

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7391980号
(P7391980)

(45)発行日 令和5年12月5日(2023.12.5)

(24)登録日 令和5年11月27日(2023.11.27)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/574

A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

Z N A

C 1 2 Q 1/04 (2006.01)

C 1 2 Q 1/04

C 0 7 K 14/47 (2006.01)

C 0 7 K 14/47

請求項の数 5 (全18頁)

(21)出願番号 特願2021-549295(P2021-549295)

(86)(22)出願日 令和2年2月21日(2020.2.21)

(65)公表番号 特表2022-521534(P2022-521534
A)

(43)公表日 令和4年4月8日(2022.4.8)

(86)国際出願番号 PCT/EP2020/054613

(87)国際公開番号 WO2020/169796

(87)国際公開日 令和2年8月27日(2020.8.27)

審査請求日 令和3年10月8日(2021.10.8)

(31)優先権主張番号 19158845.8

(32)優先日 平成31年2月22日(2019.2.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

前置審査

(73)特許権者 512113803

ドイチェス クレプスフォルシュングス

ツェントルム

ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 0 ハイデル

ベルク, イム ノイエンハイマー フェル

ト 2 8 0

(74)代理人 110002697

めぶき弁理士法人

(74)代理人 100110973

弁理士 長谷川 洋

(74)代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(72)発明者 ブント, ティモ

ドイツ連邦共和国 6 9 2 2 1 ドッセン

ハイム ブーヘンヴェック 3

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 乳がんのバイオマーカーとしてのBMMF 1 R E Pタンパク質の使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

乳がんのバイオマーカーとしての、M S B I 1 ゲノムにコードされた R e p タンパク質 (M S B I 1 R e p) の使用。

【請求項 2】

配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 1 3 6、1 3 7 ~ 2 2 9 及び 2 3 0 ~ 3 2 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列内にあるエピトープに結合する抗 R e p 抗体によって、対象からの組織サンプル中の、M S B I 1 ゲノムにコードされた R e p タンパク質 (M S B I 1 R e p) を検出するステップを含む、前記対象における乳がんの診断又は素因を提供するための方法。

【請求項 3】

前記抗 R e p 抗体が、配列番号 2 又は配列番号 3 に含まれるエピトープに結合する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

対象からの組織サンプルが、癌性乳房組織、癌性組織を取り囲む周囲組織及び (良性) 過形成からなる群から選択される、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

さらに、C D 6 8 陽性細胞が抗 C D 6 8 抗体によってサンプル中で検出される、請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳がんのバイオマーカーとしてのDNA複製関連（Rep）タンパク質の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

浸潤性乳がんは、欧米で最も多く診断されているがんであり、女性のがん死亡原因の第2位である。女性では約3人に1人が、男性でもそれよりもっと低い割合で、生涯のうちに乳がんの診断を受ける。近年、乳がん患者の死亡率はわずかに低下しているが、依然として非常に高い水準にある。これは主に、がんが発生した後に治癒することができないためである。乳がん患者の死亡率を下げるためには、乳がんを発症するリスクの高い患者を特定して治療することが必要である。したがって、前癌性乳房腫瘍を発症した被験者を含め、乳がん発症のリスクが高い患者を特定することは有利である。このため、浸潤性乳がんに発展する可能性のある前癌性腫瘍の生物学を理解し、リスクの高い前癌性乳がんを有する被験者を効果的に治療して乳がんの発生を防ぐことができれば有利である。

10

【0003】

浸潤性乳がんの発生には、多段階のプロセスがあることはよく知られている。動物実験やヒトの疫学的証拠から、終末期管小葉単位の幹細胞が増殖して過形成になり、次に原発性がんになり、その後、浸潤性乳がんになるという説がある。また、いくつかの後ろ向き及び前向きな臨床研究では、非癌性乳房腫瘍と診断された被験者のうち、異型過形成又は非異型過形成と診断された被験者は、乳がん発症のリスクが高いことが立証されている。以上のことから、組織学的及び疫学的証拠は、過形成病変が浸潤性乳がんを発症する可能性が著しく高い最も初期の前駆病変であることを示している。

20

【0004】

患者は通常、切除手術を受けた後、放射線療法、全身化学療法、及び/又は免疫療法を受けるが、治療法は腫瘍の巨視的特徴と腫瘍のステージに基づいて決定される。5年無再発生存率は、ここ数年で改善した患者もいれば、改善していない患者もいる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

マンモグラフィーの普及やスクリーニングプログラムの実施にもかかわらず、バイオマーカーの予測ができないため、多くの患者が診断を遅らせている。早期発見のためには、乳がんの早期発見を可能にするバイオマーカーが必要であり、また、乳がんの発症メカニズムを解明することが求められている。

30

【課題を解決するための手段】

【0006】

本願では、本発明者らは、図1に示すような乳がん発症のモデルを作成した。

【0007】

本発明者らは、離乳期の母乳を牛乳製品で代用したり、乳製品や牛肉製品を摂取したりして、生後数ヶ月以内にBMMF（牛肉及び牛乳因子）剤を摂取すると、一般的に新生児がBMMF抗原に早期に感染することを発見した。母体の抗体（移行抗体）の減少と、しばしば観察される生後ごく初期の新生児の免疫寛容の誘導に関連した免疫系の弱さに基づき、これらの剤は免疫応答を直接逃れるか、又はこれらの剤に対する免疫寛容の状況が誘導されるかのいずれかであろう。その後数年から数十年のうちに、宿主の免疫系に依存して、乳房組織の間質内に蓄積するBMMF抗原が増える。この蓄積はまた、BMMFに対する受容体に相当する特定の分子の取り込みによって誘発され得る。これらの分子は牛の産物の消費によっても取り込まれ、宿主細胞表面の受容体に代謝される。感染の限局的拡散と共に、BMMFの持続的な取り込みによって一定レベルの抗原量に到達すると、宿主免疫応答は慢性及び局所炎症の状態を誘導し、活性酸素種（ROS）及びシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）の安定した増加を生じ、これはROSによって誘導された周囲

40

50

の細胞におけるランダムな突然変異の同時固定を伴う脱調節細胞増殖の確率を劇的に増加させる。特に、本質的に高い複製活性を有する細胞は、腫瘍形成及び乳がんの発症の基本的な要件として、突然変異の確率的発現を可能にするランダムなDNA突然変異を濃縮する標的を表す可能性がある。したがって、BMMFは、組織間質内の慢性炎症の誘発の特定の局所的なトリガーを表し、ROSの増加を引き起こし、周囲の複製細胞の増殖と突然変異を誘発し、最終的には癌の前駆体としての過形成の形成をもたらす。

