



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110914685 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201780062068.4

(22)申请日 2017.10.10

(30)优先权数据

16193119.1 2016.10.10 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/075774 2017.10.10

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/069296 EN 2018.04.19

(83)生物保藏信息

DSM ACC3327 2017.09.28

DSM ACC3328 2017.09.28

DSM ACC3329 2017.09.28

DSM ACC3330 2017.09.28

DSM ACC3331 2017.10.06

(71)申请人 德国癌症研究公共权益基金会

地址 德国海德尔堡

(72)发明人 哈拉尔德·祖尔·豪森

埃塞尔-米歇尔·德维利耶

蒂莫·邦德

塞巴斯蒂安·艾勒布雷希特

(74)专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理

有限公司 51258

代理人 魏彦 洪玉姬

(51)Int.Cl.

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/564(2006.01)

权利要求书2页 说明书20页

序列表11页

PCT/RO/134表4页 附图7页

(54)发明名称

REP蛋白作为蛋白质抗原用于诊断试验

(57)摘要

描述了用于诊断多发性硬化症(MS)用途的DNA复制相关的(Rep)蛋白,其中,(a)来自受试者的样本中的Rep蛋白或其片段的量与对照样本中的量相比增加;或者来自受试者的样本中的抗Rep蛋白抗体的量与对照样本中的量相比增加与MS的诊断有关,其中Rep蛋白是MSBI1 Rep或MSBI2 Rep。

1. 用于诊断多发性硬化症 (MS) 用途的DNA复制相关的 (Rep) 蛋白, 其中,
 - (a) 来自受试者的样本中的Rep蛋白或其片段的量与对照样本中的量相比增加, 至少2倍; 或者
来自受试者的样本中的抗Rep抗体的量与对照样本中的量相比增加, 至少2倍与MS的诊断有关; 以及
 - (b) Rep蛋白包括
 - (i) SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;
 - (ii) 能够与特异于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的SEQ ID NO:1的片段; 或
 - (iii) 具有与(i) 或(ii) 的氨基酸序列90%或更高同源性, 并且能够与特异于具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的Rep蛋白, 其中, 所述SEQ ID NO:1的片段包括在由SEQ ID NO:1的氨基酸1至229组成的氨基酸序列内的表位。
3. 根据权利要求1或2所述的Rep蛋白, 其中, 与对照样本相比Rep蛋白或其片段或抗Rep抗体的量增加, 至少5倍, 指示MS。
4. 根据权利要求1所述的Rep蛋白, 其中, 所述蛋白由SEQ ID NO:13所示的多核苷酸编码。
5. 一种抗Rep抗体, 选自抗体AB01 523-1-1 (DSM ACC3327)、抗体AB02 304-4-1 (DSM ACC3328)、抗体MSBI1 381-6-2 (DSM ACC3329)、抗体MSBI1 761-5-1 (DSM ACC3330) 和抗体MSBI1 961-2-2组成的组。
6. 权利要求5所述的抗Rep抗体在根据权利要求1至4的任一项的方法中的用途。
7. 在受试者中诊断MS的方法, 包括以下步骤
 - (a) 使来自受试者的样本与权利要求1的(b)中限定的Rep蛋白一起温育;
 - (b) 检测所述来自受试者的样本中与Rep蛋白形成免疫复合物的抗体的量; 以及
 - (c) 将在所述来自受试者的样本中与Rep蛋白结合的抗体的量相比于对照样本中的量增加, 至少2倍, 与MS的诊断相关联。
8. 根据权利要求7所述的方法, 其中, 在步骤(a)中所述Rep蛋白被固定化, 然后将固定化的所述Rep蛋白与所述来自受试者的样本一起温育。
9. 根据权利要求7所述的方法, 其中, 在步骤(a)中, 在细胞中表达所述Rep蛋白, 然后将所述细胞与所述来自受试者的样本一起温育。
10. 根据权利要求8或9所述的方法, 其中, 在步骤(b)中, 通过检测连接有信号产生化合物的结合剂来对与Rep蛋白形成免疫复合物的抗体的量进行定量。
11. 根据权利要求7所述的方法, 其中, 在步骤(a)中, 将所述来自受试者的样本中的所述抗体固定化, 然后与规定量的Rep蛋白一起温育。
12. 根据权利要求7至11中任一项所述的方法, 其中, 所述来自受试者的样本是血清或血浆样本。
13. 在患者中诊断MS的方法, 包括以下步骤
 - (a) 通过与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所包括的表位结合的抗Rep抗体检测来自受试者的样本中的Rep蛋白的量; 以及

(b) 将在步骤(a)中在所述来自受试者的样本中检测到的Rep蛋白的量相比于对照样本中的量增加,至少2倍,与MS的诊断相关联。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,特异于Rep蛋白的所述抗体与在选自由SEQ ID NO:1的从1至136、从137至229以及从230至324的氨基酸组成的组的氨基酸序列内的表位结合。

15. 根据权利要求13或14所述的方法,其中,所述来自受试者的样本选自由血清样本、血浆样本或组织样本组成的组。

16. 用于诊断MS的试剂盒,包括

(a) Rep蛋白,其中所述Rep蛋白包括:

(i) SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;

(ii) 能够与对具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质有特异性的抗Rep抗体结合的SEQ ID NO:1的片段;或

(iii) 具有与(i)或(ii)的氨基酸序列90%或更高同源性,并且能够与对具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质有特异性的抗Rep抗体结合的氨基酸序列,

(b) 抗人抗体,与可检测的标签结合并能够与对具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质有特异性的抗Rep抗体结合;以及

(c) 固体基质,适合用于固定化根据(a)的Rep蛋白或在血清或血浆样本中疑似存在的对具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质有特异性的抗Rep抗体。

17. 根据权利要求16所述的试剂盒,用于在选自由酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫试验(RIA)、酶免疫试验(EIA)、荧光免疫试验(FIA)、发光免疫试验(LIA)和条带试验组成的组的试验中的用途。

REP蛋白作为蛋白质抗原用于诊断试验

[0001] 本发明涉及DNA复制相关的(Rep)蛋白或抗Rep抗体的检测和定量用于诊断神经退行性疾病,诸如例如多发性硬化症(MS)。具体地,本发明涉及MSBI1基因组编码的Rep蛋白。

[0002] 多发性硬化症(MS)的病因学尚未得到解决。因此,需要MS的生物标志物,其可以用来诊断MS和/或监测MS或治疗MS和/或评估MS的易感性。

[0003] 多发性硬化症(MS)的特点是损害大脑和脊髓中的神经细胞的MS病变的脱髓鞘作用。MS症状或作为突然恶化的发作(复发、加重、偶发、突发)发生,或作为随时间的逐渐恶化(进行性)而发生。脱髓鞘启动炎症过程,其触发T细胞以及细胞因子和抗体的释放。采用神经影像学、分析脑脊液和诱发电位等用于MS的诊断。

[0004] 从不同的测试材料中分离出17种不同但部分相关的DNA分子的谱。(multiple sclerosis (MS) brain tissue, bovine sera, milk) (Funk, Gunst et al. 2014, Gunst, Zur Hausen et al. 2014, Lamberto, Gunst et al. 2014, Whitley, Gunst et al. 2014)。

[0005] 在这些分离物中,与传染性海绵状脑病(TSE)关联的分离物Sphinx 1.76 (1,758bp; 登记号HQ444404, (Manuelidis L. 2011)) 紧密相关的两种DNA分子是从MS患者的脑组织中分离的。这些分离物为MSBI1.176 (MSBI, 多发性硬化脑分离物) (1,766bp) 和MSBI2.176 (1,766bp), 分别命名为“MSBI1基因组”和“MSBI2基因组”。MSBI1,176与Sphinx 1.76的序列具有98%的核苷酸相似性。这些分离物的大型开放阅读框(ORFs) 编码假定的DNA复制蛋白,它们之间具有高度相似性。另一个常见特征是存在重复子样串联重复。该重复区域的排列表明了单核苷酸核心中的变异。该重复子样重复可构成Rep蛋白的结合位点。这些分离物的序列已经以登记号LK931491 (MSBI1.176) 和LK931492 (MSBI2.176) (Whitley C. et al. 2014) 保存在EMBL数据库中,并已经在WO 2016/005064中进行了比对和描述。

[0006] 从牛乳中得到其他分离物。这些牛乳分离物(CMI) 为CMI1.252、CMI2.214和CMI3.168, 分别命名为“CMI1基因组”、“CMI2基因组”和“CMI3基因组”。这些分离物的序列已经以登记号LK931487 (CMI1.252)、LK931488 (CMI2.214) 和LK931489 (CMI3.168) 保存在EMBL数据库中,并已经在WO 2016/005064中进行了比对和描述。

[0007] 本发明人已发现,MSBI1基因组示出了转录的RNA的大量生产,且MSBI1基因组编码的Rep蛋白在人类细胞中表达。本发明人已发现,MSBI1和MSBI2基因组编码的Rep蛋白(MSBI1Rep和MSBI2Rep) 代表了用于致病性筛选试验的生物标志物。作为DNA复制相关的蛋白(RepB), Rep蛋白具有DNA结合活性,且对于启动游离或病毒DNA分子的复制可以是必不可少的。根据本发明,结构上类似于MSBI1基因组编码的Rep的Rep蛋白示出了显著的自寡聚化和聚集潜力,其在体内和体外的原核系统中均有描述。(Giraldo, Moreno-Diaz de la Espina et al. 2011, Torreira, Moreno-Del Alamo et al. 2015)。

[0008] 本发明提供了基于使用作为抗原的Rep蛋白的病原特异性、诊断性筛选试验的平台。

[0009] 在某些实施方式中,由于分离的DNA(例如MSBI1) 试剂的致病活性与Rep蛋白表达的联系,因而使用抗Rep抗体作为病原性标志物。患者血清中抗Rep抗体含量的增加表明,相应的患者肯定在足以启动Rep特异性免疫响应的足够长的时间段内暴露于与Rep相关的蛋

白或自身表达的Rep。作为人抗体的靶点,Rep蛋白用作抗原。根据抗Rep抗体的量的定量,可以诊断或监测急性MS以及MS的易感性。因为已经认识到,样本中诱导的抗Rep抗体或表达的Rep蛋白的量的增加表明了MS的发生和/或状态,因此可以分别使用抗Rep抗体和Rep蛋白的量的增加作为诊断MS的病原性生物标志物。

[0010] 有利地,可以在血液样本(诸如血清或血浆样本)中检测到MS的病原性生物标志物,而不需要从脑脊液中获得样本。

[0011] 因此,本发明提供了DNA复制相关的(Rep)蛋白,用于诊断神经退行性疾病,例如多发性硬化症(MS)。在某些实施方式中,Rep蛋白由MSBI1基因组编码,并包括(i)如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列;

[0012] (ii)能够与特异于包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的SEQ ID NO:1的片段;或

[0013] (iii)具有与(i)或(ii)的氨基酸序列90%或更高同源性,并且能够与特异于包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的氨基酸序列。

[0014] 在其他实施方式中,Rep蛋白由MSBI2基因组编码,并包括(i)如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;

[0015] (ii)能够与特异于包括如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的SEQ ID NO:8的片段;或

[0016] (iii)具有与(i)或(ii)的氨基酸序列90%或更高同源性,并且能够与特异于包括如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的氨基酸序列。

[0017] 在其他实施方式中,Rep蛋白由CMI1基因组编码,并包括(i)如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列;

[0018] (ii)能够与特异于包括如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的SEQ ID NO:10的片段;或

[0019] (iii)具有与(i)或(ii)的氨基酸序列90%或更高同源性,并且能够与特异于包括如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的氨基酸序列。

[0020] 在其他实施方式中,Rep蛋白由CMI2基因组编码,并包括(i)如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;

[0021] (ii)能够与特异于包括如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的SEQ ID NO:11的片段;或

[0022] (iii)具有与(i)或(ii)的氨基酸序列90%或更高同源性,并且能够与特异于包括如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的氨基酸序列。

[0023] 在其他实施方式中,Rep蛋白由CMI3基因组编码,并包括(i)如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列;

[0024] (ii)能够与特异于包括如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的SEQ ID NO:12的片段;或

[0025] (iii)具有与(i)或(ii)的氨基酸序列90%或更高同源性,并且能够与特异于包括如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的蛋白质的抗Rep抗体结合的氨基酸序列。

[0026] 在某些实施方式中,与对照样品中的Rep蛋白量相比,受试者样品中Rep蛋白的量的增加与神经退行性疾病例如MS的诊断相关,即指示MS。根据本发明,通过与对照样品相比

Rep蛋白的量增加,为至少2倍,来指示神经退行性疾病例如MS的诊断或神经退行性疾病例如MS的易感性。

[0027] 在其他实施方式中,与对照样品中的抗Rep抗体量相比,受试者样品中抗Rep抗体的量的增加与神经退行性疾病例如MS的诊断相关,即指示MS。根据本发明,通过与对照样品相比抗Rep抗体的量增加,为至少2倍,来指示神经退行性疾病例如MS的诊断或神经退行性疾病例如MS的易感性。

[0028] 本发明的Rep蛋白几乎可以用于使用已知抗原来检测抗体或细胞介导的免疫响应的任何测试形式。因此,本发明还包括检测对Rep蛋白的细胞介导免疫响应,例如T细胞免疫响应。

[0029] 在某些实施方式中,本发明提供了在受试者中诊断神经退行性疾病的方法,包括以下步骤

[0030] (a) 将来自受试者的样本与Rep蛋白一起温育;

