

(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2014-521058

(P2014-521058A)

(43) 公表日 平成26年8月25日(2014.8.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 L	4 B O 2 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
CO 7 K 17/12 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	
CO 7 K 17/14 (2006.01)	CO 7 K 17/12 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-517835 (P2014-517835)
 (86) (22) 出願日 平成24年7月6日 (2012.7.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月22日 (2014.1.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/063327
 (87) 国際公開番号 W02013/007661
 (87) 国際公開日 平成25年1月17日 (2013.1.17)
 (31) 優先権主張番号 11173321.8
 (32) 優先日 平成23年7月8日 (2011.7.8)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 507396301
 ユニヴェルズイテート チューリッヒ
 スイス、8006、チューリッヒ、ラーミ
 シュトラーセ 71、プロレクトラート
 エムエヌヴェー
 (74) 代理人 100082418
 弁理士 山口 朔生
 (72) 発明者 ルッツ、ハンス
 スイス、ツェーハー-8455、リュトリ
 ンゲン、オーバードルフ 134
 (72) 発明者 ベンツリ、エヴァ
 スイス、ツェーハー-8046、チューリ
 ッヒ、シュヴァンデンホルツシュトラーセ
 282

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F e L V感染症を診断するためのネコ白血病ウイルス膜貫通タンパク質 p 1 5 E

(57) 【要約】

本発明は、対象において F e L V 感染を検出するための方法を提供し、対象から得られた試料は、p 1 5 (E) 抗体結合段階において、組換え膜貫通 p 1 5 E タンパク質とインビトロで接触する。

【選択図】 図 1

Figures

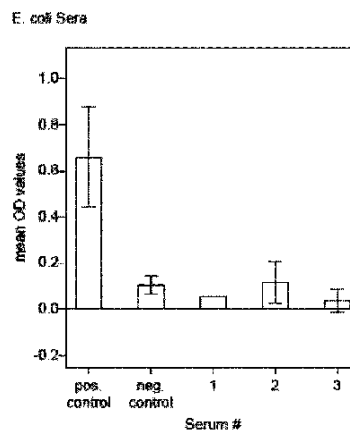


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における過去または現在の F e L V 感染検出方法であって、
前記対象から得られた試料を、S E Q I D 0 0 1 のアミノ酸配列または S E Q I D 0 0 1 と 9 0 % 以上同一である配列を含むタンパク質と接触させる工程と、
抗体の前記タンパク質への結合を検出する工程と
を備えたことを特徴とする F e L V 感染検出方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の F e L V 感染検出方法であって、前記タンパク質は単離された組換えタンパク質であることを特徴とする、F e L V 感染検出方法。

10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の F e L V 感染検出方法であって、前記試料中において F e L V p 2 7 タンパク質の存在を検出する工程をさらに備えたことを特徴とする、F e L V 感染検出方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の F e L V 感染検出方法であって、
a . 前記抗体の前記膜貫通 p 1 5 E タンパク質への結合、および前記試料中における前記 p 2 7 タンパク質の存在は、F e L V ウイルス血症を示し、
b . 前記抗体の前記膜貫通 p 1 5 E タンパク質への結合、および前記試料中における前記 p 2 7 タンパク質の非存在は、F e L V に対する免疫を示す
ことを特徴とする、F e L V 感染検出方法。

20

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれか一項に記載の F e L V 感染検出方法であって、
前記試料中において F e L V p 4 5 タンパク質に対する前記抗体の存在を検出する工程をさらに備えたことを特徴とする、F e L V 感染検出方法。

【請求項 6】

対象における F e L V 感染を検出または診断する場合の、S E Q I D 0 0 1 のアミノ酸配列または S E Q I D 0 0 1 と 9 0 % 以上同一である配列を含む組換えタンパク質の使用法。

【請求項 7】

S E Q I D 0 0 1 のアミノ酸配列または S E Q I D 0 0 1 と 9 0 % 以上同一である配列を含む単離された組換えタンパク質を備えたことを特徴とする表面。

30

【請求項 8】

請求項 7 に記載の表面であって、ニトロセルロース膜、ガラス繊維膜、マイクロタイタープレートの空洞、プラズモン共鳴チップ、または水晶微量天秤の表面であることを特徴とする、表面。

【請求項 9】

F e L V の血清学的検出用キットであって、S E Q I D 0 0 1 のアミノ酸配列または S E Q I D 0 0 1 と 9 0 % 以上同一である配列を含む単離された組換え p 1 5 E タンパク質を含むことを特徴とする F e L V の血清学的検出用キット。

40

【請求項 10】

請求項 9 に記載の F e L V の血清学的検出用キットであって、標識を含む抗ネコ免疫グロブリン抗体をさらに含むことを特徴とする、F e L V の血清学的検出用キット。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の F e L V の血清学的検出用キットであって、前記標識は発色酵素、発光タンパク質、または蛍光のタンパク質もしくは色素であることを特徴とする、F e L V の血清学的検出用キット。

【請求項 12】

請求項 9 乃至 11 のいずれか一項に記載の F e L V の血清学的検出用キットであって、F e L V p 2 7 タンパク質に対するリガンドをさらに含むことを特徴とする、F e L V の

50

血清学的検出用キット。

【請求項 13】

請求項 9 または 10 に記載の FeLV の血清学的検出用キットであって、単離された FeLV p 45 タンパク質をさらに含むことを特徴とする、FeLV の血清学的検出用キット。

【請求項 14】

請求項 9 乃至 13 のいずれか一項に記載の FeLV の血清学的検出用キットであって、前記単離された組換え p 15 E タンパク質、前記 FeLV p 27 に対するリガンド、および / または前記単離された FeLV p 45 タンパク質は表面に結合されていることを特徴とする、FeLV の血清学的検出用キット。

10

【請求項 15】

請求項 14 に記載の FeLV の血清学的検出用キットであって、前記リガンドはガンマ免疫グロブリンであることを特徴とする、FeLV の血清学的検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

背景

FeLV 感染症は、貧血、腫瘍、および免疫不全などの多面的な臨床兆候を誘導し得る獣医学的に重要な疾患である。有効なワクチンがあるにもかかわらず、FeLV 感染症は依然として存在しているが、大部分の研究対象集団において著しく異なっている (Levy ら, 2006, J Am Vet Med Assoc. 228 (3): 371-6)。

20

【背景技術】

【0002】

感染後、FeLV は最初に局所リンパ節または扁桃腺において複製する。感染したリンパ球はウイルスを骨髄に運び、ウイルスは高速で複製し、最終的には血流を經由して全身に広がる。FeLV が骨髄および血液の細胞へ組み込まれることで、ネコはプロウイルス陽性となる。ウイルスが血液中で検出できる場合、ネコはウイルス血症になる。膀胱の粘膜および / または腸および唾液腺の上皮の感染により、FeLV は新たな感染サイクルを開始することがある。

30

【0003】

FeLV の診断は、主に血漿、血清、または全血中におけるウイルスまたはウイルス抗原の検出に依存している。最も一般的な血清学的検査では、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) により FeLV p 27 抗原の存在を検出するか (Lutz ら, J. Immunol. Methods 56, 209-220 (1983)、Lutz ら, Am J Vet Res. 44 (11): 2054-9)、または、免疫蛍光抗体試験 (IFA) により感染した白血球および血小板の細胞質中で FeLV 構造抗原を検出する (Hardy ら, 1991, J Am Vet Med Assoc. 199 (10): 1327-35; ibid. 1365-73)。さらに、ウェスタンブロット分析によって FeLV 抗体の存在が検出される。