【0008】

詳しくは、腫瘍の病期が判明している乳がん患者7名の組織サンプルを選択し、マウスモノクローナル抗Rep抗体を用いてIHC染色を行った。すべての組織は、BMMF1 Rep標的に対して陽性と判定された。例示的に、抗Rep抗体（例えば、mAb10-3、mAb3-6）による染色は、乳がん患者サンプル7G6MJX及び1HHY7K内の間質性腫瘍組織領域におけるタンパク質標的の特異的検出を示す（図2及び3）。一般的に、抗Repの検出では、主に間質内の細胞の細胞質領域にある小さなサイズの凝集体が強く染色された。さらに、抗Repで染色されたシグナルは、CD68陽性のマクロファージと共局在していることが観察された。Rep特異的抗体が最も多く検出された領域は、CD68陽性細胞の検出レベルが最も高い領域と相関しており、Rep特異的抗原が炎症組織領域に局在していることを示唆している。アイソタイプコントロール抗体を用いた対照染色では、シグナルは検出されなかった。一方、母乳小葉の壁を取り囲む上皮細胞では、有意な抗Rep染色パターンが観察され、細胞質内に凝集塊状の局在が認められた。これは、BMMFの複製/増殖を可能にする組織領域であると考えられる。乳がんの場合、抗Repの染色パターンは特に腫瘍周囲に見られた（図5参照）。腫瘍そのものでは、染色パターンはあまり意味をなさなかった。

【0009】

これまでに、異なる試験材料（ウシ血清、乳、1つの多発性硬化症患者の剖検の脳組織）から、18種の、異なるが部分的に関連するDNA分子のスペクトルが単離された（Funk, Gunstら、2014, Gunst, zur Hausenら、2014, Lamberto, Gunstら、2014, Whitley, Gunstら、2014; WO2015/062726A2; WO2016/005054A2）。18分離物を、それらの分子特性に従って、4つの異なるグループBMMF1~BMMF4に分けた（zur Hausenら、2017）。これらのグループのうち3つは、アシネトバクター・バウマニ（*Acinetobacter baumannii*）及びサイクロバクター属（*Psychrobacter*）プラスミドと顕著な程度の類似性を明らかにした。第4のグループは、ジェミサーキュラーウイルス（*Gemycircularviridae*）の代表的な3つの分離物を含んでいた。推定Rep遺伝子は、利用可能な配列とのインシリコ比較により得られたBMMFのDNA配列の一部として同定された。rep遺伝子において隣接するプライマーを使用する増幅はウシ血清からの完全及び部分環状DNAゲノムの単離を導いた（Funkら、2014）。これは、特定の環状一本鎖DNAゲノムの存在について、市販の乳製品からのサンプルに拡張された。14の異なる単離物（約1100~3000ヌクレオチド）の全長環状一本鎖DNA分子をクローニングし、配列決定した（Whitleyら、2014; Gunstら、2014; Funkら、2014; Lambertoら、2014）。ヒト脳及び血清（すべて多発性硬化症患者由来）からさらに4つの分離物を得た（Whitleyら、2014; Gunstら、2014; Lambertoら、2014）。

【0010】

これらの分離物の中で、伝達性海綿状脳症（TSE）関連分離物Sphinx1.76（1758bp; 受入番号HQ444404）に密接に関連する2つのDNA分子が、MS患者の脳組織から分離された。（Manuelidis L. 2011）これらの分離物はMSBI1.176（MSBI、多発性硬化症脳分離物）（1766bp）及びMSBI2.176（1766bp）であり、それぞれ「MSBI1ゲノム」及び「MSBI2ゲノム」と命名された。MSBI1.176は、Sphinx1.76の配列と98

10

20

30

40

50

%の配列類似性を共有する。分離物の大きなオープンリーディングフレーム（ORF）は、それらの間で高い類似性を共有する推定DNA複製タンパク質をコードする。もう一つの一般的な特徴は、イテロンのようなタンデムリピートの存在である。この反復領域のアラインメントは、コアにおける単一ヌクレオチドの変異を示す。このイテロン様反復は、Repタンパク質の結合部位を構成し得る。分離物の配列はEMBL Databankに登録番号LK931491（MSBI1.176）及びLK931492（MSBI2.176）（Whitley C.ら、2014）で寄託されており、WO2016/005054A2に整列及び記載されている。

【0011】

牛乳からさらに分離物を入手した。これらの牛乳分離物（CMI）は、それぞれ「CMI1ゲノム」、「CMI2ゲノム」及び「CMI3ゲノム」と命名されたCMI1.252、CMI2.214及びCMI3.168であった。分離物の配列は登録番号LK931487（CMI1.252）、LK931488（CMI2.214）及びLK931489（CMI3.168）でEMBL Databankに寄託されており、WO2016/005054A2に整列及び記載されている。

【0012】

本発明者らは、CMIゲノムとMSBIゲノムの両方で、転写されたRNAが大量に生産され、コードされたRepタンパク質ががん組織周辺の末梢組織に多く発現していることを発見した。本発明者らは、コードされたRepタンパク質（MSBI1 Rep、MSBI2 Rep、CMI1 Rep、CMI2 Rep、CMI3 Rep）が乳がんのバイオマーカーとなることを見出した。DNA複製関連タンパク質（RepB）として、Repタンパク質はDNA結合活性を有し、エピソード又はウイルスDNA分子の複製の開始に必須であり得る。Repタンパク質は自己オリゴマー化及び凝集の顕著な可能性を示し、これは、インビボ及びインビトロにおける原核生物系内で記載されている（Giraldó, Moreno-Díaz de la Espinosaら、2011, Torreira, Moreno-Del Álamoら、2015）。

【0013】

本発明者らは、Repタンパク質に対するモノクローナル抗体を作製した。特定の実施形態において、抗Rep抗体は、図3に例示されるRepタンパク質のエピトープに結合する。特に好ましい抗体は、配列番号1のアミノ酸1～136、137～229及び230～324からなる群より選択されるアミノ酸配列内のエピトープに結合する。例えば、抗体は、配列番号2又は配列番号3に含まれるエピトープに結合する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、乳がんの発生について提案されたモデルを示す。

【図2】図2は、乳がん患者組織7G6MJXの連続した組織切片におけるBMMF1 RepのIHC検出（スケールバー＝100µm）を示す。

【図3】図3は、乳がん患者組織1HHY7Kの連続した組織切片におけるBMMF1 RepのIHC検出（スケールバー＝100µm）を示す。

【図4】図4は、産生された抗体の特徴とRep内のエピトープの局在を示す。

【図5】図5は、BMMF1 Rep染色に基づく免疫反応性スコアを示す棒グラフ（X軸：免疫反応性スコア；Y軸：患者数）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、Repタンパク質が乳がん発症のリスクを高めるバイオマーカーを示す可能性があり、乳がん患者の全生存予後を判定するためのマーカーとして有用であるという教示を提供するものである。