[0031] (b) 检测受试者样本中与Rep蛋白形成免疫复合物的抗体的量;以及

[0032] (c) 将相比于对照样本中的量与Rep蛋白结合的抗体的量与神经退行性疾病的诊断相关联。

[0033] 在特定实施方式中,本发明提供了在受试者中诊断MS的方法,包括以下步骤

[0034] (a) 将来自受试者的样本与Rep蛋白一起温育;

[0035] (b) 检测受试者样本中与Rep蛋白形成免疫复合物的抗体的量;以及

[0036] (c) 将相比于对照样本中的量与Rep蛋白结合的抗体的量与MS的诊断相关联。

[0037] 在特定实施方式中,Rep蛋白是固定化的,例如附连到支撑物或载体上,然后将固定化的Rep蛋白与来自受试者的样本一起温育。

[0038] 在其他实施方式中,在细胞中表达Rep蛋白,然后将这些细胞与来自受试者的样本一起温育。

[0039] 在某些实施方式中,与Rep蛋白形成免疫复合物的抗体的量通过连接有信号产生化合物的能够与该免疫复合物的抗Rep抗体结合的额外的结合剂来量化,例如可检测的标记的二级抗体,优选地抗人抗体。

[0040] 在其他实施方式中,将来自受试者的样本中的抗体固定化,然后与规定量的Rep蛋白一起温育。

[0041] 优选地,来自受试者的样本和对照样本为血液样本,诸如血清或血浆样本。

[0042] 在其他实施方式中,本发明提供了在患者中诊断神经退行性疾病的方法,包括以下步骤

[0043] (a) 通过抗Rep抗体检测来自受试者的样本中的Rep蛋白的量,以及

[0044] (b) 将相比于对照样本中的量的在步骤(a)中在来自受试者的样本中检测到的Rep蛋白的量与神经退行性疾病的诊断相关联。

[0045] 在某些实施方式中,本发明提供了在患者中诊断MS的方法,包括以下步骤:

[0046] (a) 通过抗Rep抗体检测来自受试者的样本中的Rep蛋白的量,以及

[0047] (b) 将相比于对照样本中的量的在步骤(a)中在来自受试者的样本中检测到的Rep蛋白的量与MS的诊断相关联。

[0048] 在这样的实施方式中,来自受试者的样本和对照样本选自由血清样本、血浆样本

或组织样本组成的组。

[0049] 在特定实施方式中,抗Rep抗体与在选自由SEQ ID NO:1的从1至136、从137至229以及从230至324的氨基酸组成的组的氨基酸序列内的表位结合。例如,抗体与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所包括的表位结合。

[0050] 在其他实施方式中,本发明提供了用于诊断MS的试剂盒,包括(a) Rep蛋白,特别是MSBI1、MSBI2、CMI1、CMI2或CMI3Rep蛋白,(b) 连接有信号产生化合物的额外的结合剂,例如连接有可检测的标签并且能够与根据本发明的抗Rep抗体结合的抗人抗体,和(c) 适合于固定化根据(a)的Rep蛋白或抗Rep抗体的固体基质,其中,在样本中特别是血清或血浆样本中怀疑有辅助抗体。

[0051] 在特定实施方式中,将试剂盒放在一起用于免疫分析,例如选自由酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫试验(RIA)、酶免疫试验(EIA)、荧光免疫试验(FIA)、发光免疫试验(LIA)和条带试验组成的组。

附图说明

[0052] 图1示出了通过血清温育1D尺寸分辨的Rep蛋白膜条带的2×8个样本的血清筛选的实例。将包含Rep蛋白的硝化纤维素条带分别与MS血清样本组库或健康供体血浆组库的两种不同的血清/血浆稀释液(1:500和1:2000)一起温育。用抗人IgG连接HRP的二级抗体检测Rep结合的人IgG。通过密度测定法量化在全长Rep蛋白靶点的尺寸上的抗体信号(参考右侧的Coomassie蛋白染色和抗Rep WB对照)。

[0053] 图2示出了基于ELISA筛选的Rep特异性血清响应的定量。每96孔检测到50、100、200、400或800ng Rep蛋白(靶抗原)。在封闭并洗涤之后,将Rep蛋白抗原与合并的MS血清样本或者合并的对照血浆样本以1:500的稀释度在室温(RT)下温育6h。在洗涤并与连接HRP的抗人IgG HRP二级抗体温育以及最后的洗涤之后,通过TMB底物反应和在450nm处的吸光度测定来对Rep结合的人IgG的存在进行定量。定量表明信号强度与Rep蛋白(抗原)的量有良好的相关性。平均而言,MS组库的信号强度水平超过对照组库的强度,至少1.9倍。通常,基于ELISA的血清筛查表明了对于至少1:1000(数据未示出)的血清稀释度的可检测的血清抗体,因此该实验的滴度很可能大于1:1000,在1:2000-1:4000的区域中,或在平台优化后甚至更大。

[0054] 图3示出了基于ELISA筛选的Rep特异性血清响应的定量。每96孔检测到200ng Rep蛋白(靶抗原)。在封闭并洗涤之后,将Rep蛋白抗原与7个个体MS血清或者7个个体对照血清一式两份以1:500的稀释度在室温(RT)下温育6h。在洗涤并与连接有HRP的抗人IgG HRP二级抗体温育以及最后的洗涤之后,通过TMB底物反应和在450nm处的吸光度测定来对Rep结合的人IgG的存在进行定量。MS样本的平均强度超过对照血清的平均强度,至少8倍,一些MS样本显示为平均对照强度的10-16倍。

[0055] 图4至6示出了通过使用在y坐标上标出的抗Rep抗体A、B、C、D1和D2获得的免疫荧光图像数据。

[0056] 图7示出了Western Blot分析,其中A、B、C和D1标出了所使用的抗Rep抗体的组。

[0057] 图8示出了“优化的”(=SEQ ID NO:13)与“原始的”(=野生型;SEQ ID NO:15)MSBI1序列的序列比对。对优化后的密码子进行了标记。

[0058] 本发明提供了作为致病标志物的抗Rep抗体的存在的诊断筛选试验。样本中抗Rep抗体含量的增加表明,相应的受试者肯定在足以诱导Rep蛋白特异性免疫反应的足够长的时间段内暴露于与Rep相关的蛋白或自身表达的Rep蛋白。通过这样的筛选分析,可以进行基于抗Rep抗体的定量的对MS的诊断、预后和监测。在可替代的实施方式中,可以通过抗Rep抗体直接在样本中检测和定量Rep蛋白。

[0059] 本文使用的“Rep蛋白”是指DNA复制相关的蛋白(RepB)。Rep蛋白包括DNA结合活性,且对于启动游离/病毒DNA分子的复制可以是必不可少的。通常,Rep蛋白是指来自小Sphinx基因组的组的Rep蛋白(Whitley et al., 2014)。特别地,Rep蛋白为MSBI1基因组编码的Rep蛋白(MSBI1Rep)、MSBI2基因组编码的Rep蛋白(MSBI2Rep)、CMI1基因组编码的Rep蛋白(CMI1Rep)、CMI2基因组编码的Rep蛋白(CMI2Rep)或CMI3基因组编码的Rep蛋白(CMI3Rep)。优选地,MSBI1Rep蛋白由以登记号LK931491保存在EMBL数据库中的MSBI1.176编码,且具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,或者Rep蛋白是MSBI2,由以登记号LK931492保存在EMBL数据库中的MSBI2.176编码,且具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列(Whitley, Gunst et al. 2014)。在另一优选的实施方式中,CMI1Rep蛋白由以登记号LK931487保存在EMBL数据库中的CMI1.252编码,且具有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。在另一优选的实施方式中,CMI2Rep蛋白由以登记号LK931488保存在EMBL数据库中的CMI2.214编码,且具有如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。在另一优选的实施方式中,CMI3Rep蛋白由以登记号LK931489保存在EMBL数据库中的CMI3.168编码,且具有如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列。在特定的优选实施方式中,Rep蛋白包括在小Sphinx基因组中保守的N-末端区,基本上由SEQ ID NO:1的从1至229的氨基酸组成,以及对MSBI1.176有特异性的C-末端可变区,基本上由SEQ ID NO:1的从230至324的氨基酸组成。N-末端保守区包括基本上由SEQ ID NO:1的从1至136的氨基酸组成的假定的第一DNA结合结构域,和基本上由SEQ ID NO:1的从137至229的氨基酸组成的第二假定的DNA结合结构域。

[0060] “Rep蛋白”还包括具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的蛋白的片段和变体,其能够结合对具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Rep蛋白有特异性的抗Rep抗体。优选地,这样的片段是具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的蛋白质的免疫原性片段,其包括针对抗SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的Rep蛋白的抗-Rep蛋白抗体的至少一个表位,且优选地包括至少7、8、9、10、15、20、25或50个连续的氨基酸。在特定的实施方式中,片段包括或基本上由Rep蛋白的结构域组成,例如,N-末端保守区、C-末端可变区、第一或第二DNA结合结构域。具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的蛋白质的变体包括与SEQ ID NO:1相比一个或多个氨基酸的删除、替换或增加,且具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性,其中,变体能够结合对具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Rep蛋白有特异性的抗Rep抗体。变体的定义包括,例如包含氨基酸的一种或多种类似物的多肽(包括,例如非天然氨基酸、肽核酸(PNA)等)、具有替换的键的多肽以及本技术中已知的天然存在和非天然存在的其他修改。术语Rep蛋白包括具有异种氨基酸序列、具有前导序列或具有标签序列等的融合蛋白。在本发明的某些实施方式中,蛋白质标签被遗传地转移到上述Rep蛋白上,例如选自由MSBI1、MSBI2、CMI1、CMI2或CMI3组成的组的Rep蛋白。特别地,至少一个蛋白标签附接到由如SEQ ID NOs:1-3、8-12、14中的任何一个所示的氨基酸序列组成的多肽上。这样的蛋白标

签可以通过化学试剂或通过酶的方法去除。蛋白标签的实例有用于纯化的亲和标签或色谱标签。例如,Rep蛋白可以与例如选自由His₆-标签(SEQ ID NO:4)、T7-标签(SEQ ID NO:5)、FLAG-标签(SEQ ID NO:6)和Strep-II-标签(SEQ ID NO:7)、His-标签(SEQ ID No:4)、T7-标签(SEQ ID NO:5)、FLAG-标签(SEQ ID NO:6)或StrepII-标签(SEQ ID NO:7)组成的组的标签序列融合。此外,可以将诸如绿色荧光蛋白(GFP)或其变体的荧光标签附连到根据本发明的Rep蛋白上。

[0061] 在特定的优选实施方式中,MSBI1基因组编码的Rep蛋白(MSBI1Rep)是为在人细胞系(例如,HEK-293、HEK293TT、HEK293T、HEK293FT、HaCaT、HeLa、SiHa、CaSki、HDMEC、L1236、L428、BJAB、MCF7、Co1o678、任何原代细胞系)以及牛(例如MAC-T)或小鼠细胞系(例如GT1-7)中生产而经密码子优化的。关于密码子优化,可以将编码抗原的核苷酸序列设计为使用在将要产生抗原的受试者的基因中所使用的密码子。在优选的实施方式中,所使用的密码子是“人源化的”密码子。这样的密码子使用可提供抗原在人细胞中的高效表达。可以使用任何合适的密码子优化方法。这样的方法和对这样的方法的选择是本领域技术人员熟知的。根据本发明,MSBI1基因组编码的Rep蛋白(MSBI1Rep)的这样的密码子优化的变体包括或具有SEQ ID.No.:13所示的序列,并包括或具有SEQ ID.No.:14所示的序列。总共在编码Rep蛋白的927个核苷酸MSBI1Rep基因(从起始到终止密码子)中有686个核苷酸被替换,以改善密码子使用。具有对例如人密码子使用最佳的适应的完美密码子使用通过密码子适应指数(CAI)为1来描述,表示所有密码子都为人表达而优化。对于原始MSBI1编码的Rep基因,计算对人系统的CAI为0,67,其远远低于被认为是良好密码子适应的较低阈值的0,8的CAI。在MSBI1Rep基因的密码子优化之后,计算优化的DNA的CAI为0,94,表明对人系统为几乎最佳密码子适应。特别地,对18个极少使用的密码子进行了修改,其中大多数代表在人系统中使用频率非常低(<10%)的编码亮氨酸的密码子。在图8中示出了SEQ ID NO:13的密码子优化的MSBI1序列与SEQ ID NO:15的野生型MSBI1序列的序列比对。

[0062] 本发明的Rep蛋白,包括如上定义的Rep片段和Rep变体,可以通过经典化学合成来制备。合成可以在均相溶液中或在固相中进行。根据本发明的多肽还可以借助重组DNA技术来制备。根据本发明生产和纯化Rep蛋白的实例在实施例1中示出。

[0063] 如本文所用,“受试者”是指哺乳动物个体或患者,包括鼠、家畜例如牛、猿猴和人类。优选地,受试者为人类患者。

[0064] 如本文所用,“样本”是指包括液体和固体样本的生物样本。液体样本包括血液液体,诸如例如血清、血浆和脑脊液(CSF)。固体样本包括组织样本,诸如组织培养物或活检标本。

[0065] 如本文所用,“相关联”是指抗Rep抗体和Rep蛋白的量,即水平或滴度,分别与例如MS的疾病状态显著相关。该相关性通过检测来自待测试受试者的样本和对照样本中存在的量的差异程度来确定。“对照样本”意为单个样本或各种即多于两个对照样本的平均值。对照取自未被诊断为MS的健康个体。可替代地,该相关性可以通过用预先确定的截止值检测待测试受试者的样本中存在的量的差异程度来理论地确定。截止值是指在不同疾病状态之间,例如健康状态和患病状态之间,具有统计学显著分离的参考值。截止值可以通过使用本领域已知的统计测试对足够大的组的来自有病史的患者的测试样本和来自健康测试组的样本进行统计分析来确定。

