

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-531926

(P2012-531926A)

(43) 公表日 平成24年12月13日(2012.12.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-519587 (P2012-519587)
 (86) (22) 出願日 平成22年6月30日 (2010. 6. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年2月29日 (2012. 2. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/040676
 (87) 国際公開番号 W02011/002936
 (87) 国際公開日 平成23年1月6日 (2011. 1. 6)
 (31) 優先権主張番号 61/305, 604
 (32) 優先日 平成22年2月18日 (2010. 2. 18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/221, 752
 (32) 優先日 平成21年6月30日 (2009. 6. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507316642
 アボット ラボラトリーズ
 アメリカ合衆国, イリノイ州, アボット
 パーク, アボット パーク ロード
 100

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 XMRV感染のマーカーとその使用

(57) 【要約】

本発明は、異種指向性マウス白血病ウイルス関連レトロウイルス (XMRV) およびXMRV感染に関連する疾患を検出するためのアッセイに関する。さらに、本発明は免疫応答を誘導することができる特異的XMRV抗原、ならびに診断、スクリーニング、および治療に大きな効用を有するXMRVに関係する核酸に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号83、配列番号84、および配列番号85からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む単離された抗原性ペプチドであって、XMRV p15Eの全アミノ酸配列に対応しない、上記ペプチド。

【請求項 2】

配列番号83、配列番号84、および配列番号85からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列から成る単離された抗原性ペプチドであって、XMRV p15Eの全アミノ酸配列に対応しない、上記ペプチド。

【請求項 3】

試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出する方法であって、

(a)前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間と条件のもとで接触させるステップ；ならびに

(b)前記抗原/抗XMRV抗体複合体の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法。

【請求項 4】

試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出する方法であって、

(a)前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間と条件のもとで接触させるステップ；

(b)抗原/抗XMRV抗体複合体をコンジュゲートと十分な時間と条件のもとで接触させ、コンジュゲートを抗XMRV抗体と結合させるステップであって、前記コンジュゲートが前記抗XMRV抗体と結合できる抗体および標識を含むものである、前記ステップ；ならびに

(c)前記標識の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法。

【請求項 5】

試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出する方法であって、

(a)前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間および条件のもとで接触させるステップ；

(b)抗原/抗XMRV抗体複合体をコンジュゲートと十分な時間と条件のもとで接触させ、コンジュゲートを抗XMRV抗体と結合させるステップであって、前記コンジュゲートがステッ

10

20

30

40

50

ブ(a)で選択した抗原のアミノ酸配列および標識を含むものである、前記ステップ；ならびに

(c)前記標識の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップ
を含んでなる前記方法。

【請求項6】

試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出する方法であって、

(a)前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間および条件のもとで接触させるステップ；

10

(b)抗原/抗XMRV抗体複合体を、コンジュゲートと十分な時間と条件のもとで接触させ、前記コンジュゲートを抗XMRV抗体と結合させるステップであって、前記コンジュゲートが(i)リガンド結合部分と機能しうる形で連結されたステップ(a)で選択された抗原のアミノ酸配列；および(ii)標識と機能しうる形で連結された(i)のリガンド結合部分と結合したリガンドを含むものである、前記ステップ；ならびに

20

(c)前記標識の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップ
を含んでなる前記方法。

【請求項7】

(a)XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない改変された抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記改変がリガンド結合部分の抗原性ポリペプチドとの機能しうる形での連結である、前記改変された抗原性ポリペプチド；および(b)標識と機能しうる形で連結された(a)のリガンド結合部分により結合したリガンドを含む、コンジュゲート組成物。

30

【請求項8】

リガンドとリガンド結合部分が、ビオチンとアビジン；ビオチンとストレプトアビジン；ジゴキシゲニンと抗ジゴキシゲニン；抗フルオレセインとフルオレセイン；抗2,4-ジニトロフェノール(DNP)とDNP；および抗ペルオキシダーゼとペルオキシダーゼからなる群より選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

標識が化学発光標識、蛍光標識、放射性標識、ペプチド標識、核酸標識、および酵素標識からなる群より選択される、請求項7に記載の方法。

40

【請求項10】

試験サンプル中の前立腺癌を検出する方法であって、

(a)前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間および条件の

50

もとで接触させるステップ；ならびに

(b)前記抗原 / 抗XMRV抗体複合体の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップ；

を含むものであり、ここで抗XMRV抗体の存在は試験サンプル中の前立腺癌の存在の指標である前記方法。

【請求項 1 1】

試験サンプル中の前立腺癌を検出する方法であって、

(a)前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原 / 抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間および条件のもとで接触させるステップ；

(b)抗原 / 抗XMRV抗体複合体をコンジュゲートと十分な時間と条件のもとで接触させ、コンジュゲートを抗XMRV抗体と結合させるステップであって、前記コンジュゲートが前記抗XMRV抗体と結合することができる抗体および標識を含むものである、前記ステップ；ならびに

(c)前記標識の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップ；

を含むものであり、ここで抗XMRV抗体の存在は試験サンプル中の前立腺癌の存在の指標である前記方法。

【請求項 1 2】

試験サンプル中の前立腺癌を検出する方法であって、

(a)前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原 / 抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間および条件のもとで接触させるステップ；

(b)抗原 / 抗XMRV抗体複合体をコンジュゲートと十分な時間と条件のもとで接触させ、コンジュゲートを抗XMRV抗体と結合させるステップであって、前記コンジュゲートがステップ(a)で選択した抗原のアミノ酸配列および標識を含むものである、前記ステップ；ならびに

(c)前記標識の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップ；

を含むものであり、ここで抗XMRV抗体の存在は試験サンプル中の前立腺癌の存在の指標である前記方法。

【請求項 1 3】

試験サンプル中の前立腺癌を検出する方法であって、

(a)前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原 / 抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間および条件の

10

20

30

40

50

もとで接触させるステップ；

(b) 抗原 / 抗XMRV抗体複合体をコンジュゲートと、コンジュゲートが抗XMRV抗体と結合するのに十分な時間と条件のもとで接触させるステップであって、前記コンジュゲートが (i) リガンド結合部分と機能しうる形で連結されたステップ (a) で選択された抗原のアミノ酸配列；および (ii) 標識と機能しうる形で連結された (i) のリガンド結合部分と結合したりガンドを含むものである、前記ステップ；ならびに

(c) 前記標識の存在を検出することにより、前記試験サンプル中の前立腺癌の存在を検出するステップ

を含む前記方法。

【請求項 14】

試験サンプル中のXMRV感染の進行をモニターする方法であって、

(a) 前記試験サンプルを、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有する配列を含む前記抗原性ポリペプチドと、抗原 / 抗XMRV抗体複合体を形成させるのに十分な時間および条件で接触させるステップ；ならびに

(b) 前記抗原 / XMRV抗体複合体の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップ

を含むものであり、ここで前記抗原 / XMRV抗体複合体の存在はXMRV感染の進行の指標である前記方法。

【請求項 15】

前記試験サンプル中の前記抗原 / XMRV抗体複合体の存在を

(a) 抗原 / 抗XMRV抗体複合体を抗体コンジュゲートと十分な時間と条件のもとで接触させ、コンジュゲートを抗XMRV抗体と結合させるステップであって、前記コンジュゲートが抗XMRV抗体と結合できる抗体および標識を含むものである、前記ステップ；および

(b) 前記標識の存在を検出することにより、前記試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップ

により検出する方法であって、ここで抗XMRV抗体の存在は試験サンプル中のXMRV感染の進行の指標である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記試験サンプル中の前記抗原 / XMRV抗体複合体の存在を、

(a) 抗原 / 抗XMRV抗体複合体を抗原コンジュゲートと十分な時間と条件のもとで接触させ、コンジュゲートを前記抗XMRV抗体と結合させるステップであって、前記コンジュゲートが抗XMRV抗体と結合できる抗原および標識を含むものである、前記ステップ；および

(b) 前記標識の存在を検出することにより、前記試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出するステップ

により検出する方法であって、ここで、抗XMRV抗体の存在は試験サンプル中のXMRV感染の進行の指標である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出するキットであって、

(a) XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチド；ならびに

10

20

30

40

50

(b) 抗XMRV抗体に対する抗体および標識を含むコンジュゲートを含むものである前記キット。

【請求項 18】

試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出するキットであって：

(a) XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチド；ならびに

10

(b) (a)より選択される配列を含む抗原および標識を含むコンジュゲートを含むものである前記キット。

【請求項 19】

試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出するキットであって：

(a) XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ポリペプチドであって、配列番号23；配列番号25；配列番号27；配列番号29；配列番号33；配列番号39；配列番号43；配列番号50；配列番号52；配列番号56；配列番号60；配列番号63；配列番号67；配列番号73；配列番号77；配列番号80；配列番号82；配列番号83；配列番号84；配列番号85；配列番号102；および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含む前記抗原性ポリペプチド；ならびに

20

(b) (i) リガンド結合部分と機能しうる形で連結された(a)で選択された配列を含む抗原性ポリペプチド；および(ii) 標識と機能しうる形で連結された(i)のリガンド結合部分と結合したリガンド、を含むコンジュゲート、を含むものである前記キット。

【請求項 20】

100未満のヌクレオチドからなる単離された核酸配列であって、配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される配列と少なくとも97%同一性を有する配列を含むものである前記単離された核酸配列。

30

【請求項 21】

100未満のヌクレオチドからなる単離された核酸配列であって、配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される配列を含むものである前記単離された核酸配列。

40

【請求項 22】

請求項 20 に記載の核酸配列を含むベクター。

【請求項 23】

請求項 22 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 24】

XMRVを含有する細胞を決定する方法であって、配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列

50

番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される配列と少なくとも97%同一性を有する配列を含む100未満のヌクレオチドの配列と特異的にハイブリダイズする細胞核酸を検出するステップを含むものであり、ここで前記細胞核酸の存在は細胞がXMRVに感染していることを示す前記方法。

【請求項 2 5】

XMRVを含有する細胞を決定する方法であって、配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される核酸配列と特異的にハイブリダイズする細胞核酸を検出するステップを含むものであり、ここで前記細胞核酸の存在は細胞がXMRVに感染していることを示すものである前記方法。

10

【請求項 2 6】

次の核酸対：配列番号16と配列番号19；配列番号30と配列番号31；配列番号40と配列番号44；配列番号53と配列番号54；配列番号57と配列番号58；配列番号64と配列番号65；配列番号68と配列番号69；配列番号70と配列番号71；配列番号74と配列番号75；配列番号74と配列番号78；配列番号90と配列番号91；配列番号96と配列番号97；配列番号98と配列番号99；配列番号103と配列番号104；配列番号105と配列番号106のグループから選択される1対の核酸と特異的にハイブリダイズする細胞核酸を検出するステップを含むものである、請求項 2 5 に記載の方法。

20

【請求項 2 7】

細胞核酸のハイブリダイゼーションが次の分子検出方法：RT-PCR、ネスト化PCR、およびヘミネスト化PCRのうちの1つの環境のもとで起こる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前立腺癌細胞を検出する方法であって、配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される配列と少なくとも97%同一性を有する配列を含む100未満のヌクレオチドの配列と特異的にハイブリダイズする細胞核酸を検出するステップを含むものであり、ここで前記細胞核酸の存在はその細胞が前立腺癌細胞であることを示す前記方法。

30

【請求項 2 9】

前立腺癌細胞を検出する方法であって、配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される核酸配列と特異的にハイブリダイズする細胞核酸を検出するステップを含むものであり、前記細胞核酸の存在は細胞が前立腺癌細胞であることを示す前記方法。

40

【請求項 3 0】

次の核酸対：配列番号16と配列番号19；配列番号30と配列番号31；配列番号40と配列番号44；配列番号53と配列番号54；配列番号57と配列番号58；配列番号64と配列番号65；配列番号68と配列番号69；配列番号70と配列番号71；配列番号74と配列番号75；配列番号74と配列番号78；配列番号90と配列番号91；配列番号96と配列番号97；配列番号98と配列番号

50

号99；配列番号103と配列番号104；配列番号105と配列番号106のグループから選択される1対の核酸と特異的にハイブリダイズする細胞核酸を検出するステップを含むものである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

細胞核酸のハイブリダイゼーションが次の分子検出方法：RT-PCR、ネスト化PCR、およびヘミネスト化PCRのうちの1つの環境のもとで起こる、請求項29に記載の方法。

【請求項32】

サンプル中のXMRV核酸を検出する標識部分を含むサンプルにおいてXMRV核酸の存在を検出するキットであって、その標識部分が100未満のヌクレオチドの核酸配列であり、その核酸配列が配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される配列と少なくとも97%同一性を有する配列を含むものである前記キット。

【請求項33】

サンプル中のXMRV核酸を検出する標識部分を含むサンプルにおいてXMRV核酸の存在を検出するキットであって、その標識部分が配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される核酸配列である前記キット。

【請求項34】

XMRVに対する免疫応答をそれを必要とする個体に誘導する方法であって、その個体に、XMRV gp70、p15E、p30、p15、p12、またはp10の全アミノ酸配列に対応しない抗原性ペプチドであって、そのアミノ酸配列が配列番号83、配列番号84、および配列番号85からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む前記抗原性ペプチドの有効量を投与するステップを含むものである前記方法。

【請求項35】

それを必要とする個体においてXMRVを阻害する方法であって、その個体に、XMRVを阻害する核酸の有効量を投与するステップを含むものであり、前記核酸が配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列からなる群より選択される核酸配列を含む単離されたアンチセンスRNAまたは干渉RNAである前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、それぞれの内容が本明細書に参照により全て組み込まれる米国特許予備出願第61/221,752号（2009年6月30日出願）および米国特許予備出願第61/305,604号（2010年2月18日出願）の優先権を主張する。

【0002】

本発明は一般に、異種指向性マウス白血病ウイルス関連レトロウイルス（XMRV）およびXMRV感染に関係する疾患を検出するアッセイに関する。さらに本発明は、免疫原性応答を誘発できる特異的XMRV抗原ならびに診断、スクリーニング、および治療に意義深い効用を有するXMRVに関係する核酸に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

XMRVは、新しく同定されたガンマレトロウイルスであり、Virochip DNAマイクロアレイ技術を用いて前立腺癌組織中に発見された (A. Urisman et al, PloS Pathog. 2:e25, 2006; 国際特許出願PCT/US2006/013167)。PCR-クローニングしたcDNAを用いて全長ゲノム配列がいくつかの前立腺腫瘍から作製された (A. Urisman et al, PloS Pathog. 2:e25, 2006)。分析の結果、異種指向性マウス白血病ウイルスと非常に密接に関連する潜在的に複製コンピテントのレトロウイルスであることが示された。ネスト化逆転写PCR (RT-PCR) を用いる初期スクリーニングは、RNase Lの低活性R462Q変異体についてホモ接合性の前立腺癌患者から得た腫瘍組織の40% (8/20) においてXMRVが検出可能であり、この対立遺伝子についてヘテロ接合性 (RQ) またはホモ接合性野生型 (RR) の患者のほんの1.5% (1/66) と対照的であることを見出した (A. Urisman et al., PloS Pathog. 2:e25, 2006)。この観察と一致して、XMRVは非家族性前立腺癌患者から得た組織サンプル105件のうち1件、および前立腺癌でない男性から得た組織サンプル70件のうち1件しか検出されなかった (N. Fischer et al, J. Clin. Virol. 43:277, 2008)。

10

【 0 0 0 4 】

Dongら (Proc. Nat'l Acad. Sci USA 104:1655, 2007) によるその後の研究は、XMRVについて次のいくつかの重要な洞察を明らかにした：(1)2つのcDNAクローン由来のXMRVゲノムを用いてトランスフェクトした前立腺癌細胞株から、感染性ウイルスを作製した。さらに、このウイルスを前立腺細胞株と非前立腺細胞株の両方において複製した；(2)前立腺癌由来の細胞株、DU145におけるXMRV複製はインターフェロン感受性である；および(3) XMRVによる感染に要求されるヒト細胞表面受容体は異種指向性かつ多形レトロウイルス受容体1 (Xpr1) である。最後に、ヒト前立腺DNA中の組込み部位の特徴付けは、XMRVのヒトに対する感染能力について明確な確証を与えた (Dong et al, Proc. Nat'l Acad. Sci US A 104:1655, 2007; Kim et al, J. Virol. 82:9964, 2008)。さらに最近、XMRVは慢性疲労症候群をもつ患者において同定された (Lombardi et al, Science 326:585-589, 2009; October 23, 2009)。

20

【 0 0 0 5 】

ウイルスを直接検出またはスクリーニングするのに代わる方法は、XMRVによる感染で誘発される抗体などの間接もしくは代理マーカーを検出またはスクリーニングする方法である。他のウイルスに対する特異的抗体を検出するために設計されたイムノアッセイは公知であり、次のいくつかの利点を与えてくれる：すなわち、(1)一般に、例えば、前立腺組織よりも入手しやすい体液 (例えば、血漿、血清、脳脊髄液、唾液、涙、尿、または組織および細胞の水抽出物) をスクリーニングできること；(2)イムノアッセイはハイスループットスクリーニングを促進する自動化が可能であること；(3)抗体は内因的に比較的安定であり、貯蔵および試験が可能であること；(4)XMRV感染により誘発される抗体の力価は測定区画においてXMRVポリペプチドより長く持続しうること；ならびに、(5)サンプル中に存在する抗体アイソタイプに基づいて最近の感染と慢性感染とを区別する方法を与えることである。このように、ウイルス感染により誘発される体液 (例えば、血漿、血清、脳脊髄液、唾液、涙、尿、または組織および細胞の水抽出物) 中のXMRV特異的抗体を検出するハイスループット血清学アッセイ (イムノアッセイ) が利用可能になると、前立腺癌または他の疾患におけるXMRVの病因学的役割を確立する研究を非常に促進するであろう。

30

40

【 0 0 0 6 】

本明細書で言及した全特許と開示物は、本明細書にその全てが参照により組み込まれる。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 国際特許出願PCT/US2006/013167

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

50

【非特許文献1】A. Urisman et al, PloS Pathog. 2:e25、2006

【非特許文献2】N. Fischer et al, J. Clin. Virol. 43:277, 2008

【非特許文献3】Proc. Nat'l Acad. Sci USA 104:1655、2007

【非特許文献4】Dong et al, Proc. Nat'l Acad. Sci USA 104:1655, 2007

【非特許文献5】Kim et al, J. Virol. 82:9964, 2008

【非特許文献6】Lombardi et al, Science 326:585-589, 2009; October 23, 2009

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはそれと相補的である、単離核酸配列またはその断片を包含する。さらに、本発明はまた、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号38、配列番号42、配列番号49、配列番号51、配列番号55、配列番号59、配列番号62、配列番号66、配列番号76、配列番号79および配列番号81からなる群より選択されるヌクレオチド配列と少なくとも70%同一性を有するヌクレオチド配列を含むかまたはそれと相補的である、単離核酸配列またはその断片を含む。前記核酸配列は異種指向性マウス白血病ウイルス関連レトロウイルス(XMRV)から単離するかもしくは調製してもよくまたは合成的に調製してもよい。さらに、かかる核酸配列をプローブおよび/またはプライマーとして用いてもよい(例えば、DNAに基づく分子アッセイにおける対照または標準物質において)。本発明はまた、以上で言及した核酸配列がコードする精製タンパク質または断片を包含する。

【0010】

さらに、本発明は配列番号29、配列番号25および配列番号82からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%または少なくとも97%同一性を有するアミノ酸配列を含むものである精製タンパク質またはその断片を包含する。