【0016】

「乳がん」とは、女性又は男性の乳房組織における制御不能な細胞増殖の結果として発生した癌を意味する。これらの悪性腫瘍は、既存の良性腺腫及び過形成の結果として発症

10

20

30

40

50

することがあり、遺伝子の変化が正常な成長から癌性の成長への移行を促進する。乳がん」とは、前段階、初期段階、後期段階、及びそれらに由来する転移を意味する。

【0017】

異なる実施形態では、本発明はまた、将来の疾患リスクを評価するための、健康な乳房組織（癌の診断を受けていない、あるいは癌の特異的なヒントを持っていない人の組織）の系統的試験を包含し得る。これは、本発明が乳がんを発症する素因を決定するのにも適していることを意味している。

【0018】

本明細書で使用される「Repタンパク質」は、DNA複製関連タンパク質（RepB）を指す。Repタンパク質はDNA結合活性を有し、エピソーム/ウイルスDNA分子の複製の開始に必須であり得る。一般に、Repタンパク質は、小さなSphinxゲノムの群からのRepタンパク質を指す（Whitleyら、2014）。特に、Repタンパク質はMSBI1ゲノムコードRepタンパク質（MSBI1 Rep）、MSBI2ゲノムコードRepタンパク質（MSBI2 Rep）、CMI1ゲノムコードRepタンパク質（CMI1 Rep）、CMI2ゲノムコードRepタンパク質（CMI2 Rep）又はCMI3ゲノムコードRepタンパク質（CMI3 Rep）である。好ましくは、MSBI1 Repタンパク質は、受入番号LK931491の下でEMBLデータベースに寄託されたMSBI1.176によってコードされ、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有し、又はRepタンパク質は、受入番号LK931492の下でEMBLデータベースに寄託されたMSBI2.176によってコードされるMSBI2であり、配列番号8に示されるアミノ酸配列を有する（Whitley, Gunstら、2014）。別の好ましい実施形態において、CMI1 Repタンパク質は、受入番号LK931487の下でEMBLデータベースに寄託されたCMI1.252によってコードされ、配列番号10に示されるアミノ酸配列を有する。別の好ましい実施形態において、CMI2 Repタンパク質は、受入番号LK931488の下でEMBLデータベースに寄託されたCMI2.214によってコードされ、配列番号11に示されるアミノ酸配列を有する。別の好ましい実施形態において、CMI3 Repタンパク質は、受入番号LK931489の下でEMBLデータベースに寄託されたCMI3.168によってコードされ、配列番号12に示されるアミノ酸配列を有する。特に好ましい実施形態において、Repタンパク質は、配列番号1の1～229のアミノ酸から本質的になるBMMF1ゲノムの間で保存されたN末端領域、及び配列番号1のアミノ酸230～324から本質的になるMSBI1.176に特異的なC末端可変領域を含む。N末端保存領域は、配列番号1の1～136のアミノ酸から本質的になる推定上の第1のDNA結合ドメインと、配列番号1の137～229のアミノ酸から本質的になる第2の推定上のDNA結合ドメインとを含む。C末端ドメインは、任意の公知のタンパク質とほとんど配列相同性を示さず、そしてアミノ酸230～324からなる。

【0019】

「Repタンパク質」はまた、配列番号1又は配列番号8のタンパク質のフラグメント及び改変体を包含し、これらは配列番号1又は配列番号8のアミノ酸配列を有するRepタンパク質に特異的な抗Rep抗体に結合し得る。好ましくはこのようなフラグメントは配列番号1又は配列番号8のアミノ酸配列を有するタンパク質の免疫原性フラグメントであり、これらは配列番号1又は配列番号8のRepタンパク質に対する抗Repタンパク質抗体のための少なくとも1つのエピトープを含み、そして好ましくは少なくとも7、8、9、10、15、20、25又は50の連続するアミノ酸を含む。特定の実施形態では、フラグメントがRepタンパク質のドメイン、例えば、N末端保存領域、C末端可変領域、第1又は第2のDNA結合ドメインを含むか、又は本質的にそれらからなる。配列番号1又は配列番号8を有するタンパク質の変異体は配列番号1と比較して1つ以上のアミノ酸欠失、置換又は付加を含み、配列番号1又は配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の相同性を有し、変異体は、配列番号1又は配列番号8のアミノ酸配列を有するR

10

20

30

40

50

repタンパク質に特異的な抗Rep抗体に結合することができる。変異体の定義内に含まれるのは、例えば、アミノ酸の1つ以上のアナログ（例えば、非天然アミノ酸、ペプチド核酸（PNA）などを含む）、置換された結合を有するポリペプチド、ならびに天然に存在するもの及び天然に存在しないもの両方の、当技術分野で公知の他の改変を含むポリペプチドである。Repタンパク質という用語は、異種アミノ酸配列、リーダー配列、又はタグ配列などを有する融合タンパク質を含む。本発明の特定の実施形態において、タンパク質タグは上記のRepタンパク質（例えば、MSBI1、MSBI2、CMI1、CMI2又はCMI3からなる群より選択されるRepタンパク質）上に遺伝的に移植される。特に、少なくとも1つのタンパク質タグは、配列番号1～3、8～12、14のいずれか1つに示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドに結合される。このようなタンパク質タグは、化学物質によって、又は酵素的手段によって除去可能であり得る。タンパク質タグの例は、精製のためのアフィニティー又はクロマトグラフィータグである。例えば、Repタンパク質はHis6-Tag（配列番号4）、T7-Tag（配列番号5）、FLAG-Tag（配列番号6）及びStrept-III-Tag（配列番号7）からなるグループから選択されるように、Tag配列に融合することができる。His-Tag（配列番号4）、T7-Tag（配列番号5）、FLAG-Tag（配列番号6）、又はStreptIII-Tag（配列番号7）。さらに、緑色蛍光タンパク質（GFP）又はその変異体などの蛍光タグを、本発明によるRepタンパク質に付着させることができる。

10

【0020】

特に好ましい実施形態において、MSBI1ゲノムコード化Repタンパク質（MSBI1 Rep）はヒト細胞株（例えば、HEK-293、HEK293T、HEK293FT、HaCaT、HeLa、SiHa、CaSki、HDMEC、L1236、L428、BJAB、MCF7、Colo678、任意の一次細胞株）ならびにウシ細胞株（例えば、MAC-T）又はマウス細胞株（例えば、GT1-7）における産生のためにコドン最適化される。これは、PCT/EP2017/075774に詳細に記載されている。