40

あるいは、非血清学的診断としては、ウイルスの単離 (Jarrett O および Ganiere JP. Vet Rec. 138 (1): 7-11)、またはプロウイルス (FeLV DNA) およびウイルス量 (FeLV RNA) を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (Hofmann-Lehmann R ら, 2001. J Gen Virol. 82 (Pt 7): 1589-96, Herring IP ら, 2001. Vet Ophthalmol. 4 (2): 119-26, Jackson ら, 1996. J Vet Diagn Invest. 8 (1): 25-30) を含む。これらの方法の大部分は時間がかかり、および / または費用がかかる特徴により、それらは実用的かつ臨床的な使用には適していない。FeLV 感染症を予測するために抗体検出はどの程度信頼できるのか、およびどの抗体が適しているのかに関する証拠が提供されていない

50

め、診断のために F e L V 抗体を検出する血清学的検査は今まで利用することができなかった。

【0004】

感染したネコにおける F e L V 疾患の結果はかなり予測することが不可能である。それらは、不稔性（プロウイルス陰性）、進行性（持続的に p 2 7 陽性、プロウイルス陽性、F e L V R N A 陽性、ウイルス単離陽性）、および退行性（p 2 7 陰性、一過性抗原血症後に、または一過性抗原血症なしでプロウイルス陽性）と称される。

しかしながら、血液中でプロウイルス陰性のままであるネコが血清転換し、F e L V 感染症が発生したことが明らかになったと報告されている（Gomes - Keller MAら, 2009. *Vet Microbiol.* 134 (3 - 4) : 208 - 17 ; Major Aら, 2010. *Vet Res.* 41 (2) : 17.）。これらのネコにおける疾患検出は、面倒で費用のかかる血清学的手順（ネコのオンコルナウイルス結合細胞膜抗原に対する免疫蛍光検査法 ' F O C M A 試験 '）によってのみ可能である。

【0005】

今までは、F e L V に対する抗体の検出は、ネコ集団における内因性 F e L V (e n F e L V) の広範囲に及ぶ存在のために、獣医学診療における診断の手段として限られた意義しかなかった。e n F e L V は免疫系によって許容されないため抗体が誘発され（Langhammerら, 2006. *Immunology.* 117 (2) : 229 - 37）、それは外因性 F e L V に対する抗体と区別できない。P C R のみが、内因性 F e L V と外因性 F e L V の間を区別することができる。したがって、F e L V 抗体はこれまで診断パラメータとして有用であると考えられていなかった。さらにいくつかの研究では、F e L V の様々なエピトープに対する十分な抗体反応を検出することができなかった。

Fontenot および共同研究者（*J Clin Microbiol.* (1992) 30 (7) : 1885 - 90）は、予測 F e L V 膜貫通免疫優性ドメイン（I m d T M ペプチド、26 個のアミノ酸長）の反応性を分析し、血清学における診断薬としてのその可能性を調査した。引用研究では、ペプチドは F e L V に感染したネコからの血清を用いて、無視できるだけのレベルの反応性を示し、それは著者を I m d T M ペプチドは F e L V 診断には有用ではないという結論に導いた。

Langhammerら, (*Immunology.* 2006 ; 117 (2) : 229 - 37) は、細胞外ドメイン (A A 4 7 6 5 8 3) を含む F e L V p 1 5 E ポリペプチドを組換え生成し、F e L V に感染したネコは p 1 5 E に対する抗体を作ったが、E L I S A における反応は低かったことを示した。エピトープマッピングにより、p 1 5 E 免疫ネコからの血清により検出されたエピトープを含めて、F e L V 感染動物からの血清により認識される様々なエピトープが示されたが、感染した動物における反応はワクチン接種を受けた動物よりも弱かった。該研究から、自然 F e L V 感染は p 1 5 E に特異的な抗体の弱い誘導、および中和抗体の少ない誘導をもたらすことが結論付けられた。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】Levy et al., 2006, *J Am Vet Med Assoc.* 228 (3) : 371 - 6

【非特許文献 2】Lutz et al. *J. Immunol. Methods* 56, 209 - 220 (1983)

【非特許文献 3】Lutz et al., *Am J Vet Res.* 44 (11) : 2054 - 9

【非特許文献 4】I F A ; Hardy et al., 1991, *J Am Vet Med Assoc.* 199 (10) : 1327 - 35 ; *ibid.* 1365 - 73

【非特許文献 5】Jarrett O and Ganiere J P. *Vet Rec.* 138 (1) : 7 - 11

【非特許文献 6】Hofmann - Lehmann R et al. 2001. *J G*

10

20

30

40

50

en Virol. 82 (Pt 7) : 1589 - 96

【非特許文献7】Herring IP et al. 2001. Vet Ophthalmol. 4 (2) : 119 - 26

【非特許文献8】Jackson et al., 1996. J Vet Diagn Invest. 8 (1) : 25 - 30

【非特許文献9】Gomes - Keller MA et al. 2009. Vet Microbiol. 134 (3 - 4) : 208 - 17

【非特許文献10】Major A et al. 2010. Vet Res. 41 (2) : 17

【非特許文献11】Langhammer et al. 2006. Immunology. 117 (2) : 229 - 37

【非特許文献12】Fontenot et al., J Clin Microbiol. (1992) 30 (7) : 1885 - 90

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、いくつかの実施形態において、ネコにおけるFeLV感染を検出するため、特にp27陽性ウイルス血症の非存在下で潜伏伝染性のFeLV感染を診断するための、安全かつ経済的な方法および手段を提供することである。この目的は、独立請求項の主題によって達成される。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本明細書において使用される「FeLV感染」は、生殖細胞系における内因性FeLV配列の存在の対語として、外因性FeLVの存在および複製を指す。

【0009】

本発明のある実施形態の基礎は、感染を例えばELISAによるp27の検出などの従来の方法によって検出することができない場合であっても、N末端アミノ酸配列を含む組換え膜貫通タンパク質p15Eへの抗体の結合は、過去及び現在のFeLV感染を検出するための重要な診断能力の手段であるという、驚くべき知見にある。

本発明は、FeLV診断における別のアプローチとして、血清学における4つのFeLV抗原：組換えenv遺伝子産物(p45)、全ウイルス、FeLV TM C領域からの短いペプチド、および全細胞質配列を含む組換えp15E、の有用性に関する研究の成果である。実験的に感染し、かつ免疫されたネコからだけでなく、現地調査のネコからの血清をELISAで調べた。各試料から、プロウイルス、p27、および免疫の状態を知った。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】平均O.D. (y軸) に対して血清型(x軸)をプロットした図である。ELISAにより組換えp15E調製物において免疫原性汚染物質が存在しないことが示されている。

【図2】SPFネコおよびプロウイルス陽性(p27陽性およびp27陰性のネコ)を含む実験的に感染したネコに対するプロウイルスの経験的受信者動作特性(ROC)曲線を示す図である。様々なカットオフで、真陽性率(感度、y軸)を偽陽性率(1 - 特異度、x軸)に対してプロットされている。