【0011】

さらに本発明はまた、a)配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号38、配列番号42、配列番号49、配列番号51、配列番号55、配列番号59、配列番号62、配列番号66、配列番号76、配列番号79および配列番号81からなる群より選択される核酸配列を単離するステップ; b)調節配列と作動しうる形で連結された前記単離核酸配列を含むベクターを構築するステップ; およびc)前記ベクターを十分な時間と条件のもとで宿主細胞中に導入し、タンパク質を発現させるステップを含むものであるタンパク質を製造する方法を含む。

【0012】

さらに本発明は、調節配列と作動しうる形で連結された、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号38、配列番号42、配列番号49、配列番号51、配列番号55、配列番号59、配列番号62、配列番号66、配列番号76、配列番号79および配列番号81からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含むものであるベクターを含む。本発明はまた、このベクターを含むものである宿主細胞を含む。

【0013】

さらに、本発明はまた、抗XMRV抗体を含有すると疑われる試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出する方法であって、(a)前記試験サンプルを、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80および配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗原と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ; および(b)前記抗原/抗XMRV抗体複合

10

20

30

40

50

体の存在を検出することにより、試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法を包含する。

【0014】

さらに、本発明は抗XMRV抗体を含有すると疑われる試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出する方法であって、(a)試験サンプルを、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む第1の抗原と十分な時間と条件のもとで接触させ、第1の抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；(b)抗体コンジュゲート（この抗体コンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた、抗XMRV抗体に対する抗体を含むものである）を、抗原/抗XMRV抗体複合体と十分な時間と条件のもとで接触させ、コンジュゲートを結合した抗XMRV抗体と結合させるステップ；および(c)シグナル発生化合物が発生する前記シグナルの存在を検出することにより試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出し、シグナルの存在は試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を示すステップを含むものである前記方法を含む。

10

【0015】

さらに、前記抗XMRV抗体を含有すると疑われる試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出する方法は、(a)試験サンプルを抗体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗体/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；および(b)抗体/抗XMRV抗体複合体の存在を検出することにより試験サンプル中に存在するXMRV抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法を含んでもよい。抗体は、例えば、抗ヒト抗体であってもよい。

20

【0016】

また、本発明は、抗XMRV抗体を含有すると疑われる試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出する方法であって、(a)試験サンプルを抗体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗体/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；(b)抗原コンジュゲート（このコンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗原を含むものである）を、抗体/抗XMRV抗体複合体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗原コンジュゲートを結合した抗XMRV抗体と結合させるステップ；および(c)シグナル発生化合物が発生するシグナルの存在を検出することにより、試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出し、シグナルの存在は試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を示すステップを含むものである前記方法を含む。ある特定の実施形態において、抗原コンジュゲートの抗原部分は最初に抗XMRV抗体と結合するのに使われた抗原と同一であるか、または抗原コンジュゲートの抗原部分は異なるものの同じXMRV抗体が結合できるものであってもよい。

30

【0017】

本発明はさらに、試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出する他の方法を包含する。この方法は、(a)前記抗体を含有すると疑われる試験サンプルを、p15E-CKS（配列番号27）、p15E-CKS（配列番号29）、p15E-PET（配列番号33）、p15E-PL（配列番号23）、p15E-PL（配列番号25）、p15E（配列番号82）とそれらのエピトープ（すなわち、配列番号83、84および85）、p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、gp70（配列番号102）およびp30（配列番号109）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである単離タンパク質または抗原と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；(b)XMRV抗原コンジュゲート〔このXMRV抗原コンジュゲートはp15E-CKS（配列番号27）、p15E-CKS

40

50

(配列番号29)、p15E-PET(配列番号33)、p15E-PL(配列番号23)、p15E-PL(配列番号25)、p15E(配列番号82)とそれらのエピトープ(すなわち、配列番号83、84および85)、p70-PL(配列番号39)、p70-CKS(配列番号43)、p70-PET(配列番号50)、p30-CKS(配列番号67)、p30-PL(配列番号73)、p15-PL(配列番号52)、p15-CKS(配列番号56)、p12-CKS(配列番号60)、p12-PET(配列番号63)、p10-CKS(配列番号77)、p10-PET(配列番号80)、gp70(配列番号102)およびp30(配列番号109)からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものであり、リガンド結合部分と作動しうる形で連結されている]を、得られる抗原/XMRV抗体複合体に十分な時間と条件のもとで加え、抗原を結合したXMRV抗体と結合させるステップ、および(c)抗原コンジュゲートと作動しうる形で連結されたりガンド結合部分により結合されたりガンドと作動しうる形で連結されたシグナル発生化合物が発生するシグナルを検出することにより、試験サンプル中に存在しうる抗XMRV抗体の存在を検出するステップを含むものである。ある特定の実施形態において、抗原コンジュゲートの抗原部分は、最初に抗XMRV抗体と結合するのに使われる抗原と同一であるか、または抗原コンジュゲートの抗原部分は異なるが同じ抗XMRV抗体と結合できるものであってもよい。再び、XMRVに対する抗体を含む対照または標準物質を用いてもよい。

10

【0018】

さらに本発明は試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を確認するためのキットであって、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80および配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの抗原を含むものである前記キットを含む。

20

【0019】

さらに本発明はまた、試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を確認するためのキットであって、a)配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80および配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである少なくとも1つの抗原；およびb)2)検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた1)抗XMRV抗体に対する抗体；を含むものである前記キットを含む。

30

【0020】

さらに、本発明はまた、試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出するためのキットであって、a)固相上に結合した配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80および配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つの抗原；およびb)2)検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた1)配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80および配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗原を含むものであるコンジュゲート；を含むものである前記キットを含む。少なくとも1つの抗原はコンジュゲートのアミノ酸配列またはタンパク質のいずれかを含んでもよい。

40

【0021】

さらに、本発明は試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出するためのキットであって、a)抗XMRV抗体に対する抗体；およびb)2)検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた1)配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号

50

号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80および配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗原を含むコンジュゲート；を含むものである前記キットを包含する。

【0022】

さらに本発明はまた、試験サンプル中の抗XMRV抗体を検出するためのキットであって、a)抗XMRV抗体に対する第1の抗体；およびb)2)検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた1)抗XMRV抗体に対する第2の抗体を含むコンジュゲート；を含むものである前記キットを含む。

【0023】

さらに本発明は、配列番号83、配列番号84、および配列番号85からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離タンパク質を包含する。

【0024】

さらに、本発明は哺乳動物におけるXMRV感染を検出する方法であって、(a)哺乳動物から試験サンプルを単離するステップ；(b)試験サンプルを、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗原と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；および(c)抗原/抗XMRV抗体複合体の存在を検出することにより試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出し、複合体の存在は哺乳動物における過去または現在のXMRV感染を示すステップ；を含むものである前記方法を含む。

【0025】

さらに、本発明は哺乳動物におけるXMRV感染を検出する方法であって、(a)哺乳動物から試験サンプルを単離するステップ；(b)試験サンプルを、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む第1の抗原と十分な時間と条件のもとで接触させ、第1の抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；(c)抗体コンジュゲート（このコンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた、抗XMRV抗体に対する抗体を含む）を抗原/抗XMRV抗体複合体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗体コンジュゲートを結合した抗XMRV抗体と結合させるステップ；および(d)シグナル発生化合物により発生されるシグナルの存在を検出することにより、試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出し、シグナルの存在は哺乳動物における過去または現在のXMRV感染を示すステップ；を含むものである前記方法を包含する。

【0026】

さらに、本発明は哺乳動物におけるXMRV感染を検出する方法であって、(a)哺乳動物から試験サンプルを得るステップ；(b)試験サンプルを抗体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗体/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；および(c)抗体/抗XMRV抗体複合体の存在を検出することにより試験サンプル中に存在する抗XMRV抗体の存在を検出し、複合体の存在は哺乳動物における過去または現在のXMRV感染を示すステップ；を含むものである前記方法を含む。

【0027】

さらに本発明はまた、哺乳動物におけるXMRV感染を検出する方法であって、(a)哺乳動物から試験サンプルを単離するステップ；(b)試験サンプルを抗体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗体/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；(c)抗原コンジュゲート（この抗原コンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生

10

20

30

40

50

化合物に取り付けられた、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む)を得られる抗体/抗XMRV抗体複合体と十分な時間と条件のもとで接触させ、コンジュゲートを結合した抗XMRV抗体と結合させるステップ;および(d)前記シグナル発生化合物により発生されるシグナルの存在を検出することにより、試験サンプル中に存在しうる抗XMRV抗体の存在を検出し、シグナルの存在は哺乳動物における過去または現在のXMRV感染を示すステップ;を含むものである前記方法を含む。

【0028】

さらに本発明はまた、哺乳動物におけるXMRV感染を検出する方法であって、(a)哺乳動物から試験サンプルを単離するステップ; (b)試験サンプルを、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む第1の抗原と十分な時間と条件のもとで接触させ、第1の抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ; (c)抗原コンジュゲート(この抗原コンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むものである)を抗原/抗XMRV抗体複合体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗原コンジュゲートを結合した抗XMRV抗体と結合させるステップ;および(d)シグナル発生化合物により発生されるシグナルの存在を検出することにより、試験サンプル中に存在しうる抗XMRV抗体の存在を検出し、抗XMRV抗体の存在は哺乳動物における過去または現在のXMRV感染を示すステップ;を含むものである前記方法を含む。

【0029】

また、本発明は哺乳動物におけるXMRV感染を検出する方法であって、(a)哺乳動物から試験サンプルを得るステップ; (b)試験サンプルを抗XMRV抗体に対する第1の抗体と十分な時間と条件のもとで接触させ、第1の抗体/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ; (c)コンジュゲート(このコンジュゲートは、検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた第2の抗XMRV抗体に対する抗体を含む)を前記第1の抗体/抗XMRV抗体複合体に十分な時間と条件のもとで加え、コンジュゲートを結合した抗XMRV抗体と結合させるステップ;および(d)シグナル発生化合物により発生されるシグナルの存在を検出することにより、試験サンプル中に存在しうる抗XMRV抗体の存在を検出し、シグナルの存在は哺乳動物における過去または現在のXMRV感染を示すステップ;を含むものである前記方法を包含する。

【0030】

さらに本発明はまた、哺乳動物におけるXMRV感染を検出する方法であって、(a)哺乳動物から試験サンプルを得るステップ; (b)試験サンプルを配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む第1の抗原と十分な時間と条件のもとで接触させ、第1の抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ; (c)抗原コンジュゲート(このコンジュゲートはリガンド結合部分と作動しうる形で連結された、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102およ

び配列番号109からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む第2の抗原を含む)を、抗原/抗XMRV抗体複合体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗原コンジュゲートを結合した抗XMRV抗体と結合させるステップ; および(d)抗原コンジュゲートと作動しうる形で連結されたりガンド結合部分により結合されたりガンドと作動しうる形で連結されたシグナル発生化合物が発生するシグナルを検出することにより、試験サンプル中に存在しうる抗XMRV抗体の存在を検出するステップ; を含むものである前記方法を包含する。ある特定の実施形態において、抗原コンジュゲートのXMRV抗原部分は最初にXMRVと結合するために使われたXMRV抗原と同一であるかまたは抗原コンジュゲートの抗原部分は異なるものの同じXMRV抗体が結合できるものであってもよい。再び、XMRVに対する抗体を含む対照または標準物質を用いてもよい。

10

【0031】

また、本発明は哺乳動物におけるXMRV感染を検出する方法であって、(a)哺乳動物から得たサンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出する方法; (b)哺乳動物から得た試験サンプルをFISHプローブと接触させる方法; および(c)哺乳動物から得た試験サンプルを、XMRV核酸とハイブリダイズして十分な条件のもとでかかるXMRV核酸を増幅することができる核酸組成物と接触させる方法の1以上を含み、ここで、抗XMRV抗体、XMRVFISHプローブの蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)を示すシグナル、およびXMRV核酸配列の増幅を示すシグナルの1以上の存在は哺乳動物における過去または現在のXMRV感染を示すものである前記方法を包含する。

【0032】

本発明はまた、XMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群の指標であるXMRV抗体を検出する方法を提供する。さらに、本発明は前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群を発症する傾向の指標であるXMRV抗体を検出する方法を提供する。

20

【0033】

本発明はまた、特異的XMRVタンパク質に対する抗体を検出することによりXMRV感染の進行をモニタリングする方法を提供する。例えば、限定されるものでないが、XMRV感染の進行を、次のXMRVタンパク質: gp70、p15E、p30、p15、p12、およびp10の1以上に対する抗体の存在を検出することによりモニタリングすることができる。

【0034】

本発明はまた、XMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群の指標であるXMRV核酸を検出する方法を提供する。さらに、本発明は前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群を発症する傾向の指標であるXMRV核酸を検出する方法を提供する。本発明はさらに、免疫応答を誘発できる抗原性XMRVアミノ酸配列に関する。

30

【0035】

本発明はまた、XMRV遺伝子発現を減少させることができる阻害性核酸に関し、これには、限定されるものでないが、アンチセンス核酸、リボザイム、およびsiRNA核酸が含まれる。

【0036】

以上の実施形態において、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号102および配列番号109は任意にそれぞれ、さらに大きいペプチド中に含まれていてもよく、前記さらに大きいペプチドはXMRVまたは非XMRVアミノ酸配列を含んでもよく、ここで上記配列の外側のXMRVアミノ酸配列のパーセントは0%、10%以下、20%以下、30%以下、40%以下、50%以下、60%以下、70%以下、80%以下、90%以下、95%以下、99%以下、または100%以下であってもよく、そしてここで上記配列を含む全ペプチドは生来のXMRVタンパク質のまたは全XMRVがコードするポリタンパク質の10%以下、20%以下、30%以下、40%以下、50%以下、70%以下、80%以下、90%以下、95%以下、99%以下、または100%以下を構成してもよい。

40

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 3 7 】

【図 1】合成XMRV env p15E遺伝子構築物を作製するために用いるオリゴヌクレオチドを
図解し、ここで、8つの重複オリゴヌクレオチド(A~H)の1セットは全長p15E遺伝子を構
築し、そして7つの重複オリゴヌクレオチド(A~FおよびI)の他の1セットは示した疎水
領域(HR)が欠失されたp15E遺伝子を生じる。

【図 2 A】図2A~2Cは、全長合成XMRV env p15E遺伝子を運ぶプラスミドクローンpK121F/
DH5aおよびpJ1F2A/XL1の構築に関わるステップの図解である。

【図 2 B】図2A~2Cは、全長合成XMRV env p15E遺伝子を運ぶプラスミドクローンpK121F/
DH5aおよびpJ1F2A/XL1の構築に関わるステップの図解である。

【図 2 C】図2A~2Cは、全長合成XMRV env p15E遺伝子を運ぶプラスミドクローンpK121F/
DH5aおよびpJ1F2A/XL1の構築に関わるステップの図解である。

【図 3 A】図3A~3Cは、欠失のある合成XMRV env p15E遺伝子を含有するプラスミドクロ
ーンpK1310B/DH5aおよびpJ10B9A/XL1の構築に関わるステップの図解を示す。

【図 3 B】図3A~3Cは、欠失のある合成XMRV env p15E遺伝子を含有するプラスミドクロ
ーンpK1310B/DH5aおよびpJ10B9A/XL1の構築に関わるステップの図解を示す。

【図 3 C】図3A~3Cは、欠失のある合成XMRV env p15E遺伝子を含有するプラスミドクロ
ーンpK1310B/DH5aおよびpJ10B9A/XL1の構築に関わるステップの図解を示す。

【図 4】全長生来のXMRV env p15E遺伝子を有するプラスミドクローンpET28b-p15E/DH5a
の構築に関わるステップの図解である。

【図 5 A】図5A~5Cはそれぞれ、プラスミドクローンpKABT_1-A3/DH5a、pJABT_1-B2/XL1
、およびpEABT_1-D2/DH5aの構築に関わる模式的ステップの概要であり、ここで全ての3ク
ローンは全長合成XMRV env gp70遺伝子のコピーを有する。

【図 5 B】図5A~5Cはそれぞれ、プラスミドクローンpKABT_1-A3/DH5a、pJABT_1-B2/XL1
、およびpEABT_1-D2/DH5aの構築に関わる模式的ステップの概要であり、ここで全ての3ク
ローンは全長合成XMRV env gp70遺伝子のコピーを有する。

【図 5 C】図5A~5Cはそれぞれ、プラスミドクローンpKABT_1-A3/DH5a、pJABT_1-B2/XL1
、およびpEABT_1-D2/DH5aの構築に関わる模式的ステップの概要であり、ここで全ての3ク
ローンは全長合成XMRV env gp70遺伝子のコピーを有する。

【図 6】精製したXMRVエンベロープをもつビリオンの電子顕微鏡写真である。

【図 7】ヤギ抗Friend MuLVポリクローナル抗体によりウェスタンブロット上で同定したX
MRVウイルスタンパク質のバンドを示す。Env、エンベロープタンパク質；TM、膜貫通タン
パク質；MA、マトリックスタンパク質；CA、キャプシドタンパク質；およびNC、ヌクレオ
キャプシドタンパク質。gag前駆体(p68/p80)およびタンパク質分解中間体(p12-CA)は
イタリック書体で示した。

【図 8】生来のXMRVタンパク質に対する抗MuLVおよび抗Envポリクローナル抗体結合の組
換えXMRVタンパク質による競争阻害を示す。組換えタンパク質および特異的ストリップに
対する濃度を表に掲げた。

【図 9 A 1】図9A~9Cは、XMRV溶解液タンパク質を用いたアカゲザルR11-10(A)、RLq-10(
B)およびRYh-10(C)におけるIgGおよびIgM応答のウェスタンブロットである。ストリップ
上の血液サンプルをXMRVによる接種後(PI)日数として掲げた(0~93)。ヤギ 抗Friend
MuLV (a-F)を陽性対照として用いた。

【図 9 A 2】図9A~9Cは、XMRV溶解液タンパク質を用いたアカゲザルR11-10(A)、RLq-10(
B)およびRYh-10(C)におけるIgGおよびIgM応答のウェスタンブロットである。ストリップ
上の血液サンプルをXMRVによる接種後(PI)日数として掲げた(0~93)。ヤギ 抗Friend
MuLV (a-F)を陽性対照として用いた。

【図 9 B 1】図9A~9Cは、XMRV溶解液タンパク質を用いたアカゲザルR11-10(A)、RLq-10(
B)およびRYh-10(C)におけるIgGおよびIgM応答のウェスタンブロットである。ストリップ
上の血液サンプルをXMRVによる接種後(PI)日数として掲げた(0~93)。ヤギ 抗Friend
MuLV (a-F)を陽性対照として用いた。

【図 9 B 2】図9A~9Cは、XMRV溶解液タンパク質を用いたアカゲザルR11-10(A)、RLq-10(
B)およびRYh-10(C)におけるIgGおよびIgM応答のウェスタンブロットである。ストリップ
上の血液サンプルをXMRVによる接種後(PI)日数として掲げた(0~93)。ヤギ 抗Friend
MuLV (a-F)を陽性対照として用いた。

10

20

30

40

50

B)およびRYh-10(C)におけるIgGおよびIgM応答のウェスタンブロットである。ストリップ上の血液サンプルをXMRVによる接種後(PI)日数として掲げた(0~93)。ヤギ抗Friend MuLV(a-F)を陽性対照として用いた。