20

【0021】

本発明のRepタンパク質（上記で定義したRep断片及びRep変異体を含む）は、古典的化学合成によって調製することができる。合成は、均一溶液中又は固相中で行うことができる。組換えDNA技術の手段により、ポリペプチドを調製することもできる。

30

【0022】

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

【0023】

本明細書で使用される「抗Rep抗体」は、Repタンパク質に検出可能なレベルで結合する抗体を指し、非Repタンパク質よりも本発明のRepタンパク質により強く親和性である。好ましくは、Repタンパク質に対する抗原親和性がバックグラウンド結合よりも少なくとも2倍大きい。特に、抗Rep抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有するMSBI1 Rep又はMSBI2 Repに特異的である。特定の実施形態では、抗体がMSBI1 Rep、MSBI2 Rep、CMI1 Rep、CMI2 Rep及び/又はCMI3 Repに対して交差特異的である。特定の実施形態では、抗Rep抗体がMSBI1 Rep、MSBI2 Rep、CMI1 Rep、CMI2 Rep及び/又はCMI3 Repの少なくとも2つ、好ましくは全てに対して交差特異的である。

40

【0024】

本発明者らはまた、抗Repタンパク質抗体を含むことが疑われる検体とRepタンパク質を、Repタンパク質が検体中に存在する任意のこのような抗体に結合することを可能にする条件下で接触させることによって、乳がん患者の抗体レベルを試験した。このような条件は、典型的には過剰のRepタンパク質を使用する生理学的温度、pH及びイオン強度である。検体とのRepタンパク質のインキュベーションに続いて、抗原を含む免疫複合体を検出する。特定の実施形態において、Repタンパク質はシグナル生成化合物

50

(例えば、検出可能な標識)に結合されるか、又はシグナル生成化合物に結合されるさらなる結合剤(例えば、二次抗ヒト抗体)が、免疫複合体を検出するために使用される。

【0025】

抗R e p抗体はタンパク質抗原としてのR e pタンパク質に基づくアッセイにおいて検出及び定量され得、これは、試料において疑われる哺乳動物(例えば、ヒト)抗体の標的として役立つ。好ましくは、R e pタンパク質は精製され、そして検体は例えば、血清又は血漿であり得る。この方法は、マトリックス上へのR e pタンパク質の固定化、続いて、固定化されたR e pタンパク質の検体とのインキュベーションを含む。最後に、R e pタンパク質と検体の抗体との間に形成された免疫複合体のR e p結合抗体を、シグナル生成化合物、例えば、二次HRP-(西洋ワサビ-ペルオキシダーゼ)結合検出抗体に結合した検出結合剤によって定量し、HRP基質に基づく定量を可能にする。このシグナル生成化合物又は標識は、それ自体が検出可能であるか、又は追加の化合物と反応させて検出可能な生成物を生成することができる。

10

【0026】

イムノアッセイの設計は、非常に多くのバリエーションがあり、そして多くの形式が当該分野で公知である。プロトコールは例えば、固体支持体又は免疫沈降を使用し得る。ほとんどのアッセイはシグナル生成化合物、例えば、標識抗体又は標識R e pタンパク質に結合された結合剤の使用を含む;標識は、例えば、酵素、蛍光、化学発光、放射性、又は色素分子であり得る。免疫複合体からのシグナルを増幅するアッセイも知られており、その例は、ビオチン及びアビジン又はストレプトアビジンを利用するアッセイ、ならびにELISAアッセイなどの酵素標識及び酵素媒介免疫アッセイである。

20

【0027】

イムノアッセイは、不均一又は均一フォーマットであり得、そして標準又は競合型であり得る。標準フォーマット及び競合フォーマットの両方が、当該技術分野で知られている。

【0028】

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

【0029】

さらなる実施形態において、本発明者らは、サンプル中の増加した量のR e pタンパク質が乳がんの診断又は素因と相関する方法を使用した。このような実施形態において、サンプル中のR e pタンパク質は、抗R e p抗体によって検出される。

30

【0030】

本明細書中で使用される「サンプル」は、癌性乳房組織、癌性組織を取り囲む周囲組織、及び(良性)過形成を包含する生物学的サンプルをいう。サンプルは、組織培養物又は生検検体などの組織サンプルを包含する。

【0031】

このような方法は、抗R e p抗体によって被験体由来のサンプル中のR e pタンパク質を検出する工程を包含する。このような方法において、R e pタンパク質は、免疫組織化学的方法又は免疫蛍光顕微鏡法によって組織サンプル中で検出される。

40

【0032】

特定の実施形態において、抗R e p抗体は、サンプル中のR e pタンパク質の検出又は捕捉のために使用される。

【0033】

用語「抗体」は、好ましくは異なるエピトープ特異性を有するブールされたポリクローナル抗体、ならびに個別のモノクローナル抗体調製物から本質的になる抗体に関連する。本明細書で使用される場合、用語「抗体」(Ab)又は「モノクローナル抗体」(Mab)は完全な免疫グロブリン分子、ならびにR e pタンパク質に特異的に結合することができる抗体断片(例えば、Fab及びF(ab')₂断片など)を含むことを意味する。Fab

50

b 及び F (a b ')₂ フラグメントは、インタクトな抗体の F c フラグメントを欠き、循環からより迅速に取り除かれ、インタクトな抗体よりも非特異的な組織結合が少ないかもしれない。従って、これらのフラグメント、ならびに F A B 又は他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物が好ましい。さらに、本発明の目的に有用な抗体には、キメラ、一本鎖、多機能（例えば、二重特異性）及びヒト化抗体又はヒト抗体が含まれる。

【 0 0 3 4 】

特定の実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントはシグナル生成化合物に結合され、例えば、検出可能な標識を有する。抗体又はその抗原結合フラグメントは、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤又は酵素で直接的又は間接的に検出可能に標識することができる。当業者は、通常の実験を用いて、抗体に結合するための他の適切な標識を知っているか、又はそれを確認することができる。

10

【 0 0 3 5 】

抗 R e p 抗体は好ましくは当業者に周知の方法により、配列番号 1 又は配列番号 8 のアミノ酸配列又はその断片を有する R e p タンパクに対し、産生（生成）される。