【図3】カットオフ(x軸)に対してプロットした感度×特異度(y軸)により、実験的に感染したネコに対する最適なカットオフ値の決定を示す図である。暗線は、特異度80%を表し、矢印は、カットオフポイントを示している。

【図4】現地調査ネコに対するプロウイルスの経験的受信者動作特性(ROC)曲線を示す図である。様々なカットオフで、真陽性率(感度、y軸)が偽陽性率(1 - 特異度、x軸)に対してプロットされている。

10

20

30

40

50

【図5】カットオフ（x軸）に対してプロットした感度×特異度（y軸）により、実験的に感染したネコに対する最適なカットオフ値の決定を示す図である。

【図6】決定のための種々の方法の間の一致度の程度を示している（コーエンのk（=カッパ）値）図である。

【図7】相対的OD値を表すy軸および研究で使用されるさまざまなワクチンのx軸により、実験的にワクチン接種したネコにおけるp15E反応性を示す図である。灰色バー：ワクチン接種前の8週齢のSPFネコ、白色バー：チャレンジ実験前に2回ワクチン接種した後の同じ子ネコ。

【図8】相対的OD値を表すy軸および抗原のx軸により、ワクチン接種した現地調査のネコにおける4つの異なる抗原調製物に対する反応性を示す図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0011】

発明の第1の態様によれば、対象においてF e L V感染を検出する方法が提供され、前記対象から得られた試料は、組換え膜貫通タンパク質p15E、またはp15EのN末端アミノ酸配列を含むその断片とインビトロで接触し、組換えp15Eタンパク質に結合することができる試料中に含まれる抗体の存在が検出される。

【0012】

本発明の他の態様では、対象においてF e L V感染を検出する方法が提供され、前記対象から得られた試料は、(a)完全な膜貫通p15Eタンパク質、および(b)envポリタンパク質前駆体からのp15Eタンパク質切断後の前記p15Eタンパク質のN末端を含む膜貫通p15Eタンパク質の断片、から選択されるタンパク質と接触する。

20

【0013】

本発明の他の態様では、対象においてF e L V感染を検出する方法が提供され、前記対象から得られた試料は、SEQ ID 001のアミノ酸配列を含むp15Eタンパク質、またはSEQ ID 001と90%以上同一である配列とインビトロで接触し、p15Eタンパク質に結合することができる試料中に含まれる抗体の存在が検出される。

【0014】

いくつかの実施形態では、前記タンパク質は組換えタンパク質である。

【0015】

本発明の文脈において、用語「組換え」は、タンパク質が、例えば(a)p15Eの細胞質領域のN末端アミノ酸配列を含むp15E膜貫通タンパク質の配列をコードする遺伝子の宿主細胞中で発現することによって、または(b)無細胞系において、例えば個々のアミノ酸の固相合成によって、合成的に生成されることを意味する。

30

【0016】

対象は、F e L Vに感染しやすい宿主、例えば飼い猫(*Felis catus*)、スペインオオヤマネコ(*Lynx pardinus*)、またはヨーロッパヤマネコ(*Felis silvestris silvestris*)である。試料は、抗体を含み得る任意の対象の試料である。最も好ましい試料は、全血試料または血清試料である。

【0017】

本発明の好ましい態様によれば、組換えタンパク質は、SEQ ID 001(F e L V Aのアミノ酸446 642; GenBank: AAA93093.1)のアミノ酸配列、またはSEQ ID 001と90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%以上同一である配列から基本的に成る、または構成される。

40

【0018】

本発明の文脈における同一性は、位置ごとの配列比較の結果を表す単一の定量的パラメータである。配列比較の方法は当技術分野で周知であり、公的に利用可能であるBLASTアルゴリズムが例としてある。

【0019】

試料と組換え膜貫通タンパク質とが接触した後、組換え膜貫通タンパク質への抗体の結

50

合が検出される。抗体結合のこのような検出は、例えば結合パートナーの一方、好ましくは組換えタンパク質が結合している表面の物理的性質を測定することによって、直接行うことができる。このような方法の例としては、水晶微量天秤または表面プラズモン（B I A C O R E社）実験がある。

【0020】

あるいは、p 1 5 Eに対する抗体の存在は、例えばウェスタンブロットまたはE L I S A型の方法によって間接的に検出することができ、それには対象種のガンマ免疫グロブリンの一定部分に特異的な検出抗体またはリガンドが用いられ、検出抗体の結合は、例えば検出抗体を標識することによって検出される。

好ましい標識は発色酵素であり、それは基質を生成物に変換し、生成物形成の速度または量は分析法によって検出することができる。例としては西洋ワサビペルオキシダーゼがある。好ましい標識の他の種類としては、発光タンパク質（例えばルシフェラーゼ）、または蛍光タンパク質（例えばG F P）、または蛍光色素もしくは燐光色素がある。

【0021】

一実施形態によれば、F e L V感染の検出方法は、組換えp 1 5のN末端配列を含む組換えp 1 5に結合する抗体の存在を検出することに加えて、試料中のF e L V p 2 7タンパク質の存在を検出する工程を含む。

【0022】

p 2 7の検出は、均一または不均一アッセイとして、試料をp 2 7に対する抗体に接触させることによって達成することができる。p 2 7に対して反応する抗体は表面に結合させることができ、p 2 7の結合は、上記に記載したように表面プラズモン共鳴または同等の技術によって直接測定することができる。同様に、p 2 7に対する抗体は、表面にp 2 7を結合させるために使用され得、結合したp 2 7は、二次抗体に結合した検出可能な標識を有する二次抗体によって測定することができる。

【0023】

一実施形態において、本発明の方法はp 2 7の検出を含み、前記試料中におけるp 2 7タンパク質の存在と合わせて膜貫通p 1 5 Eタンパク質への抗体の結合は、F e L Vウイルス血症を示し、試料中における前記p 2 7タンパク質非存在下での膜貫通p 1 5 Eタンパク質への抗体の結合は、F e L Vに対する免疫を示す。

【0024】

試料を組換えp 1 5 Eタンパク質に接触させる前の段階として、p 2 7の検出を行ってもよい。p 2 7タンパク質の検出は、対象における急性のF e L Vウイルス血症の指標であるため、p 1 5 Eと接触させることによるさらなる分別分析の必要性を取り除く。しかしながら、試料がp 2 7に対して陰性を示した場合、試料をp 1 5 Eと接触させて、対象が過去にF e L Vにさらされていたか、および潜伏感染の可能性があるかを確立する。

あるいは、p 2 7およびp 1 5 Eの検出を組み合わせることで、いずれかの因子の個別の検出よりも複雑でないワークフローを与える。検出反応条件によって、p 1 5 Eの後にp 2 7を検出することが好ましい場合がある。

【0025】

F e L V p 2 7の検出は、p 2 7に特異的な抗体またはリガンドによって達成することができ、それは上記に記載したように標識することができる。p 2 7の検出およびp 1 5 Eの検出が同時に行われる実施例では、2つの抗原に対する抗体の標識は異ならなければならない。

【0026】

同様に、他の好ましい実施形態によれば、p 4 5に対する抗体の存在は、p 1 5 E膜貫通タンパク質に対する抗体に加えて、場合によってはp 2 7の存在に加えて検出することができる。p 4 5に対する抗体の存在は、p 1 5 Eに対する抗体の存在を検出するために用いられる手段と同様の手段によって達成可能である。