【図9C1】図9A~9Cは、XMRV溶解液タンパク質を用いたアカゲザルR11-10(A)、RLq-10(B)およびRYh-10(C)におけるIgGおよびIgM応答のウェスタンブロットである。ストリップ上の血液サンプルをXMRVによる接種後(PI)日数として掲げた(0~93)。ヤギ抗Friend MuLV(a-F)を陽性対照として用いた。

【図9C2】図9A~9Cは、XMRV溶解液タンパク質を用いたアカゲザルR11-10(A)、RLq-10(B)およびRYh-10(C)におけるIgGおよびIgM応答のウェスタンブロットである。ストリップ上の血液サンプルをXMRVによる接種後(PI)日数として掲げた(0~93)。ヤギ抗Friend MuLV(a-F)を陽性対照として用いた。

10

【図10A】図10A~10Cは、ウェスタンブロットとARCHITECT(登録商標)化学発光イムノアッセイ(CMIA)に基づく、組換えXMRVタンパク質によるアカゲザル、R11-10におけるIgG抗体応答の検出を示す。ストリップ上の血液サンプルをPI日(XMRVによる)(0~93)に従って掲げた。ヤギ抗Friend MuLV(a-F)をウェスタンブロットの陽性対照として用いた。

【図10B】図10A~10Cは、ウェスタンブロットとARCHITECT(登録商標)化学発光イムノアッセイ(CMIA)に基づく、組換えXMRVタンパク質によるアカゲザル、R11-10におけるIgG抗体応答の検出を示す。ストリップ上の血液サンプルをPI日(XMRVによる)(0~93)に従って掲げた。ヤギ抗Friend MuLV(a-F)をウェスタンブロットの陽性対照として用いた。

20

【図10C】図10A~10Cは、ウェスタンブロットとARCHITECT(登録商標)化学発光イムノアッセイ(CMIA)に基づく、組換えXMRVタンパク質によるアカゲザル、R11-10におけるIgG抗体応答の検出を示す。ストリップ上の血液サンプルをPI日(XMRVによる)(0~93)に従って掲げた。ヤギ抗Friend MuLV(a-F)をウェスタンブロットの陽性対照として用いた。

【図11A】図11A~11Cはヒト前立腺癌サンプルVP234の、生来のウイルスタンパク質ストリップ(A)、組換えp15E-CKSストリップ(B)および組換えp70-CKSストリップによるウェスタンブロット分析を図解する。サンプル番号は、1:VP234、2:正常なヒト血漿#85(陰性対照)、3:XMRVを持つ霊長類R11-10PIの第93日採血、4:ヤギ抗FriendMuLVポリ

30

クローナル抗体(陽性対照)である。
【図11B】図11A~11Cはヒト前立腺癌サンプルVP234の、生来のウイルスタンパク質ストリップ(A)、組換えp15E-CKSストリップ(B)および組換えp70-CKSストリップによるウェスタンブロット分析を図解する。サンプル番号は、1:VP234、2:正常なヒト血漿#85(陰性対照)、3:XMRVを持つ霊長類R11-10PIの第93日採血、4:ヤギ抗FriendMuLVポリ

クローナル抗体(陽性対照)である。
【図11C】図11A~11Cはヒト前立腺癌サンプルVP234の、生来のウイルスタンパク質ストリップ(A)、組換えp15E-CKSストリップ(B)および組換えp70-CKSストリップによるウェスタンブロット分析を図解する。サンプル番号は、1:VP234、2:正常なヒト血漿#85(陰性対照)、3:XMRVを持つ霊長類R11-10PIの第93日採血、4:ヤギ抗FriendMuLVポリ

40

【図12】XMRVに対する抗体を検出するために、組換えタンパク質を用いる間接的な抗ヒトに基づくARCHITECT(登録商標)CMIAフォーマットの模式図を示す。

【図13】組換えタンパク質(p15E、p70およびp30)による、間接的な抗ヒトに基づくARCHITECT(登録商標)CMIAフォーマットを用いる、アカゲザルにおけるXMRV特異的抗体の検出を示す。S/N=サンプルのシグナル/第0日サンプルのシグナル。

【図14】XMRV-p15Eタンパク質に対する抗体を検出するために設計した、直接二重p15E抗原サンドイッチに基づくARCHITECT(登録商標)CMIAフォーマットの模式図を示す。

【図15】抗ヒトアッセイフォーマットおよび二重抗原サンドイッチアッセイフォーマットの両方に基づくCMIAを用いる、アカゲザルにおけるXMRV-p15E特異的抗体の検出を示す

50

。

【図16】97人の血液ドナーサンプルについての抗ヒトおよびサンドイッチp15Eアッセイフォーマットに基づくCMIAの間のシグナル分布パターンを比較した図である。

【図17】XMRV陽性霊長類採血および血液ドナーについてのp15Eアッセイフォーマットに基づくCMIAの、抗ヒトとサンドイッチとの間のアッセイ性能（感受性および特異性）を比較した図である。

【図18】8つのp15Eマッピングペプチドの位置を図解する。p15Eタンパク質配列はGenbank、受託番号EF185282に基づく。

【図19】p15E合成ペプチドの、XMRV感染した霊長類RIL-10およびRYh-10由来の血漿サンプル中に存在する抗体との結合を示す。結合は、シグナルがカットオフ値0.06を超えたときに有意と考えた。

【図20】哺乳動物発現のための、生来のXMRV env gp70遺伝子を運ぶプラスミドクロロンの構築を示す。

【図21】哺乳動物発現のための、生来のXMRV env gag p30遺伝子を運ぶプラスミドクロロンの構築を示す。

【図22】哺乳動物で発現されたXMRV gp70タンパク質に基づくウェスタンブロット（WB）による、アカゲザルRIL-10のIgG抗体応答の検出を示す。WBストリップ上の血漿サンプルを、0～132 PI日として掲げた。ヤギ抗Friend MuLV（a-F）を陽性対照として用いた。

【図23】直接gp70およびp15E ARCHITECT（登録商標）CMIAを用いて、アカゲザルRIL-10における抗gp70と抗p15E応答を比較した。連続採血を正常ヒト血漿で1：10に希釈した。

【図24】gp70 ARCHITECT（登録商標）CMIAにおける、抗Hisモノクローナル抗体（Mab）の検出を示す。抗His Mabを正常なヒト血漿で希釈して、100、10、1、および0ng/mlの濃度とした。1000 RLUのカットオフ値（バックグラウンド+17標準偏差）を用いる線形回帰分析により、検出限界を6.3ng/mlと見積もった。

【図25】正常な血液ドナーとXMRV WB陽性の霊長類採血の分布を示し、これは直接gp70サンドイッチCMIAアッセイで試験したものである。

【図26】ヤギ抗MuLV pAbおよび抗XMRVアカゲザルRIL-10血漿ならびにマウス抗His Mabの抗体反応性を示し、これは哺乳動物の発現したXMRV p30タンパク質に基づくWBによるものである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明はXMRV感染を検出するためのマーカー（例えば、XMRVまたはXMRV核酸による感染によって誘発される抗XMRV特異的抗体）の同定、ならびにかかるマーカーを同定する方法に関する。さらに、本発明は前立腺癌細胞株、そのウイルス粒子による霊長類の実験感染およびXMRV感染霊長類のセロコンバージョンパターンのモニタリングから誘導されるXMRVビリオンの特徴付けを記載する。さらに本発明は、全ての霊長類がエンベロープ（env）およびコア（gag）タンパク質に対する抗体を発現することを示し、霊長類におけるXMRV感染とセロコンバージョンの直接的確証を与える。さらに具体的に、env p15E、env gp70およびgag p30タンパク質に対する抗体は非常に優性かつ持続的な応答を示すことを同定した；従って、これらのタンパク質に対する抗体はXMRV感染を示す感受性血清学的マーカーとして利用することができる。他のXMRVタンパク質（すなわち、gag p15、gag p12およびgag p10）に対して誘発される抗体応答は、抗env p15E、env p70およびgag p30抗体応答と比較して弱かつ持続期間は短いが、これらのウイルスタンパク質に対する抗体もXMRV感染を検出および/または確認するための追加の血清学的マーカーとしてなお効用を有しうる。

【0039】

さらに、本発明は、XMRVの検出および治療に利用することができる、単離または精製された核酸配列または分子（およびそれらがコードするタンパク質）に関する。これらならびに他の利用を以下に詳しく記載する。

【0040】

10

20

30

40

50

核酸配列およびコードされるタンパク質

ある特定の実施形態において、本発明は単離したXMRV抗原およびこれらの抗原をコードする核酸に関する。かかる抗原には、限定されるものでないが、次のXMRVタンパク質：gp70、p15E、p30、p15、p12、およびp10、ならびにそれらの断片が含まれる。

【0041】

配列番号81は、「p15E」として特定されるXMRV env p15E変異体のアミノ酸配列をコードする遺伝子（すなわち、単離された核酸分子）のヌクレオチド配列を表す。p15Eアミノ酸配列は、p15E配列が野生型XMRV env p15E配列の疎水性推定膜貫通ドメインを欠失することを除くと、野生型XMRV p15Eアミノ酸配列と同一である。配列番号82はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。配列番号24はp15E-PL融合タンパク質のアミノ酸配列（例えば、PLを用いる融合タンパク質の作製におけるPLの使用については米国特許第5,322,769号、第5,312,737号および第5,854,001号を参照）をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を説明し、そして配列番号25はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。配列番号28はp15E-CKS融合タンパク質（配列番号86 = CKSのヌクレオチド配列；配列番号87 = CKSのアミノ酸配列）をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号29はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。さらに配列番号83、84および85は、p15Eタンパク質内の免疫優性エピトープのアミノ酸配列を表す。

10

【0042】

配列番号38はenv gp70のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号39はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。配列番号42はgp70-CKS融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号43はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。配列番号49はgp70-PET融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号50はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。

20

【0043】

配列番号72はp30のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表す。配列番号73はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。配列番号66はp30-CKS融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号67はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。

30

【0044】

配列番号51はp15のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表す。配列番号52はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。配列番号55はp15-CKS融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号56はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。

【0045】

配列番号62はp12-PET融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号63はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。配列番号59はp12-CKS融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号60はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。

40

【0046】

配列番号79はp10-PET融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号80はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。配列番号76はp10-CKS融合タンパク質のアミノ酸配列をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を表し、そして配列番号77はコードされた精製タンパク質のアミノ酸配列を表す。

【0047】

本発明はまた、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号38、配列番号42、配列番号49、配列番号51、配列番号55、配列番号59、配列番号62、配列番号66、配列番号76、配列番号79または配列番号81のヌクレオチド配列と少なくとも約70%同一、好ましくは少なくとも約80%同一、または少なくとも約90%同一、そしてより好ましくは

50

少なくとも約95%同一、または少なくとも約97%同一、または少なくとも約99%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸配列または分子を包含することに注意すべきである。以上注意したように、かかる配列は、例えば、本明細書に記載した目的のポリペプチドの産生に用いることができる；しかしながら、これらはまた、分子に基づくアッセイの安全および効力を保証するために使われる対照または標準物質にプローブまたはプライマーとして利用することができる。（本明細書に記載したヌクレオチド配列の断片ならびに上記の同一性を有する配列の断片も本発明の範囲内に含まれる。）これらの配列の相補配列ならびにこれらの相補配列の断片も本発明に包含される。（%同一性の用語においては、70~100の範囲内の全ての整数も本発明の範囲内に含まれる（すなわち、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および100%））。

10

【0048】

本発明はまた、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号33、配列番号39、配列番号43、配列番号50、配列番号52、配列番号56、配列番号60、配列番号63、配列番号67、配列番号73、配列番号77、配列番号80、配列番号82、配列番号102または配列番号109のアミノ酸配列と少なくとも約70%同一、好ましくは少なくとも約80%同一、または少なくとも約90%同一、そしてより好ましくは少なくとも約95%同一、または少なくとも約97%同一、または少なくとも約99%同一であるアミノ酸配列を含むタンパク質またはポリペプチドを包含することに注意すべきである。（再び、%同一性の用語においては、70~100の範囲内の全ての整数も本発明の範囲内に含まれる（すなわち、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および100%））。

20

【0049】

さらに本発明は本明細書に記載した全長ポリペプチドの「断片またはペプチド」を包含する。配列番号83、配列番号84、および配列番号85などのペプチドは、例えば、特異的免疫原性または結合特性を有しうるポリペプチドの部分を表す。断片は、例えば、長さが3~10アミノ酸、長さが10~20アミノ酸、長さが20~40アミノ酸、長さが40~80アミノ酸、長さが80~160アミノ酸またはさらに長いものであってもよい。本明細書に記載した断片と少なくとも70%アミノ酸同一、好ましくは少なくとも80%アミノ酸同一、または少なくとも90%同一、そしてより好ましくは少なくとも約95%同一、または少なくとも約97%同一、または少なくとも約99%同一であるアミノ酸配列も本発明の範囲内に含まれる。（さらに、上記の70~100の範囲の整数%同一性もまた、本発明の範囲内に入ると考えられる。）

30

「エピトープ」はポリペプチドの抗原決定要因である。1つのエピトープは、そのエピトープにとってユニークである空間コンフォーメーション中に少なくとも3アミノ酸を含む。一般に、1つのエピトープは少なくともかかる5アミノ酸、そして通常、少なくとも8~10アミノ酸から構成される。

【0050】

上記の%同一性を有するヌクレオチドまたはアミノ酸配列（またはヌクレオチド配列については相補配列）は、XMRV以外の1以上の供給源から誘導されたものであってもよい。かかる配列は、例えば、非XMRVウイルス、哺乳動物細胞株、昆虫、寄生虫、細菌または真菌から誘導することができる。

40

【0051】

さらに、上記の通り、本発明はまた、本発明の核酸配列の断片および誘導体ならびに本発明のアミノ酸配列の断片および部分を包含する。上記の非XMRVから誘導された、および上記の相補性または同一性を有する対応する配列も、適宜、本発明の範囲内に入ると考えられる。上記配列の機能的等価体（すなわち、コードされたタンパク質と同じ結合アフィニティ、エピトープなどを有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列）も本発明に

50

包含される。

【0052】

本発明において「相補性」は、2つのDNAセグメント間の関連性の程度として定義される。これは、1つのDNAセグメントのセンス鎖が他のDNAセグメントのアンチセンス鎖と、二重らせんを形成するのに適当な条件のもとで、ハイブリダイズする能力を測定することにより決定される。二重らせんにおいて、アデニンが1つの鎖に現れると、チミンが他の鎖に現れる。同様に、グアニンが1つの鎖に見出されると、シトシンが他の鎖に見出される。2つのDNAセグメントのヌクレオチド配列の間の関連性が大きいほど、2つのDNAセグメント間のハイブリッド二重鎖を形成する能力が大きい。

【0053】

用語「同一性」は、ある特定の比較ウィンドウまたはセグメントにわたるヌクレオチドとヌクレオチド毎の比較によるに基づく2配列の関連性を意味する。

【0054】

従って、同一性は、2つのDNAセグメント（または2つのアミノ酸配列）の同じ鎖（センスまたはアンチセンスいずれかの）酷似性、対応性または等価性の程度として定義される。「パーセント同一性」は、ある特定領域にわたって2つの最適にアラインされた配列を比較し、同一の塩基もしくはアミノ酸が両方の配列に生じる位置の数を確認してマッチした位置の数を得て、かかる位置数を比較したセグメント中の全位置数により除しかつその結果に100を乗じることによって計算される。配列の最適なアラインは、Smith & Waterman, Appl. Math. 2:482 (1981)のアルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)のアルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:2444 (1988)の方法により、および関連アルゴリズムを実行するコンピュータプログラム（例えば、Clustal Macaw Pileup (<http://cmgm.stanford.edu/biochem218/11Multiple.pdf>); Higgins et al., CABIOS. 5L151-153 (1989)）、FASTDB (Intelligenetics)、BLAST (National Center for Biomedical Information; Altschul et al., Nucleic Acids Research 25:3389-3402 (1997)）、PILEUP (Genetics Computer Group, Madison, WI) またはGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI) により行うことができる。（米国特許第5,912,120号を参照されたい。）

「2つのアミノ酸配列間の同一性」は、両方の配列における正確に同様なもしくは不変のアミノ酸残基の存在として定義される（核酸配列の間の同一性についての上記定義を参照されたい）。「相補性」および「同一性」の定義は当業者に周知である。

【0055】

「によりコードされる」は、ポリペプチド配列をコードする核酸配列に言及する表現であり、このポリペプチド配列又はその一部が、その核酸配列によりコードされるポリペプチド由来の少なくとも3アミノ酸、より好ましくは少なくとも8アミノ酸およびさらにより好ましくは少なくとも15アミノ酸のアミノ酸配列を含有することを意味する。

【0056】

本発明はまた、配列番号24、配列番号28または配列番号81により表されるタンパク質と類似または等価である機能的活性を有するタンパク質または抗原をコードする単離核酸配列、および中程度のストリンジェントな条件のもとで、上記ヌクレオチド配列を含むかまたは相補的であるヌクレオチド配列を有する核酸分子とハイブリダイズ可能である単離核酸配列を包含する。核酸分子は、一本鎖の核酸分子が他の核酸分子と適当な温度およびイオン強度条件のもとでアニーリングできる場合、他の核酸分子と「ハイブリダイズ可能」である (Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。温度およびイオン強度の条件がハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。「ハイブリダイゼーション」は2つの核酸が相補配列を含有することを必要とする。しかし、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに応じて、塩基間のミスマッチが起こりうる。核酸をハイブリダイズするための適当なストリンジェンシーは核酸の長さ

と相補性の程度に依存する。かかる変数を当業者は周知している。さらに具体的には、ヌクレオチド配列間の類似性、同一性または相同性の程度が大きいほど、これらの配列を有する核酸のハイブリッドに対する T_m の値が高くなる。長さが100ヌクレオチドより大きいハイブリッドについて、 T_m の計算式が誘導されている（前掲のSambrook et al, (1989)参照）。もっと短い核酸のハイブリダイゼーションについては、ミスマッチの位置がより重要であり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（前掲のSambrook et al, (1989)を参照されたい）。

【0057】

本明細書に記載の「単離核酸断片または配列」は、合成、非天然または改変ヌクレオチド塩基を任意に含有する一本鎖または二本鎖であるRNAまたはDNAのポリマーである。DNAポリマーの形態の単離核酸断片は、cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAの1以上のセグメントから構成されうる。（具体的なポリヌクレオチドの断片はおよそ、少なくとも約6ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約8ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約10ヌクレオチド、そしてさらにより好ましくは少なくとも約15ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも約25ヌクレオチドの近接配列を含み、かつ参照配列の全長まで、全長マイナス1ヌクレオチドまで、または50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、500ヌクレオチド、1000ヌクレオチド、2000ヌクレオチド、3000ヌクレオチド、4000ヌクレオチド、5000ヌクレオチド、6000ヌクレオチド、7000ヌクレオチド、または8000ヌクレオチドであって、具体的なヌクレオチド配列の領域と同一または相補的であるポリヌクレオチド配列を意味する。）

ヌクレオチド（通常、その5'-リン酸型で見出される）はその1文字表記によって次の通り呼ばれる：アデニル酸またはデオキシアデニル酸に対して「A」（それぞれ、RNAまたはDNAに対して）、シチジル酸またはデオキシシチジル酸に対して「C」、グアニル酸またはデオキシグアニル酸に対して「G」、ウリジル酸に対して「U」、デオキシウリジル酸に対して「T」、プリン（AまたはG）に対して「R」、ピリミジン（CまたはT）に対して「Y」、GまたはTに対して「K」、AまたはCまたはTに対して「H」、イノシンに対して、および任意のヌクレオチドに対して「N」。