【 0 0 3 6 】

特定の実施形態において、抗 R e p 抗体は、小さな S p h i n x ゲノム（抗 S m a l l - S p h i n x 様 R e p 抗体又は抗 S S L R e p 抗体）の群からのいくつかの又は全ての種類の R e p タンパク質に結合することができる本発明の方法において使用される。このような抗 S S L R e p 抗体は、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 2 2 9 の R e p タンパク質の保存された N 末端領域内のエピトープに結合する。特定の実施形態では、配列番号 2（配列番号 1 のアミノ酸 3 2 ~ 4 9）又は配列番号 3（配列番号 1 のアミノ酸 1 9 6 ~ 2 1 6）内のエピトープに結合する抗 S S L R e p 型の抗 R e p 抗体が使用される。配列番号 2 及び配列番号 3 のペプチド断片は、小さな S p h i n x ゲノム群由来の R e p タンパク質の間で高度に保存されており、それらの親水性のために露出しているようである。抗 S S L R e p 型の抗 R e p 抗体は、例えばマウス又はモルモットの免疫化によって、配列番号 2 又は 3 に示されるアミノ酸配列から本質的になるペプチドによって；又は配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 2 2 9 の保存された N 末端 R e p タンパク質領域に由来する、好ましくは少なくとも 8 ~ 1 5 アミノ酸を含む他の免疫原性フラグメントによって産生され得る。

20

【 0 0 3 7 】

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

30

【 0 0 3 8 】

好ましくは、本発明の方法がピコグラムからフェムトグラムまでの範囲までの R e p タンパク質を検出することができる抗 R e p 抗体を使用する。

このような抗 R e p 抗体群の例を表 1 に示す：

【 0 0 3 9 】

40

【表 1】

抗体 グループ	Rep-タンパク質の 局在	特異性	抗体	DSMZ 寄託
グループ A	細胞質 + 核膜 (+核)	MSBI1 + 小さなsphinx様 全てのBMMF1	AB01 523-1-1 (Ab 1-5)	DSM ACC3327
グループ B	細胞質内の スペckル	MSBI1 + 小さなsphinx様	AB02 304-4-1 (Ab 5-2)	DSM ACC3328
グループ C	細胞質 + 核膜 (+核)	MSBI1 特異的	MSBI1 381-6-2 (Ab 3-6) MSBI1 572-13-19 (Ab 10-3) MSBI1 617-1-3 (Ab 11-5)	DSM ACC3329
グループ D	細胞質内の スペckル	MSBI1 特異的	D1: MSBI1 961-2-2 (Ab 9-2) D2: MSBI1 761-5-1 (Ab 13)	DSM ACC3331 DSM ACC3330

10

20

【0040】

グループ A の抗 Rep 抗体は配列番号 3 (配列番号 1 の a a 1 9 6 ~ 2 1 6) に示されるアミノ酸配列内にエピトープを有し、そして小さな Sphinx ゲノム群のこの保存されたエピトープを含む MSBI1 Rep 及び Rep タンパク質 (例えば、MSBI2、CMI1、CMI4) を検出し得る。免疫蛍光アッセイにおいて、このような抗 Rep 抗体は特異的な Rep 局在化パターンを検出し、ここで、主要な局在化は、細胞質及び核膜にわたって均一に分布され；そしてさらなる弱く均一に分布された局在化が核において見られる。このようなグループ A 抗体の例は、実施例においてグループ A 抗体として使用された抗体 AB01 523-1-1 (抗体 1-5 と呼ばれる；DSMZ ACC3327) である。

30

【0041】

グループ B の抗 Rep 抗体は配列番号 2 (配列番号 1 の a a 3 3 ~ 5 0) に示されるアミノ酸配列内にエピトープを有し、小さな Sphinx ゲノムグループ (例えば、MSBI2、CMI1、CMI4) のこの保存されたエピトープを含む MSBI1 Rep 及び Rep タンパク質を検出することができる。免疫蛍光アッセイにおいて、このような抗 Rep 抗体は、Rep タンパク質の特異的スペckル (細胞質凝集) (しばしば核膜の周辺) を検出する。このようなグループ B 抗体の例は AB02 304-4-1 (抗体 5-2 と呼ばれる；DSMZ ACC3328) として指定される抗体であり、これは、実施例においてグループ B 抗体として使用された。

40

【0042】

グループ C の抗 Rep 抗体は、MSBI1 (配列番号 1) の構造エピトープを特異的に検出する。免疫蛍光アッセイにおいて、このような抗 Rep 抗体は、特異的な Rep 局在化パターンを検出し、ここで、主要な局在化は、細胞質及び核膜にわたって均一に分布され；そしてさらなる弱く均一に分布された局在化が核において見られる。このようなグループ C 抗体の例は、a a 2 3 0 ~ 3 2 4 の配列中にエピトープを有するグループ C 抗体として実施例において使用された抗体 MSBI1 381-6-2 (抗体 3-6 と呼ばれる；DSMZ ACC3329) である。グループ C 抗体の別の例は、MSBI1 Rep (a a 2 3 0 ~ 3 2 4) の C 末端ドメインにおけるエピトープを検出する抗体 MSBI1 572-13-19 (抗体 10-3 と呼ばれる) である。グループ C 抗体の別の例は、M

50

S B I 1 R e p (a a 1 ~ 1 3 6) の N 末端ドメインにおけるエピトープを検出する抗体 M B S I 1 6 1 7 - 1 - 3 (抗体 1 1 - 5 と呼ばれる) である。

【 0 0 4 3 】

グループ D の抗 R e p 抗体は M S B I 1 の構造エピトープ (配列番号 1) を特異的に検出し、ここで、「 D 1 」として指定される抗体 M S B I 1 9 6 1 - 2 - 2 (抗体 9 - 2 と称される ; D S M A C C 3 3 3 1) は、 M S B I 1 の C 末端ドメイン中の配列番号 9 (a a 2 8 1 - 2 8 7) に示されるエピトープを検出する。抗体 M S B I 1 7 6 1 - 5 - 1 (抗体 1 3 と呼ばれる ; D S M A C C 3 3 2 8) が「 D 2 」として指定されるが、 M S B I 1 の 3 D 構造エピトープを検出し、これはインビボ条件下でのみアクセス可能であり、ウェスタンブロットではアクセスできない。免疫蛍光アッセイにおいて、このような抗 R e p 抗体は、 R e p タンパク質の特異的スペckル (細胞質凝集) (しばしば核膜の周辺) を検出する。本発明を、以下の実施例によってさらに説明するが、これらに限定されるものではない：

【 実施例 】

【 0 0 4 4 】

実施例 1 : 乳房組織における B M M F タンパク質ターゲットの検出

すべての組織サンプルは、組織バンクの規定及びハイデルベルク大学倫理委員会の承認に基づき、国立腫瘍疾患センター (N C T 、ハイデルベルク、ドイツ、ハイデルベルク大学病院病理学研究所) の組織バンクから提供された。

