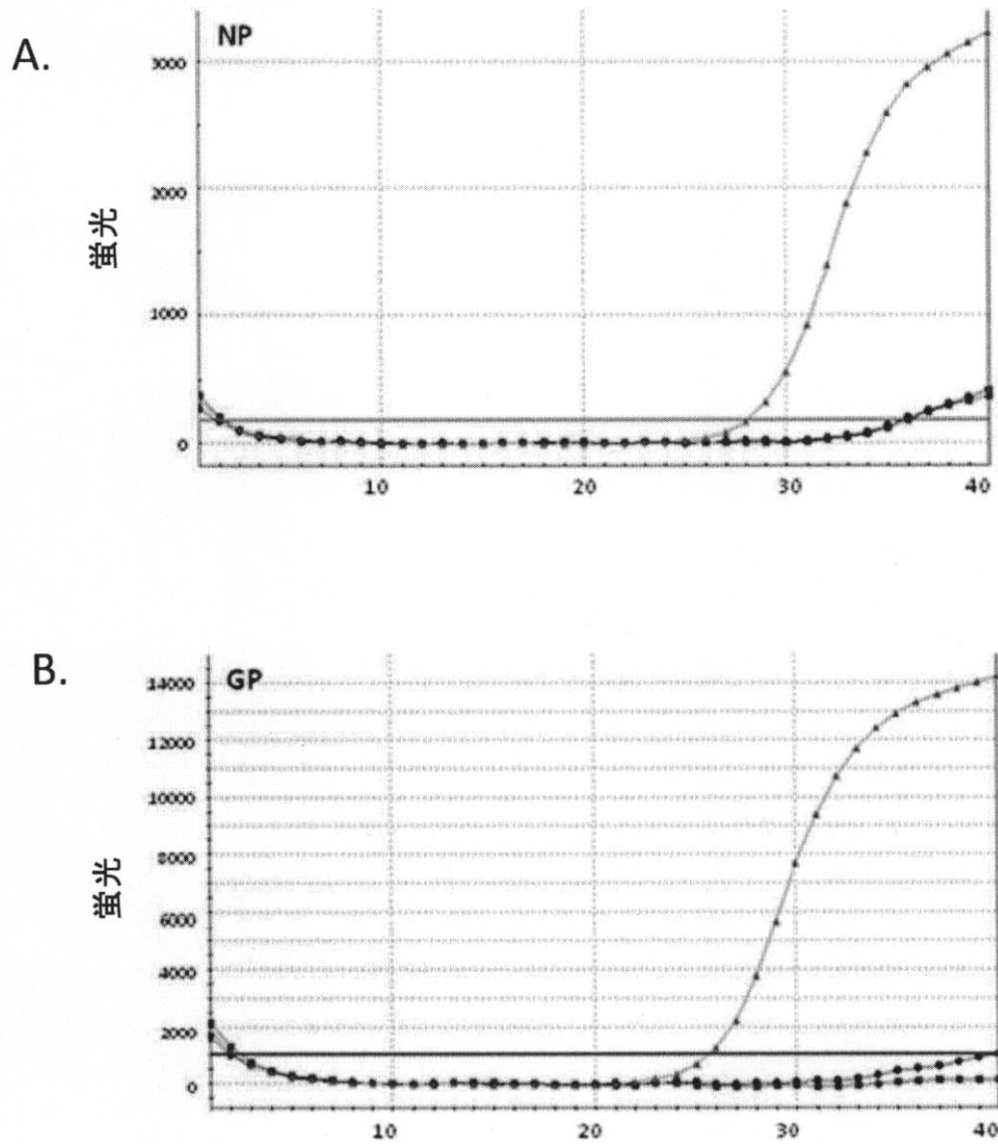


FIG. 20

【图 2 1】



FIGs. 21A-21B

【図 22】