[0066] 在某些实施方式中,对例如MS的诊断,通过与对照样本相比在来自受试者的样本中蛋白质即Rep蛋白和抗Rep抗体的量增加,各自至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍、500倍或1000倍来指示。

[0067] 如本文所用,“抗Rep抗体”是指在本发明的方法中以可检测水平与Rep蛋白结合的抗体,该抗体与本发明的Rep蛋白的亲合力比与非Rep蛋白的更强。优选地,Rep蛋白的抗原亲合力是背景结合的至少2倍。特别地,抗Rep抗体对具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的MSBI1Rep或MSBI2Rep有特异性。在特定的实施方式中,抗体对MSBI1Rep、MSBI2Rep、CMI1Rep、CMI2Rep和/或CMI3Rep有交叉特异性。在某些实施方式中,抗Rep抗体对MSBI1Rep、MSBI2Rep、CMI1Rep、CMI2Rep和/或CMI3Rep中的至少两个优选地全部有交叉特异性,并与SEQ ID NO:1的从1至136的氨基酸内的表位结合。

[0068] 所有试验的一个共同特征是,Rep蛋白与怀疑包含抗Rep蛋白抗体的样本在允许Rep蛋白与样本中存在的任何这样的抗体结合的条件下相接触。这样的条件典型地是生理温度、pH值和离子强度,使用过量的Rep蛋白。将Rep蛋白与样本温育,然后检测包括抗原的免疫复合物。在某些实施方式中,Rep蛋白与信号产生化合物(例如可检测的标签)连接,或者连接有信号产生化合物的额外的结合剂(例如二级抗人抗体)被用于检测免疫复合物。

[0069] 在基于Rep蛋白作为蛋白抗原的试验中,可以对抗Rep抗体进行检测和定量,其中Rep蛋白充当样品中疑似存在的哺乳动物(例如人类)抗体的靶点。优选地,Rep蛋白是纯化的(例如,参见实施例1),且样本可以是例如血清或血浆样本。该方法包括将Rep蛋白固定在基质上,然后将固定化的Rep蛋白与样品温育。最后,通过与连接有信号产生化合物的检测结合剂,例如允许基于HRP底物定量的二级HRP(辣根过氧化物酶)结合的检测抗体,对样本的Rep蛋白与抗体之间形成的免疫复合物的Rep结合的抗体进行定量。该信号产生化合物或标签本身是可检测的,或可与额外的化合物反应以生成可检测的产物。

[0070] 在其他实施方式中,间接地定量抗Rep抗体,通过首先将样本的抗体固定在基质上,然后与规定量的Rep蛋白温育,Rep蛋白可以是标记的或包括标签蛋白,其中固定化并存在于基质上的抗-Rep抗体从蛋白样本液体混合物中捕获Rep蛋白,然后对结合的Rep蛋白进行定量。

[0071] 在其他实施方式中,Rep蛋白可以在细胞中表达,并将这些细胞与样本温育。然后,对与由细胞表达的Rep蛋白结合的样本中的抗Rep抗体进行检测和定量。

[0072] 免疫试验的设计可进行很大的改变,且许多形式都是本领域已知的。例如,方案可使用固体支撑物或免疫沉淀。大多数试验涉及使用连接有信号产生化合物的结合剂,例如标记的抗体或标记的Rep蛋白;标记可以是例如酶、荧光、化学发光、放射性或染料分子。放大来自免疫复合物的信号的试验也是已知的;其实例为利用生物素和亲和素或链霉亲和素的试验,以及酶标记和介导的免疫试验,诸如ELISA试验。

[0073] 免疫试验可采用非均相或均相形式,并具有标准型或竞争型。在非均相形式下,多肽(Rep蛋白或抗Rep抗体)典型地与固体基质或支撑物或载体结合,以促进温育后样本从多肽中分离。可以使用的固体支撑物的实例有硝化纤维素(例如,以膜或微量滴定孔形式)、聚氯乙烯(例如,以薄片或微量滴定孔)、聚苯乙烯乳胶(例如,以珠或微量滴定板)、聚偏氟乙烯(被称为Immulon)、重氮化纸、尼龙膜、活性珠和蛋白A珠。典型地在将固体支撑物从测试样本中分离之后并在检测结合的抗Rep抗体之前清洗包含抗原多肽的固体支撑物。标准形

式和竞争形式两者都是本领域已知的。

[0074] 在均相格式中,将测试样本与Rep蛋白在溶液中温育。例如,它可以处于将沉淀所形成的任何Rep蛋白抗体复合物的条件下。这些试验的标准形式和竞争形式两者都是本领域已知的。

[0075] 在标准格式中,直接监测抗体-Rep蛋白复合物中的抗Rep抗体的量。这可以通过确定识别抗Rep抗体上的表位的(标记的)抗异种(例如抗人)抗体是否会由于复合物形成而结合来实现。在竞争形式中,通过监测对复合物中已知量的标记的抗体(或其他竞争配体)的结合的竞争效应来推断样本中抗Rep抗体的量。

[0076] 根据形式,通过多种已知技术中的任何一种检测包括抗Rep抗体的所形成的复合物(或在竞争性试验的情况下,竞争抗体的量)。例如,复合物中未标记的抗Rep抗体可以使用与标签(例如酶标签,诸如例如HRP)复合的抗异种Ig的缀合物来检测。

[0077] 在免疫沉淀或凝集试验形式中,Rep蛋白与抗Rep抗体之间的反应形成从溶液或悬浮液中析出的网状物,并形成可见的沉淀层或膜。如果样本中不存在抗Rep抗体,则不会形成可见的沉淀。

[0078] 所选择的固相可包括聚合或玻璃珠、硝化纤维素、微粒、反应盘的微孔、试管和磁珠。信号产生化合物可包括酶、发光化合物、色原体、放射性元素和化学发光化合物。酶的实例包括碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶(HRP)和 β 半乳糖苷酶。强化剂化合物的实例包括生物素、抗生物素和亲和素。结合成员的强化剂化合物的实例包括生物素、抗生物素和亲和素。

[0079] 在其他实施方式中,本发明提供了多种方法,其中,样本中Rep蛋白的量增加与神经退行性疾病(例如MS)的诊断或易感性相关,或者被用于监测疾病(例如MS),或监测疾病(例如MS)的治疗。在这样的实施方式中,样本中的Rep蛋白通过抗Rep抗体检测。

[0080] 这样的方法包括以下步骤:

[0081] (a) 通过抗Rep抗体检测来自受试者的样本中的Rep蛋白的量;以及(b) 将相比于对照样本中的量的在步骤(a)中在来自受试者的样本中检测到的Rep蛋白的量与神经退行性疾病(例如MS)的诊断相关联。

[0082] 可在用于检测血清或血浆样本中的Rep蛋白的这样的方法中使用的试验的实例包括但不限于免疫沉淀、免疫荧光、斑点印迹和Western Blot。

[0083] 例如,可以将血清样本与抗Rep蛋白抗体温育以捕获样本中的Rep蛋白,然后进行Rep蛋白的免疫沉淀的步骤,且此后进行通过SDS-PAGE和Western Blot检测的步骤。

[0084] 在其他实例中,可将斑点印迹膜与血清温育,然后进行SDS-PAGE和Western blot的步骤。

[0085] 在另一实例中,将样本的血清稀释液加载到SDS-Page上,然后进行Western Blot。

[0086] 在其他实施方式中,通过免疫组织化学方法或免疫荧光显微镜法在组织样本中检测Rep蛋白。

[0087] 在某些实施方式中,使用抗Rep抗体来检测或捕获样本中的Rep蛋白。

[0088] 术语“抗体”优选地涉及基本上由具有不同表位特异性的合并的多克隆抗体组成的抗体以及不同的单克隆抗体制剂。如本文所用,术语“抗体”(Ab)或“单克隆抗体”(Mab)旨在包括能够与Rep蛋白特异性结合的完整的免疫球蛋白分子以及抗体片段(诸如例如Fab和F(ab')₂片段)。Fab和F(ab')₂片段缺乏完整抗体的Fc片段,更快地从循环中清除,且可能具

有比完整抗体更少的非特异性组织结合。因此,这些片段以及FAB或其他免疫球蛋白表达库的产物是首选的。此外,可用于本发明目的的抗体包括嵌合、单链、多功能(例如双特异性)和人源化抗体或人抗体。

[0089] 在某些实施方式中,其抗体或抗原结合片段与信号产生化合物连接,例如,携带可检测的标签。其抗体或抗原结合片段可以是直接或间接地可检测标记的,例如,用放射性同位素、荧光化合物、生物发光化合物、化学发光化合物、金属螯合剂或酶。本领域技术人员知道用于与抗体结合的其他合适的标签,或者能够使用常规实验确定这样的标签。

[0090] 抗Rep抗体优选地通过本领域技术人员熟知的方法针对具有SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其片段的Rep蛋白产生(生成)。

[0091] 在某些实施方式中,在本发明的方法中使用能够与小Sphinx基因组(抗小Sphinx样Rep抗体或抗SSLRep抗体)的组中的多种或所有类型的Rep蛋白结合的抗Rep抗体。这样的抗SSLRep抗体与SEQ ID NO:1的氨基酸1至229中的Rep蛋白的保守N-末端区内的表位结合。在特定的实施方式中,使用抗SSLRep类型的抗Rep抗体,其与SEQ ID NO:2(SEQ ID NO:1的氨基酸32-49)或SEQ ID NO:3(SEQ ID NO:1的氨基酸197-216)内的表位结合。SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的肽片段在小Sphinx基因组组中的Rep蛋白中是高度保守的,且由于其亲水性而似乎被暴露。可通过用基本上由SEQ ID NOs:2或3所示的氨基酸序列组成的肽类,或者用优选地包括源自SEQ ID NO:1的氨基酸1至229的保守N-末端Rep蛋白区域的至少8-15个氨基酸的其他免疫原性片段免疫例如小鼠或豚鼠来产生抗SSLRep型的抗Rep抗体。

[0092] 在其他实施方式中,使用对MSBI1Rep蛋白有特异性的抗Rep抗体。这样的抗体可以例如通过用具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的全长Rep蛋白免疫哺乳动物(诸如小鼠或豚鼠)来产生。

[0093] 优选地,本发明的方法使用能够在不同种类的体液(诸如例如血液、血清、脊髓液或脑脊液)中检测从皮克(picogramm)到飞克(femtogramm)的范围的Rep蛋白的抗Rep抗体。

[0094] 在本发明的方法中,可以使用特定类型的抗Rep抗体或两种或多种不同类型的抗Rep抗体的组库。如果使用不同类型的抗Rep抗体的组库,抗Rep抗体组库可包括与在Rep蛋白的不同结构域(例如,第一DNA结合结构域(例如SEQ ID NO:1的aa 1-136)、第二DNA结合结构域(例如SEQ ID NO:2的aa 137-229)和/或可变结构域(例如SEQ ID No:1的aa 230-324))内的不同表位结合,特别地与在MSBI1Rep蛋白(SEQ ID NO:1)的不同结构域内的不同表位结合的不同的抗Rep抗体。

[0095] 在其他实施方式中,抗Rep抗体用于从患者和/或健康个体中筛选Rep蛋白的探针。在例如神经退行性疾病患者的组织中选择性检测Rep蛋白,表明了样本中检测到的Rep蛋白的分离的DNA基因组与样本所来源的患者的疾病之间存在因果关系。

[0096] 对于通过抗Rep抗体方法检测Rep蛋白,可以应用诸如例如Western Blot、免疫荧光显微镜法或免疫组织化学方法。

[0097] 在某些实施方式中,使用能够在某些特定的细胞定位处检测Rep蛋白的抗Rep抗体。例如,抗Rep抗体可以检测细胞质、核膜和细胞核中的Rep蛋白,或者检测细胞质中的斑点。这样的抗Rep抗体的组的实例在表1中示出:

	抗体组	Rep 蛋白定位	特异性	抗体	DSMZ 保藏号
[0098]	A 组	细胞质+核膜(+ 细胞核)	MSBI1+小 -sphinx-样	AB01 523-1-1	DSM ACC3327
	B 组	细胞质中的斑点	MSBI1+小 -sphinx-样	AB02 304-4-1	DSM ACC3328
	C 组	细胞质+核膜(+ 细胞核)	MSBI1 特异性	MSBI1 381-6-2	DSM ACC3329
	D 组	细胞质中的斑点	MSBI1 特异性	D1: MSBI1 961-2-2 D2: MSBI1 761-5-1	DSM ACC3330

[0099] A组的抗Rep抗体具有在SEQ ID NO:3(SEQ ID NO:1的aa 198-217)中所示的氨基酸序列内的表位,且能够检测包括小Sphinx基因组组(例如MSBI2、CMI1、CMI4)的该保守表位的MSBI1Rep和Rep蛋白。在免疫荧光试验中,这样的抗Rep抗体检测特定的Rep定位模式,其中主要定位均匀分布在细胞质和核膜上;且在细胞核中可见到额外的弱的且均匀分布的定位。这样的A组抗体的实例是抗体AB01 523-1-1(DSM ACC3327),其在实施例作为A组抗体使用。

[0100] B组的抗Rep抗体具有在SEQ ID NO:2(SEQ ID NO:1的aa 33-50)中所示的氨基酸序列内的表位,且能够检测包括小Sphinx基因组组(例如MSBI2、CMI1、CMI4)的该保守表位的MSBI1Rep和Rep蛋白。在免疫荧光分析中,这样的抗Rep抗体特异性检测Rep蛋白的斑点(细胞质聚集)(通常在核膜的外围)。这样的B组抗体的实例是被称为AB02 304-4-1(DSM ACC3328)的抗体,其在实施例作为B组抗体使用。