【 0 0 4 5 】

組織の染色

パラフィン包埋組織切片 (約 4 μ m 厚) を、 E D T A エピトープ回収 (S i g m a E 1 1 6 1) 後、 Z y t o m e d C h e m - P l u s H R P P o l y m e r - K i t (Z y t o m e d 、 P O L H R P - 1 0 0) 及び D A B S u b s t r a t e K i t H i g h C o n t r a s t (Z y t o m e d 、 D A B 5 0 0 p l u s) を用いて、所定の抗体インキュベーション (表 2 参照) 及びヘマトキシリン対比染色で染色した。スライドはデジタルスライドスキャナー (浜松) でスキャンし、 N D P . v i e w 2 P l u s ソフトウェア (浜松) を用いて解析した。

【 0 0 4 6 】

【 表 2 】

抗体	出所	宿主	希釈	終濃度 μg/ml	インキュベーション時間
一次					
Rep mAb #3-6	T. Bund, DKFZ	マウス	1:500	3.9	室温で30分間
Rep mAb #10-3	T. Bund, DKFZ	マウス	1:500	3.9	
CD68	Cell signaling #76437	ウサギ	1:1000		
二次					
ウサギ抗マウス抗体	Abcam #125904	ウサギ	1:500		室温で20分間

【 0 0 4 7 】

抗 R e p 抗体 (m A b 1 0 - 3 、 m A b 3 - 6 など) を用いた染色では、乳がん患者サンプル 7 G 6 M J X 及び 1 H H Y 7 K の間質腫瘍組織領域におけるタンパク質ターゲットの特異的な検出が示された (図 2 及び 3) 。一般的に、抗 R e p の検出では、主に間質内

の細胞の細胞質領域にある小さなサイズの凝集体が強く染色された。さらに、抗 R e p 抗体で染色されたシグナルと C D 6 8 陽性のマクロファージとの共局在も観察された。R e p 特異的抗体が最も多く検出された領域は、C D 6 8 陽性細胞が最も多く検出された領域と相関しており、R e p 特異的抗原が炎症組織領域に局在していることを示唆している。すなわち、炎症性単球、循環マクロファージ、又は組織内常駐マクロファージが特に多く存在する領域である。アイソタイプコントロール抗体を用いた対照染色では、シグナルは検出されなかった。

【 0 0 4 8 】

実施例 2：組織の染色と組織の分析

組織マイクロアレイ Z T M A 2 6 は、チューリッヒ大学の提供により作成された。このデータセットには、患者ごとに 1 つの腫瘍組織スポットが含まれている。Z T M A 2 6 の染色は B O N D M A X 機（ライカバイオシステムズ）で E D T A エピトープリトリバルバッファー（A b c a m , # a b 9 3 6 8 0）を用いて全自動で行った。一次抗体抗 B M M F 1 R e p（# 3 - 6 , m o n o c l o n a l , D K F Z H e i d e l b e r g）とアイソタイプコントロール抗体（B i o l e g e n d I g G 1 , M G 1 - 4 5）を室温で 3 0 分間インキュベートした（ $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）。二次ウサギ抗マウス（A b c a m # 1 2 5 9 0 4）を室温で 2 0 分間インキュベートした。検出は、D A B クロモゲンとヘマトキシリン対比染色を含む B o n d P o l y m e r R e f i n e D e t e c t i o n K i t（L e i c a # D S 9 8 0 0）を用いて行った。スライドは浜松の N a n o z o o m e r スライドスキャナー（浜松）でスキャンし、N D P . v i e w 2 P l u s ソフトウェア（浜松）で解析した。

【 0 0 4 9 】

組織分析

組織マイクロアレイ（T M A）上の B M M F 1 R e p 染色の解析では、抗体染色は、染色された細胞の割合（陽性率）と、組織スポットの間質 / 間隙部分におけるシグナルの強度（I）の 2 つのパラメータに基づいて特徴付けられた。上皮部分や腫瘍細胞は、一般的に B M M F の陽性化の対象ではないため、解析には含めなかった。B M M F 1 R e p 染色の陽性度（P O S）は、3 段階で評価した。0 は全く陽性の組織部分がないことを示し、1 は 1 ~ 1 0 % の陽性、2 は 1 1 ~ 3 0 % の陽性、3 は 3 0 % 以上の陽性細胞が組織スポットの複数の領域に分布していることを示した。強度（I）は以下のように評価した。0 = 検出されない、1 = 中程度、2 = 強い染色。統計解析のため、免疫反応性スコア（I R S）を以下のように算出した。 $I R S = I \times P O S$ ；最小値 = 0、最大値 = 6（表 2）。

【 0 0 5 0 】

【表 3】

T M A 上での B M M F 1 R e p 染色の定量化のためのスコアリングパラメータ

標的	強度(染色強度I)	I	陽性 (陽性細胞の割合 POS)	POS
BMMF1 Rep	0	検出なし	0	0
	1	中程度	1	1-10%
	2	強い	2	11-30%
			3	>31%

【 0 0 5 1 】

$I R S = I \times P O S$

I R S = 免疫反応性スコア

これらのスクーリング基準を用いて、B M M F 1 R e p 染色に基づく腫瘍周囲組織（1

6名の患者)のサンプルは

12%の陰性(IRS 0)

88%が陽性(IRS 1以上)[うち44%が有意に陽性=IRS 2以上]