【0058】

用語「機能的に等価である断片またはサブ断片」および「機能的に等価な断片またはサブ断片」は本明細書において互換的に用いられる。これらの用語は、その断片またはサブ断片が活性酵素をコードするしないに関わらず、遺伝子発現を改変するかまたはある特定の表現型を生じる能力が保持されている単離核酸断片の部分またはサブ配列を意味する。例えば、その断片またはサブ断片を、形質転換した植物で所望の表現型を生じるキメラ構築物の設計に用いることができる。核酸断片またはそのサブ断片を、それが活性タンパク質をコードするかどうかに関わらず、プロモーター配列に対して適当な配向で連結することにより、共抑制またはアンチセンスに使用するためのキメラ構築物を設計することができる。

【0059】

用語「相同性」、「相同的」、「実質的に類似した」および「実質的に対応する」は本明細書において互換的に使用される。これらの用語は、1以上のヌクレオチド塩基の変化が、遺伝子発現に介在するまたはある特定の表現型を生じる核酸断片の能力に影響を与えない核酸断片を意味する。これらの用語はまた、最初の、未改変の断片と比較して得られる核酸断片の機能的特性を実質的に変えない本発明の核酸断片の改変、例えば、1以上のヌクレオチドの欠失または挿入を意味する。それ故に、当業者は認めるように、本発明は本明細書に記載した具体的な例示の配列より多くのものを包含すると理解される。

【0060】

「遺伝子」は、コード配列に先行する（5'非コード配列）およびその後の（3'非コード配列）調節配列を含む、特定のタンパク質を発現する核酸断片を意味する。

【0061】

「生来の遺伝子」は、それ自身の調節配列とともに天然に見出される遺伝子を意味する

10

20

30

40

50

。一方、「キメラ構築物」は、天然において通常は一緒に見られない核酸断片の組み合わせを意味する。従って、キメラ構築物は、異なる源由来の調節配列およびコード配列または、同じ源由来であるが、天然で通常見られるものとは異なる方式で配置された調節配列およびコード配列を含みうる。（「単離された」という用語は、配列がその天然の環境から取り出されたことを意味する。）

「外来」遺伝子は、宿主生物において通常は見られない遺伝子を意味するが、これは宿主生物に遺伝子導入により導入される。外来遺伝子は、非生来の生物またはキメラ構築物中に挿入された生来の遺伝子を含みうる。「導入遺伝子」は、形質転換手順によりゲノムに導入されている遺伝子である。

【0062】

本明細書で使用する「プローブ」または「プライマー」は、長さが少なくとも8ヌクレオチド、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、または少なくとも25ヌクレオチドであり、かつ標的領域ポリヌクレオチドの配列と、プローブまたはプライマー中の少なくとも1つの配列の相補性によって標的配列とハイブリッド構造を形成するポリヌクレオチドである。プローブのポリヌクレオチド領域はDNAおよび/またはRNAおよび/または合成ヌクレオチド類似体から構成されうる。好ましくは、プローブは、ポリメラーゼ連鎖反応中に標的配列のプライマーとして用いる配列と相補的である配列を含有しない。代替の実施形態、すなわち、限定されるものでないが、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、本明細書で使用する用語「プローブ」または「FISHプローブ」は、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、少なくとも1000ヌクレオチド、少なくとも2000ヌクレオチド、少なくとも3000ヌクレオチド、少なくとも4000ヌクレオチド、少なくとも5000ヌクレオチド、少なくとも6000ヌクレオチド、少なくとも7000ヌクレオチド、または少なくとも8000ヌクレオチドを意味する。

【0063】

「コード配列」は、特定のアミノ酸配列をコードするDNA配列を意味する。「調節配列」は、コード配列の上流（5'非コード配列）、コード配列内、またはその下流（3'非コード配列）に位置するヌクレオチド配列であって、関連するコード配列の転写、RNAプロセッシングまたは安定性または翻訳に影響を与える前記ヌクレオチド配列を意味する。調節配列には、限定されるものでないが、プロモーター、翻訳リーダー配列およびポリアダニル化認識配列が含まれうる。

【0064】

「プロモーター」（または「調節配列」）は、コード配列または機能的RNAの発現を調節することができるDNA配列を意味する。プロモーター配列は、例えば、近位およびより遠位の上流エレメントからなり、後者のエレメントはしばしばエンハンサーと呼ばれる。従って、「エンハンサー」は、プロモーター活性を刺激することができるDNA配列であって、プロモーターの先天的エレメントまたはプロモーターのレベルもしくは組織特異性を促進するために挿入された異種エレメントであってもよい。調節配列（例えば、プロモーター）はまた、遺伝子の転写部分内、および/または転写配列の下流に位置しうる。プロモーターはその全体が生来の遺伝子由来であってもよく、または、天然で見られる色々なプロモーター由来の色々なエレメントからなってもよく、または合成DNAセグメントすら含んでもよい。当業者は理解するが、異なるプロモーターは、異なる組織または細胞型において、または発生の異なる段階において、または異なる環境条件に応じて、遺伝子の発現を指揮しうる。ほとんどの宿主細胞型において、ほとんどの場合、遺伝子の発現を引き起こすプロモーターは、一般的に「構成的プロモーター」と呼ばれる。植物細胞において有用な様々なタイプの新しいプロモーターが絶えず発見されている；数多くの例を、Okamoto and Goldbergの編集による "Biochemistry of Plants 15:1-82 (1989)"に見出すことができる。さらに、殆どの場合、調節配列の正確な境界は完全に規定されていないので、DNA断片のいくつかのパリエーションが同一のプロモーター活性を有しうるということが認識されている。

10

20

30

40

50

【0065】

「イントロン」は遺伝子中の介在配列であって、タンパク質配列の部分をコードしない。従って、かかる配列はRNAに転写されるがその後に切り出され、翻訳はされない。この用語はまた、切り出されたRNA配列に対しても使用される。「エクソン」は転写され、その遺伝子由来の成熟メッセンジャーRNAに見出される遺伝子配列の一部であるが、必ずしも最終遺伝子産物をコードする配列の一部ではない。

【0066】

「翻訳リーダー配列」は、遺伝子のプロモーター配列とコード配列との間に位置するDNA配列を意味する。翻訳リーダー配列は、完全にプロセシングされたmRNAの、翻訳開始配列の上流に存在する。翻訳リーダー配列は、一次転写物のmRNAへのプロセシング、mRNA安定性または翻訳効率に影響しうる。翻訳リーダー配列の例は記載されている (Turner, R. and Foster, G. D. (1995) *Molecular Biotechnology* 3:225)。

10

【0067】

「3'非コード配列」は、コード配列の下流に位置するDNA配列を意味し、これには、ポリアデニル化認識配列およびmRNAプロセシングまたは遺伝子発現に影響を与えうる調節シグナルをコードする他の配列が含まれる。ポリアデニル化シグナルは、通常、ポリアデニル酸領域のmRNA前駆体3'末端への付加に影響を与えることを特徴とする。色々な3'非コード配列の使用が、Ingelbrecht et al, (1989) *Plant Cell* 1:671-680に例示されている。

【0068】

「RNA転写物」とは、RNAポリメラーゼにより触媒されるDNA配列の転写により得られる産物を意味する。RNA転写物がDNA配列の完全な相補的コピーである場合、これは一次転写物と呼ばれ、あるいは、一次転写物の転写後プロセシング由来のRNA配列である場合、これは成熟RNAと呼ばれる。「メッセンジャーRNA (mRNA)」は、イントロンが無く、細胞がタンパク質へ翻訳することができるRNAを意味する。「cDNA」は、mRNAテンプレートに相補的であり、酵素逆転写酵素を用いてこれから合成されるDNAを意味する。cDNAは、1本鎖であるか、またはDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を用いて2本鎖形に変換されうる。「センス」RNAは、mRNAを含み、細胞内またはin vitroでタンパク質に翻訳することができるRNA転写物を意味する。「アンチセンスRNA」は、標的の一次転写物またはmRNAの全てもしくは一部に相補的であり、標的遺伝子の発現をブロックするRNA転写物を意味する (米国特許第5,107,065号)。アンチセンスRNAの相補性は、特定の遺伝子転写物のいずれかの部分との (すなわち、5'非コード配列、3'非コード配列、イントロンまたはコード配列における) 相補性でありうる。「機能的RNA」は、アンチセンスRNA、リボザイムRNAまたは、翻訳されないかも知れないが、細胞プロセスに影響を与えるその他のRNAを意味する。用語「相補配列」および「逆相補配列」は、mRNA転写物に関して本明細書中で互換的に使用され、メッセージのアンチセンスRNAを定義することを意味する。

20

30

【0069】

用語「内因性RNA」は、天然であれ非天然 (すなわち、組み換え手段、突然変異誘発などにより導入されたもの) であれ、本発明の組み換え構築物により形質転換される前に、宿主のゲノム中に存在するいずれかの核酸配列によりコードされたいずれかのRNAを意味する。

40

【0070】

用語「非天然」は、人工のものであり、天然で通常見られるものと一致しないことを意味する

用語「作動しうる形で連結された」は、2つの部分の連合を意味する。例えば、限定されるものでないが、2以上の核酸配列が1つの核酸断片上で連合し、1つの核酸配列が他の核酸配列によって調節されることを意味する。限定されるものでないが、かかる一例として、プロモーターが作動しうる形でコード配列と連結されている場合、そのプロモーターはそのコード配列の発現を調節することができる (すなわち、コード配列はプロモーターの転写制御下にある)。コード配列を作動しうる形で調節配列に、センスまたはアンチセ

50

ンス方向で連結することができる。他の限定されない例においては、本発明の相補的RNA領域を、作動しうる形で、直接または間接に、標的mRNAに対して5'にまたは標的mRNAに対して3'にまたは標的mRNA内に連結してもよく、または第一の相補的領域が標的mRNAに対して5'にあり、その相補配列が3'にある。代替りの作動しうる形の連結の例には、限定されるものでないが、共有結合および非共有結合による連合、例えば、ポリペプチドのビオチン化（共有結合連結）および2つの相補的核酸のハイブリダイゼーション（非共有結合連結）が含まれる。

【0071】

本明細書で使用する用語「発現」は機能的最終産物の産生を意味する。遺伝子の発現は、遺伝子の転写とmRNAの前駆体または成熟タンパク質への翻訳に関わる。「アンチセンス阻害」は標的タンパク質の発現を抑制することができるアンチセンスRNA転写物の産生を意味する。「共抑制」は同一または実質的に類似の外來または内因性遺伝子の発現を抑制することができるセンスRNA転写物の産生を意味する（米国特許第5,231,020号）。

10

【0072】

「成熟」タンパク質は、翻訳後プロセッシングをしたポリペプチド、すなわち、一次翻訳産物において存在するプレまたはプロペプチドが除去されたものを意味する。「前駆体」タンパク質は、mRNAの翻訳の一次産物、すなわち、プレおよびプロペプチドがまだ存在するものを意味する。プレおよびプロペプチドは、限定されるものでないが、細胞内局在シグナルでありうる。

【0073】

「安定な形質転換」は核酸断片の、宿主生物のゲノム中への導入を意味し、遺伝的に安定な遺伝形質をもたらす。対照的に、「一過的形質転換」は核酸断片の、宿主生物の核またはDNA含有細胞小器官中への導入を意味し、組込みまたは安定な遺伝形質を生じない遺伝子発現をもたらす。形質転換した核酸断片を含有する宿主生物は「トランスジェニック」生物と呼ばれる。本明細書で使用する用語「形質転換」は安定な形質転換および一過的形質転換の両方を意味する。

20

【0074】

本発明で用いる標準の組換えDNAおよび分子クローニング技法は当技術分野で周知であり、Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, 1989（以後「Sambrook」と呼ぶ）にさらに詳しく記載されている。

30

【0075】

用語「組換え体」は、例えば、化学合成による、または遺伝子操作技術による核酸の単離セグメントの操作による、2つのさもなければ分離された配列セグメントの人工的組み合わせを意味する。

【0076】

「PCR」または「ポリメラーゼ連鎖反応」は一連の繰り返しサイクルからなる、大量の特定のDNAセグメントを合成する技法である（Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT）。典型的には、二本鎖のDNAを熱変性し、標的セグメントの3'境界と相補的な2つのプライマーを低温でアニーリングし次いで中間温度にて伸長する。これらの3つの連続ステップの1セットを1サイクルと呼ぶ。

40

【0077】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、短時間に、テンプレートを繰り返し複製することによりDNAを数百万倍に増幅する強力な技法である。（Mullis et al, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273 (1986); Erlich et al, *European Patent Application No. 50,424*; 欧州特許出願第84,796号; 欧州特許出願第258,017号; 欧州特許出願第237,362号; 欧州特許出願第201,184号; 米国特許第4,683,202号; 米国特許第4,582,788号; 米国特許第4,683,194号）。このプロセスは、特定の*in vitro*で合成したオリゴヌクレオチドのセットをDNA合成のプライマーに利用する。プライマーの設計は分析しようとするDNAの配列に応じるものである。この技法は、テンプレートを高温で融解するステップ、プラ

50

イマーをテンプレート内の相補配列とアニーリングするステップ、および、次いでテンプレートをDNAポリメラーゼを用いて複製するステップから成るものである、多数（通常 20～50）のサイクルを通して行われる。

【0078】

PCR反応の産物をアガロースゲルでの分離、次いで臭化エチジウム染色および紫外透過光を用いる可視化により分析する。あるいは、放射性dNTPをPCRに加えて標識を産物中に組込んでよい。この場合、PCR産物をゲルのX線フィルムへの曝露により可視化する。放射標識PCR産物のさらなる利点は、個々の増幅産物を数値化できることにある。

【0079】

用語「組換え構築物」と「組換え発現構築物」は本明細書で互換的に使用される。これらの用語は、当業者に周知の標準技法を用いて、細胞のゲノム中に挿入できる遺伝物質の機能的ユニットを意味する。かかる構築物はそれ自体でまたはベクターと一緒に用いることができる。もしベクターを用いるのであれば、ベクターの選択は宿主植物を形質転換するために用いる方法に依存する。例えば、プラスミドを使用することができる。当業者は、首尾よく形質転換し、選択し、本発明の単離核酸断片の何れかを含有する宿主細胞を増殖させるために、ベクターに存在しなければならない遺伝的エレメントを十分認識している。当業者はまた、異なる独立の形質転換事象の結果、異なるレベル及びパターンの発現が得られること（Jones et al, (1985) EMBO J. 4:2411-2418 ; De Almeida et al, (1989) Mol. Gen. Genetics 218:78-86）および、従って、所望の発現レベル及びパターンを示す株を得るために複数の事象をスクリーニングしなければならないことも認識するであろう。かかるスクリーニングは、DNAのサザン分析、mRNA発現のノーザン分析、タンパク質発現のウエスタン分析又は表現型分析により行うことができる。

【0080】

本明細書で使用する用語「血清学的マーカー」は、XMRVでの感染により誘発されるXMRVに対して特異的な抗体（すなわち、XMRV特異的抗体）として定義される。

【0081】

本明細書で使用する用語「ペプチド」および「ペプチド配列」はアミノ酸残基のポリマーを意味する。ある特定の実施形態において、本発明のペプチド配列は1～30、1～50、1～100、1～150、または1～300アミノ酸残基を含みうる。ある特定の実施形態において、本発明のペプチド配列はXMRVまたは非XMRV配列を含むものである。例えば、限定されるものでないが、本発明のペプチド配列は本明細書で同定したXMRVペプチド配列に対して、10%、または20%、または30%、または40%、または50%、または60%、または70%、または80%、または90%、または95%、または96%、または97%、または98%、または99%までの同一性を含んでもよい。

【0082】

ある特定の実施形態において、本発明はまた、本明細書で同定したXMRVペプチド配列と「実質的に類似」しているペプチド配列を包含する。かかるペプチド配列には、限定されるものでないが、参照ペプチド配列のある特定の構造および機能的特性を保持するが、なお1以上のアミノ酸位置において参照ペプチド配列と異なる（すなわち、アミノ酸置換により）ペプチド配列が含まれる。

【0083】

参照ペプチド配列のアミノ酸残基を置換しかつ参照配列の構造および/または活性を保持するペプチド配列を選択することにより、変異体ペプチド配列を調製することができる。例えば、参照ペプチド配列のアミノ酸残基を他の残基で体系的に置換し、置換したペプチド配列を次いで標準アッセイで試験して、参照ペプチド配列の活性を遂行するペプチド配列の能力に与えるかかる置換の効果を評価することができる。

【0084】

いくつかの実施形態においては、機能的活性を保持するために、保存的アミノ酸置換が行われる。本明細書で使用する表現「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基を類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換える置換を含むことを意図する。当技術分野では、類似

10

20

30

40

50

の側鎖を有するアミノ酸残基のグループは次の通り定義されている：塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）；酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）；無電荷の極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）；非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）； β -分枝側鎖の側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）；および芳香族性側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。他の一般に好ましい置換は、アミノ酸残基の、アラニンまたはグリシンなどの小側鎖を有する他のアミノ酸残基による置換えに関わる。アミノ酸置換したペプチド配列は、自動化学合成などの標準技法により調製することができる。

【0085】

タンパク質の産生

いったん目的のタンパク質をコードする遺伝子が単離されると、これを次いでベクターまたは構築物を用いて原核生物または真核生物の宿主細胞中に導入し、宿主細胞に目的のタンパク質を発現させることができる。ベクター、例えば、バクテリオファージ、コスミドまたはプラスミドは、酵素をコードする核酸配列、宿主細胞において機能性がありかつ核酸配列がコードするタンパク質の発現を誘発できるいずれかの調節配列（例えば、プロモーター）を含みうる。調節配列（例えば、プロモーター）はヌクレオチド配列と作動しうる形で連合するかまたは作動しうる形で連結されている。（調節配列（例えば、プロモーター）がコード配列と「作動しうる形で連結されている」というのは、調節配列がコード配列の転写または発現に影響を与えることを意味する。）好適なプロモーターには、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸塩デヒドロゲナーゼ、ホスホグルコイソメラーゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、酸性ホスファターゼ、T7、TPI、ラクターゼ、メタロチオネイン、サイトメガロウイルス極初期、乳清酸性タンパク質、グルコアミラーゼをコードする遺伝子由来のもの、ガラクトースの存在で活性化されるプロモーター、例えば、GAL1およびGAL10、ならびに原核生物および真核生物発現系に関わるいずれか他のプロモーターが含まれる。さらに他のタンパク質をコードする核酸配列ならびに他の非プロモーター調節配列、例えば、ポリアデニル化シグナル（例えば、SV-40T-抗原、卵白アルブミンまたはウシ成長ホルモンのポリAシグナル）もベクター内に含まれうる。構築物中に存在する配列の選択は、所望の発現産物ならびに宿主細胞の性質に依存する。

【0086】

上記の通り、いったんベクターが構築されると、これを次いで選択した宿主細胞中に、当業者に公知の方法、例えば、トランスフェクション、形質転換およびエレクトロポレーション（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Vol. 1-3, ed. Sambrook et al, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)を参照）により導入することができる。この宿主細胞を次いで、所望のタンパク質の発現を可能にする好適な条件のもとで培養し、前記タンパク質を次いで回収しかつ精製する。