[0101] C组的抗Rep抗体特异性检测MSBI1(SEQ ID NO:1)的结构表位。在免疫荧光试验中,这样的抗Rep抗体检测特定的Rep定位模式,其中主要定位均匀分布在细胞质和核膜上;且在细胞核中可见到额外的弱的且均匀分布的定位。这样的C组抗体的实例是抗体MSBI1 381-6-2(DSM ACC3329),其在实施例作为C组抗体使用。

[0102] D组的抗Rep抗体特异性检测MSBI1(SEQ ID NO:1)的结构表位,其中被指定为“D1”的抗体MSBI1 961-2-2检测在MSBI1的C-末端结构域中的SEQ ID NO:9(aa 281-287)中示出的表位。被指定为“D2”的抗体MSBI1 761-5-1(DSM ACC3328)检测MSBI1的3D结构表位,其仅在体内条件下可实现,且在Western Blots中不可实现。在免疫荧光分析中,这样的抗Rep抗体特异性检测Rep蛋白的斑点(细胞质聚集)(通常在核膜的外围)。

[0103] 在某些实施方式中,使用A、B、C或D组的抗Rep抗体;或至少两组不同的A、B、C或D组的抗Rep抗体的组合来确定探针中Rep蛋白定位的类型,以及这样的Rep蛋白定位是否与病

原体功能相关。例如,是否存在斑点。在某些实施方式即本发明的方法或试剂盒中,选自A组和B组的至少一种抗Rep抗体与选自C组和D组的至少一种抗Rep抗体组合。在特定的实施方式即本发明的方法或试剂盒中,A组的抗Rep抗体与选自B、C和D组的至少一种其他抗Rep抗体组合。例如,A组的抗Rep抗体可与C组和D组的其他抗Rep抗体组合。不同组的抗Rep抗体的这样的组合提高了诊断评估的特异性,特别是对MS的诊断。这些A、B、C或D组抗体优选地用于对MS的诊断。

[0104] 以下抗体于2017年9月28日保存在Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) [德国微生物保藏中心]:

[0105] 抗体AB01 523-1-1保藏号DSM ACC3327;

[0106] 抗体AB02 304-4-1保藏号DSM ACC3328;

[0107] 抗体MSBI1 381-6-2保藏号DSM ACC3329;和

[0108] 抗体MSBI1 761-5-1保藏号DSM ACC3330。

[0109] 抗体MSBI1 961-2-2已于2017年10月6日保存在DSMZ。

[0110] 在其他实施方式中,提供了用于诊断MS的试剂盒。该试剂盒可包括用于检测抗Rep抗体和/或Rep蛋白的材料,以及用于在诊断MS的试验中使用该材料的说明书。该试剂盒可包括一种或多种以下组分:根据本发明的生物标志物,即分别为Rep蛋白和抗-Rep抗体,例如表1的抗体;信号产生化合物、用于附连捕获剂的固体基质、样本的稀释剂、洗涤缓冲液。信号产生化合物是指与能够与本发明的生物标志物结合的额外的结合剂连接的,或直接与本发明的生物标志物连接的可检测的标签。

[0111] 本发明通过以下实施例进一步说明,但并不限于这些实施例:

[0112] 实施例1:

[0113] MSBI1 Rep蛋白纯化

[0114] 将在MSBI1基因组内鉴定的编码全长Rep开放阅读框(ORF)的核苷酸分子克隆到表达质粒(pEXP5-CT, Invitrogen)中,该表达质粒能够基于大肠杆菌(E.coli)高产量无细胞体外翻译系统(Expressway™无细胞大肠杆菌表达系统, Invitrogen)进行蛋白表达。通过加入20反应体积的包含100mM NaH₂PO₄、10mM Tris HCl、pH 8.0、5mM咪唑的8M尿素样本缓冲液pH 8.0,来使体外翻译反应内合成的具有SEQ ID No:1的氨基酸序列的Rep蛋白变性。然后在基于将C-末端His6-标签融合到Rep蛋白上的变性条件下(20mM咪唑用于洗涤,以及300mM咪唑用于蛋白洗脱)纯化Rep蛋白。纯化的质量由Coomassie蛋白染色和抗Rep蛋白抗体的Western Blotting确定。用密度测定法计算了Rep蛋白纯度,且其纯度大于95%。纯化后的蛋白可直接用于基于ELISA的血清筛选,或者进行SDS-Page,然后转移印迹到硝化纤维素膜上,用于血清温育1D尺寸分辨的Rep蛋白膜条带。

[0115] 实施例2:

[0116] 血清主板的生成

[0117] 首先等分血清样本以减少样本冻融循环。然后,通过在U形96孔板中由0.02% (w/v) 叠氮化钠最终浓度稳定,在PBS pH 7.2中产生1:1稀释的血清建立主板。该板当存储于4℃下并在无菌条件下处理时,在至少2个月内是稳定的,并在个体筛选实验之前作为进一步血清稀释(1:20最终稀释)的模板使用。

[0118] 实施例3:

[0119] 通过血清温育1D尺寸分辨的Rep蛋白膜条带的血清筛选

[0120] 对于基于1D分辨率Rep蛋白膜条带与血清的温育的筛选试验,将20 μ g纯化的Rep蛋白加载在Sigma Tru-PAGE 4-20%预制凝胶上。在凝胶装载前,将分隔凝胶袋的壁移除以产生一个大袋和用于分子量标准的单个的袋。在1D尺寸分辨的SDS-PAGE之后,使用标准的湿/罐转移印迹方案将蛋白转移印迹到硝化纤维素膜上。在此之后,用PonceauS对印迹膜上的蛋白(基本上是一条全长Rep蛋白带,运行高度为约40kDa)进行可视化,以检查转移质量并准备切割2mm宽度且完整1D尺寸分辨的膜的高度的膜条带。然后用每个500 μ l无血清封闭剂(Genetex Trident通用封闭剂)封闭条带1h。在此之后,基于两种不同的血清稀释液对血清进行表征。在4 $^{\circ}$ C下在线性振动装置上进行血清温育14h(过夜)。在此之后,在室温下用PBS-T pH7.2 0.1%吐温-20洗涤膜条带3 \times 5min。通过用连接有HRP的山羊抗人IgG(H+L)二级抗体在室温下温育1h,来检测血清内的Rep特异性结合的人IgG。在于室温下用PBS-T pH7.2 0.1%吐温20进行三次洗涤3 \times 5分钟之后,将每个个体的血清温育液的条带用胶带固定在塑料薄膜上。然后用ECL底物(Biorad Clarity)温育薄膜,以在BioRad WesternBlot检测系统上可视化的结合的人类IgG。通过密度测定法进行定量对应于与蛋白膜上的Rep带特异性结合的IgG的量的信号。

[0121] 图1中示出了1D尺寸分辨的Rep蛋白膜条带的结果的实例,且表2中示出了血清反应阳性的血清/血浆样本的定量:几乎50%的血清样本对两种稀释(1:500和1:2000)都得到很强的信号,且21个样本中只有3个是完全阴性的。在血浆对照中,7个样本在1:500稀释时得到中间信号(一些额外的样本信号非常低),而在1:2000稀释时只有3个样本得到非常微弱的信号,而所有其他的样本都是血清反应阴性的。所有的量化都证实MS-血清强度显示出相比于对照血清强度高的信号的趋势,至少30倍。

血清稀释	血清反应阳性的样本数量	
[0122] 1:2000	17	3
1:500	21	8
[0123]	MS 血清	对照血浆

[0124] 表2:血清反应阳性的血清/血浆样本的定量。

[0125] 根据MS血清组库和健康对照血浆组库(各总共21个)的1:500和1:2000的血清/血浆稀释的信号强度,计算检测Rep特异性人IgG的血清/血浆。对于两种稀释(1:500和1:2000),几乎50%的血清样本都得到很强的信号,且21个样本中只有3个是完全阴性的。在血浆对照中,7个样本在1:500稀释时得到中间信号(一些额外的样本信号非常低),而在1:2000稀释时只有3个样本得到非常微弱的信号,而所有其他的样本都是血清反应阴性的。所有的量化都证实MS-血清强度显示出相比于对照血清强度高的信号的趋势,至少30倍。

[0126] 实施例4:

[0127] 通过ELISA进行血清筛选

[0128] 将适量纯化的Rep蛋白(通常每孔为50和200ng之间)加入到预先置于Maxisorp 96

孔ELISA板 (Fisher Scientific) 中的pH 8.0 8M尿素和pH 7.2PBS的1:1混合物中。允许蛋白在线性振动装置上于4℃下与板基质结合14h。然后在室温下用PBS-T pH 7.2 0.1%吐温-20洗涤板3×5min,然后在4℃下用最终包含0.02%叠氮化钠的PBS pH 7.2 1% (w/v) BSA封闭至少14h。在此之后,将血清以1:500的稀释加入,并在室温下进行温育6h。在此之后,在室温下用PBS-T pH 7.2 0.1%吐温-20洗涤板3×5min。通过用连接有HRP的山羊抗人IgG (H+L) 二级抗体在室温下温育1h,来检测血清内的Rep特异性结合的人IgG。在于室温下用PBS-T pH 7.2 0.1%吐温-20洗涤3×5min三次之后,向每个孔中加入100μl TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺,对HRP敏感)的底物溶液并在室温下温育5min。通过加入100μl 8M乙酸/1M硫酸来停止反应。通过测量450nm处的吸光度在Perkin Elmer ELISA兼容装置上量化信号强度。

[0129] 基于ELISA筛选的Rep特异性血清响应的定量的实例结果在图2中示出:定量表明信号强度与Rep蛋白(抗原)的量有良好的相关性。平均而言,MS组库的信号强度水平超过对照组库的强度,至少1.9倍。通常,基于ELISA的血清筛查表明对于至少1:1000(数据未示出)的血清稀释度可检测的血清抗体,因此该实验的滴度很可能大于1:1000,在1:2000-1:4000的区域中,或在平台优化后甚至更大。

[0130] 实施例5:

[0131] 免疫荧光分析

[0132] 在免疫荧光8-孔腔中在DMEM 10%FCS(补充有1x谷氨酰胺(Gibco)和1x非必需氨基酸(Gibco))中培养HEK293TT细胞(125.000/孔)24h,然后使用聚乙烯亚胺(PEI)进行表达自体荧光标志物蛋白ZsGreen的对照质粒ZsGreen1CI(Clontech)或者在3'末端载有全长MSBI1Rep ORF编码ZsGreen-Rep融合蛋白的相同质粒的DNA转染。在DNA转染48小时后,用PBS洗涤细胞,在RT下用PBS 4%PFA在RT下固定20min,并在振动装置上在RT下用PBS 0,5%曲拉通X-100透化10min。用PBS洗涤细胞,并在RT下用PBS 1%BSA进行封闭45min。在37℃下在PBS 1%BSA中用1:500抗体稀释液(包括缺乏一级抗体的对照)进行小鼠单克隆抗Rep抗体(参见表1)的温育1h。用PBS洗涤细胞三次,然后在RT下与PBS 1%BSA温育15min。然后,在RT下在PBS 1%BSA中进行与二级抗体(AlexaFluor546山羊抗小鼠,1:500;DNA标志物Hoechst 33342,1:5.000)的温育45min。将细胞用PBS 1%BSA洗涤三次,并用PBS洗涤三次,然后安装盖片(Dako封固介质)。在Zeiss细胞观察仪(20x物镜,样本和对照物的暴露时间固定)上获得免疫荧光图像。

[0133] 免疫荧光图像(图4)显示用A组和C组抗体进行抗体处理可产生对细胞质+核膜(+细胞核)定位的靶蛋白的特异性检测,而无对聚集物的检测。相比之下,B组和D组抗体显示出与斑点蛋白的特异性共定位和无至微弱水平的细胞质信号。在ZsGreen融合蛋白上单独抗体的对照温育并没有产生显著的信号检测(使用相同暴露时间进行抗体信号的可视化)。

[0134] 实施例6:

[0135] 免疫荧光分析

[0136] 在免疫荧光8-孔腔中在DMEM 10%FCS(补充有1x谷氨酰胺(Gibco)和1x非必需氨基酸(Gibco))中培养HEK293TT细胞(125.000/孔)24h,然后使用聚乙烯亚胺(PEI)进行表达自体荧光标志物蛋白ZsGreen的对照质粒ZsGreen1CI(Clontech)或者在3'末端载有全长CMI1Rep ORF编码ZsGreen-Rep融合蛋白的相同质粒的DNA转染。在DNA转染48小时后,用PBS

洗涤细胞,在RT下用PBS 4%PFA在RT下固定20min,并在振动装置上在RT下用PBS 0,5%曲拉通X-100透化10min。用PBS洗涤细胞,并在RT下用PBS 1%BSA进行封闭45min。在37℃下在PBS 1%BSA中用1:500抗体稀释液(包括缺乏一级抗体的对照)进行小鼠单克隆抗Rep抗体(表1)的温育1h。将细胞用PBS洗涤三次,然后在RT下与PBS 1%BSA温育15min。然后,在RT下在PBS 1%BSA中进行与二级抗体(AlexaFluor546山羊抗小鼠,1:500;DNA标志物Hoechst 33342,1:5.000)的温育45min。将细胞用PBS 1%BSA洗涤三次,并用PBS洗涤三次,然后用盖片(Dako封固介质)封固。在Zeiss细胞观察仪(20x物镜,样本和对照物的暴露时间固定)上获得免疫荧光图像。