これらの結果は、図5に棒グラフで示されている。

【0052】

【表4-1】

配列概要

配列番号	配列	
1	MSBI1.176によってコードされたRepタンパク質のアミノ酸配列 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAIEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFNVERHT AYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDDTATVEIIFAPAVVPLITRLE EQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLICWRSTGKTPIIELDEFKRIGVLDTEYTRTDNLKMR VIELALKQINEHTDITASYEQHKKGRVITGFSFKFKHKKQNSDKTPKNSDSSPRIVKHSQIPT NIVKQPENAKMSDLEHRASRVTEIMRNLSDRFKQGDESAIDMMKRIQSEIITDAIADQWE SKLEEFQGVVF	10
2	Repペプチド断片のアミノ酸配列 EARETGKGINANDPLTVH	
3	Repペプチド断片のアミノ酸配列 KQINEHTDITASYEQHKKGRV	
4	His-Tag (2つの中性アミノ酸と共に) GAHHHHHH	20
5	T7-Tag MASMTGGQQMG	
6	FLAG-Tag DYKDDDDK	
7	Strep-II-Tag WSHPQFEK	
8	MSBI2.176によりコードされたRepタンパク質のアミノ酸配列 MSKLVVKDNALMNASYNLDLVEQRLILLAIEARESGKGINANDPLTVHA ESYINQFGVHRVTAYQALKDACDNLFARQFSYQSKSEKGNIQNHRSRWVS EIIYIDTEATVKIIFAPAIVPLITRLEEQFTKYDIEQISDLSSAYAIRLY ELLICWRSTGKTPIIIGLGEFRNRVGVLDSEYHRIAHLKERVIEHSIKQIN EHTDITATYEQHKKGRITITGFSFKFKQKPKQAEIATETPKTATNDPDTT KPLTEPQIAKYSMILCKLGSISDLSNFPDYPAFANWIGNILRNPEKADEQ IAKRIFTALKTETDYSKKN	30
9	MSBI.1 特異的エピトープ NRLSDRF	
10	CMI1.252によりコードされたRepタンパク質のアミノ酸配列 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFNVERHT AYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDDTATVEIIFAPAVVPLITRLE EQFTQYDIEQISELSSAYAVRLYELLICWRSTGKTPIIDLTEFRKRLGVLDTEYTRTDNLKMRV IELGLKQINEHTDITASYEQHKKGRITITGFSFKFKQKKKTGAEMPKNSDSSPHIEKPSQIPANI AKQPENAKKDDLGHASKITGLIMSNGLADRFKRGDESVIDMMKRIKEEITDITADQWEN KLEEFQGVIFQS	40

【0053】

【表 4 - 2】

11	<p>CMI2.214によりコードされたRepタンパク質のアミノ酸配列</p> <p>MSDLIVKDNALMNASYNLDLVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHAESYINQFGVARQ TAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRANITSRWVSQIAYIDETATVEVIFAPAVVPLITR LEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLICWRSTGKTPVIELAEFRKRLGVLNDEYTRSDNFK KWIENPIKQINEHTDITASYEQHKKGRTITGFSFKFKQKKKTEPETPKNSDSSQRIEKPSQIP ANIVKQPENANLSDLQHRASKITGLIMSNRLSDRFKQGDESIMQMMARIQSEITTDSDIADQ WQSKLEEFVVVF</p>	10
12	<p>CMI3.168によりコードされたRepタンパク質のアミノ酸配列</p> <p>MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFNVERH TAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRANITSRWVSQIAYIDETATVEVIFAPAVVPLITR LEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLICWRSTGKTPVLDLTFEFRKRLGVLNDEYTRSDNFK KMRVIEQSLKQINKHTDITASYEQHKKGRTITGFSFKFKQKKKTEPETPKNDSGVSKPKTV EIPAENVKQPKNTNLSDLKRVRMITGAIKNNLASRFQHGNEPLDMMKRIQSEITSDETA DLWQNKLESMGVVF</p>	20
13	<p>コドン最適化MSBI RepのDNA配列</p> <p>ATGAGCGACCTGATCGTGAAAGACAATGCCCTGATGAACGCCTCCTACAACTGGCACTGG TCGAACAGAGACTGATTCTGCTGGCTATCATCGAGGCAAGGGAGACCGCAAGGGCATCA ACGCCAATGACCCCTGACAGTGACGCCAGCTCCTACATCAACCAGTTTAAATGTGGAGCG CCACACCGCCTATCAGGCCCTGAAGGACGCCTGCAAGGATCTGTTTGCCCGGCAGTTGAG CTACCAGGAGAAGCGGGAGAGAGGCAGGATCAACATCACAAGCAGATGGGTGTCCAGAT CGGCTATATGGACGATACCGCCACAGTGGAGATCATCTTTGCACCAGCAGTGGTGCTCT GATCACCAGGCTGGAGGAGCAGTTCACACAGTACGACATCGAGCAGATCTCCGGAAGTGT TAGCGCCTACGCCGTGCGCATGTATGAGCTGCTGATCTGTTGGCGGTCTACCGGCAAGAC ACCTATCATCGAGCTGGATGAGTTCGCAAGCGGATCGGCGTGCTGGACACCGAGTACAC CAGAACAGATAACCTGAAGATGAGAGTGATCGAGCTGGCCCTGAAGCAGATCAATGAGCA CACCGATATCACAGCCTCTTATGAGCAGCACAAGAAGGGCCGCGTGATCACCGGCTTCAGC TTTAAGTTCAAGCACAAGAAGCAGAAGTCTGACAAGACACCAAGAATAGCGATTCTCTC CCCGGATCGTGAAGCACAGCCAGATCCCTACCAACATCGTGAAGCAGCCAGAGAATGCCAA GATGTCCGACCTGGAGCACAGGGCATCTAGGGTGACAGGCGAGATCATGAGAAATAGGCT GAGCGATCGGTTCAAGCAGGGCGACGAGTCCGCCATCGATATGATGAAGAGAATCCAGTC CGAGATCATCACCGACGCCATCGCCGATCAGTGGGAATCTAACTGGAAGAGTTTGGAGT CGTGTTTGGAGCACATCACCATCATCATCACTGA</p>	30 40

【 0 0 5 4 】

【 0 0 5 5 】

14	<p>コドン最適化MSBI Repタンパク質の配列</p> <p>MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAIIIEARETGKGINANDPLTVHASSYINQFNVERHT AYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDDTATVEIIFAPAVVPLITRL EEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELICWRSTGKTPIIELDEFKRIGVLDTEYTRTDNLKM RVIELALKQINEHTDITASYEQHKKGRVITGFSFKFKHKQNSDKTPKNSDSSPRIVKHSQIP TNIVKQOPENAKMSDLEHRASRVTEIMRNRLSDRFKQGDESAIDMMKRIQSEIITDAIADQ WESKLEEFVVFGA</p>
15	<p>MSBI1 Rep 野生型のDNA配列</p> <p>ATGAGCGATTTAATAGTAAAAGATAACGCCCTAATGAATGCTAGTTATAACTTAGCTTTGG TTGAACAGAGGTTAATTCTATTAGCAATCATAGAAGCGAGAGAAACAGGCAAAGGGATTAA TGCCAATGATCCTTTAACAGTTCATGCAAGTAGCTATATCAATCAATTTAACGTAGAAAGG CATACGGCATATCAAGCCCTCAAAGATGCTTGTAAGACTTGTTTGCCCGTCAATTCAGTT ACCAAGAAAAGCGAGAACGAGGACGAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTCGCAAATTG GCTATATGGACGATACAGCAACCGTTGAGATTATTTTTGCCCTGCGGTTGTTCTCTGAT TACACGGCTAGAGGAACAGTTCACCCAGTACGATATTGAGCAAATTAGCGGTTTATCGAGT GCATATGCTGTTTCGTATGTACGAACTGCTGATTTGTTGGCGTAGCACAGGCAAAACACCAA TTATTGAGCTAGACGAGTTTAGAAAAGCGAATAGGTGTTTTAGATACTGAATACACTAGAAC AGATAATTTAAAGATGCGAGTTATTGAATTAGCCCTAAAACAAATCAACGAACATACAGAC ATCACAGCAAGCTATGAACAACACAAAAAAGGGCGAGTGATTACAGGATTCTCATTCAAGT TTAAGCACAAGAAACAAAACAGCGATAAAACGCCAAAAAATAGCGATTCTAGCCACGTAT CGTAAACATAGTCAAATCCCTCCAACATTGTAAACAGCCTGAAAACGCCAAAAATGAGCG ATTTAGAACATAGAGCGAGCCGTGTTACAGGGGAAATAATGCGAAATCGTCTGTCAGATC GGTTTAAACAAGGCGATGAATCAGCAATCGACATGATGAAACGTATTCAAAGTGAAATAAT AACCGATGCAATAGCAGACCAGTGGGAAAGCAAACCTGGAGGAGTTTGGCGTGGTTTTTTA G</p>