【0087】

好適な原核生物の宿主細胞の例には、例えば、細菌（bacteria）、例えば、大腸菌（Escherichia coli）、枯草菌（Bacillus subtilis）；放線菌類（Actinomycetes）、例えば、Streptomyces coelicolor、Streptomyces lividans；ならびにラン藻類（cyanobacteria）、例えば、Spirulina spp.（すなわち、青緑色の藻類）が含まれる。好適な真核生物の宿主細胞の例には、例えば、哺乳動物細胞、植物細胞、酵母細胞、例えば、Saccharomyces spp.、Lipomyces spp.、Candida spp.、例えば、Yarrowia（Candida）spp.、Kluyveromyces spp.、Pichia spp.、Trichoderma spp. または Hansenula spp.、または真菌細胞、例えば、糸状真菌細胞、例えば、Aspergillus、NeurosporaおよびPenicilliumが含まれる。好ましくは、Saccharomyces cerevisiae（製パン用イースト）細胞を使用する。

【0088】

宿主細胞での発現は一過的または安定的に実施することができる。一過性発現は、宿主

10

20

30

40

50

細胞中で機能的な発現シグナルを含有する導入構築物から生じうるが、この構築物は宿主細胞において複製しないしかつ稀にしか組込まれないかまたは宿主細胞が増殖しない。一過性発現はまた、その遺伝子に作動しうる形で連結された調節可能なプロモーターの活性を誘発することにより実施することができるが、かかる誘発系は発現の基礎レベルは低いことが多い。安定な発現は、宿主ゲノムに組み込むかまたは宿主細胞中で自律複製する構築物を導入することによって達成することができる。目的の遺伝子の安定的発現は、発現構築物上に位置するかまたは発現構築物にトランスフェクトされた選択マーカースを使用し、その後、そのマーカースを発現する細胞を選ぶことによって選択することができる。組み込みにより安定な発現を得る場合、構築物の組み込み部位は宿主ゲノム内で無作為に生じうるかまたは、宿主遺伝子座との組換えを標的化するのに十分な宿主ゲノムとの相同性領域を含有する構築物を使用することにより標的化しうる。構築物を内因性遺伝子座に標的化する場合、転写および翻訳領域の全部または一部を内因性遺伝子座により与えることができる。

10

20

30

40

50

【0089】

上記核酸配列の1つまたは両方によりコードされたタンパク質を発現する目的で、トランスジェニック哺乳動物を用いることもできる。より具体的には、いったん上記構築物が作製されると、その構築物を胚の前核中に挿入することができる。この胚を次いで受容者の雌に移植することができる。あるいは、核移植法も利用できる (Schnieke et al., Science 278:2130-2133 (1997))。次いで妊娠および誕生の起こるのが認められる (例えば、米国特許第5,750,176号および同第5,700,671号参照)、そして子孫の乳液、組織または他の体液サンプルは、目的のタンパク質を含有するに違いない。宿主として使用する哺乳動物は、例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマおよびウシからなる群から選択することができる。しかし、哺乳動物が目的のタンパク質をコードするDNAをそのゲノム中に組み込む能力を有する限り、いずれの哺乳動物を使用してもよい。

【0090】

以上からわかるように、本発明はまた、1以上の上記タンパク質を産生する方法であって、1)タンパク質をコードする遺伝子の所望の核酸配列 (例えば、配列番号24および/または配列番号28)を単離するステップ; 2)前記核酸配列を含むベクターを構築するステップ; および3)前記ベクターを宿主細胞中に十分な時間および条件で導入し、前記タンパク質を産生するステップを含むものである前記方法を包含する。

【0091】

遺伝子およびそれがコードするタンパク質の用途

上記の通り、単離核酸配列 (または遺伝子) およびそれがコードする対応タンパク質 (または精製ポリペプチド) は多くの有利な用途を有する。例えば、感染個体で誘発される抗XMRV特異的抗体の存在を正確に検出できるイムノアッセイの診断薬として利用しうる抗原を発見するために大いに必要である。本発明はかかる必要性のあるイムノアッセイおよび、特に、ヒト体液中のXMRVに対する抗体の存在を正確に検出する単独の抗原または抗原の組み合わせを提供する。かかる抗原に対する抗体の存在は前立腺または他の癌/疾患の適切な診断を助けかつ他の関係症状 (例えば、良性の前立腺過形成) を排除することができる。加えて、かかる抗原を用いて個体の免疫応答を誘発させることができる。例えば、限定されるものでないが、XMRV感染を治療または予防する状況でかかる方式で免疫応答を誘発させることができる。

【0092】

本発明はまた、上記タンパク質に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む。かかる抗体は、例えば、イムノアッセイで、研究目的のキットに用いることができる。かかる抗体はまた、治療薬として効用を有しうる。

【0093】

本発明はまた、XMRV感染および関係症状の分子的検出に関係する組成物および方法に関する。例えば、限定されるものでないが、本発明は、XMRVの存在を検出するためのハイブリダイゼーションおよび/または増幅に基づくアッセイで使用することができる数多くの

核酸配列を含む。これらの核酸はまた、例えば、XMRV活性のアンチセンスまたはsiRNAインヒビターの基礎として、治療環境での用途を見出すことができる。

【0094】

以上に記した用途を以下に詳しく記載する。

【0095】

イムノアッセイ

2つの基本形のイムノアッセイ、競合および非競合（それぞれ、例えば、免疫測定およびサンドイッチ）が存在する。両方のアッセイにおいて、抗体または抗原試薬は共有または非共有結合で固相に取り付けられる（The Immunoassay Handbook, 2nd Edition, edited by David Wild, Nature Publishing Group, London 2001を参照）。共有結合用の連結剤は公知であり、固相の一部であってもまたはコーティングの前に誘導体化されてもよい。イムノアッセイで使われる固相の例は、多孔質および非多孔質材料、ラテックス粒子、磁性粒子、微粒子、ストリップ、ビーズ、膜、マイクロタイターウエルおよびプラスチックチューブである。固相材料および抗原または抗体試薬を標識する方法の選択は、所望のアッセイフォーマット性能特性に基づいて決定する。いくつかのイムノアッセイには標識を必要としない。例えば、抗原が赤血球などの検出可能な粒子であれば、反応性は凝集に基づいて確立することができる。あるいは、抗原-抗体反応は可視変化（例えば、放射免疫拡散法）を生じうる。ほとんどの場合、イムノアッセイに使う抗体または抗原試薬の1つにシグナル発生化合物または「標識」が取り付けられる。このシグナル発生化合物または「標識」は、それ自体が検出可能であるかまたは1以上のさらなる化合物と反応して検出可能な生成物を発生することができる（米国特許第6,395,472 B1号を参照）。かかるシグナル発生化合物には、色素源、放射性同位元素（例えば、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、³H、³⁵S、および¹⁴C）、蛍光化合物（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、化学発光化合物、粒子（可視または蛍光）、核酸、錯化合物、または酵素などの触媒（例えば、アルカリホスファターゼ、酸ホスファターゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、およびリボヌクレアーゼ）が含まれる。酵素使用の場合には、色素、蛍光、または発光原性基質の付加により、検出可能なシグナルの発生がもたらされる。他の検出系、例えば、時間分割蛍光、内部反射蛍光、増幅（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応）およびラマン分光計も有用である。

10

20

30

40

【0096】

次の3つの一般的フォーマットがヒトの特異的抗体力価と型をモニターするために通常使用される：(1)間接抗ヒトアッセイフォーマット、ここでは、抗原を固相上に上記のように提示し、特異的抗体を含有するヒトの体液を抗原と反応させて抗原/抗体複合体を形成させ、次いで抗原に結合した抗体を、シグナル発生化合物とカップリングした抗ヒト抗体を用いて検出する；(2)半直接抗ヒトアッセイフォーマット、ここでは、抗ヒト抗体を固相に結合し、特異的抗体を含有するヒトの体液を結合した抗ヒト抗体と反応させて抗ヒト抗体/抗体複合体を形成し、次いでシグナル発生化合物に取り付けられた抗原を加えて体液サンプル中に存在する特異的抗体を検出する；および(3)直接二重抗原サンドイッチアッセイフォーマット、ここでは、抗原を捕獲抗原としておよび検出コンジュゲートとしての両方で提示する；すなわち、フォーマット(1)に記載のように抗原を固相で提示し、特異的抗体を含有するヒトの体液を固相上に提示した抗原と反応させて抗原/抗体複合体を形成させ、次いで抗原に結合した抗体を、シグナル発生化合物とカップリングした抗原を用いて検出する。フォーマット(1)および(2)において、抗ヒト抗体試薬は、アッセイの意図する目的に応じて、全ての抗体クラスを認識しうるか、またはあるいは、特別なクラス、または抗体のサブクラスに特異的でありうる。

【0097】

フォーマット(3)は、全ての抗体クラスと全ての哺乳動物種由来の抗体を検出する点で、フォーマット(1)および(2)を上回る利点を有する。これらのアッセイフォーマットならびに他の公知のフォーマットは、本発明の範囲内であると考えられかつ当業者にとって周知である。

50

【 0 0 9 8 】

勿論、本明細書に記載の例示のフォーマットおよび本発明によるアッセイまたはキットは、自動化および半自動化システム（微粒子を含む固相のあるものを含む）における使用に適合または最適化することができるのであり、例えば、米国特許第5,089,424号および第5,006,309号に記載され、またAbbott Laboratories (Abbott Park, IL) により市販されている（例えば、限定されるものでないが、AbbottのARCHITECT（登録商標）、AxSYM、IMX、PRISM、およびQuantum IIプラットフォーム、ならびに他のプラットフォームを含む）。

【 0 0 9 9 】

さらに本発明のアッセイおよびキットは、場合によっては、Abbottのポイント・オブ・ケア（i-STAT（登録商標））電気化学イムノアッセイシステムを含むポイント・オブ・ケアのアッセイシステムに適合または最適化することができる。イムノアッセイならびにそれを製造するおよび単一使用試験デバイスで操作する方法は、例えば米国特許第5,063,081号に記載されかつ米国特許出願公開第20030170881号、第20040018577号、第20050054078号、および第20060160164号（参照により本明細書に前記に関する教示が組み込まれる）に開示されている。

【 0 1 0 0 】

以上を考えると、本発明は、例えば、試験サンプル中のXMRVに対する抗体を検出する方法であって、(a)抗体を含有すると疑われる試験サンプルを、p15E-CKS（配列番号27）、p15E -CKS（配列番号29）、p15E-PET（配列番号33）、p15E-PL（配列番号23）、p15E -PL（配列番号25）、p15E （配列番号82）およびそれらのエピトープ（配列番号83、84および85）、p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、gp70（配列番号102）およびp30（配列番号109）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離タンパク質もしくは抗原と十分な時間および条件のもとで接触させ、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；ならびに(b)試験サンプル中に存在する抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法を含む。さらに特定すれば、本発明は、試験サンプル中のXMRVに対する抗体を検出する方法であって、(a)抗体を含有すると疑われる試験サンプルを、p15E-CKS（配列番号27）、p15E -CKS（配列番号29）、p15E-PET（配列番号33）、p15E-PL（配列番号23）、p15E -PL（配列番号25）、p15E （配列番号82）およびそれらのエピトープ（配列番号83、84および85）、p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、gp70（配列番号102）およびp30（配列番号109）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離タンパク質もしくは抗原と十分な時間および条件のもとで接触させ、抗原/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；(b)コンジュゲート（このコンジュゲートは、例えば、検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた抗ヒト抗体を含むものである）を、得られる抗原/抗XMRV抗体複合体に十分な時間と条件のもとで加え、コンジュゲートを結合した抗体と結合させるステップ；ならびに(c)シグナル発生化合物が発生するシグナルを検出することにより、試験サンプル中に存在する抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法を含む。XMRVに対する抗体を含む対照または標準物質を用いてもよい。

【 0 1 0 1 】

本発明はさらに、試験サンプル中に存在する抗体の存在を検出する異なる方法を含む。この方法は、(a)抗体を含有すると疑われる試験サンプルを、抗ヒト抗体と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗ヒト抗体/抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；(b)p15E-CKS（配列番号27）、p15E -CKS（配列番号29）、p15E-PET（配列番号33）、p15E-PL（配列番号23）、p15E -PL（配列番号25）、p15E （配列番号82）およびそれらのエピトー

ブ（配列番号83、84および85）、p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、gp70（配列番号102）およびp30（配列番号109）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗原コンジュゲート（このXMRV抗原コンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられている）を、得られる抗ヒト抗体／抗XMRV抗体複合体に十分な時間と条件のもとで加え、抗原を結合した抗体と結合させるステップ；ならびに(c)シグナル発生化合物が発生するシグナルを検出することにより、試験サンプル中に存在しうる抗XMRV抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法を含む。再び、XMRVに対する抗体を含む対照または標準物質を用いてもよい。

10

【0102】

本発明はまた、試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出する他の方法を包含する。この方法は、(a)前記抗体を含有すると疑われる試験サンプルを、p15E-CKS（配列番号27）、p15E-CKS（配列番号29）、p15E-PET（配列番号33）、p15E-PL（配列番号23）、p15E-PL（配列番号25）、p15E（配列番号82）およびそれらのエピトープ（すなわち、配列番号83、84および85）、p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、gp70（配列番号102）およびp30（配列番号109）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離タンパク質または抗原と十分な時間と条件のもとで接触させ、抗原／抗XMRV抗体複合体を形成させるステップ；(b)p15E-CKS（配列番号27）、p15E-CKS（配列番号29）、p15E-PET（配列番号33）、p15E-PL（配列番号23）、p15E-PL（配列番号25）、p15E（配列番号82）およびそれらのエピトープ（すなわち、配列番号83、84および85）、p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、gp70（配列番号102）およびp30（配列番号109）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むXMRV抗原コンジュゲート（このXMRV抗原コンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられている）を、得られる抗原／XMRV抗体複合体に十分な時間と条件のもとで加え、抗原を結合したXMRV抗体と結合させるステップ；ならびに(c)シグナル発生化合物が発生するシグナルを検出することにより、試験サンプル中に存在しうる抗XMRV抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法を含む。再び、XMRVに対する抗体を含む対照または標準物質を用いてもよい。本発明はさらに、試験サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出する他の方法を包含する。この方法は、(a)前記抗体を含有すると疑われる試験サンプルを、p15E-CKS（配列番号27）、p15E-CKS（配列番号29）、p15E-PET（配列番号33）、p15E-PL（配列番号23）、p15E-PL（配列番号25）、p15E（配列番号82）およびそれらのエピトープ（すなわち、配列番号83、84および85）、p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、gp70（配列番号102）およびp30（配列番号109）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離タンパク質または抗原と、抗原／抗XMRV抗体複合体を形成するのに十分な時間と条件のもとで接触させるステップ；(b)p15E-CKS（配列番号27）、p15E-CKS（配列番号29）、p15E-PET（配列番号33）、p15E-PL（配列番号23）、p15E-PL（配列番号25）、p15E（配列番号82）およびそれらのエピトープ（すなわち、配列番号83、84および85）、p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、g

20

30

40

50

p70 (配列番号102) およびp30 (配列番号109) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むXMRV抗原コンジュゲート (このXMRV抗原コンジュゲートはリガンド結合部分と作動しうる形で連結されている) を、得られる抗原/XMRV抗体複合体に十分な時間と条件のもとで接触させ、抗原コンジュゲートを結合したXMRV抗体と結合させるステップ; ならびに、(c) 抗原コンジュゲートと作動しうる形で連結されたリガンド結合部分により結合されたリガンドと作動しうる形で連結されたシグナル発生化合物が発生するシグナルを検出することにより、試験サンプル中に存在しうる抗XMRV抗体の存在を検出するステップを含むものである前記方法を含む。ある特定の実施形態において、抗原コンジュゲートのXMRV抗原部分は、最初にXMRV抗体と結合するために使われるXMRV抗原と同一であるか、または抗原コンジュゲートの抗原部分は異なるが、なお同じXMRV抗体が結合できるものであってもよい。再び、XMRVに対する抗体を含む対照または標準物質を用いてもよい。

10

【0103】

ある特定の実施形態において、上記リガンド結合部分はアビジンであり、そしてリガンドはビオチンである。代替の実施形態において、リガンド結合部分はストレプトアビジンである。本発明の環境において利用しうるさらなるリガンドとリガンド結合部分は、限定されるものでないが、ジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン; 抗フルオレセイン/フルオレセイン; 抗2,4-ジニトロフェノール (DNP) /DNP; および抗ペルオキシダーゼ/ペルオキシダーゼが含まれる。さらなる代替の実施形態は、十分特異的な受容体/リガンドまたは抗体/抗原相互作用を使って、信頼性のある検出を可能にすることができる。

【0104】

ある特定の実施形態において、本発明はXMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群の指標となるXMRV抗体を検出する方法を提供する。ある特定の実施形態において、本発明は前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群を発症する傾向の指標となるXMRV抗体を検出する方法を提供する。

20

【0105】

ある特定の実施形態において、本発明は特定のXMRVタンパク質に対する抗体を検出することによりXMRV感染の進行をモニターする方法を提供する。例えば、限定されるものでないが、XMRV感染の進行は、次のXMRVタンパク質: gp70、p15E、p30、p15、p12、およびp10のうち1以上に対する抗体の存在を検出することによりモニターすることができる。ある特定の実施形態においては、かかるモニタリングはp30に対する抗体の存在を検出することにより達成される。ある特定の実施形態においては、かかるモニタリングはgp70およびp30に対する抗体の存在を検出することにより達成される。ある特定の実施形態においては、かかるモニタリングはp15Eおよびp30に対する抗体の存在を検出することにより達成される。

30

【0106】

ある特定の実施形態において、上記XMRV感染の進行のモニタリングは1以上の抗XMRV抗体の存在を1以上の期間にわたって検出することにより達成することができる。かかる期間の例としては、限定されるものでないが、被験体から毎6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、72時間、毎週、または毎月採取したサンプル中の1以上の抗XMRV抗体の存在を検出することが挙げられる。

40

【0107】

さらなる実施形態において、本発明は1以上の抗XMRV抗体免疫検出法を1以上のXMRV分子検出技法、例えば、限定されるものでないが、LCR、SDA、RT-PCR、FISH、またはNASBAと組み合わせるXMRV感染を検出する方法を提供する。

【0108】

ある特定の実施形態において、本発明はXMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群を検出する方法であって、XMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群の一連のマーカーを試験する際に、1以上の抗XMRV免疫検出技法を使用する前記技法を提供する。かかる一連のマーカーはXMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群の1以上のマーカーを含みうる。かかるマーカーには、限定される

50

ものでないが、PSAレベルの上昇、前立腺癌特異的遺伝子発現（例えば、Bradford et al., *Molecular markers of prostate cancer* (2006), *Urol. Oncol.* 24(6), 538-551を参照）、頸部癌特異的遺伝子発現（例えば、Bachtiary et al., *Gene Expression Profiling in Cervical Cancer: An Exploration of Intratumor Heterogeneity* (2006) *Clin Cancer Res* 2006;12(19) 5632-5640を参照）、子宮癌特異的遺伝子発現（例えば、Smid-Koopman et al., (2003) *Gene expression profiling in human endometrial cancer tissue samples: utility and diagnostic value*, *Gynecologic Oncology*, 93(2): 292-300を参照）、および慢性疲労症候群特異的遺伝子発現（例えば、Fletcher et al. (2010) *Biomarkers in Chronic Fatigue Syndrome: Evaluation of Natural Killer Cell Function and Dipeptidyl Peptidase IV/CD26*. *PLoS ONE* 5(5): e10817を参照）が含まれる。ある特定の