【0027】

p 4 5に対する抗体を検出することの利点は、p 4 5は全ての商業ワクチンに共通する

10

20

30

40

50

抗原であるため、以前に F e L V に対するワクチン接種を受けたことがある対象が検出されることである。

【 0 0 2 8 】

本発明の第 1 の態様による方法は、結合パートナーの一方が表面に結合して他のパートナーの結合を検出する二相系として必ずしも実施される必要はない。このような表面液体体系は、現在のところ操作が容易であり、E L I S A 読み取り機の遍在性、および試薬の安定供給のために商業市場を支配しているが、均一相検出システムは、同様にリガンドへの抗体の結合を確実に示すことができると当技術分野で知られている。均一相近接検出システムの一例は、Alpha Screen 技術 (Perkin Elmer 社) であり、それにより光誘起一重項酸素種は近くのパートナーにおいて化学発光を起こす。

10

【 0 0 2 9 】

本発明の他の態様によれば、特に、対象における F e L V ウイルスの検出または F e L V 感染症の診断に使用するために、S E Q I D 0 0 1 のアミノ酸配列、または様々な実施形態において、S E Q I D 0 0 1 と 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 以上同一である配列を有する、単離された組換えタンパク質が提供される。

【 0 0 3 0 】

S E Q I D 0 0 1
 e p i s l t v a l m l g g l t v g g i a a g v g t g t k a l l e t a q f
 r q l q m a m h t d i q a l e e s i s a l e k s l t s l s e v v l q n r r
 g l d i l f l q e g g l c a a l k e e c c f y a d h t g l v r d n m a k
 l r e r l k q r q q l f d s q q g w f e g w f n r s p w f t t l i s s i
 m g p l l i l l l i l l f g p c i l n r l v q f v k d r i s v v q a l i l
 t q q y q q i k q y d p d r p

20

【 0 0 3 1 】

一実施形態によれば、S E Q I D 0 0 1 のアミノ酸配列、または他の実施形態において S E Q I D 0 0 1 と 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 以上同一である配列を有する組換えタンパク質は、表面に結合される。

より好ましい実施形態では、この表面は、マイクロタイタープレートの空洞の表面、例えば E L I S A キットの一部分として、ラボオンチップ装置の表面、水晶微量天秤の表面、またはプラズモン共鳴チップの表面である。同様に、この表面はニトロセルロース膜またはガラス繊維膜であってもよい。

30

【 0 0 3 2 】

本発明の他の態様によれば、上記で定義した表面の一つ以上は F e L V の血清学的検出のためのキットに含まれている。好ましい実施形態において、このキットはさらに、標識された抗ネコ免疫グロブリン抗体を含む。より好ましい実施形態では、標識は発色酵素、発光または蛍光のタンパク質もしくは色素を含む群からの 1 つ以上の標識を含む。最も好ましい実施形態では、キットはさらに、p 2 7 タンパク質の血清学的検出のためのリガンドを含む。

40

【 0 0 3 3 】

本発明の第 1 の態様による適したリガンドはまた、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、または S E L E X などの発展的方法によって作成することが可能であり、ポリペプチドまたはオリゴヌクレオチドが標的物質に対するそれらの結合親和性に依りて選択される。

【 0 0 3 4 】

さらに、より高い親和性阻害剤は、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列における発展および選択の反復ラウンドによって特定することができる。

【 0 0 3 5 】

本発明の基礎となる研究の目的は、非感染のネコと感染したネコとを区別するため、およびワクチン接種を受けたネコの抗体レベルを評価するために、血清学における診断薬と

50

しての種々の F e L V 成分の可能性を分析することであった。原理の証明として、実験的に感染したネコを試験した。診断の可能性に関して、最善の試験抗原は O D = 0 . 0 4 9 5 でのカットオフで、95.7%の診断感度および100%の特異度を有する組換え F e L V 膜貫通 (T M) タンパク質 p 1 5 E であるが、E P K 2 1 1、F L 7 4 および p 4 5 は適していないことを実証することができた。現地調査のネコにおける p 1 5 E に対するカットオフ値は、77.1%の診断感度および85.6%の特異度で、O D = 0 . 1 6 2 5 に決定された。

p 1 5 E で試験したほぼ全ての S P F 血清は e n F e L V に対する抗体を持っていなかったが、ある種類が e n F e L V に対する抗体の増加したレベルを有し得る可能性を我々は排除してはならない。ほぼ全てのネコは F e L V と接触した後に血清転換し、我々は、ネコが F e L V に感染した確率は p 2 7 陰性のネコでは高いが p 1 5 E 陽性のネコでは低いことを明言することができる。

しかしながら、p 1 5 E はウイルス血症のネコと免疫性のネコとの間を区別することができず、そのため p 2 7 はウイルス血症を検出するために診断においてより一層必要とされていることが示される。

【 0 0 3 6 】

ネコにワクチン接種を割り当てるために、F e L V 抗原に対してだけでなく、F e L V 抗体も試験することが有用であろう。そうすることで動物の潜在的な免疫力に関する情報を取得することができ、それはワクチン接種を不必要なものにするかもしれない。

ネコ白血病ウイルスまたは狂犬病のワクチン含む特定のワクチン、およびワクチン接種の手続きは、ネコ注射部位関連肉腫 (F I S A S) と関係することが示唆されており、それは浸潤性の挙動を有する局所侵襲性肉腫の形成、および全症例の 2 5 - 7 0 % における転移の確率を特徴とする悪性疾患である。F I S A S は、1 0 , 0 0 0 匹のネコ当たり、わずか 1 - 1 0 匹において発生することが報告されている。

【 0 0 3 7 】

抗体検査では、免疫動物だけでなく、F e L V に接触したことがないネコも検出しなければならず、診療する獣医にとって臨床的に有用なものとするために、内因性の F e L V に対する抗体を検出してはならない。F e L V 未感作動物は、F e L V による後の感染を避けるために、ワクチン接種のための候補である。

獣医師は、F I S A S の危険性を伴うさらなるワクチン接種を避けるために免疫ネコの検出により多くの重点を置くか、または後のワクチン接種のために感染していないネコの検出により多くの重点を置くかどうかを選択する必要がある。

【 0 0 3 8 】

カットオフを超える p 1 5 E O D 値を有するネコは免疫があると考えられ (p 2 7 E L I S A が陰性の場合)、カットオフ未満に O D 値を有するネコは未感作で F e L V の影響を受けやすいと考えられ、ワクチン接種をする必要がある。

カットオフを超えるワクチン接種を受けたネコは、感染によって免疫があると考えられ、ワクチン接種を受けない。これらのネコは F e L V に感染する危険性はない。カットオフ未満のワクチン接種を受けたネコは、F e L V の影響を受けやすいと考えられるため、再びワクチン接種を受ける。

ほとんど全てのネコが L e u c o g e n で免疫された場所では (例えば本明細書に関連する現地調査において : 9 8 %)、獣医師はネコがワクチン接種を受けていることを確認するために、p 4 5 E L I S A を用いて p 1 5 E 陰性のネコを試験して、ワクチン接種による F I S A S の (小さな) 危険性を排除することができる。