[0137] 免疫荧光图像(图5)显示,虽然A组抗体特异性地检测到细胞质+核膜(+细胞核)定位的靶蛋白而无对聚集物的检测,但B组抗体检测到斑点靶蛋白,有细胞质定位的靶蛋白的最小的背景。C组和D组的MSBI1特异性抗体不能产生对信号的特异性检测。抗体D1和D2两者均属于“D”组,但具有略微不同的表位识别。

[0138] 实施例7:

[0139] 免疫荧光分析

[0140] 在免疫荧光8-孔腔中在DMEM 10%FCS(补充有1x谷氨酰胺(Gibco)和1x非必需氨基酸(Gibco))中培养HEK293TT细胞(125.000/孔)24h,然后使用聚乙烯亚胺(PEI)进行对照质粒pcDNA3.1(-)(Invitrogen)或者表达全长MSBI1Rep ORF的密码子优化的变体(SEQ ID.No.:13)的相同质粒的DNA转染。在DNA转染48小时后,用PBS洗涤细胞,在RT下用PBS 4%PFA在RT下固定20min,并在振动装置上在RT下用PBS 0,5%Triton X-100透化10min。用PBS洗涤细胞,并在RT下用PBS 1%BSA进行封闭45min。在37℃下在PBS 1%BSA中用1:500抗体稀释液(包括缺乏一级抗体的对照)进行与小鼠单克隆抗Rep抗体(表1)的温育1h。将细胞用PBS洗涤三次,然后在RT下与PBS 1%BSA温育15min。然后,在RT下在PBS 1%BSA中进行与二级抗体(AlexaFluor488山羊抗小鼠,1:500;DNA标志物Hoechst 33342,1:5.000)的温育45min。将细胞用PBS1%BSA洗涤三次,并用PBS洗涤三次,然后用盖片(Dako封固介质)封固。在Zeiss细胞观察仪(20x物镜,样本和对照物的暴露时间固定)上获得免疫荧光图像。

[0141] 免疫荧光图像(图6)显示用A组和C组抗体进行抗体处理可产生对细胞质+核膜(+细胞核)定位的靶蛋白的特异性检测,而无对聚集物的检测。相比之下,B组和D组抗体显示出与斑点蛋白的特异性共定位和无至微弱水平的细胞质信号。在ZsGreen融合蛋白上单独抗体的对照温育并没有产生显著的信号检测(使用相同暴露时间进行抗体信号的可视化)。

[0142] 实施例8:

[0143] Western Blot分析

[0144] 在6-孔细胞培养板中在DMEM 10%FCS(补充有1x Glutamax(Gibco)和1x非必需氨基酸(Gibco))中培养HEK293TT(1,5Mio/6-孔)24h,然后使用聚乙烯亚胺(PEI)进行编码具有N-末端ZsGreen标签的作为融合蛋白的全长MSBI1、CMI1或MSBI2Rep蛋白的ZsGreen1CI质粒的DNA转染。DNA转染后48小时,将细胞用PBS洗涤,通过胰蛋白酶消化分离,再次用PBS洗涤并在SDS-PAGE Lämmli缓冲液中裂解(在98℃下煮沸5min)。将样本加载到具有一个大袋的预制的12,5%SDS-PAGE凝胶上。转移印迹之后,用PBS 5%脱脂乳封闭,然后将膜的每两条条带剪开,用于使条带与用表1中的不同的小鼠单克隆抗体各自一起温育(在PBS 5%脱脂乳中1:1000稀释)。将条带用PBS 0,1%Tween20洗涤三次,并与连接有HRP的抗小鼠二级

抗体温育,允许抗体的Westernblot分析,以在Biorad ChemiDoc装置上检测不同的ZsGreen-Rep融合蛋白。基于与ZsGreen抗体 (OriGene,1:2000) 的温育进行阳性对照检测。

[0145] 图7显示虽然A组和B组的抗体特异性地检测所有三种Rep融合蛋白,除MSBI1Rep融合蛋白之外还包括CMI1和MSBI2Rep融合蛋白,但C组和D组的MSBI1特异性抗体仅检测MSBI1Rep融合蛋白。抗体D2是WB阴性的,最可能是由于其检测3D结构表位,其在SDS-PAGE中在变性条件下不占优势,且在此处未测试。

[0146] 序列总结

序列 ID 号	序列
[0147] 1	由 MSBI1.176 编码的 Rep 蛋白的氨基酸序列 MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAIIHEARETGKGINANDPLTVHASSYI NQFNVERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKRERGRINITSRWVVSQIGYMDDT ATVEIIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELLCWRSTGKTPIIE LDEFKRIGVLDTEYTRTDNLKMRVIELALKQINEHTDITASYEQHKKGRVITG

[0148]

	FSFKFKHKKQNSDKTPKNSDSSPRIVKHSQIPTNIVKQPENAKMSDLEHRASRV TGEIMRNRLSDRFKQGDESAIDMMKRIQSEIITDAIADQWESKLEEFVVF
2	Rep 肽片段的氨基酸序列 EARETGKGINANDPLTVH
3	Rep 肽片段的氨基酸序列 KQINEHTDITASYEOKKGR
4	His-标签 (有两个中性填充氨基酸) GAHHHHHH
5	T7-标签 MASMTGGQMG
6	FLAG-标签 DYKDDDDK
7	Strep-II-标签 WSHPQFEK
8	由 MSBI2.176 编码的 Rep 蛋白的氨基酸序列 MSKLVVKDNALMNASYNLDLVEQRLILLAIIARESGKGINANDPLTVHA ESYINQFGVHRVTAYQALKDACDNLFARQFSYQSKSEKGNIQNHRSRWVS EIIYIDTEATVKIIFAPAIVPLITRLEEQFTKYDIEQISDLSSAYAIRLY ELLCWRSTGKTPIIGLGEFRNRVGVLDSEYHRIAHLKERVIEHSIKQIN EHTDITATYEQHKKGRITITGFSFKFKQKKPKQAEIATETPKTATNDPDTT KPLTEPQIAKYSMILCKLGSISDLSNFPDYPAFANWIGNILRNPEKADEQ IAKRIFTALKTETDYSKKN

[0149]

9	<p>MSBI.1 特异性表位</p> <p>NRLSDRF</p>
10	<p>由 CMI1.252 编码的 Rep 蛋白的氨基酸序列</p> <p>MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYI NQFNVERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRINITSRWVSQIGYMDDT ATVEIIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISELSSAYAVRLYELLCWRSTGKTPIID LTEFRKRLGVLDTHEYTRTDNLKMRVIELGLKQINEHTDITASYEQHKKGRTITG FSFKFKQKKKTGAEMPKNSDSSPHIEKPSQIPANIAKQPENAKKDDLGHASKI TGLIMSNGLADRFKRGDESVIDMMKRIKKEITTDTTADQWENKLEEFVIFQS</p>
11	<p>由 CMI2.214 编码的 Rep 蛋白的氨基酸序列</p> <p>MSDLIVKDNALMNASYNLDLVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHAESYI NQFGVARQTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRANITSRWVSQIAYIDET ATVEVIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLCWRSTGKTPVI ELAEFRKRLGVLNDEYTRSDNFKKWIENPIKQINEHTDITASYEQHKKGRTITG FSFKFKQKKKTEPETPKNSDSSQRIEKPSQIPANIVKQPENANLSDLQHRASKIT GLIMSNRLSDRFKQGDESIMQMMARIQSEITTDSDIADQWQSKLEEFVVVF</p>
12	<p>由 CMI3.168 编码的 Rep 蛋白的氨基酸序列</p> <p>MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAILEARETGKGINANDPLTVHASSYI NQFNVERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKREGRANITSRWVSQIAYIDET ATVEVIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRLYELLCWRRTGKTPVL DLTEFRKRLGVLDTHEYTRTDNLKMRVIEQSLKQINKHTDITASYEQHKKGRTIT GFSFKFKQKKKTEPETPKNNSDGVSKPKTVEIPAEEVVKQPKNTNLSGLEKRV</p>

[0150]

	<p>MITGAIKNNLASRFQHGNESPLDMMKRIQSEITSDETADLWQNKLESMGVVF</p>
<p>13</p>	<p>DNA 序列, MSBII Rep, 密码子优化的</p> <p>ATGAGCGACCTGATCGTGAAAGACAATGCCCTGATGAACGCCTCCTACAAC CTGGCACTGGTCGAACAGAGACTGATTCTGCTGGCTATCATCGAGGCAAGG GAGACCGGCAAGGGCATCAACGCCAATGACCCCTGACAGTGCACGCCAG CTCCTACATCAACCAGTTTAATGTGGAGCGCCACACCGCCTATCAGGCCCTG AAGGACGCCTGCAAGGATCTGTTTGCCCGGCAGTTCAGCTACCAGGAGAAG CGGGAGAGAGGCAGGATCAACATCACAAGCAGATGGGTGTCCCAGATCGG CTATATGGACGATAACGCCACAGTGGAGATCATCTTTGCACCAGCAGTGGTG CCTCTGATCACCAGGCTGGAGGAGCAGTTCACACAGTACGACATCGAGCAG ATCTCCGGACTGTCTAGCGCCTACGCCGTGCGCATGTATGAGCTGCTGATCT GTTGGCGGTCTACCGGCAAGACACCTATCATCGAGCTGGATGAGTCCGCA AGCGGATCGGCGTGCTGGACACCGAGTACACCAGAACAGATAACCTGAAGA TGAGAGTGATCGAGCTGGCCCTGAAGCAGATCAATGAGCACACCGATATCA CAGCCTCTTATGAGCAGCACAAGAAGGGCCGCGTGATCACCGGCTTCAGCT TTAAGTTCAAGCACAAGAAGCAGA ACTCTGACAAGACACCAAAGAATAGC GATTCTCTCCCCGGATCGTGAAGCACAGCCAGATCCCTACCAACATCGTGA AGCAGCCAGAGAATGCCAAGATGTCCGACCTGGAGCACAGGGCATCTAGG GTGACAGGCGAGATCATGAGAAATAGGCTGAGCGATCGGTTCAAGCAGGGC GACGAGTCCGCCATCGATATGATGAAGAGAATCCAGTCCGAGATCATCACCG ACGCCATCGCCGATCAGTGGGAATCTAAACTGGAAGAGTTTGGAGTCGTGT TTGGAGCACATCACCATCATCATCACTGA</p>
<p>14</p>	<p>蛋白序列, MSBII Rep, 密码子优化的</p>

	MSDLIVKDNALMNASYNLALVEQRLILLAIIIEARETGKGINANDPLTVHASSYI NQFNVERHTAYQALKDACKDLFARQFSYQEKRERGRINITSRWVVSQIGYMTDT ATVEIIFAPAVVPLITRLEEQFTQYDIEQISGLSSAYAVRMYELICWRSTGKTPIIE LDEFKRIGVLDTEYTRTDNLKMRVIELALKQINEHTDITASYEQHKKGRVITG FSFKFKHKKQNSDKTPKNSDSSPRIVKHSQIPTNIVKQPENAKMSDLEHRASRV TGEIMRNRLSDRFKQGDESAIDMMKRIQSEIITDAIADQWESKLEEFVGFVGA
15	DNA 序列, MSBII Rep, 野生型 ATGAGCGATTTAATAGTAAAAGATAACGCCCTAATGAATGCTAGTTATAACTT AGCTTTGGTTGAACAGAGGTTAATTCTATTAGCAATCATAGAAGCGAGAGAA ACAGGCAAAGGGATTAATGCCAATGATCCTTTAACAGTTCATGCAAGTAGCT ATATCAATCAATTTAACGTAGAAAGGCATACGGCATATCAAGCCCTCAAAGA TGCTTGTAAGACTTGTTTGCCCGTCAATTCAGTTACCAAGAAAAGCGAGA ACGAGGACGAATTAATATTACAAGTCGATGGGTTTCGCAAATTGGCTATATG GACGATACAGCAACCGTTGAGATTATTTTGCCCCTGCGGTTGTTCTCTGAT TACACGGCTAGAGGAACAGTTCACCCAGTACGATATTGAGCAAATTAGCGGT TTATCGAGTGCATATGCTGTTTCGTATGTACGAACTGCTGATTTGTTGGCGTAG CACAGGCAAAACACCAATTATTGAGCTAGACGAGTTTAGAAAGCGAATAGG TGTTTTAGATACTGAATACACTAGAACAGATAATTTAAAGATGCGAGTTATTG AATTAGCCCTAAAACAAATCAACGAACATACAGACATCACAGCAAGCTATG AACAACACAAAAAAGGGCGAGTGATTACAGGATTCTCATTCAAGTTTAAGC ACAAGAAACAAAACAGCGATAAAACGCCAAAAAATAGCGATTCTAGCCCAC GTATCGTAAAACATAGTCAAATCCCTCCAACATTGTAACAGCCTGAAAAC GCCAAAATGAGCGATTTAGAACATAGAGCGAGCCGTGTTACAGGGGAAATA ATGCGAAATCGTCTGTCAGATCGGTTTAAACAAGGCGATGAATCAGCAATCG ACATGATGAAACGTATTCAAAGTGAAATAATAACCGATGCAATAGCAGACCA GTGGGAAAGCAAACCTGGAGGAGTTTGGCGTGGTTTTTTAG

[0151]

[0152]

--	--

[0153]

参考文献:

[0154]

Funk, M., et al. (2014). "Isolation of protein-associated circular DNA

from healthy cattle serum”.Genome Announc 2(4)

[0155] Giraldo,R.,et al.(2011).“RepA-WH1prionoid:a synthetic amyloid proteinopathy in a minimalist host.”AB01 52-64

[0156] 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).

[0157] 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).