10

【0109】

XMRVの存在の指標となる上記の方法のいずれかを用いた結果が陽性であると、場合によっては、次いで実証的または確認的診断手順、例えば、限定されるものでないが、組織バイオプシー、組織学的評価、X線撮影研究、MRI研究、超音波研究、PETスキャンなどを実施しうる。

20

【0110】

分子の検出

ある特定の実施形態において、本発明は核酸ハイブリダイゼーションおよび/または増幅に基づくアッセイを用いてXMRV核酸を検出するための組成物および方法を提供する。

【0111】

ある特定の実施形態において、本発明のハイブリダイゼーションおよび/または核酸増幅を介して検出する方法は、限定されるものでないが、リアルタイムPCR（例えば Mackay, *Clin. Microbiol. Infect.* 10(3):190-212, 2004を参照）、鎖置換増幅（SDA）（例えば、Jolley and Nasir, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 6(3):235-44, 2003を参照）、自己保持配列複製反応（3SR）（例えば、Mueller et al., *Histochem. Cell. Biol.* 108(4-5):431-7, 1997を参照）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば、Laffler et al., *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 51(9):821-6, 1993を参照）、転写媒介増幅（TMA）（例えば、Prince et al., *J. Viral Hepat.* 11(3):236-42, 2004を参照）、または核酸配列に基づく増幅（NASBA）（例えば、Romano et al., *Clin. Lab. Med.* 16(1):89-103, 1996を参照）を含む。

30

【0112】

ある特定の実施形態において、本発明は蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）に関わるXMRV核酸を検出する方法を提供する。用語「in situハイブリダイゼーション」は一般に核酸プローブの細胞学的または組織学的調製物の一部分である核酸標的とのハイブリダイゼーションを意味する。典型的にはFISH法は次のステップ、すなわち：(a) 研究対象である組織もしくは他の生物学的材料を支持体（例えば、ガラススライドまたはマイクロタイターウエルの壁）に固定するステップ；(b) 組織もしくは材料を処理してFISHプローブの標的核酸へのアクセス可能性を高めるステップ；(c) 標的核酸を含有する組織もしくは材料をプローブと接触させて特異的ハイブリダイゼーション複合体を形成するステップ；(d) ハイブリダイゼーション後に複合体を洗浄して標的と特異的にハイブリダイズしてないプローブを除去するステップ；および(e) 標的核酸分子とハイブリダイゼーション複合体を形成したプローブを検出するステップに関わる。かかる方法は、いくつかの出所に記載されていて、それには：Gall and Pardue, (1981) *Methods of Enzymology* 21:470-480；Henderson, (1982) *International Review of Cytology*, 76:1-46；およびAngerer, et al., (1985) in *Genetic Engineering: Principles and Methods* (Setlow and Hollaender, Eds.) vol. 7, pp. 43-65, Plenum Press, New Yorkが含まれる。

40

50

【0113】

上記のハイブリダイゼーションおよび/または核酸増幅を介して検出する方法のある特定の実施形態は、1以上の次の配列：配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはその相補配列を含むかまたはそうでなければそれから誘導される核酸の使用（例えば、FISHプローブ、増幅プライマー、またはRT-PCRプローブ）を含むものである。

【0114】

ある特定の実施形態において、本発明は、XMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群の指標であるXMRV核酸を検出する方法を提供する。ある特定の実施形態において、本発明は、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群を発症する傾向の指標であるXMRV核酸を検出する方法を提供する。

【0115】

さらなる実施形態において、本発明は1以上の分子検出法、例えば、LCR、SDA、RT-PCR、FISH、またはNASBAを、限定されるものでないが、本明細書に記載した免疫検出技法を含む1以上の免疫検出技法と組み合わせるXMRV感染を検出する方法を提供する。

【0116】

ある特定の実施形態において、本発明はXMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群の一連のマーカーを試験する際に1以上の抗XMRV分子検出技法を使用する、XMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群を検出する方法を提供する。かかる一連のマーカーは、XMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群のうちの1以上のマーカーを含みうる。かかるマーカーには、限定されるものでないが、PSAレベルの上昇、前立腺癌特異的遺伝子発現（例えば、Bradford et al., *Molecular markers of prostate cancer* (2006), *Urol. Oncol.* 24(6), 538-551を参照）、頸部癌特異的遺伝子発現（例えば、Bachtiary et al., *Gene Expression Profiling in Cervical Cancer: An Exploration of Intratumor Heterogeneity* (2006) *Clin Cancer Res* 2006;12(19) 5632-5640を参照）、子宮癌特異的遺伝子発現（例えば、Smid-Koopman et al., (2003) *Gene expression profiling in human endometrial cancer tissue samples: utility and diagnostic value*, *Gynecologic Oncology*, 93(2): 292-300を参照）、および慢性疲労症候群特異的遺伝子発現（例えば、Fletcher et al. (2010) *Biomarkers in Chronic Fatigue Syndrome: Evaluation of Natural Killer Cell Function and Dipeptidyl Peptidase IV/CD26*. *PLoS ONE* 5(5): e10817を参照）が含まれる。ある特定の実施形態において、本発明は前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群を発症する傾向を検出する方法であって、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、または慢性疲労症候群の一連のマーカーを試験する際に、1以上の抗XMRV分子検出技法を使用する前記方法を提供する。

【0117】

XMRVの存在の指標となる上記の方法のいずれかを用いた結果が陽性であると、場合によっては、次いで実証的または確認的診断手順、例えば、限定されるものでないが、組織バイオプシー、組織学的評価、X線撮影研究、MRI研究、超音波研究、PETスキャンなどを実施してもよい。

【0118】

診断キット

診断キットも本発明の範囲内に含まれる。さらに具体的には、本発明は試験サンプル中のXMRVに対する抗体の存在を確認するためのキットならびに試験サンプル中のXMRV核酸の存在を確認するための診断キットを含む。

【0119】

サンプル中のXMRVに対する抗体の存在を確認するためのキットは、a)p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-P

10

20

30

40

50

L (配列番号73)、p15-PL (配列番号52)、p15-CKS (配列番号56)、p12-CKS (配列番号60)、p12-PET (配列番号63)、p10-CKS (配列番号77)、p10-PET (配列番号80)、gp70 (配列番号102)、p30 (配列番号109)、p15E -CKS (配列番号29)、p15E -PL (配列番号25)、p15E (配列番号82) およびそれらのエピトープ (すなわち、配列番号83、84および85) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのXMRV抗原、およびb) 検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた抗体を含むコンジュゲートを含むものであってもよい。キットはまた、抗原と結合する試薬を含む対照または標準物質ならびにキットを利用する方法を記載した取扱説明書シートを含有してもよい。

【0120】

本発明はまた、試験サンプル中のXMRVに対する抗体を検出するための他の型式のキットを含む。このキットは、a) 抗ヒト抗体およびb) p70-PL (配列番号39)、p70-CKS (配列番号43)、p70-PET (配列番号50)、p30-CKS (配列番号67)、p30-PL (配列番号73)、p15-PL (配列番号52)、p15-CKS (配列番号56)、p12-CKS (配列番号60)、p12-PET (配列番号63)、p10-CKS (配列番号77)、p10-PET (配列番号80)、gp70 (配列番号102)、p30 (配列番号109)、p15E -CKS (配列番号29)、p15E -PL (配列番号25)、p15E (配列番号82) およびそれらのエピトープ (すなわち、配列番号83、84および85) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのXMRV抗原を含んでもよい。キットはまた、XMRV抗原と結合する試薬を含む対照または標準物質も含んでもよい。さらに具体的には、キットは、a) 抗ヒト抗体、およびb) p70-PL (配列番号39)、p70-CKS (配列番号43)、p70-PET (配列番号50)、p30-CKS (配列番号67)、p30-PL (配列番号73)、p15-PL (配列番号52)、p15-CKS (配列番号56)、p12-CKS (配列番号60)、p12-PET (配列番号63)、p10-CKS (配列番号77)、p10-PET (配列番号80)、gp70 (配列番号102)、p30 (配列番号109)、p15E -CKS (配列番号29)、p15E -PL (配列番号25)、p15E (配列番号82) およびそれらのエピトープ (すなわち、配列番号83、84および85) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのXMRV抗原を含むコンジュゲート (このコンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられている) を含んでもよい。再び、キットはまた、XMRV抗原と結合する試薬を含む対照または標準物質を含んでもよい。

【0121】

本発明はまた、試験サンプル中のXMRVに対する抗体を検出するための他の型式のキットを含む。このキットは、a) 固相と結合した、p70-PL (配列番号39)、p70-CKS (配列番号43)、p70-PET (配列番号50)、p30-CKS (配列番号67)、p30-PL (配列番号73)、p15-PL (配列番号52)、p15-CKS (配列番号56)、p12-CKS (配列番号60)、p12-PET (配列番号63)、p10-CKS (配列番号77)、p10-PET (配列番号80)、gp70 (配列番号102)、p30 (配列番号109)、p15E -CKS (配列番号29)、p15E -PL (配列番号25)、p15E (配列番号82) およびそれらのエピトープ (すなわち、配列番号83、84および85) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのXMRV抗原、およびb) 2) 検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられた1) p70-PL (配列番号39)、p70-CKS (配列番号43)、p70-PET (配列番号50)、p30-CKS (配列番号67)、p30-PL (配列番号73)、p15-PL (配列番号52)、p15-CKS (配列番号56)、p12-CKS (配列番号60)、p12-PET (配列番号63)、p10-CKS (配列番号77)、p10-PET (配列番号80)、gp70 (配列番号102)、p30 (配列番号109)、p15E -CKS (配列番号29)、p15E -PL (配列番号25)、p15E (配列番号82) およびそれらのエピトープ (すなわち、配列番号83、84および85) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む抗原を含むコンジュゲートを含んでもよい。キットはまた、XMRV抗原と結合する試薬を含む対照または標準物質を含んでもよい。さらに具体的には、このキットは、a) 固相と結合した、p70-PL (配列番号39)、p70-CKS (配列番号43)、p70-PET (配列番号50)、p30-CKS (配列番号67)、p30-PL (配列番号73)、p15-PL (配列番号52)、p15-CKS (配列番号56)、p12-CKS (配列番号60)、p12-PET (配列番号63)、p10-CKS (配列番号77)、p10-PET (配列番号80)、gp70 (配列番号102)

10

20

30

40

50

、p30（配列番号109）、p15E -CKS（配列番号29）、p15E -PL（配列番号25）、p15E（配列番号82）およびそれらのエピトープ（すなわち、配列番号83、84および85）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのXMRV抗原、およびb)p70-PL（配列番号39）、p70-CKS（配列番号43）、p70-PET（配列番号50）、p30-CKS（配列番号67）、p30-PL（配列番号73）、p15-PL（配列番号52）、p15-CKS（配列番号56）、p12-CKS（配列番号60）、p12-PET（配列番号63）、p10-CKS（配列番号77）、p10-PET（配列番号80）、gp70（配列番号102）、p30（配列番号109）、p15E -CKS（配列番号29）、p15E -PL（配列番号25）、p15E（配列番号82）およびそれらのエピトープ（すなわち、配列番号83、84および85）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも1つのXMRV抗原を含むコンジュゲート（このコンジュゲートは検出可能なシグナルを発生することができるシグナル発生化合物に取り付けられている）を含んでもよい。再び、キットはまた、XMRV抗原と結合する試薬を含む対照または標準物質を含んでもよい。

10

【0122】

ある特定の実施形態において、本発明はXMRV核酸を検出するのに有用であるキットおよび組成物に関する。ある特定の実施形態において、かかるキットはXMRV核酸とハイブリダイゼーションできる核酸を含む。例えば、限定されるものでないが、かかるキットはXMRV核酸を検出するハイブリダイゼーションおよび/または核酸増幅アッセイに関して利用することができる。

【0123】

ある特定の実施形態において、本発明のキットを用いて使うことができるハイブリダイゼーションおよび/または核酸増幅アッセイとしては、限定されるものでないが、リアルタイムPCR（例えば、Mackay, Clin. Microbiol. Infect. 10(3):190-212, 2004）、鎖置換増幅（SDA）（例えば、Jolley and Nasir, Comb. Chem. High Throughput Screen. 6(3):235-44, 2003を参照）、自己保持配列複製反応（3SR）（例えば、Mueller et al, Histochem. Cell. Biol. 108(4-5):431-7, 1997を参照）、リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば、Laffler et al, Ann. Biol. Clin. (Paris).51(9):821-6, 1993を参照）、転写介在性増幅（TMA）（例えば、Prince et al, J. Viral Hepat. 11(3):236-42, 2004を参照）、または核酸配列に基づく増幅（NASBA）（例えば、Romano et al, Clin. Lab. Med. 16(1):89-103, 1996を参照）が挙げられる。

20

【0124】

本発明のある特定の実施形態において、XMRV核酸を検出するキットは、(i)XMRV核酸標的と特異的にハイブリダイズする標的的特異的配列を含む核酸配列、および(ii)検出可能な標識を含む。かかるキットはさらに、標的配列の増幅に介在する、ネスト化および/またはヘミネスト化プライマーを含むプライマーとして機能する1以上の追加の核酸配列を含んでもよい。ある特定の実施形態において、本発明のキットはさらに、増幅の指標としての追加の核酸配列機能、例えば、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応アッセイの環境のもとで使用する標識プローブを含みうる。

30

【0125】

本発明のキットはまた、複数のXMRV核酸標的を検出するためにも有用である。かかる状況において、キットは、それぞれの異なる核酸標的に対して異なるセットのプライマーおよび1以上の別の標識を含みうる。

40

【0126】

ある特定の実施形態において、キットは、次の配列：配列番号16；配列番号19；配列番号30；配列番号31；配列番号40；配列番号44；配列番号53；配列番号54；配列番号57；配列番号58；配列番号64；配列番号65；配列番号68；配列番号69；配列番号70；配列番号71；配列番号74；配列番号75；配列番号78；配列番号90；配列番号91；配列番号96；配列番号97；配列番号98；配列番号99；配列番号103；配列番号104；配列番号105；および配列番号106、またはそれらの相補配列の1以上を含むかそうでなければそれから誘導される核酸（例えば、ハイブリダイゼーションプローブ、プライマー、またはRT-PCRプローブ）を含む。

50

【0127】

治療薬免疫応答を誘発できるXMRV配列

ある特定の実施形態において、本発明は抗原性免疫応答を誘発できるXMRVアミノ酸配列に関する。XMRVアミノ酸配列は、XMRVアミノ酸配列の少なくとも一部分に対して細胞介在性免疫応答、液性免疫応答、またはそれらの両方を起こすいずれかの物質を含むかまたはかかる物質から誘導されてもよい。好適な抗原性物質には、例えば、限定されるものでないが、XMRVタンパク質、XMRVポリタンパク質、またはXMRVタンパク質もしくはXMRVポリタンパク質の抗原性ポリペプチド断片が含まれる。ある特定の実施形態において、抗原性XMRVアミノ酸配列はp15E -CKS（配列番号29）、p15E -PL（配列番号25）、p15E（配列番号82）およびそれらのエピトープ（配列番号83、84、および85）からなる群より選択される。

10

【0128】

ある特定の実施形態においては、免疫応答を誘発できるアミノ酸配列をアジュバントと共に投与する。ある特定の実施形態において、アジュバントは免疫刺激性アジュバント、より好ましくは、サポニン系アジュバント、そして、なおさらに特に免疫刺激性複合体（またはISCOM(登録商標)）、例えば、ISCOMATRIX(登録商標)アジュバントである。しかし、本発明はまた、他の免疫刺激性アジュバントの、個々にまたは他のアジュバント、例えば免疫刺激性複合体と組み合わせての使用を包含し、前記免疫刺激性複合体には、例えばリポソーム、水中油アジュバント、例えばMF59、アルミニウム塩アジュバント、例えば水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム、リポ多糖アジュバント、例えば脂質Aおよびモノホスホリル脂質A(MPL)、オリゴヌクレオチドアジュバント、例えばCpGオリゴヌクレオチドアジュバント、および粘膜アジュバント、例えばコレラ毒が含まれる。好適な免疫刺激性アジュバントは、例えば、Cox and Coulter, Vaccine (1997), 15(3): 248-256に記載されている。

20

【0129】

ある特定の実施形態において、免疫応答を誘発できるアミノ酸配列は免疫原性組成物の剤形で調製される。目的の免疫原性組成物は様々な製剤のいずれかで提供される。例えば、限定されるものでないが、本発明の免疫原性組成物は、例えば、滅菌および非滅菌の両方の剤形で、例えば、カプセル、溶液、液滴、乳濁液、懸濁液、エリキシル、クリーム、座剤、ゲル、ソフトカプセル、スプレー、吸入薬、エアロゾル、粉末、錠剤、コーティングした錠剤、トローチ剤、マイクロカプセル、座剤、糖衣錠、シロップ、スラリー、顆粒、浣腸または丸薬の剤形で使われる。不活性の担体、例えば、生理食塩水、またはリン酸緩衝食塩水、安定剤、噴霧剤を用いてもよく、ゼラチンカプセルにまたはマイクロカプセルもしくは投与を助けるベクターに入れてもよく、または本発明の方法で用いる化合物が本発明の方法における使用に好適な溶解度特性を有するいずれの担体を用いてもよい。

30

【0130】

さらなる実施形態においては、目的の免疫原性組成物を単独でまたは分散系で送達することができる。いくつかの実施形態において、分散系は、限定されるものでないが、マクロ分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズおよび脂質に基づく系からなる群より選択される。脂質に基づく系には、任意に水中油乳濁液、ミセル、混合ミセル、またはリポソームが含まれる。

40

【0131】

ある特定の実施形態において、目的の免疫原性組成物は製薬上許容される溶液の剤形であり、これは通常製薬上許容される濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合しうる担体、アジュバントおよび任意に他の治療成分を含有しうる。かかる組成物は添加剤、例えば：崩壊剤、バインダー、コーティング剤、膨潤剤、滑沢剤、香料、甘味剤または溶解剤その他を含有してもよい。ある特定の実施形態においては、目的の免疫原性組成物を純粋な形態でまたは製薬上許容される塩の形態で投与する。

【0132】

50

ある特定の実施形態においては、免疫原性組成物を長期安定性と固体形態での貯蔵のために凍結乾燥する。凍結乾燥の方法は当業者に公知である。

【0133】

ある特定の実施形態において、本発明の免疫原性組成物は次の疾患：XMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、および慢性疲労症候群の治療または予防に使用される。

【0134】

阻害性核酸

ある特定の実施形態において、本発明はXMRV遺伝子発現を減少することができる阻害性核酸に関する。かかる阻害性核酸には、限定されるものでないが、アンチセンス核酸、リボザイム、およびsiRNA核酸が含まれる。ある特定の実施形態において、本発明の阻害性核酸は特別な標的遺伝子の転写または翻訳を阻害することによって機能する。