【 0 0 3 9 】

p 1 5 E は、非感染動物から感染動物を区別するために使用することができるが、ワクチン接種を受けたネコの大部分は p 1 5 E E L I S A に対して計算されるカットオフよりも低い抗体値を有するので、この抗原はワクチン接種を明確に検出するには有用ではない。したがって、p 1 5 E はこれまでの知見 (L u t z H ら , 1 9 8 0 . C a n c e r R e s . 4 0 (1 0) : 3 6 4 2 - 5 1) と一致して、ワクチン接種よりもむしろ感

10

20

30

40

50

染を読み出すようである。

【0040】

4つの抗原の間、および実験的に感染したネコと現地調査のネコとの間の著しい差異を、本発明の基礎となる調査において観察した。最も顕著な差異は、第1に、p15Eは他の全ての抗原に比べて群を抜いて最も強力な診断薬であり、これは実験的に感染したネコにおいてだけでなく、現地調査のネコでも同様である。

第2に、実験的に感染したネコにおけるp15Eの検査の特異度は現地調査のネコよりも良く、それはおそらく現地調査のネコとは対照的に、実験的に感染したネコからの試料は特定かつ規定された時点で採取していたためであろう。

現地調査のネコは、多くの場合、未知の経緯、不明確な年齢、および試料採取の不明確な時点を有する。さらに、特に、現地調査のネコが捨て猫の場合、現地調査のネコがFeLVによって、種々のFeLVサブタイプによって、または他のウイルスによって何回感染したかは分からず、それは異なる検査の特異度の説明に役立つ。これらの要因は、実験的に感染したネコのデータと比較して、現地調査のネコのデータのカットオフ値およびカップ値が上昇するという猫の免疫状態があまり明確でない結果をもたらし得る。

【0041】

本発明の基礎となる研究では、SPFネコ、実験的に感染したネコ、および4つのFeLV抗原、すなわち組換えenv遺伝子産物、全ウイルス、FeLV膜貫通タンパク質からの15個のアミノ酸長ペプチド、および組換えp15Eに免疫があるネコからの血清の反応性を体系的に評価した。

間接ELISAを用いて、FeLV感染症の診断のための代替的アプローチとして、ネコがFeLVと接触したことがあるかまたはないかどうかの証拠を求めた。本明細書に提示するp15Eの結果に基づいて、血清学的結果は、少なくとも部分的にPCRに取って代わる、ネコの感染状態を評価するのに有益な支持を示すという結論に達した。

【実施例】

【0042】

材料および方法

間接酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)は、FeLVの診断に役立つその能力を評価するために開発した。そして、FeLV膜貫通タンパク質からの短いペプチド、組換えenv遺伝子産物(p45)、全FeLV抗原、および組換えp15Eを抗原として用いた。実験的に感染し、かつワクチン接種したネコからの血清、および現地調査のネコの血清を、抗原に対するそれらの反応性について調査した。

【0043】

ELISAのための抗原

p45: FeLV Aエンベローブ糖タンパク質のgp70表面ユニット(ワクチン抗原)の非グリコシル化組換え変異体(Jarrett OおよびGanier JP, 1996, Vet Rec, 138(1): 7-11.)。抗原懸濁液(Leucogen(登録商標)、Virbac Schweiz AG社、グラットブルック、スイス)を、0.1mlの3%水酸化アルミニウムゲルおよび10μgのキラヤの精製抽出物をアジュバントとして添加した。

【0044】

全ウイルス: 全ウイルスは、FL74細胞に由来する。このリンパ芽球FOCMA(オンコウイルス関連細胞膜抗原)細胞株をFeLV_{ABC}に慢性的に感染させた(Jarrettら, 1973, J Gen Virol, 20(2): 169-75.)。ウイルスをショ糖密度勾配で精製した。

【0045】

EPK211: この合成15アミノ酸ペプチド(Ac-GWFEGWFNRSPWFT-NH₂)は、p15EのFeLVカルボキシ末端領域の一部を模倣している。これは、固相ペプチド合成により合成し、分析用高圧液体クロマトグラフィーで精製した(純度>85%)。

10

20

30

40

50

【0046】

p15E: FeLVエンベロープ糖タンパク質の組換え膜貫通部分(TM)を生成するために、FeLV Aのアミノ酸446-642をコードするDNA配列(GenBank: AAA93093.1)をpCRII Topoベクター(Invitrogen社、ルツェルン、スイス)でクローニングし、大腸菌(E. coli) Top10細胞において発現させた。

p15Eを含む融合タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーで精製した。ELISAに使用するタンパク質を7.5mMトリス Cl緩衝液pH8.0に対して透析した。生成物をウェスタンブロット分析によって確認した。p15E中の大腸菌残渣の存在を、大腸菌成分に対して免疫した3匹のウサギからの3つの異なる抗大腸菌血清(血清1、2および3)(図1を参照のこと)を用いてELISAにより決定した。精製したp15(E)の調製物中に微量の大腸菌成分のみが存在していたことが結果から示された。

10

【0047】

血清および血漿の試料

4つの抗原に対する抗体について試験するために、種々のワクチン研究の血清および血漿を用いた。第1研究からの試料(n/群=9)は: 1群 ワクチン接種を受けていない対照動物。2群 Eurifel(登録商標)(新名称: Purevax(登録商標); Merial社、リヨン、フランス)でワクチン接種。EurifelはFeLV A env、gag、およびpolの一部を含む、非アジュバントカナリア痘ベクター化生ワクチン(ALVAC)である。3群 全ウイルスFeLVを死滅させた多価ワクチンである、Fel O Vax(登録商標) LV-KIV(Fort Dodge社、アイオワ州、米国)でワクチン接種。ワクチンは二回皮下注射した。2回目のワクチン接種から四週間後に、各ネコにFeLV A/Glasgow 1(Jarrettら, 1996. J Gen Virol. 20(2): 169-75.)をチャレンジした。

20

【0048】

1997年に行われた第2の研究からの試料(n/群=14)は: 1群 ワクチン接種を受けていない対照群。2群 不活性化(または死滅)抗原から成る、Fevaxyn(登録商標) FeLV(Solvay Animal Health社、メンドータ ハイ ツ、ミネソタ州、米国)でワクチン接種。3群 Fel O Vax(登録商標) LV-KIVでワクチン接種し、4群はLeucogen(登録商標)を接種した。ワクチンは二回皮下注射した。2回目のワクチン接種から四週間後に、各ネコにFeLV A/Glasgow 1をチャレンジした。

30

両研究において、チャレンジ暴露の前日およびその日に血液を採取した。その後、試料を15週目まで毎週採取した。さらに、我々は、チャレンジから8週または10週後のワクチン未接種の対照群からの血漿を使用した(n=47)。抗体に対する長期的な影響について、我々はワクチン未接種であるがチャレンジした対象群からの血清を使用した。我々はまた、若いSPFネコ(n=90)、成体の血液ドナー(SPF)ネコ(n=20)からの血漿も使用し、かつ長期的な影響のために、我々は22週間チャレンジしていない状態のネコから成る研究からの陰性対照群(n=4)を試験した。ワクチン接種したネコの反応性を試験するために、我々はワクチン研究からの全ての群を使用し、ワクチン接種前、およびワクチン接種後/FeLV Aでのチャレンジ前にネコを試験した。

40

【0049】

個人所有のネコ(n=294)からの血清も使用し、M. A. Gomes - Keller(2006 J Clin Microbiol. 44(3): 916-22.)によって2004年4月から2005年1月まで採取した。ネコのワクチン接種状態に関する情報は、血液試料を採取していた獣医師から得た。