参考文献

Eilebrecht, S., et al. (2018), "Expression and replication of virus-like DNA in human cells", *Scientific Reports* 8:2851

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

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

10

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

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

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

20

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

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

30

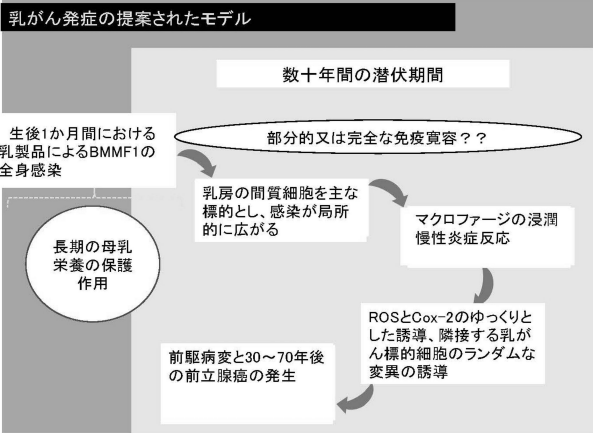
zur Hausen, H., Bund, T., de Villiers, E.-M. (2017). „Infectious agents in bovine red meat and milk and their potential role in cancer and other chronic diseases." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Volume 407, 83-116.

40

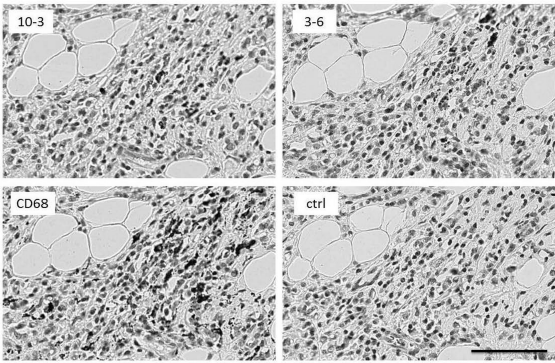
50

【 図 面 】

【 図 1 】

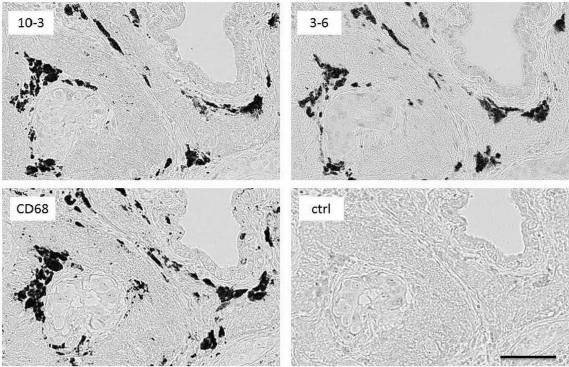


【 図 2 】

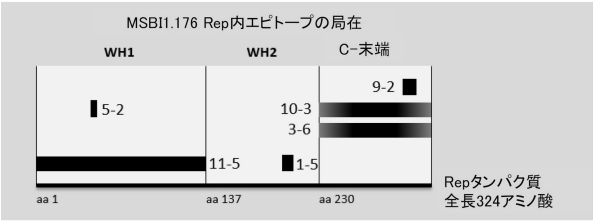


10

【 図 3 】



【 図 4 】



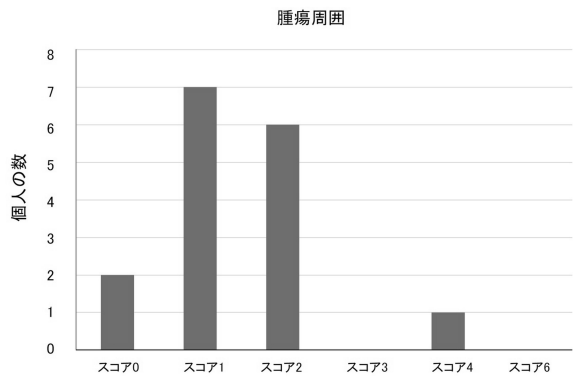
20

30

40

50

【図 5】



10

【配列表】

0007391980000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 ド ヴィリエ - ツア ハウゼン , エセル - ミシェル
ドイツ連邦共和国 6 9 4 8 3 ヴァルトミヒエルバッハ アイヒェンシュトラッセ 1
- (72)発明者 ツア ハウゼン , ハラルド
ドイツ連邦共和国 6 9 4 8 3 ヴァルトミヒエルバッハ アイヒェンシュトラッセ 1
- (72)発明者 エルンスト , クラウディア
ドイツ連邦共和国 6 9 4 3 6 シェーンブルン タールシュトラッセ 2
- (72)発明者 テスマー , クラウディア
ドイツ連邦共和国 7 4 8 6 9 シュヴァルツァハ ヘーエンシュトラッセ 2 3
- 審査官 西浦 昌哉
- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 9 / 0 0 8 0 5 2 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 0 0 5 0 5 4 (W O , A 2)
EILEBRECHT, S. et al. , Expression and replication of virus-like circular DNA in human cells
, SCIENTIFIC REPORTS , 2018年02月12日 , Vol.8/No.2851 , p.1-15
YANG, J. et al. , The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis , INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY
, 2015年06月15日 , Vol.8/No. 6 , p.6656-6664
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 9 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)