10

【0135】

ある特定の実施形態において、本発明の阻害性核酸はアンチセンス核酸分子、すなわち、本発明のセンス核酸と相補的、例えばXMRVタンパク質のコード鎖と相補的である分子である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、限定されるものでないが、長さが約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50ヌクレオチドまたはそれ以上でありうる。本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野で公知の手順を用いて化学合成または酵素合成反応により構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は天然のヌクレオチドまたは、分子の生物学的安定性を増加するようにまたはアンチセンスとセンス核酸の間の二本鎖の物理的安定性を増加するように設計した改変ヌクレオチドを用いて化学合成することができ、例えば、ホスホロチオアート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを用いることができる。アンチセンス核酸を作製するために用いることができる改変ヌクレオチドの例には、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N-6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(ac p3)w、および2,6-ジアミノプリンが含まれる。

20

30

【0136】

ある特定の実施形態において、阻害性核酸はリボザイムである。リボザイムはリボヌクレアーゼ活性を示す触媒性RNA分子であり、一本鎖核酸、例えばそれに対して相補性領域を有するmRNAを切断することができる。このように、リボザイム（例えば、Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334:585-591に記載のハンマーヘッドリボザイム）を用いてmRNA転写物を触媒作用により切断し、それによりmRNAがコードするタンパク質の翻訳を阻害することができる。目的のXMRVタンパク質をコードする核酸分子に対して特異性を有するリボザイムを、そのXMRVタンパク質のヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。例えば、限定されるものでないが、活性部位のヌクレオチド配列が切断すべきヌクレオチド配列と相補的であるテトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体を構築することができる（Cechらの米国特許第4,987,071号；およびCechらの米国特許第5,116,742号を参照されたい）。

40

【0137】

ある特定の実施形態において、阻害性核酸はsiRNAである。siRNAが介在する転写物「ノ

50

ックダウン」は、多数の遺伝子の発現を特異的かつ強力に阻害する標準的な方法として現われた技法である。本発明のsiRNAは部分精製したRNA、実質的に純粋なRNA、合成RNA、または組換えで産生したRNA、ならびに1以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および/または改変により天然RNAとは異なる改変されたRNAを含みうる。かかる改変は、非ヌクレオチド物質の、例えば、siRNAの末端へまたはsiRNAの1以上の内部ヌクレオチドへの付加、またはsiRNAをヌクレアーゼ消化に対して耐性にする改変、またはsiRNA中の1以上のヌクレオチドのデオキシリボヌクレオチドによる置換を含みうる。

【0138】

ある特定の実施形態において、本発明のsiRNAの1つまたは両方の鎖は3'オーバーハングを含んでもよい。本明細書で使用する「3'オーバーハング」は、二本鎖RNA鎖の3'末端から伸長する少なくとも1つの非対ヌクレオチドを意味する。従って、一実施形態において、本発明のsiRNAは少なくとも1つの長さ1~約6ヌクレオチド(リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含む)、好ましくは長さ1~約5ヌクレオチド、より好ましくは長さ1~約4ヌクレオチド、そして特に好ましくは長さ約2~約4ヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。

10

【0139】

本発明のsiRNAは標的mRNA配列のいずれかにおけるおよそ19~25近接ヌクレオチドのいずれかのストレッチを標的化することができる。siRNAに対する標的配列を選択する技法は、例えば、Tuschl T et al, "The siRNA User Guide," revised Oct. 11, 2002(この全開示は本明細書に参照により組み込まれる)に記載されている。一般に、標的mRNA上の標的配列は、好ましくは、出発コドンから50~100nt下流(すなわち3'方向)に始まる標的mRNAに対応する所望のcDNA配列からなる群より選択することができる。しかし、標的配列は5'または3'非翻訳領域に、または出発コドン近くの領域に位置してもよい。

20

【0140】

ある特定の実施形態においては、阻害性核酸配列を医薬組成物の剤形で調製する。かかる医薬組成物は様々な剤形のいずれかで提供することができる。例えば、限定されるものでないが、阻害性核酸を含有する本発明の医薬組成物を、無菌および非無菌両方の剤形、例えば、カプセル、溶液、液滴、乳濁液、懸濁液、エリキシル、クリーム、座剤、ゲル、ソフトカプセル、スプレー、吸入薬、エアロゾル、粉末、錠剤、コーティングした錠剤、トローチ剤、マイクロカプセル、座剤、糖衣錠、シロップ、スラリー、顆粒、浣腸または丸薬で使用することができる。例えば、限定されるものでないが、本発明の阻害性核酸を含有する医薬組成物を、無菌および非無菌の両方の剤形で使用することができる。いずれの不活性担体、例えば、生理食塩水、またはリン酸緩衝食塩水、安定剤、噴霧剤を用いてもよく、ゼラチンカプセルにまたはマイクロカプセルもしくは投与を助けるベクターに入れてもよく、または本発明の方法で用いる化合物が本発明の方法に使用するのに好適な溶解度特性を有するいずれの担体を用いてもよい。

30

【0141】

阻害性核酸を含有する医薬組成物は製薬上許容される濃度の塩、緩衝剤、保存剤、適合しうる担体、アジュバントおよび任意に他の治療成分を含有してもよい。かかる組成物は添加剤、例えば：崩壊剤、バインダー、コーティング剤、膨潤剤、滑沢剤、香料、甘味剤または溶解剤その他を含有してもよい。ある特定の実施形態においては、阻害性核酸を含有する医薬組成物を純粋な形態でまたは製薬上許容される塩の形態で投与する。

40

【0142】

ある特定の実施形態においては、阻害性核酸を含有する医薬組成物を長期安定性と固体形態での貯蔵のために凍結乾燥する。

【0143】

ある特定の実施形態において、本発明の阻害性核酸を含有する組成物は次の疾患：XMRV感染、前立腺癌、頸部癌、子宮癌、および慢性疲労症候群の1以上の治療または予防に使用される。

【0144】

50

本発明を以下の限定するものでない例を用いて説明しよう。

【実施例】

【0145】

(実施例1)

XMRVビリオンの作製

XMRV粒子はAdvanced Biotechnologies, Inc.(ABI, Columbia, MD)が作製して精製した。概要を説明すると、Cleveland Clinic (Cleveland, OH) から得たXMRV感染したDU145前立腺癌細胞を、10%ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、200単位ペニシリンGおよび200ug/mlストレプトマイシンを補充したRPMI培地1640で培養した。培養上清から得たウイルス粒子をスクロース勾配密度法を用いて精製した。(Mahy, B.W.J. Virology: A Practical Approach; IRL Press: Oxford, 1985, pp.36-37)。

10

【0146】

(実施例2)

一般クローニングの手順

遺伝子構築、遺伝子クローニングおよび配列決定用のオリゴヌクレオチドはMWG Biotech (High Point, NC)、TriLink BioTechnologies (San Diego, CA)、またはInvitrogen (Carlsbad, CA)において合成した。遺伝子はGenScript Corporation (Piscataway, NJ)が合成した。AmpliTaq DNAポリメラーゼおよびdNTPを含むポリメラーゼ連鎖反応(PCR)試薬はApplied Biosystems (Foster City, CA)から、ロングテンプレート用SuperScriptワンステップRT-PCRはInvitrogenから、QIAGENワンステップRT-PCRキットはQiagen (Valencia, CA)から、およびPfu DNAポリメラーゼはStratagene (La Jolla, CA)から入手し、特に断らない限り、製造業者取扱説明書に従って使用した。PCR増幅はGeneAmp 9700サーマルサイクラー(Applied Biosystems, Foster City, CA)で実施した。制限酵素とリガーゼはInvitrogenから購入して製造業者の推奨の通り用いた。消化したDNAは、製造業者プロトコルに従って、QIAquickゲル抽出キット(QiagenまたはWizard SVゲル)およびPCRクリーンアップシステム(Promega, Madison, WI)を用いてゲル精製するか、または、Clontech (Palo Alto, CA)から入手したChroma Spin-100 DEPC-H₂O カラムを通過させることにより精製した。

20

【0147】

細菌の形質転換はSubcloning Efficiency DH5a (Invitrogen)、XL1-Blue (Stratagene)またはBL21(DE3) (Novagen, Madison, WI)のコンピテント細胞を用いて、製造業者取扱説明書に基づいて実施した。形質転換および細菌の再ストリークは、100 μg/mlアンピシリンもしくは50 μg/mlカナマイシン入りのLB寒天プレート(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)で、または最終濃度1%のグルコースを補充したLB+抗生物質寒天プレートで行った。細菌を一晩30 または37 にて、記載したようにインキュベートした。

30

【0148】

所望のクローンを同定するために、細菌コロニーPCRを用いて形質転換体をスクリーニングした。個々のコロニーを寒天プレートから拾い、最初にLB+抗生物質寒天プレートでストリークし、次いで96ウエルPCRプレート(Bio-Rad, Richmond, CA)の25 μl水のウェルに懸濁した。接種した寒天プレートを将来使用するマスタープレートとして、一晩30 または37 でインキュベートした。75 μlのPCRマスターミックス(10 μlの10 x PCRバッファー、10 μlの10mM dNTP(それぞれ、0.25mM)、2 μlの20 μMフォワードプライマー(0.4 μM)、2 μlの20 μMリバープライマー(0.4 μM)、0.5 μlの5単位/μl AmpliTaq DNAポリメラーゼ(2.5単位)、および50.5 μlの水を含有する)を96ウエルプレート中の25 μlの細菌懸濁液にそれぞれ加えた。サイクリング条件は、94 にて5分間、次いで(94 にて15秒間、50 にて30秒間、および72 にて60秒間)の40サイクルとした。次いでPCR反応液を72 にて7分間インキュベートし、そして4 にて保った。PCR産物とミニプレッププラスミドDNAをアガロースゲル電気泳動により試験し、次いで、製造業者プロトコルに従い、QIAquick PCR精製キット(Qiagen)またはWizard SVゲルおよびPCRクリーンアップシステム(Promega)を通して精製した。一晩細菌培養から得たミニプレッププラスミドD

40

50

NAを単離し、製造業者プロトコルに従い、QIAprep Spin Miniprepキット (Qiagen) を用いることにより精製した。

【0149】

自動3130xlジェネティックアナライザー (Applied Biosystems) を用いてDNA配列分析を行った。配列決定反応は、BigDye Terminator v3.1 RR-1000 サイクルシーケンシングキット (Applied Biosystems) を用いて製造業者の推奨に従い実施した。配列反応液を、製造業者取扱説明書に従い、Centri-SepスピンカラムまたはCentri-Sep 96-ウエルプレート (Princeton Separations, Adelphia, NJ) を用いて精製した。配列データを、Sequencer 4.8 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) およびDNASTAR Lasergene 7.1.1または7.2.1 (DNASTAR, Madison, WI) を用いて分析した。

10

【0150】

(実施例3)

合成XMRV env p15E遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築

図1は合成XMRV env p15E遺伝子構築物を作製するために使った計画を図解する。env p15Eアミノ酸配列 (配列番号1) はXMRV菌株VP62 (GenBank受託番号EF185282) のゲノムDNA配列から推論した。全長 (すなわち180アミノ酸) 合成env p15E遺伝子を作るために8つの重複オリゴヌクレオチド (A~H) を設計したが、ここでヌクレオチド#1はp15Eの第1コドンの第1塩基でありかつヌクレオチド#540は最後のコドンの第3塩基である。p15Eの高度に疎水性の領域 (膜貫通ドメイン) を包含する14アミノ酸 (ヌクレオチド#433~#474) の欠失を運ぶ切り詰めたp15E遺伝子を構築するために、7つのオリゴヌクレオチド (A~FおよびI) を設計した。その結果、短縮されたp15E遺伝子 (p15E) は166アミノ酸をコードする。

20

【0151】

全部で9つの重複オリゴヌクレオチドにおいて、大腸菌宿主中の組換えタンパク質の発現レベルを増加するために、生来のXMRVウイルスコドンで大腸菌コドンバイアスと一致するように改変した。(例えば、M. Gouy and C. Gautier, *Nucleic Acids Research* 10:7055 (1982); H. Grosjean and W. Fiers, *Gene* 18:199 (1982); J. Watson et al., (ed s.), *Molecular Biology of the Gene*, 4th Ed., Benjamin Kummings Publishing Co., pp.440 (1987)を参照されたい。)

遺伝子構築の過程で、9つの重複オリゴヌクレオチドの相補性末端は、アニーリングの際に、相補鎖伸長のプライマーとして役立った。このプロセス (すなわち、オリゴヌクレオチドの「PCRニッティング」) を繰り返して遺伝子断片の伸長を進行させた。ニッティング断片を次いでPCR (オリゴヌクレオチドプライマーのセット: FP125/RP226またはFP322/RP423) により増幅した。最も外側のPCRプライマー-15EF33はPLベクター-pKRR826中へのクローニング用に設計した。発現ベクター-pKRR826は、バクテリオファージ pLプロモーターベクター-pSDKR816の改変された形であり、米国特許出願第08/314,570号 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。pKRR826は、温度感受性 cIリプレッサー遺伝子を含有するpBR322の高コピー数誘導体である (Benard et al, *Gene* 5:59[1979])。しかし、pKRR826は翻訳ターミネーター-rrnBt1を欠きかつ pLおよびpRプロモーターをpSDKR816に対して逆方向に有する。pKRR826のポリリンカー領域はEcoRIおよびBamHI制限酵素部位を含有するがATG翻訳開始コドンを欠く。最適な発現は遺伝子インサート (N-末端メチオニンを含む) の5'末端をEcoRI部位中にクローニングすると得られる。5'末端センス (またはフォワード) プライマー-15EF33 (配列番号15) をクローニング用のEcoRI制限酵素切断部位とATGコドン (メチオニン) を含有するように設計し、組換えタンパク質の適当な翻訳開始を提供した。対応する3'末端アンチセンス (またはリバース) プライマー-15ER32 (配列番号16) は2つの逐次的翻訳終結コドン (TAA、TAG) とBamHI制限酵素切断部位を含有する。プライマー-15EF33および15ER32を用いて、180アミノ酸 (N末端メチオニンを除く) の全長env p15E遺伝子産物をコードするオリゴヌクレオチドA~Hを含有する、pK121F (配列番号23) と名付けたニッティング断片を増幅した。プライマー-15EF33および15ER32を用いてまた、N-末端メチオニンを除いて166アミノ酸 (pK1310B; 配列番号25) を

30

40

50

コードする切り詰めたenv p15E遺伝子産物をもたらすオリゴヌクレオチドA~FおよびIから成る第2のニッティング断片を増幅した。

【0152】

全長および切り詰めたp15E遺伝子をまた、CMP-KDOシンターゼ（CKS）融合タンパク質として発現させた。pKRR826からの2つの合成遺伝子の、CKS発現ベクターpJ0200中へのPCR媒介導入（米国特許出願第6,593,083 B1号に記載されかつ参照により本明細書に組み込まれる）を、代わりにの5'末端センスPCRプライマー、15EF30（配列番号19）を使うことにより実施した。プライマー15EF30はEcoRI部位を含有し、遺伝子インサートの、pJ0200中のCKSへのインフレーム融合をもたらした。3'末端アンチセンスプライマー15ER32（配列番号16）を15EF30と組み合わせて用いて、全長（180アミノ酸）p15E遺伝子を運ぶプラスミド構築物 pJ1F2A（配列番号27）、または切り詰めた（166アミノ酸）p15E遺伝子を有するpJ10B9A（配列番号29）を作製した。

10

【0153】

上述のクローニングステップを以下に詳しく説明する：

A. 合成オリゴヌクレオチドのPCRニッティング

図2Aおよび3Aに概説したように、3つのPCR反応液（それぞれ、50 μl体積）を次の通り調製した：

(1) 反応液K1： 1 x 反応バッファー（0.2 mMの各dNTP + 1.2mMのMgSO₄を含有する）中のRT/白金TaqHiFi酵素ミックス（Invitrogen）、0.1 μMの各オリゴヌクレオチドA（配列番号2）、B（配列番号3）、C（配列番号4）およびD（配列番号5）、ならびに0.4 μMの各プライマーFP125（配列番号11）およびRP226（配列番号12）；

20

(2) 反応液K2： 1 x 反応バッファー（0.2mMの各dNTP + 1.2mMのMgSO₄を含有する）中のRT/白金TaqHiFi酵素ミックス（Invitrogen）、0.1 μMの各オリゴヌクレオチドE（配列番号6）、F（配列番号7）、G（配列番号8）およびH（配列番号9）、ならびに0.4 μMの各プライマーFP322（配列番号13）およびRP423（配列番号14）

； および

(3) 反応液K3： 1 x 反応バッファー（0.2 mMの各dNTP + 1.2mMのMgSO₄を含有する）中のRT/白金TaqHiFi酵素ミックス（Invitrogen）、0.1 μMの各オリゴヌクレオチドE（配列番号6）、F（配列番号7）およびI（配列番号10）、ならびに0.4 μMの各プライマーFP322（配列番号13）およびRP423（配列番号14）。

30

【0154】

PCRサーマルプロファイルは、最初のステップ（94 °にて2分）、続いて30サイクル（94 °にて15秒、55 °にて30秒、および68 °にて60秒）で構成した。反応液を次いで72 °にて7分間インキュベートし、そして4 °にて保持した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquickPCR精製キット（Qiagen）を通して精製した。

【0155】

B. 反応液K1とK2または反応液K1とK3から得たPCR産物のPCRニッティング

反応液K1、K2およびK3からのPCR産物を、制限酵素エンドヌクレアーゼ Nco I（Invitrogen）で消化し、Chroma Spin-100 DEPC-H₂Oカラム（Clontech）を通過させることにより精製し、そして（K1 + K2またはK1 + K3）をT4 DNAリガーゼ（Invitrogen）でライゲートした（図2Aおよび3Aを参照）。2つのライゲーション反応液、K1 + K2およびK1 + K3を次いでChroma Spinカラムを通して精製し、そして別々にプライマー15EF33（配列番号15）および15ER32（配列番号16）を用いてSuperScript One-ステップRT-PCRキット（Invitrogen）で製造業者の取扱説明書に従い増幅した。2つの15EF33-15ER32産物（K1 + K2およびK1 + K3）をその後、アガロースゲル電気泳動により可視化し、QIAquick PCR精製キットを用いて精製した。

40

【0156】

C. 15EF33-15ER32 PCR産物の、pKRR826中へのクローニング

図2Bおよび3Bに示したように、2つの15EF33-15ER32増幅産物（K1 + K2およびK1 + K3）およびPL発現ベクターであるpKRR826を制限酵素Eco RI + Bam HIで消化し、Chroma Spinカラ

50

ムを用いて精製し、そして一晩14℃にてT4DNAリガーゼ (Invitrogen) でライゲートした。ライゲーション産物を DH5aコンピテント細胞中に形質転換し、形質転換した細胞を30℃にてLB+アンピシリン寒天プレートでインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマーKR21 (配列番号17) およびKR18 (配列番号18) を用いてスクリーニングしてプラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物を、アガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquick PCR精製キットを用いて精製し、そしてプライマーKR21およびKR18で配列決定した。配列確証を済ませたクローンを同定した：(1)全長 (180アミノ酸) p15E遺伝子 (p15E) をコードするK1+K2インサートを運ぶpK121F/DH5a、および(2)切り詰めた (166アミノ酸) p15E遺伝子 (p15E) をコードするK1+K3インサートを持つpK1310B/DH5a。MiniprepプラスミドDNAを、各クローンの一晩培養から調製し、配列をプライマーKR21とKR18を用いて確証した。配列番号22はクローンpK121F/DH5a中の全長p15E組換えタンパク質のヌクレオチド配列を表し、配列番号23は対応するアミノ酸配列を示す。この組換えタンパク質 (p15E-PL) はenv p15EのN-末端メチオニンと180アミノ酸から成る。配列番号24はクローンpK1310B/DH5a中の切り詰めたp15E (p15E) 組換えタンパク質のヌクレオチド配列を記述し、配列番号25は対応するアミノ酸配列を掲げる。この組換えタンパク質 (p15E -PL) はenv p15EのN-末端メチオニンと166アミノ酸から成る。