【0050】

試験した全ての血清、プロウイルス、およびp27について、結果が入手できた。現地調査のネコの血清を表1にまとめる。

【0051】

50

【表1】

現地調査ネコの概要						
プロウイルス	-		+			
p27	-		-		+	
ワクチン	-	+	-	+	-	+
#	201	50	9	5	26	3

【0052】

酵素結合免疫吸着検定法

10

ELISAは公開されている方法に基づいた(Engvall EおよびPerlmann P. 1972. J Immunol. 109(1): 129-35, Voller R, 1976, Bull World Health Organ. 53(1): 55-65.)。

抗FeLV p45および抗FeLV全ウイルス('FL 74')の抗体を前に記載したようにELISAより測定した(Lutz H, 1980. Cancer Res. 40(10): 3642-51, Lehmann R, 1991. J Am Vet Med Assoc. 199(10): 1446-52.)。p45および全ウイルスを100ng/ウェルの最終濃度で使用した。EPK211およびp15Eは0.005%のSDSと合わせて25ng/ウェルの最終濃度で使用した。血漿および血清を1:200に希釈した。affiniPureヤギ抗ネコIgG(H+L)ペルオキシダーゼ結合二次抗体(Milan Analytica AG社、ラインフェルデン、スイス)を1:3000に希釈して使用した。ELISAプレートを、415nmの吸光度で光学密度(OD)値を測定するために、分光光度計(Spectramax plus 384、Molecular Devices社、カリフォルニア州、米国)を用いて評価した。陽性および陰性の対照血清を、実行の間の比較性を確保するために内部標準として使用した。

20

【0053】

p15Eの純度は、大腸菌の特異的エピトープに対する抗体を含む3つの異なるウサギ血清を用いて試験した。ELISAは、affiniPureヤギ抗ウサギIgG(H+L)ペルオキシダーゼ結合二次抗体(Milan Analytica社)を用いて上記のように行った。

30

【0054】

データ分析および統計

ELISA OD値を標準化した： $(OD \text{ 値} (試料) - OD \text{ 値} (陰性対照)) / (OD \text{ 値} (陽性対照) - OD \text{ 値} (陰性対照))$ 。

【0055】

ソフトウェアパッケージNCSS(登録商標)バージョン07.1.20(LLC Kayville社、ユタ州、米国)、およびPASW(登録商標)統計ソフトウェアバージョン18.0.2(Polar Engineering and Consulting社、ニクスキー、米国)を受信者動作特性(ROC)分析に使用し、かつWin Episcopy 2.0(登録商標)ソフトウェア(Borland International社)をカップバ値の計算に使用した。成体のSPFネコと若いSPFネコとの間の平均値の差を比較するために、一元配置分散分析(one-way ANOVA)およびWelch/Brown-Forsythe試験を使用した。

40

【0056】

結果：

要約すると、p45、全ウイルス、およびペプチドは、抗原薬として不適当であることが見出された。p15Eでは、実験的に感染したネコからの血清を用いて、95.7%の診断感度および100%の特異度が示された。現地調査のネコの血清および異なるカット

50

オフを用いて、p 1 5 E 対プロウイルス PCR からは、77.1%の診断感度および85.6%の特異度が示された。

【0057】

ワクチン接種したネコはp 1 5 E に対する低い抗体レベルのみを示し、それは抗p 1 5 E 抗体がワクチン接種よりも感染の証拠であることを示している。

【0058】

組換え p 1 5 E の純度。

大腸菌細胞中で産生したp 1 5 E の純度を、大腸菌抗原で免疫したウサギからの3つの異なる血清を用いて、組換えp 1 5 E でコーティングしたウェル上でELISAによって試験した。我々は残渣の大腸菌成分に対する抗体レベルを測定した(図1)。ODは最大0.117であり(血清2)、それは陰性対照(OD = 0.106)に相当するものである。他の2つの大腸菌血清はさらに低いOD値を示した。

全てのカットオフ率は、上記に記載の実験に由来する生データに対応する。当業者は、類似の方法により導出されたデータにカットオフ率を割り当てることができ、それは異なるODの生データをもたらす。

【0059】

実験的に感染したネコにおける抗体レベル。

偽陽性率(1 - 特異度)に対して真陽性率(感度)をプロットした受信者動作曲線(ROC)に、実験的に感染したネコおよび現地調査のネコを表示してそれらと比較することで、異なるFeLV抗原の診断的有用性を評価および比較した。

【0060】

ROC分析では、感染し、プロウイルス陽性(血清転換)のネコから、非感染、プロウイルス陰性で、特定病原体未感染(SPF)のネコを区別するカットオフポイントを選択することで、最適な検査の特異度および感度がもたらされる。実験的に感染したネコの評価により原理の証明が表された。

ゴールドスタンダードとしてプロウイルスを使用して、全ての抗原のROC曲線を図2に示す。原則として、最適なカットオフは、特異度80%、および感度×特異度は最大として定義した(図3)。抗原p 1 5 E は、ROC空間の左側の境界および上部の境界に沿って優れた曲線を示した(図2)。OD = 0.0495のカットオフを選択し、感度(95.7%)と特異度(100%)との間で最善のトレードオフを表した。EPK 2 1 1 に対する最適なカットオフ(-0.039)は、65.7%の感度および81.1%の特異度を示し、一方でp 4 5 (カットオフ0.016)は80%の感度および88.9%の特異度を示した。全ウイルスは、-0.007のカットオフで65.7%の感度および81.1%の特異度を示した。

【0061】

大部分のネコが6歳を超える、異なる年齢の20匹の成体の血液ドナーネコ(SPF)からの血清も試験した。それらは若いSPFネコの一定のデータセットを有するために、原理証明の研究には含まなかった。これら20匹の動物も、4つ全ての抗原で試験した(データは示していない)。

簡潔には、p 0.01の4つ全ての抗原に対する平均値の差異が観察され、それは若いSPFネコの値と比較して、成体動物のOD値はより分散し、かつ上昇する傾向を有し、これは年齢がこの抗体検査に重要であることを示している。

【0062】

SPFネコおよびチャレンジした対照群のネコからの抗体に関する長期的な影響も検討した。SPF血清は22週間の間低いレベルのままであり、チャレンジしたネコ(免疫およびウイルス血症)からの血清は感染から4週間後に上昇し、高いレベルのままであった(データは示していない)。

【0063】

分類された2つのデータセット間の一致度における偶然補正型測度を表すコーエンのk(カッパ)値は、p 1 5 E とプロウイルスとの間における一致度のほぼ完璧なレベル(k

10

20

30

40

50

= 0.96) を示した (図 6)。

プロウイルスと、p 45、全ウイルス 'FL 74'、および E P K 2 1 1 との間の一致度は、0.47 - 0.70 の間の範囲のより低いレベルを示した。抗原のペア間における一致度は満足のいく良好なレベルを示したが、p 15 E とプロウイルスとの間の一致度よりも低い。

【0064】

現地調査のネコにおける抗体レベル

ゴールドスタンダードとしてプロウイルスを使用した R O C 分析による現地調査のネコの評価 (図 4) は、抗原 p 15 E に対してよい方向を示し、それは他の抗原とは著しく対照的である。