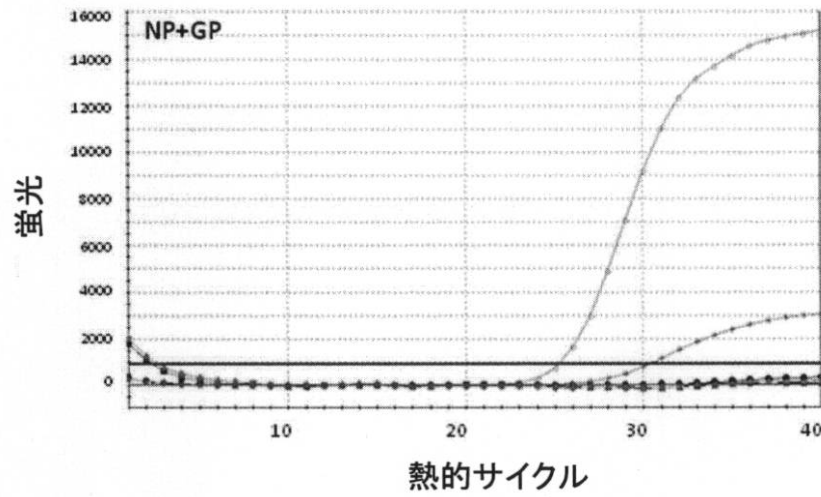
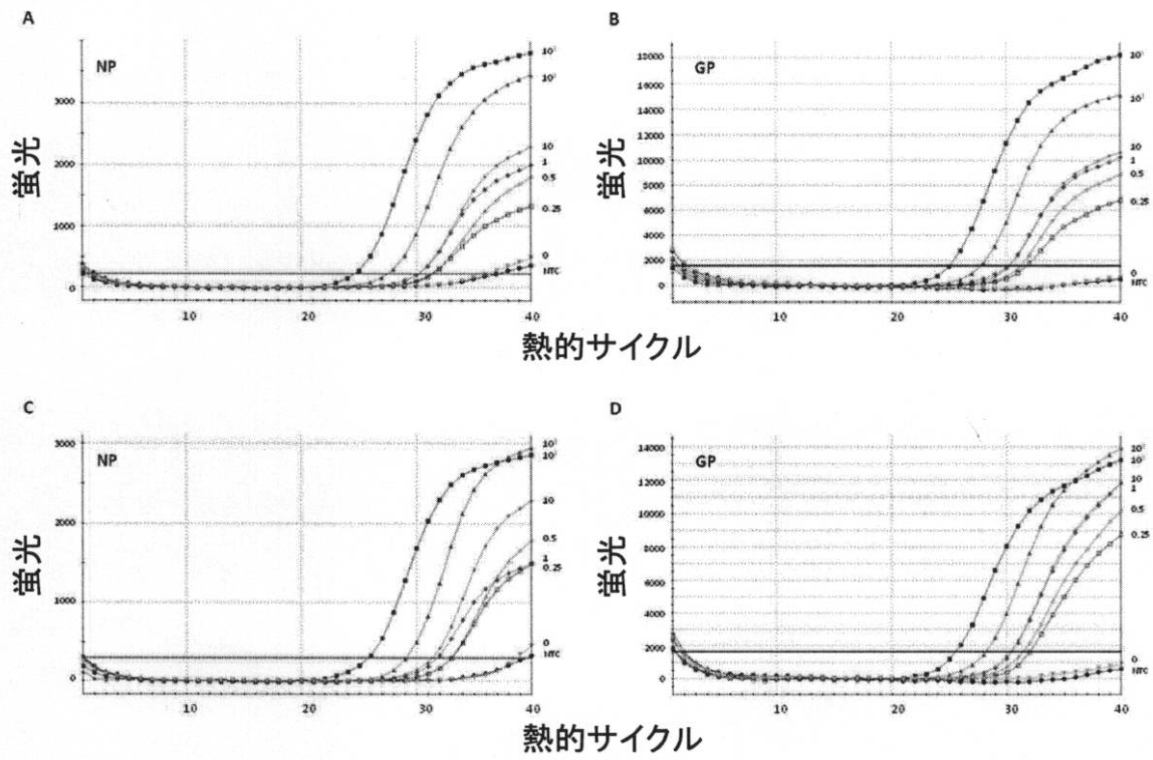