[0158] Manuelidis L.,2011.“Nuclease resistant circular DNAs co-purify with infectivity in scrapie and CJD”.J.Neurovirol.AB01 17131-145

[0159] Torreira,E.,et al.(2015).“Amyloidogenesis of bacterial prionoid RepA-WH1recaptiulates dimer to monomer transitions of RepA in DNAreplication initiation.”Structure 23(1):183-189

[0160] Whitley,C.,et al.(2014).“Novel replication-competent circulara DNA molecules from healthy cattle serum and milk and multiple sclerosis-affected human brain tissue.”Genome Announc 2(4)。

序列表

<110> 德国癌症研究公共权益基金会 (Deutsches Krebsforschungszentrum)

<120> Rep蛋白作为蛋白质抗原用于诊断试验

<130> PN19009336P

<150> EP16193119.1

<151> 2016-10-10

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 324

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MSBI1 Rep蛋白

<400> 1

```

Met Ser Asp Leu Ile Val Lys Asp Asn Ala Leu Met Asn Ala Ser Tyr
1           5           10           15
Asn Leu Ala Leu Val Glu Gln Arg Leu Ile Leu Leu Ala Ile Ile Glu
           20           25           30
Ala Arg Glu Thr Gly Lys Gly Ile Asn Ala Asn Asp Pro Leu Thr Val
           35           40           45
His Ala Ser Ser Tyr Ile Asn Gln Phe Asn Val Glu Arg His Thr Ala
           50           55           60
Tyr Gln Ala Leu Lys Asp Ala Cys Lys Asp Leu Phe Ala Arg Gln Phe
65           70           75           80
Ser Tyr Gln Glu Lys Arg Glu Arg Gly Arg Ile Asn Ile Thr Ser Arg
           85           90           95
Trp Val Ser Gln Ile Gly Tyr Met Asp Asp Thr Ala Thr Val Glu Ile
           100          105          110
Ile Phe Ala Pro Ala Val Val Pro Leu Ile Thr Arg Leu Glu Glu Gln
           115          120          125
Phe Thr Gln Tyr Asp Ile Glu Gln Ile Ser Gly Leu Ser Ser Ala Tyr
           130          135          140
Ala Val Arg Met Tyr Glu Leu Leu Ile Cys Trp Arg Ser Thr Gly Lys
145          150          155          160
Thr Pro Ile Ile Glu Leu Asp Glu Phe Arg Lys Arg Ile Gly Val Leu
           165          170          175
Asp Thr Glu Tyr Thr Arg Thr Asp Asn Leu Lys Met Arg Val Ile Glu

```


<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> His标签
<400> 4
Gly Ala His His His His His His
1 5
<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> T7标签
<400> 5
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
1 5 10
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> FLAG标签
<400> 6
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> Trep II标签
<400> 7
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5
<210> 8
<211> 319
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MSBI2.176

<400> 8

Met	Ser	Lys	Leu	Val	Val	Lys	Asp	Asn	Ala	Leu	Met	Asn	Ala	Ser	Tyr
1				5					10					15	
Asn	Leu	Asp	Leu	Val	Glu	Gln	Arg	Leu	Ile	Leu	Leu	Ala	Ile	Ile	Glu
				20				25						30	
Ala	Arg	Glu	Ser	Gly	Lys	Gly	Ile	Asn	Ala	Asn	Asp	Pro	Leu	Thr	Val
				35				40						45	
His	Ala	Glu	Ser	Tyr	Ile	Asn	Gln	Phe	Gly	Val	His	Arg	Val	Thr	Ala
				50				55						60	
Tyr	Gln	Ala	Leu	Lys	Asp	Ala	Cys	Asp	Asn	Leu	Phe	Ala	Arg	Gln	Phe
65								70						75	80
Ser	Tyr	Gln	Ser	Lys	Ser	Glu	Lys	Gly	Asn	Ile	Gln	Asn	His	Arg	Ser
				85					90					95	
Arg	Trp	Val	Ser	Glu	Ile	Ile	Tyr	Ile	Asp	Thr	Glu	Ala	Thr	Val	Lys
				100					105					110	
Ile	Ile	Phe	Ala	Pro	Ala	Ile	Val	Pro	Leu	Ile	Thr	Arg	Leu	Glu	Glu
				115					120					125	
Gln	Phe	Thr	Lys	Tyr	Asp	Ile	Glu	Gln	Ile	Ser	Asp	Leu	Ser	Ser	Ala
								135						140	
Tyr	Ala	Ile	Arg	Leu	Tyr	Glu	Leu	Leu	Ile	Cys	Trp	Arg	Ser	Thr	Gly
145								150						155	160
Lys	Thr	Pro	Ile	Ile	Gly	Leu	Gly	Glu	Phe	Arg	Asn	Arg	Val	Gly	Val
								165						170	175
Leu	Asp	Ser	Glu	Tyr	His	Arg	Ile	Ala	His	Leu	Lys	Glu	Arg	Val	Ile
				180					185					190	
Glu	His	Ser	Ile	Lys	Gln	Ile	Asn	Glu	His	Thr	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr
				195					200					205	
Tyr	Glu	Gln	His	Lys	Lys	Gly	Arg	Thr	Ile	Thr	Gly	Phe	Ser	Phe	Lys
								215						220	
Phe	Lys	Gln	Lys	Lys	Pro	Lys	Gln	Ala	Glu	Ile	Ala	Thr	Glu	Thr	Pro
225								230						235	240
Lys	Thr	Ala	Thr	Asn	Asp	Pro	Asp	Thr	Thr	Lys	Pro	Leu	Thr	Glu	Pro
								245						250	255
Gln	Ile	Ala	Lys	Tyr	Ser	Met	Ile	Leu	Cys	Lys	Leu	Gly	Ser	Ile	Ser
				260					265					270	
Asp	Leu	Ser	Asn	Phe	Pro	Asp	Tyr	Pro	Ala	Phe	Ala	Asn	Trp	Ile	Gly

275	280	285
Asn Ile Leu Arg Asn Pro Glu Lys Ala Asp Glu Gln Ile Ala Lys Arg		
290	295	300
Ile Phe Thr Ala Leu Lys Thr Glu Thr Asp Tyr Ser Lys Lys Asn		
305	310	315
<210> 9		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> MSBI1表位		
<400> 9		
Asn Arg Leu Ser Asp Arg Phe		
1	5	
<210> 10		
<211> 326		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> CMI1.252		
<400> 10		
Met Ser Asp Leu Ile Val Lys Asp Asn Ala Leu Met Asn Ala Ser Tyr		
1	5	10
15		
Asn Leu Ala Leu Val Glu Gln Arg Leu Ile Leu Leu Ala Ile Leu Glu		
20	25	30
Ala Arg Glu Thr Gly Lys Gly Ile Asn Ala Asn Asp Pro Leu Thr Val		
35	40	45
His Ala Ser Ser Tyr Ile Asn Gln Phe Asn Val Glu Arg His Thr Ala		
50	55	60
Tyr Gln Ala Leu Lys Asp Ala Cys Lys Asp Leu Phe Ala Arg Gln Phe		
65	70	75
80		
Ser Tyr Gln Glu Lys Arg Glu Arg Gly Arg Ile Asn Ile Thr Ser Arg		
85	90	95
Trp Val Ser Gln Ile Gly Tyr Met Asp Asp Thr Ala Thr Val Glu Ile		
100	105	110
Ile Phe Ala Pro Ala Val Val Pro Leu Ile Thr Arg Leu Glu Glu Gln		
115	120	125
Phe Thr Gln Tyr Asp Ile Glu Gln Ile Ser Glu Leu Ser Ser Ala Tyr		
130	135	140

<400> 12

Met Ser Asp Leu Ile Val Lys Asp Asn Ala Leu Met Asn Ala Ser Tyr
 1 5 10 15
 Asn Leu Ala Leu Val Glu Gln Arg Leu Ile Leu Leu Ala Ile Leu Glu
 20 25 30
 Ala Arg Glu Thr Gly Lys Gly Ile Asn Ala Asn Asp Pro Leu Thr Val
 35 40 45
 His Ala Ser Ser Tyr Ile Asn Gln Phe Asn Val Glu Arg His Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Gln Ala Leu Lys Asp Ala Cys Lys Asp Leu Phe Ala Arg Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Tyr Gln Glu Lys Arg Glu Arg Gly Arg Ala Asn Ile Thr Ser Arg
 85 90 95
 Trp Val Ser Gln Ile Ala Tyr Ile Asp Glu Thr Ala Thr Val Glu Val
 100 105 110
 Ile Phe Ala Pro Ala Val Val Pro Leu Ile Thr Arg Leu Glu Glu Gln
 115 120 125
 Phe Thr Gln Tyr Asp Ile Glu Gln Ile Ser Gly Leu Ser Ser Ala Tyr
 130 135 140
 Ala Val Arg Leu Tyr Glu Leu Leu Ile Cys Trp Arg Thr Thr Gly Lys
 145 150 155 160
 Thr Pro Val Leu Asp Leu Thr Glu Phe Arg Lys Arg Leu Gly Val Leu
 165 170 175
 Asp Thr Glu Tyr Thr Arg Thr Asp Asn Leu Lys Met Arg Val Ile Glu
 180 185 190
 Gln Ser Leu Lys Gln Ile Asn Lys His Thr Asp Ile Thr Ala Ser Tyr
 195 200 205
 Glu Gln His Lys Lys Gly Arg Thr Ile Thr Gly Phe Ser Phe Lys Phe
 210 215 220
 Lys Gln Lys Lys Lys Thr Glu Pro Glu Thr Pro Lys Asn Asn Asp Ser
 225 230 235 240
 Gly Val Ser Lys Pro Lys Thr Val Glu Ile Pro Ala Glu Val Val Lys
 245 250 255
 Gln Pro Lys Asn Thr Asn Leu Ser Asp Leu Glu Lys Arg Val Arg Met
 260 265 270
 Ile Thr Gly Ala Ile Ala Lys Asn Asn Leu Ala Ser Arg Phe Gln His
 275 280 285
 Gly Asn Glu Ser Pro Leu Asp Met Met Lys Arg Ile Gln Ser Glu Ile
 290 295 300

Thr Ser Asp Glu Thr Ala Asp Leu Trp Gln Asn Lys Leu Glu Ser Met
 305 310 315 320

Gly Val Val Phe

<210> 13

<211> 999

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 密码子优化的MSBI1

<400> 13

atgagcgacc tgatcgtgaa agacaatgcc ctgatgaacg cctcctacaa cctggcactg 60
 gtcgaacaga gactgattct gctggctatc atcgaggcaa gggagaccgg caagggcatc 120
 aacgccaatg accccctgac agtgcacgcc agctcctaca tcaaccagtt taatgtggag 180
 cgccacaccg cctatcaggc cctgaaggac gcctgcaagg atctgtttgc ccggcagttc 240
 agctaccagg agaagcggga gagaggcagg atcaacatca caagcagatg ggtgtcccag 300
 atcggctata tggacgatac cgccacagtg gagatcatct ttgcaccagc agtggtgctt 360
 ctgatcacca ggctggagga gcagttcaca cagtacgaca tcgagcagat ctccggactg 420
 tctagcgcct acgccgtgcg catgtatgag ctgctgatct gttggcggtc taccggcaag 480
 acacctatca tcgagctgga tgagttccgc aagcggatcg gcgtgctgga caccgagtac 540
 accagaacag ataacctgaa gatgagagtg atcgagctgg cctgaagca gatcaatgag 600
 cacaccgata tcacagcctc ttatgagcag cacaagaagg gccgcgtgat caccggcttc 660
 agctttaagt tcaagcacia gaagcagaac tctgacaaga caccaaagaa tagcgattcc 720
 tctccccgga tcgtgaagca cagccagatc cctaccaaca tcgtgaagca gccagagaat 780
 gccaaagtgt ccgacctgga gcacagggca tctagggtga caggcgagat catgagaaat 840
 aggctgagcg atcggttcaa gcagggcgac gaggccgcca tcgatatgat gaagagaatc 900
 cagtccgaga tcatcaccga cgccatcgcc gatcagtggg aatctaaact ggaagagttt 960
 ggagtcgtgt ttggagcaca tcaccatcat catcactga 999

<210> 14

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MSBI1蛋白

<400> 14

Met Ser Asp Leu Ile Val Lys Asp Asn Ala Leu Met Asn Ala Ser Tyr
 1 5 10 15

Asn Leu Ala Leu Val Glu Gln Arg Leu Ile Leu Leu Ala Ile Ile Glu
 20 25 30

Ala Arg Glu Thr Gly Lys Gly Ile Asn Ala Asn Asp Pro Leu Thr Val

35	40	45		
His Ala Ser Ser Tyr Ile Asn Gln Phe Asn Val Glu Arg His Thr Ala				
50	55	60		
Tyr Gln Ala Leu Lys Asp Ala Cys Lys Asp Leu Phe Ala Arg Gln Phe				
65	70	75	80	
Ser Tyr Gln Glu Lys Arg Glu Arg Gly Arg Ile Asn Ile Thr Ser Arg				
	85	90	95	
Trp Val Ser Gln Ile Gly Tyr Met Asp Asp Thr Ala Thr Val Glu Ile				
	100	105	110	
Ile Phe Ala Pro Ala Val Val Pro Leu Ile Thr Arg Leu Glu Glu Gln				
	115	120	125	
Phe Thr Gln Tyr Asp Ile Glu Gln Ile Ser Gly Leu Ser Ser Ala Tyr				
	130	135	140	
Ala Val Arg Met Tyr Glu Leu Leu Ile Cys Trp Arg Ser Thr Gly Lys				
	145	150	155	160
Thr Pro Ile Ile Glu Leu Asp Glu Phe Arg Lys Arg Ile Gly Val Leu				
	165	170	175	
Asp Thr Glu Tyr Thr Arg Thr Asp Asn Leu Lys Met Arg Val Ile Glu				
	180	185	190	
Leu Ala Leu Lys Gln Ile Asn Glu His Thr Asp Ile Thr Ala Ser Tyr				
	195	200	205	
Glu Gln His Lys Lys Gly Arg Val Ile Thr Gly Phe Ser Phe Lys Phe				
	210	215	220	
Lys His Lys Lys Gln Asn Ser Asp Lys Thr Pro Lys Asn Ser Asp Ser				
	225	230	235	240
Ser Pro Arg Ile Val Lys His Ser Gln Ile Pro Thr Asn Ile Val Lys				
	245	250	255	
Gln Pro Glu Asn Ala Lys Met Ser Asp Leu Glu His Arg Ala Ser Arg				
	260	265	270	
Val Thr Gly Glu Ile Met Arg Asn Arg Leu Ser Asp Arg Phe Lys Gln				
	275	280	285	
Gly Asp Glu Ser Ala Ile Asp Met Met Lys Arg Ile Gln Ser Glu Ile				
	290	295	300	
Ile Thr Asp Ala Ile Ala Asp Gln Trp Glu Ser Lys Leu Glu Glu Phe				
	305	310	315	320
Gly Val Val Phe Gly Ala				
	325			