現地調査の値は全体的に増加したため、このデータセットのために新たなカットオフポイントを決定しなければならなかった。プロウイルス陽性に加えて免疫もされた 8 匹のネコはこの研究から除外した。(表 1) 最適なカットオフは、特異度 80%、および感度 × 特異度は最大として定義し (図 5)、p 15 E に対して O D = 0.163 と計算され、77.1% の感度および 85.6% の特異度 (特異度 80%) がもたらされた。

FL 74 は、カットオフ 0.647 で 42.9% の感度および 80.1% の特異度を示し、p 45 E はカットオフ 0.531 で 40% の感度および 81.1% の特異度を示し、かつ E P K 2 1 1 はカットオフ 2.411 で 17.1% の感度および 84.6% の特異度を有していた。

【0065】

コーエンの k 値 (特異度 80%) は、実験的に感染したネコの k 値と比較してより低いレベルを示し、それは R O C 分析で評価した 2 つのデータセット間の差異と一致した。最高的一致度レベルは、プロウイルスに対してプロットした p 15 E によって達成された (k = 0.55) (図 6)。

それとは著しく対照的に、他の抗原のペア、およびプロウイルスと抗原とのペアは、わずか 0.08 ~ 0.42 のレベルにしか到達しなかったため、明らかに不十分であった。これらの結果から、p 15 E とプロウイルスとの間の一致度は、p 15 E と他の抗原との如何なる組み合わせよりもはるかに優れていることが示された。

【0066】

p 15 (E) 血清学対プロウイルスの結果における診断感度および特異度が、実験的に感染したネコに比べて現地調査のネコにおいて低かったという事実は、Major (2010) によって記載されているように、低レベルの FeLV のへの曝露により、血液中にプロウイルス DNA が存在しない状態で血清転換が誘導され得るという知見によって説明することができる。

実験的感染は、常に比較的高含量の FeLV チャレンジウイルスを用いて注入することで行われ、プロウイルス陽性および血清転換がもたらされる。これとは対照的に、現地における FeLV による感染は、ネコが様々な感染圧力にさらされる結果、低ウイルス量の存在下で血清転換するという点で、非常に可変的でなければならない。したがって、現地調査のネコにおける p 15 (E) 血清学の一見低い診断特異度は、血液中のプロウイルスの非存在下での p 15 (E) への血清転換を正しく反映している。

【0067】

実験的にワクチン接種したネコ

ワクチン接種した動物の反応を見るために、若い 8 週齢の S P F ネコからの血清を、ワクチン接種前のワクチン研究の開始時、および再度、2 回のワクチン接種の後、チャレンジ感染の前に試験した。

【0068】

結果をボックスプロットにまとめている (図 7)。p 45 に対する結果から、全 65 匹のネコ (プラセボなし) のうち、56.92% はカットオフを超えたが、予想したように、Leucogen (登録商標) で免疫した場合には 100% がカットオフを上回った。全 FeLV 抗原 (FL 74) は、抗体反応の全体的な増加を示した (90.77% がカ

10

20

30

40

50

ットオフを超えた；Leucogen（登録商標）をワクチン接種した場合は100%）。

対照的に、抗体検出のための抗原としてのEPK211の使用では、58.46%がカットオフを超え、Leucogen（登録商標）でワクチン接種した40%のネコがカットオフを超えた。組換えp15Eでは、44.62%のネコはカットオフを超え、Leucogen（登録商標）でワクチン接種した動物の13.3%がカットオフを超えた。

【0069】

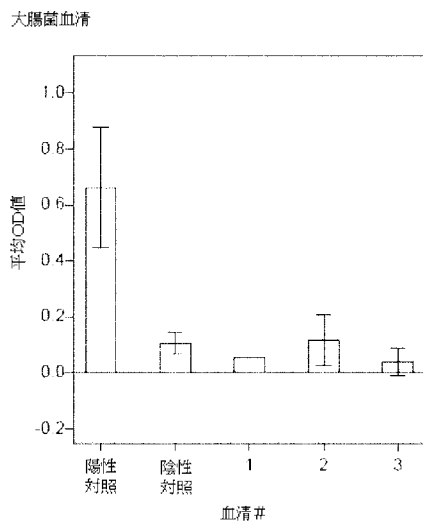
現地調査からのワクチン接種したネコ

全てのプロウイルス陰性ネコのうち、50匹のネコにワクチン接種した（表1）。8匹のネコは、免疫されている他に、それらはプロウイルス陽性またはさらにはウイルス血症でもあるため、本研究から除外した（表1）。研究に考慮された98%の全ての動物は、Leucogen（登録商標）を受け、大部分はFeligen（登録商標）（Virbac Schweiz AG社、グラットブルック、スイス；ネコ汎白血球減少症およびネコ鼻気管炎/ネコインフルエンザ用）と組み合わせて適用した。

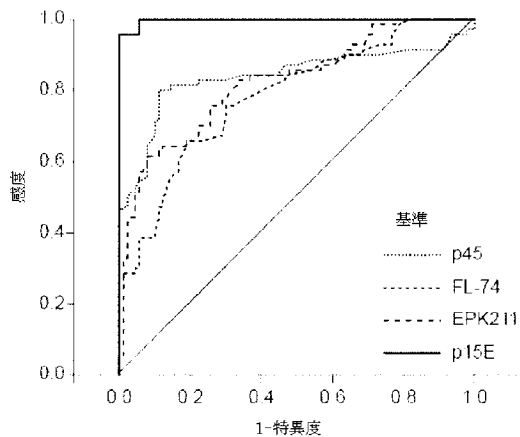
結果（図8）から、抗体反応は抗原p45（70%）、全ウイルス（42%）、およびEPK211（24%）を用いて明確に増加したことが示された。p15EはLeucogenワクチン接種ネコに対して低い反応性を示し、16%のケースでカットオフポイントを超えた。