FIG. 22

【図 23】



【 図 2 4 】

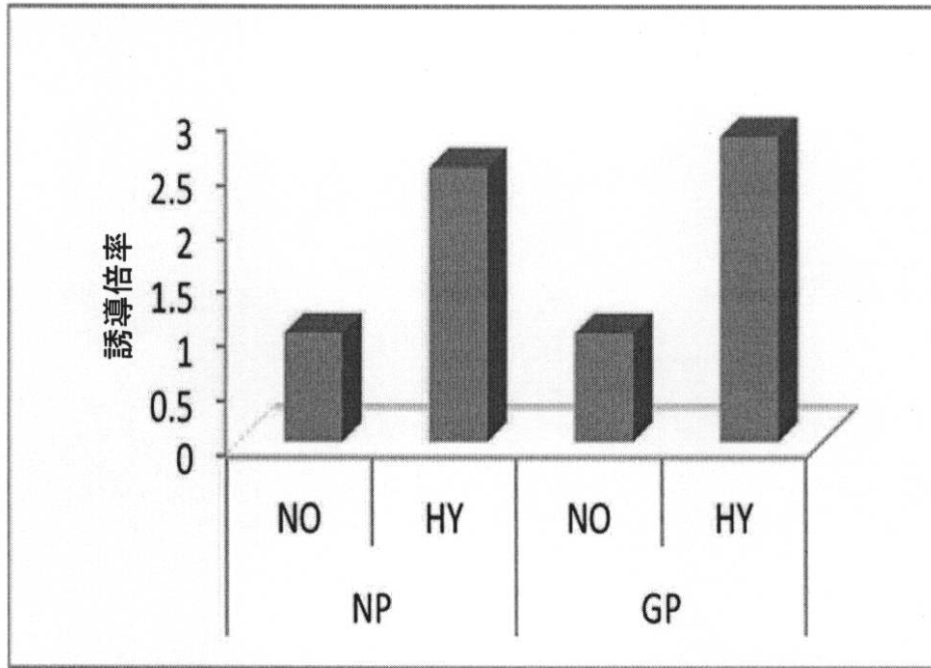


FIG. 24

【 配列表 】

2014502848000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成25年9月6日 (2013.9.6)