<210> 15

<211> 974

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> MSBI1野生型

<400> 15

```
atgagcgatt taatagtaaa agataacgcc ctaatgaatg ctagttataa cttagctttg 60
gttgaacaga ggtaattct attagcaatc atagaagcga gagaaacagg caaagggatt 120
aatgccaatg atcctttaac agttcatgca agtagctata tcaatcaatt taacgtagaa 180
aggcatacgg catatcaagc cctcaaagat gcttgtaaag acttgtttgc ccgtcaattc 240
agttaccaag aaaagcgaga acgaggacga attaatatta caagtcgatg ggtttcgcaa 300
attggctata tggacgatac agcaaccgtt gagattatth ttgccctgc ggttgttctc 360
ctgattacac ggctagagga acagttcacc cagtacgata ttgagcaaat tagcggttta 420
tcgagtgc atgctgttcg tatgtacgaa ctgctgattt gttggcgtag cacaggcaaa 480
acaccaatta ttgagctaga cgagtttaga aagcgaatag gtgttttaga tactgaatac 540
actagaacag ataatttaaa gatgcgagtt attgaattag ccctaaaaca aatcaacgaa 600
catacagaca tcacagcaag ctatgaacaa cacaaaaaag ggcgagtgat tacaggattc 660
tcattcaagt ttaagcacia gaaacaaaac agcgataaaa cgccaaaaaa tagcgattct 720
agcccacgta tcgtaaaaca tagtcaaate cctccaacat tgtaaaacag cctgaaaacg 780
ccaaaatgag cgatttagaa catagagcga gccgtgttac aggggaaata atgcgaaate 840
gtctgtcaga tcggtttaa caaggcgatg aatcagcaat cgacatgatg aaacgtattc 900
aaagtgaaat aataaccgat gcaatagcag accagtggga aagcaactg gaggagtttg 960
gcgtggtttt ttag 974
```

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号 K 3610PCT	国际申请号 PCT/EP2017/075774
----------------------	-------------------------

关于微生物保藏的说明
(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏的说明	
A.对说明书第 22 页, 第 29 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2017-10-06	保藏号 DSM ACC3331
C.补充说明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
无	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	
无	

[0001]

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

附页

微生物保藏(2)	
A.对说明书第 22 页, 第 25 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2017-09-28	保藏号 DSM ACC3327
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
无	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	
无	
微生物保藏(3)	
A.对说明书第 22 页, 第 26 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2017-09-28	保藏号 DSM ACC3328
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	

附页

无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
无	
E.补充说明（必要时）	
下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”）	
无	
微生物保藏(4)	
A.对说明书第 22 页，第 27 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2017-09-28	保藏号 DSM ACC3329
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的）	
无	
E.补充说明（必要时）	

附页

下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无	
微生物保藏(5)	
A.对说明书第 <u>22</u> 页，第 <u>28</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2017-09-28	保藏号 DSM ACC3330
C.补充说明（必要时）	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的） 无	
E.补充说明（必要时） 下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无	