10

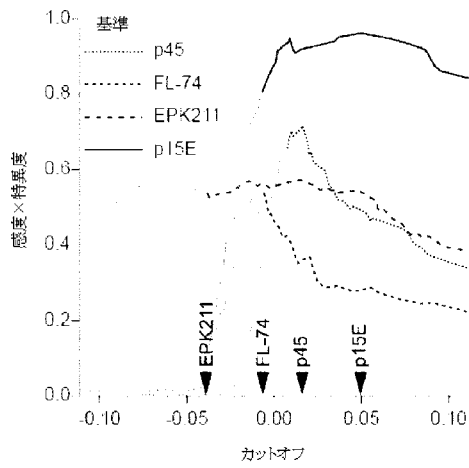
【図1】



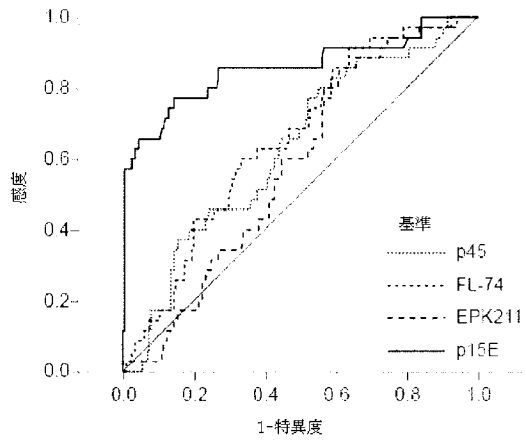
【図2】



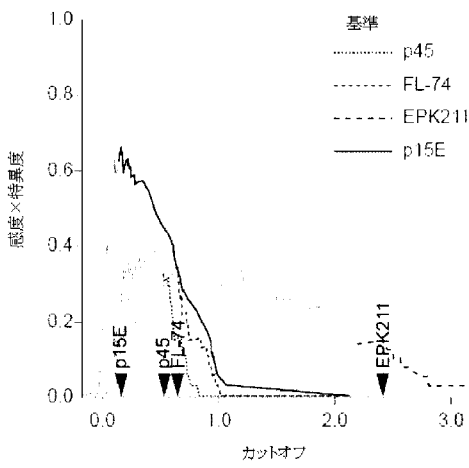
【 図 3 】



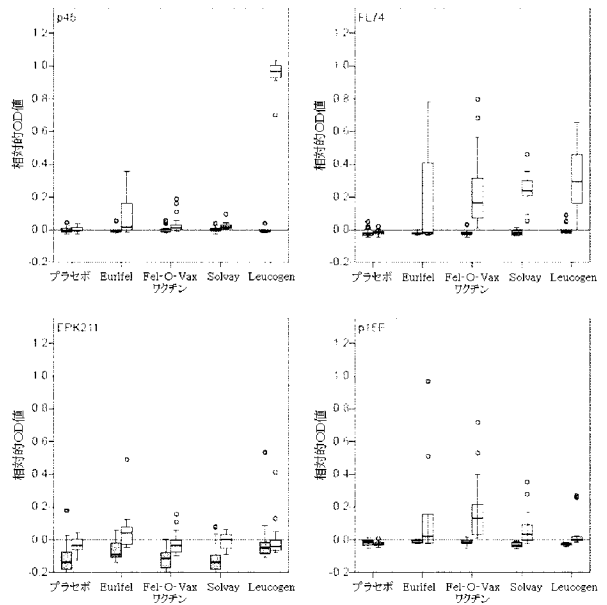
【 図 4 】



【 図 5 】



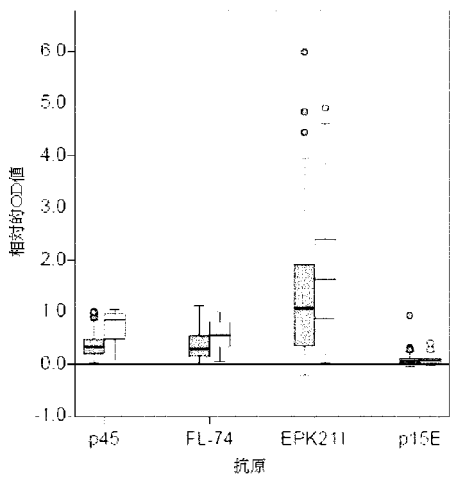
【 図 7 】



【 図 6 】

SP>80%	プロウイルス	p45	FL-74	EPK211	p15E
プロウイルス		0.18	0.13	0.08	0.55
p45	0.69		0.42	0.16	0.21
FL-74	0.47	0.45		0.24	0.12
EPK211	0.47	0.57	0.42		0.06
p15E	0.96	0.70	0.51	0.48	

【 图 8 】



【 配列表 】

2014521058000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/063327

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. 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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/66568 A2 (HESKA CORP [US]; UNIV COLORADO STATE RES FOUND [US]; JENSEN WAYNE A [U] 13 September 2001 (2001-09-13) page 4, paragraph 2; claims 1-3,24; sequence 30	1,2,6-11,14,15 3,12
Y	-----	
X	EP 1 754 715 A1 (BUNDESREP DEUTSCHLAND [DE]) 21 February 2007 (2007-02-21) paragraphs [0051], [0052]; claims 1-3,18; sequences 58,59	1,2,6-9,11,14,15 3,12
Y	-----	
Y	US 4 923 798 A (LEMOINE ERIC D [US] ET AL) 8 May 1990 (1990-05-08)	3,12
A	abstract; claim 1	4,5

	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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
11 September 2012		15/11/2012
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 Gundlach, Björn

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/063327

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LUTZ ET AL: "Humoral Immune Reactivity to Feline Leukemia Virus and Associated Antigens in Cats Naturally Infected with Feline Leukemia Virus", CANCER RESEARCH,, vol. 40, 1 October 1980 (1980-10-01), pages 3642-3651, XP008109148,	3,12
A	abstract page 3649, column 2, paragraph 1 -----	4,5
Y	CHEN ET AL: "Pathogenicity induced by feline leukemia virus, Rickard strain, subgroup A plasmid DNA (pFRA).", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 9, 1 September 1998 (1998-09-01), pages 7048-7056, XP055036770, ISSN: 0022-538X	3,12
A	abstract -----	4,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/063327**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.:
4, 12(completely); 1-3, 5-11, 14, 15(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/ EP2012/ 063327

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 4, 12(completely); 1-3, 5-11, 14, 15(partially)

Method for detecting FeLV infection by detecting antibodies to p15E and also by detecting p27.

2. claims: 13(completely); 1-3, 5-11, 14, 15(partially)

Method for detecting FeLV infection by detecting antibodies to p15E and also tp p45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/063327

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0166568	A2	13-09-2001	AU 783559 B2 10-11-2005
			AU 4910301 A 17-09-2001
			CA 2399202 A1 13-09-2001
			EP 1294749 A2 26-03-2003
			JP 2003527584 A 16-09-2003
			US 2004058316 A1 25-03-2004
			US 2008286295 A1 20-11-2008
			WO 0166568 A2 13-09-2001

EP 1754715	A1	21-02-2007	EP 1754715 A1 21-02-2007
			WO 2007020243 A2 22-02-2007

US 4923798	A	08-05-1990	NONE

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 M	1/00	(2006.01)	C 0 7 K 17/14	
			C 1 2 M 1/00	A

(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, 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, ZA

(72) 発明者 ホフマン、レギナ

スイス、ツェーハー - 8 6 4 0、ラッパーズヴィール、ヒンターガッセ 1 4

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB16 BB17 FA15

4H045 AA10 BA10 BA62 BA63 CA04 DA50 EA53 FA33 FA74

专利名称(译)	猫白血病病毒跨膜蛋白p15E用于诊断FeLV感染		
公开(公告)号	JP2014521058A	公开(公告)日	2014-08-25
申请号	JP2014517835	申请日	2012-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	苏黎世大学		
申请(专利权)人(译)	海胆威赛罗卡泰特苏黎世		
[标]发明人	ルッツハンス ベントリエヴァ ホフマンレギナ		
发明人	ルッツ、ハンス ベントリ、エヴァ ホフマン、レギナ		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 C07K17/12 C07K17/14 C12M1/00		
CPC分类号	G01N33/56983 C07K14/005 C12N7/00 C12N2740/13022		
FI分类号	G01N33/569.L G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/543.501.A C07K17/12.ZNA C07K17/14 C12M1/00.A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/FA15 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA62 4H045/BA63 4H045/CA04 4H045/DA50 4H045/EA53 4H045/FA33 4H045/FA74		
优先权	2011173321 2011-07-08 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于检测患者中FeLV感染的方法，其中将获自患者的样品与p15 (E) 抗体结合步骤中的重组跨膜p15E蛋白体外接触。

Figures