【 手続補正 1 】

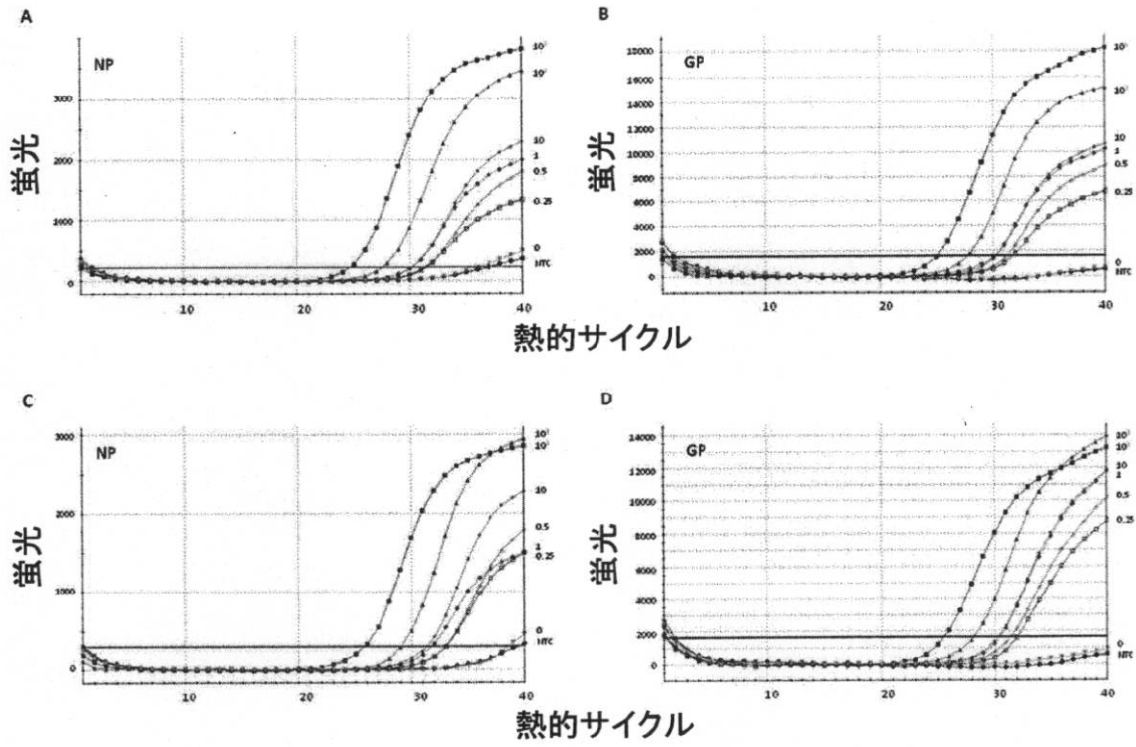
【 補正対象書類名 】 図面

【 補正対象項目名 】 図 2 3

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【図 23】



FIGs. 23A-23D

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/000293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/70 G01N33/569 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCCAUSLAND ET AL: "Quantitative PCR technique for detecting lymphocytic choriomeningitis virus in vivo", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 147, no. 1, 17 October 2007 (2007-10-17), pages 167-176, XP022390484, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2007.08.025 the whole document ----- -/--	1-4, 7-18, 32-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 July 2012		25/10/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Eveleigh, Anna

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2012/000293

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DAVID BESSELS ET AL: "Detection of lymphocytic choriomeningitis virus by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis.", COMPARATIVE MEDICINE, vol. 53, no. 1, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 65-69, XP055030897, ISSN: 1532-0820 the whole document -----	1,2, 7-18, 32-40
X	VIETH S ET AL: "RT-PCR assay for detection of Lassa virus and related Old World arenaviruses targeting the L gene", TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, ELSEVIER, GB, vol. 101, no. 12, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 1253-1264, XP026864782, ISSN: 0035-9203 [retrieved on 2007-12-01] the whole document -----	1,2, 7-18, 32-40
X	JANA TOMASKOVA ET AL: "Molecular characterization of the genes coding for glycoprotein and L protein of lymphocytic choriomeningitis virus strain MX", VIRUS GENES, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 37, no. 1, 21 May 2008 (2008-05-21), pages 31-38, XP019616592, ISSN: 1572-994X the whole document -----	32-40
X	JAMIESON ET AL: "Lymphocytic choriomeningitis virus: An emerging obstetric pathogen?", AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS & GYNECOLOGY, MOSBY, ST LOUIS, MO, US, vol. 194, no. 6, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 1532-1536, XP005513693, ISSN: 0002-9378, DOI: 10.1016/J.AJOG.2005.11.040 the whole document -----	1,5,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2012/000293**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ 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. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

2-18, 33-40(completely); 1, 32(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ IB2012/ 000293

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 2-18, 33-40(completely); 1, 32(partially)

A method of assessing lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection status or activity in a sample, comprising the use of a composition for detecting LCMV. Said method, wherein the composition for detecting LCMV comprises at least one primer binding specifically to one or more LCMV nucleic acids. Related kit.

2. claims: 19(completely); 1, 32(partially)

A method of assessing lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection status or activity in a sample, comprising the use of a composition for detecting LCMV, wherein the composition for detecting LCMV comprises at least one isolated LCMV protein or a fragment thereof. Related kit.

3. claims: 20-31, 41-52(completely); 1, 32(partially)

A method of assessing lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection status or activity in a sample, comprising the use of a composition for detecting LCMV, wherein the composition for detecting LCMV comprises at least one isolated monoclonal antibody or antibody fragment. Related kit.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00 1 0 2
C 0 7 K	16/08	(2006.01)	C 0 7 K	16/08

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 コパチェク, ユライ
スロバキア、8 4 0 0 5 ブラチスラバ、ピィ・オウ・ボックス・1 3 5、ドゥブラブスカ・チェスタ、9

(72)発明者 パストレク, ヤロミール
スロバキア、8 4 0 0 5 ブラチスラバ、ピィ・オウ・ボックス・1 3 5、ドゥブラブスカ・チェスタ、9

(72)発明者 パストレコバ, シルビア
スロバキア、8 4 0 0 5 ブラチスラバ、ピィ・オウ・ボックス・1 3 5、ドゥブラブスカ・チェスタ、9

Fターム(参考) 4B024 AA14 CA04 CA09 CA20
4B063 QA01 QA19 QQ10 QR08 QR55 QR62 QS25 QS33 QS34
4B065 AA91X AA91Y AB05 AC14 BA08 CA25 CA46
4H045 CA40 DA76 EA53 FA74