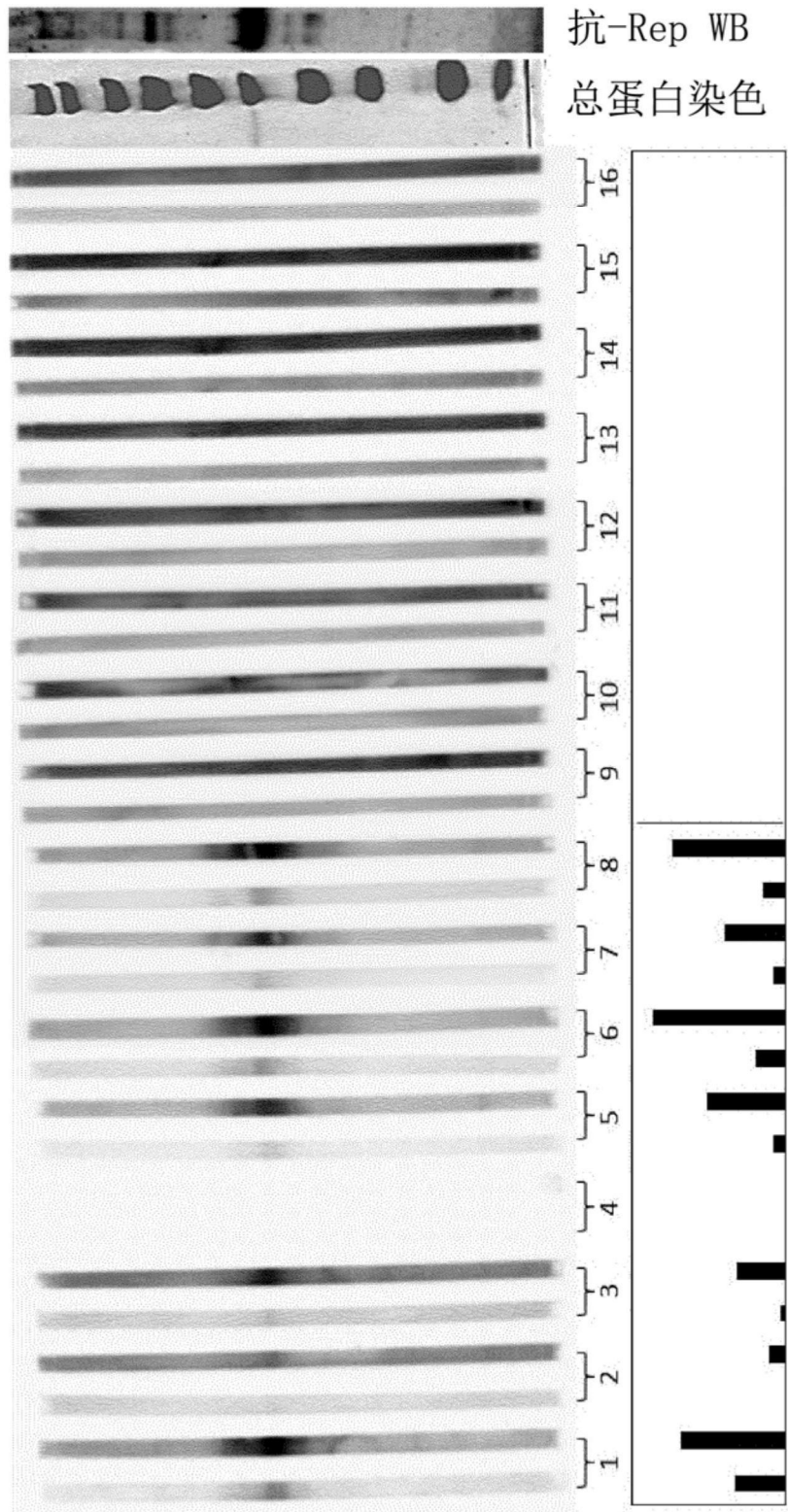


图1

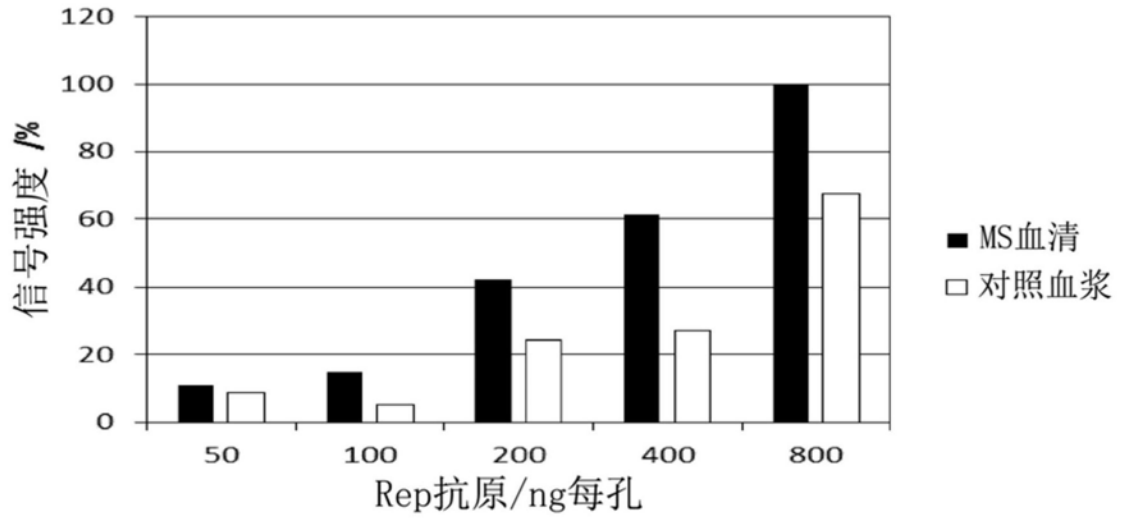


图2

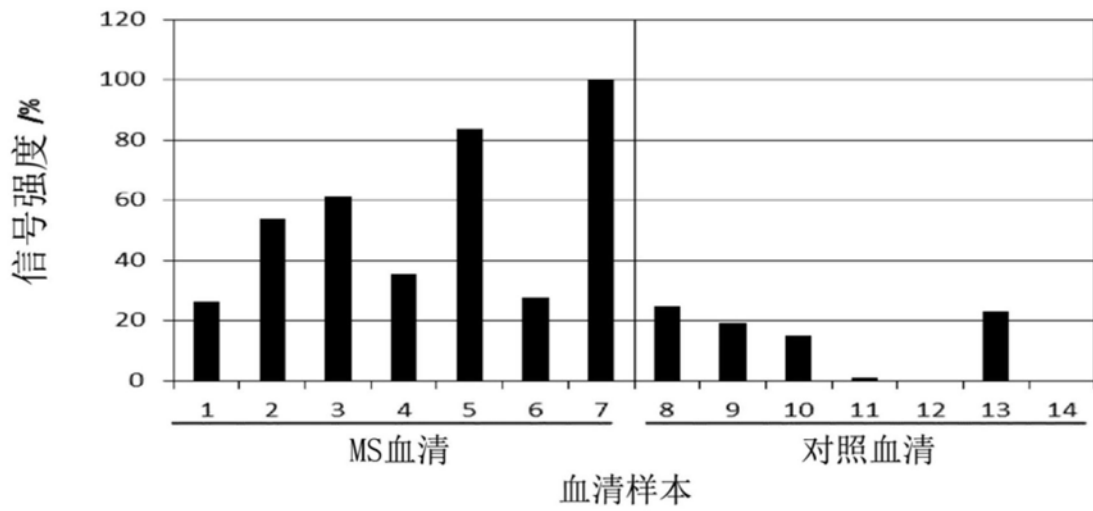


图3

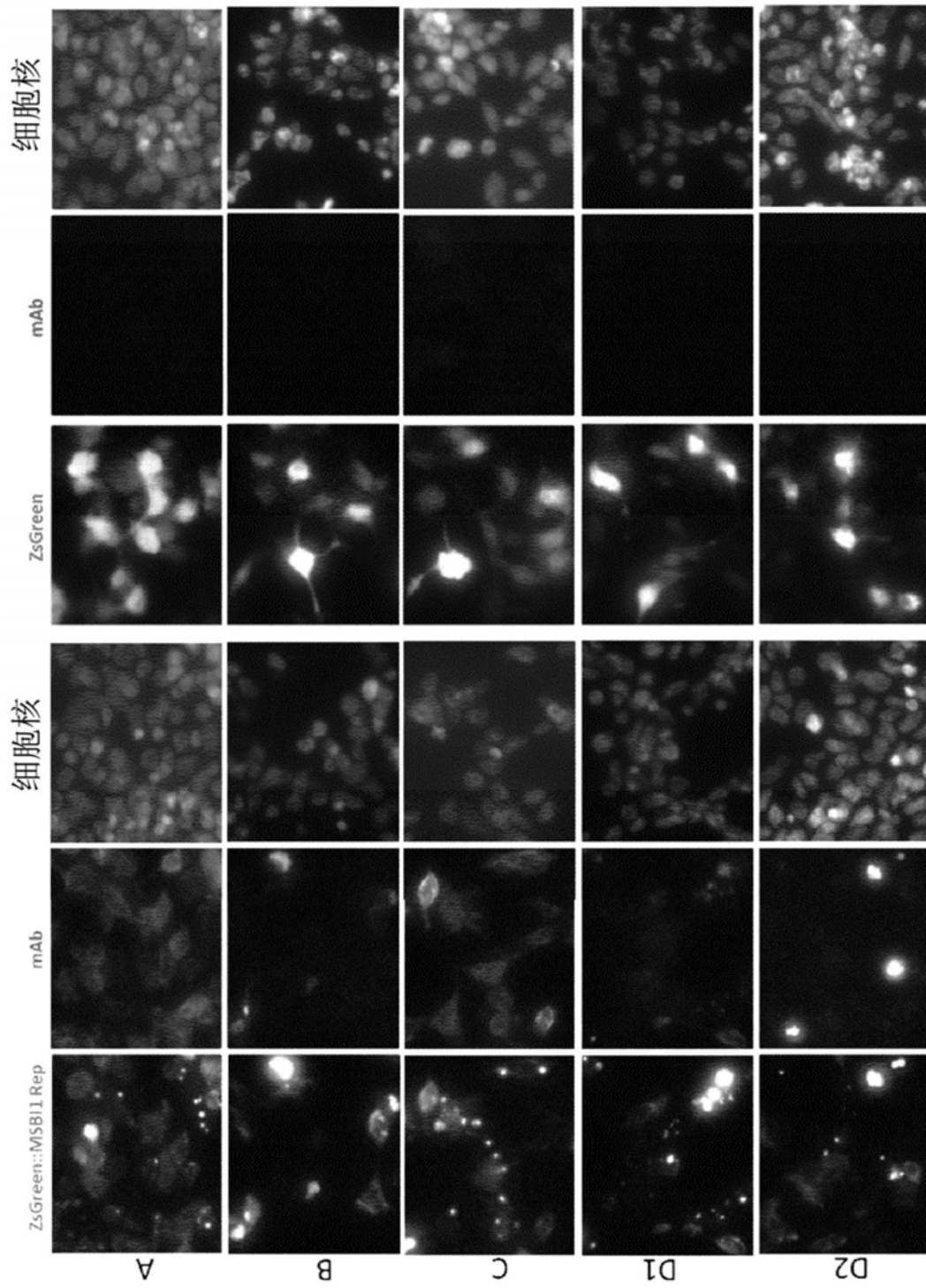


图4

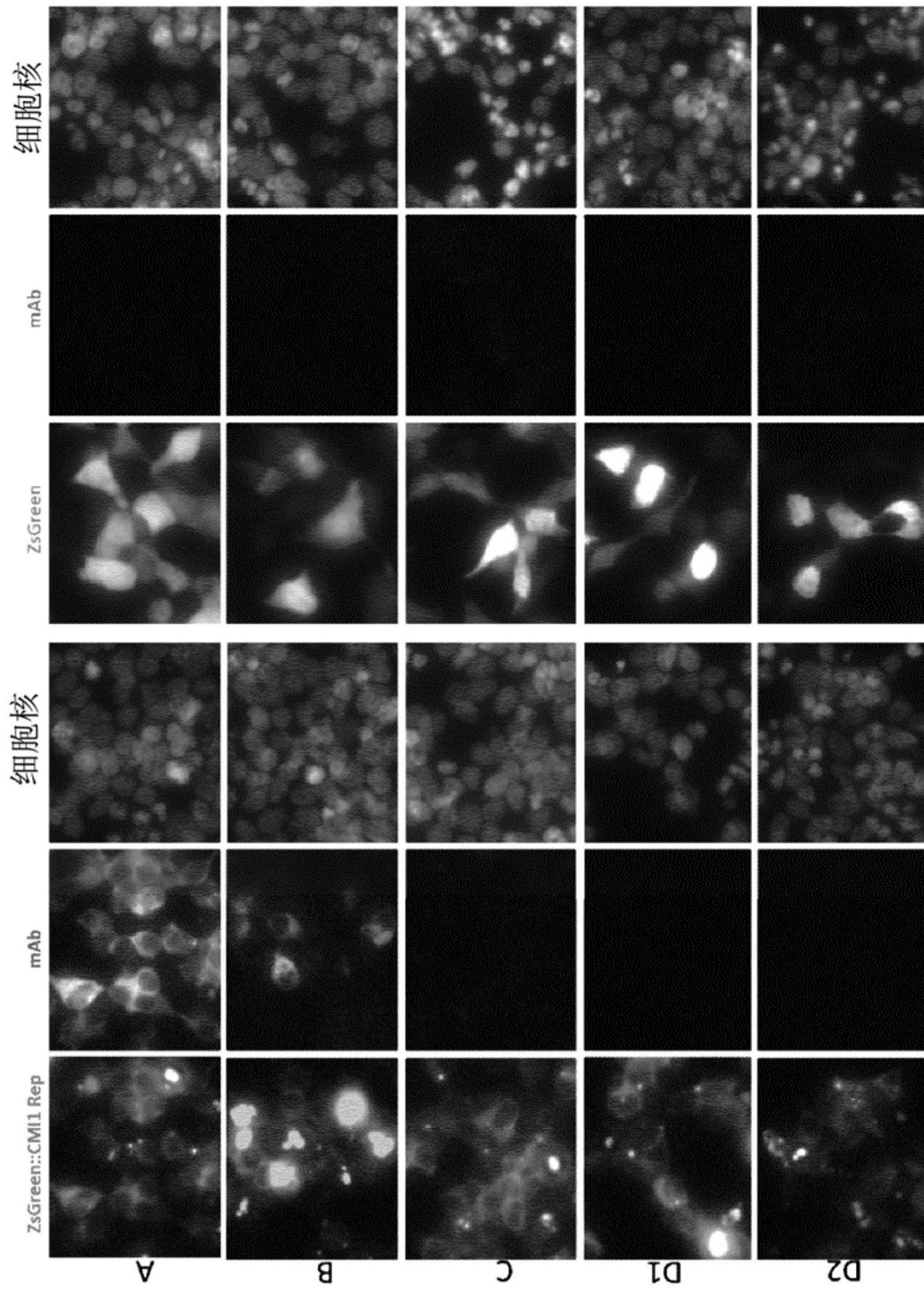


图5

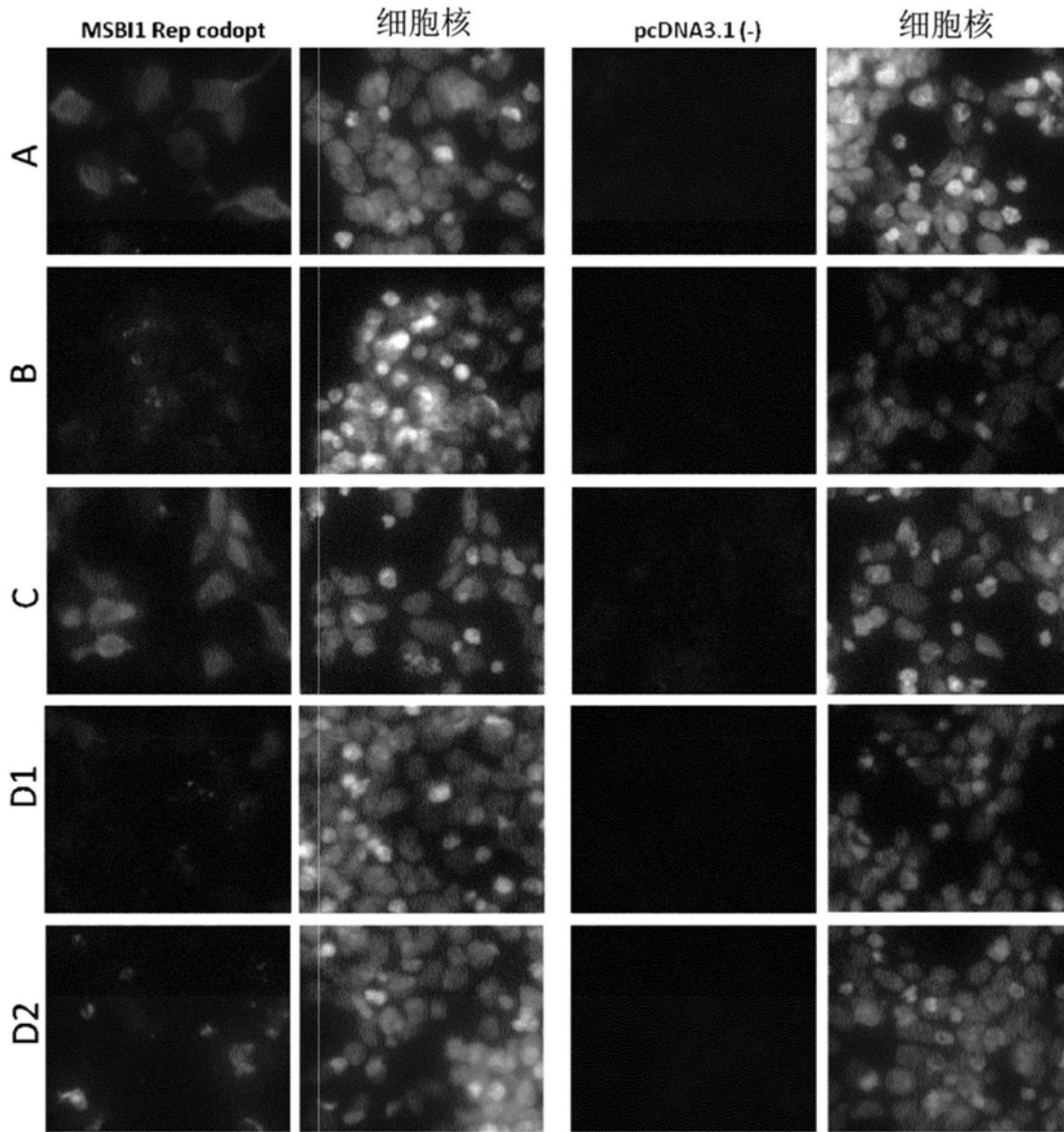


图6

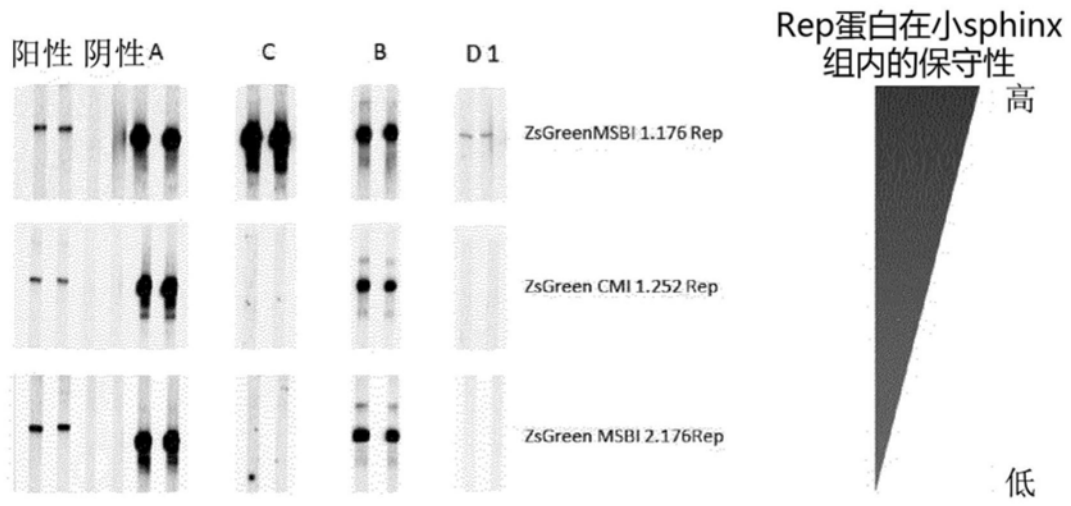


图7

专利名称(译)	REP蛋白作为蛋白质抗原用于诊断试验		
公开(公告)号	CN110914685A	公开(公告)日	2020-03-24
申请号	CN201780062068.4	申请日	2017-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	德国癌症研究公共权益基金会		
申请(专利权)人(译)	德国癌症研究公共权益基金会		
当前申请(专利权)人(译)	德国癌症研究公共权益基金会		
发明人	哈拉尔德·祖尔·豪森 埃塞尔-米歇尔·德维利耶 蒂莫·邦德 塞巴斯蒂安·艾勒布雷希特		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/564		
CPC分类号	G01N33/502 G01N33/53 G01N33/564 G01N2800/285 G01N33/6896 C07K16/18 G01N33/563 G01N33/577 G01N33/6857 G01N2496/80		
代理人(译)	魏彦		
优先权	2016193119 2016-10-10 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了用于诊断多发性硬化症(MS)用途的DNA复制相关的(Rep)蛋白，其中，(a)来自受试者的样本中的Rep蛋白或其片段的量与对照样本中的量相比增加；或者来自受试者的样本中的抗Rep蛋白抗体的量与对照样本中的量相比增加与MS的诊断有关，其中Rep蛋白是MSB11 Rep或MSB12 Rep。

关于微生物保藏の説明	
申请人或代理人档案号 K 3610PCT	国际申请号 PCT/EP2017/075774
关于微生物保藏の説明 (专利合作条约实施细则 13 之 2)	
微生物保藏の説明	
A. 对说明书第 22 页, 第 29 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的説明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称: DSMZ-德国微生物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 德国	
保藏日期 2017-10-06	保藏号 DSM ACC 3331
C. 补充説明 (必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D. 本説明是为下列指定国作的 (如果説明不是为所有指定国而作的)	
无	
E. 补充説明 (必要时)	
下列説明将随后向国际局提供 (写出説明的类别, 例如, “保藏的编号”)	
无	
由受理局填写	
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到	由国际局填写
授权官员	<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
	授权官员