【0157】

D. 15EF30-15ER32 PCR産物の、CKS発現ベクター-pJ0200中へのクローニング

図2A~2Cは、pJ1F2A/XL1の構築に関わるステップの模式図を示し、図3A~3CはpJ10B9A/XL1の構築に用いるステップを示す。クローンpJ1F2A/XL1とpJ10B9A/XL1の構築は次の通り達成した。

【0158】

2つのPCR反応液 (各50 μl) を、1 x 反応バッファー (0.2mMの各dNTP + 1.2mM MgSO₄ を含有する) 中のRT/白金TaqHiFi酵素ミックス (Invitrogen) 、60ngのプラスミドDNA、pK121F/DH5aまたはpK1310B/DH5a (実施例2、セクションCを参照) 、および0.4 μMの各プライマー15EF30 (配列番号19) と15ER32 (配列番号16) を用いて調製した。サイクリング条件は最初のステップ (2分、94℃にて) 、続いての30サイクル (94℃にて15秒、55℃にて30秒、および68℃にて60秒) から成った。反応液を次いで72℃にて7分間インキュベートし、そして4℃にて保持した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、そしてQIAquickPCR精製キット (Qiagen) を通して精製した。2つの15EF33-15ER32増幅産物 (p15Eおよびp15E) および発現ベクター、pJ0200をEco RI + Bam HIで消化し、Chroma Spinカラムを用いて精製し、そしてT4DNAリガーゼ (Invitrogen) でライゲートした (14℃一晩) 。ライゲーション産物をXL1-Blueコンピテント細胞中に形質転換し、形質転換した細胞を37℃にてLB+アンピシリン+1%グルコース寒天プレートでインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマーJF19 (配列番号20) およびJR20 (配列番号21) を用いてスクリーニングしてプラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物を、アガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquick PCR精製キットを用いて精製し、そしてプライマーJF19およびJR20で配列決定した。2つの配列を確証したクローンを同定した：(1)全長 (180アミノ酸) p15E遺伝子 (p15E) を運ぶpJ1F2A/XL1、および(2)切り詰めたp15E遺伝子 (p15E ; 166アミノ酸) を含有するpJ10B9A/XL1。MiniprepプラスミドDNAを各クローンの一晩培養から調製し、p15E遺伝子インサートの配列をプライマーJF19およびJR20で確証した。配列番号26はクローンpJ1F2A/XL1中のp15E-CKS組換え融合タンパク質のコード領域のヌクレオチド配列を提示する。対応するp15E-CKS (配列番号27) のアミノ酸配列はCKS/ポリリンカーの246アミノ酸とそれに続くenv p15Eの180アミノ酸から構成される。配列番号28はクローンpJ10B9A/XL1中の組換え融合タンパク質、15E -CKSのコード領域のヌクレオチド配列を記述する。組換えp15E -CKS融合タンパク質 (配列番号29) はCKS/ポリリンカーの246アミノ酸とそれに続くenv p15Eの166アミノ酸を含有する。

【0159】

(実施例4)

生来のXMRV env p15E遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築

図4はp15E-PET/DH5a、生来のXMRV env p15E遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築に関わるステップを図解する。このプラスミド構築物は、組換えタンパク質p15E-PET(アミノ酸配列を配列番号33に示す)を産生する。この組換えタンパク質は、37アミノ酸のプラスミドhis-タグ/ポリリンカーとそれに融合した201アミノ酸のXMRV env p15Eタンパク質とから成る。配列番号32はこの組換え融合タンパク質のヌクレオチド配列を提示する。DNA配列はプラスミドからの111塩基対とそれに続く生来のXMRVウイルスRNA由来のenv p15E遺伝子の603塩基対を含有する。プラスミドクローンpET28b-p15E/DH5aは次の通り構築した。

10

【0160】

全長XMRV菌株VP62を運ぶpcDNA3.1に基づくプラスミドクローンを、B. Dong et al、Proc. Natl. Acad. Sci. 104:1655 (2007)に記載の通り構築した。全長XMRV VP62 DNAインサートをウイルスRNAのRT-PCR増幅により作製した。PCR反応液(50 μ l)は、1x反応バッファー(2mMのMgSO₄および0.25mMの各dNTPを含有する)中のPfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)、VP62プラスミドクローンDNAの10⁵コピー、および0.2 μ Mの各プライマーp15-R1-G-5(配列番号30)およびp15-Xho-3(配列番号31)を用いて作製した。サイクリング条件は最初のステップ(2分、94 $^{\circ}$ Cにて)、続いての39サイクル(95 $^{\circ}$ Cにて30秒、55 $^{\circ}$ Cにて30秒、および68 $^{\circ}$ Cにて4.5分)から成った。反応液を次いで68 $^{\circ}$ Cにて10分間インキュベートし、そして4 $^{\circ}$ Cにて保持した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、そしてWizad SVゲルおよびPCR Clean-Up系(Promega)を用いて精製した。精製したp15-R1-G-5/p15-Xho-3 PCR産物(env p15E遺伝子)とpET-28b(+)発現ベクターを制限酵素Eco RI + Xho Iで消化し、Wizad SVゲルおよびPCR Clean-Up系(Promega)を用いてゲル精製し、そしてPET発現ベクターpET-28b(+) (Novagen)中にライゲートし、これをEco RI + Xho Iで消化し、そしてWizad SVゲルおよびPCR Clean-Up系(Promega)を用いてゲル精製した。精製したp15E遺伝子インサートと消化したpET-28b(+)ベクターをT4 DNAリガーゼでライゲートした。ライゲーション産物をDH5aコンピテント細胞中に形質転換し、そして形質転換した細胞を37 $^{\circ}$ CにてLB+カナマイシン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーをコロニーPCRにより、プラスミドインサートを増幅する2つの隣接するプラスミドプライマーT7プロモーター(配列番号34)およびT7ターミネーター(配列番号35)を用いてスクリーニングした。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、Wizad SVゲルおよびPCR Clean-Up System(Promega)を用いて精製し、T7プロモーターおよびターミネータープライマーを用いて配列決定した。pET28b-p15E/DH5aと名付けたクローンを同定した。このクローンの一晚培養からMiniprepプラスミドDNAを調製し、p15E遺伝子インサートの完全性をT7プロモーターおよびターミネータープライマーを用いて配列確認をした。配列番号32はクローンpET28b-p15E/DH5aにより発現されたp15E-PET組換え融合タンパク質のヌクレオチド配列を提示し、配列番号33は対応するアミノ酸配列を示す。

20

30

【0161】

(実施例5)

合成XMRV env gp70遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築

図5A~5Cは合成XMRV env gp70遺伝子を運ぶ3つのプラスミドクローンの構築に関わるステップを示す。gp70遺伝子はGenScript Corporation(Piscataway, NJ)で合成し、生来のXMRVウイルスコドンを変更して大腸菌コドンバイアスに一致させ、大腸菌宿主における組換えgp70タンパク質の発現レベルを増加した。合成遺伝子を次いでプラスミドベクターpUC57中にクローニングし、このプラスミドを用いて3つのenv gp70発現構築物を作った。

40

【0162】

A. pKABT_1-A3/DH5aの構築

図5Aに示すように、GenScriptより受領した、全長合成gp70遺伝子を運ぶpUC57に基づくプラスミドクローンおよびベクターpKRR826をEcoRI + BamHIで消化した。gp70インサート

50

をQIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてゲル精製した。消化したベクターをChroma Spinカラムを通して精製した。精製したgp70インサートおよびpKRR826ベクターをT4 DNAリガーゼでライゲートした。ライゲーション産物をDH5a中に形質転換し、形質転換した細胞を30℃にてLB+アンピシリン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマー-pKR34-F (配列番号36) およびpKR51-R (配列番号37) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquickPCR精製キット (Qiagen) を通して精製し、プライマー-pKR34-FおよびpKR51-Rを用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pKABT_1-A3/DH5Dと名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、gp70遺伝子インサートの配列を、

10

【 0 1 6 3 】

B. pJABT_1-B2/XL1の構築

図5Bに示すように、pUC57からのゲル精製したgp70遺伝子インサートを、QIAGEN OneStep RT-PCRキット (Qiagen) を使用し、プライマー-ABT1-gp70cks-F (配列番号40) およびABT1-gp70cks-R (配列番号41) を用いて、製造業者プロトコルに従い増幅した。増幅産物をその後、アガロースゲル電気泳動により分析しかつQIAquick PCR精製キットを通して精製した。精製したPCR産物とpJ0200ベクターDNAをEcoRI+BamHIで消化し、Chroma Spinカラム上で精製し、そしてT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をXL1-Blue中に形質転換し、形質転換した細胞を37℃にてLB+アンピシリン+1%グルコース寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマー-JF19 (配列番号20) およびJR20 (配列番号21) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquick PCR精製キットを通して精製し、プライマー-JF19、JR20、ABT1-gp70cks-FおよびABT1-gp70cks-Rを用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pJABT_1-B2/XL1と名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNA

20

30

【 0 1 6 4 】

C. pEABT_1-D2/DH5aの構築

図5Cに図解したように、pUC57からのゲル精製したgp70遺伝子インサートを、QIAGEN OneStep RT-PCRキット (Qiagen) およびプライマー-ABT1-gp70cks-F (配列番号40) およびABT1-gp70xho-R (配列番号44) を用いて増幅した。増幅産物を、アガロースゲル電気泳動により分析しかつQIAquick PCR精製キットを通して精製した。精製したPCR産物とpET-28b (+)ベクターをEcoRI+XhoIで消化し、Chroma Spinカラム上で精製し、そしてT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をDH5a中に形質転換し、形質転換した細胞を37℃にてLB+カナマイシン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマー-T7プロモーター (配列番号34) およびT7ターミネーター (配列番号35) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquick PCR精製キットを通して精製し、プライマー-T7プロモーター、T7ターミネーター、ABT_1-seq2-F (配列番号45)、ABT_1-seq3-F (配列番号46)、ABT_1-seq1-R (配列番号47) およびABT_1-seq2-R (配列番号48) を用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、

40

50

pEABT_1-D2/DH5aと名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、gp70遺伝子インサートの配列を確認した。配列番号49はクローンpEABT_1-D2/DH5aにおいて発現されたp70-PET融合タンパク質のヌクレオチド配列を示す。pEABT_1-D2/DH5aがコードする組換えp70-PET融合タンパク質（p70-PET）は、プラスミドhis-タグ/ポリリンカーの36アミノ酸とそれに続く融合したenv gp70ウイルスタンパク質の414アミノ酸から構成される（配列番号50）。

【0165】

（実施例6）

合成XMRV gag p15遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築

全長XMRV gag p15遺伝子をGenScript Corporationで合成し、実施例5に記載したようにpUC57中に挿入した。この合成p15遺伝子は生来のXMRVウイルスコドンを変更して大腸菌コドンバイアスに一致させ、細菌宿主における組換えp15タンパク質の発現レベルを増加した。pUC57に基づくプラスミドクローンを用いて2つのgag p15発現構築物をクローニングした。

【0166】

A. pKABT_2-D5/DH5aの構築

図5Aに図解したように、全長合成gag p15遺伝子を運ぶ、pUC57に基づくGenScriptより得たプラスミドクローンをEcoRI + BamHIで消化した。消化したp15遺伝子インサートをQIAquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いてゲル精製した。ベクターpKRR826をEcoRI + BamHIで消化し、ChromaSpinカラムで精製した。消化したgag p15インサートとpKRR826ベクター調製物をT4 DNAリガーゼでライゲートした。ライゲーション産物をDH5a中に形質転換し、形質転換した細胞を30℃にてLB + アンピシリン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマーpKR34-F（配列番号36）およびpKR51-R（配列番号37）を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquickPCR精製キットを用いて精製し、プライマーpKR34-FとpKR51-Rを用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pKABT_2-D5/DH5aと名付けたクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、p15遺伝子インサートの配列を確認した。配列番号51はクローンpKABT_2-D5/DH5aにおいて発現されたp15組換えタンパク質のヌクレオチド配列を示す。pKABT_2-D5/DH5aがコードする非融合組換えタンパク質（p15-PL）は、gag p15タンパク質の129アミノ酸（生来のウイルスのN-末端メチオニンを含む）とそれに続く6ヒスチジン残基から構成される（配列番号52）。

【0167】

B. pJABT_2-C3/XL1の構築

図5Bに概説したように、pUC57からのゲル精製したgag p15遺伝子インサートを、QIAGEN OneStep RT-PCRキット（Qiagen）を使用し、プライマーABT2-p15cks-F（配列番号53）およびABT2-p15cks-R（配列番号54）を用いて、製造業者プロトコルに従い増幅した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquick PCR精製キットを通して精製した。精製したPCR産物とpJ0200ベクターDNAをEcoRI + BamHIで消化し、Chroma Spinカラム上で精製し、そしてT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をXL1-Blue中に形質転換し、形質転換した細胞を37℃にてLB + アンピシリン + 1%グルコース寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマーJF19（配列番号20）およびJR20（配列番号21）を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquick PCR精製キットを通して精製し、プライマーJF19およびJR20を用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pJABT_2-C3/XL1と名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、p15遺伝子インサートを再びもう1回、プライマーJF19およびJR20での配列決定により確認した。配列番号55はクローンpJABT_2-C3/XL1において発現されたgag p15-CKS融合タンパク質のヌクレオチド配列を示す。pJABT_2-C3/XL1がコードする組換え融合タンパク質（

10

20

30

40

50

p15-CKS) は、CKSおよびポリリンカーの246アミノ酸と融合したgag p15ウイルスタンパク質の129アミノ酸およびそれに続く6ヒスチジン残基から構成される(配列番号56)。

【0168】

(実施例7)

合成XMRV gag p12遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築

全長XMRV gag p12遺伝子をGenScript Corporation (Piscataway, NJ) で合成し、実施例5に記載のようにpUC57中に挿入した。この合成gag p12遺伝子は生来のXMRVウイルスコドンを変更して大腸菌コドンバイアスに一致させ、大腸菌宿主におけるp12組換えタンパク質の発現レベルを増加した。pUC57に基づくプラスミドクローンをDNAの供給源として用いて2つのgag p15発現構築物をクローニングした。

【0169】

A. pJABT_3-E4/XL1の構築

図5Bに図解したように、pUC57からのゲル精製したp12遺伝子インサートを、QIAGEN One Step RT-PCRキット (Qiagen) を使用し、プライマー-ABT3-p12cks-F (配列番号57) およびABT3-p12cks-R (配列番号58) を用いて、製造業者プロトコルに従い増幅した。増幅産物をその後、アガロースゲル電気泳動により分析しかつQIAquick PCR精製キットを通して精製した。精製したPCR産物とpJ0200ベクターDNAをEco RI + Bam HIで消化し、Chroma Spin カラム上で精製し、そしてT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をXL1-Blue中に形質転換し、形質転換した細胞を37℃にてLB+アンピシリン+1%グルコース寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマー-JF19 (配列番号20) およびJR20 (配列番号21) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquick PCR精製キットを通して精製し、プライマー-JF19およびJR20を用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pJABT_3-E4/XL1と名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、gag p12遺伝子インサートの配列を確認した。配列番号59はクローンpJABT_1-B2/XL1において発現されたp12-CKS融合タンパク質のヌクレオチド配列を示す。pJABT_3-E4/XL1がコードする組換え融合タンパク質 (p12-CKS) は、CKS/ポリリンカーの246アミノ酸と融合したgag p12ウイルスタンパク質の84アミノ酸およびそれに続く6ヒスチジン残基から構成される(配列番号60)。

【0170】

B. pEABT_3-B3/DH5aの構築

図5Cに図解したように、pUC57からのゲル精製したp12遺伝子インサートを、QIAGEN One Step RT-PCRキット (Qiagen) およびプライマー-ABT3-p12cks-F (配列番号57) およびABT3-p12xho-R (配列番号61) を用いて増幅した。増幅産物を、アガロースゲル電気泳動により分析しかつQIAquick PCR精製キットを通して精製した。精製したPCR産物とpET-28b(+)ベクターDNAをEco RI + Xho Iで消化し、Chroma Spinカラム上で精製し、そしてT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をDH5a中に形質転換し、形質転換した細胞を37℃にてLB+カナマイシン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマー-T7プロモーター (配列番号34) およびT7ターミネーター (配列番号35) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquick PCR精製キットを通して精製し、プライマー-T7プロモーターおよびT7ターミネーターを用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pEABT_3-B3/DH5aと名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、gag p12遺伝子インサートの配列をプライマー-T7プロモーターおよびT7ターミネーターを用いて確認した。配列番号62はクローンpEABT_3-B3/DH5aにおいて発現されたgag p12-PET融合タンパク質のヌクレオチド配列を示す。pEABT_3-B3/DH5aがコードする組換え融合タンパク質 (p12-PET) は、プラスミドhis-タグ/ポリリンカーの36アミノ酸とそれに続く融合したgag p12ウイルスタンパク質の84アミノ酸から構成される(配列番号63)。

【 0 1 7 1 】

(実施例 8)

XMRV gag p30遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築

全長XMRV gag p30遺伝子はGenScript Corporation (Piscataway, NJ) で合成し、生来のXMRVウイルスコドンを変更して大腸菌コドンバイアスに一致させ、細菌宿主におけるp30組換えタンパク質の発現レベルを増加した。この合成遺伝子を用いてCKS融合発現構築物(A)を作製した。

【 0 1 7 2 】

A . pJABT_4-G1/XL1の構築

図5Bに概説したように、合成gag p30遺伝子をpUC57からEco RI + Bam HIで切り出し、QIAquickゲル抽出キット (Qiagen) を用いてゲル精製し、そしてQIAGEN OneStep RT-PCRキット (Qiagen) およびプライマー-ABT4-p30cks-F (配列番号64) およびABT4-p30cks-R (配列番号65) を用いて増幅した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析しかつQIAquick PCR精製キットを通して精製した。精製したPCR産物とpJ0200ベクターDNAをEco RI + Bam HIで消化し、Chroma Spin カラム上で精製し、そしてT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をXL1-Blue中に形質転換し、形質転換した細胞を37 にてLB+アンピシリン+1%グルコース寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマー-JF19 (配列番号20) およびJR20 (配列番号21) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。

【 0 1 7 3 】

増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquick PCR精製キットを通して精製し、プライマー-JF19、JR20、ABT4-p30cks-FおよびABT4-p30cks-Rを用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pJABT_4-G1/XL1と名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、gag p30遺伝子インサートの配列を確認した。配列番号66はクローンpJABT_4-G1/XL1において発現されたp30-CKS融合タンパク質のヌクレオチド配列を示す。pJABT_4-G1/XL1がコードする組換え融合タンパク質 (p30-CKS) は、CKS/ポリリンカーの246アミノ酸と融合したgag p30ウイルスタンパク質の全263アミノ酸およびそれに続く6ヒスチジン残基から構成される (配列番号67) 。

【 0 1 7 4 】

B . pKp30-B2/DH5aの構築

XMRV菌株VP62の全gag遺伝子およびpol遺伝子の5'部分を運ぶプラスミドクローンAM-2-9を、A. Urisman et al., PloS Pathogens 2:e25 (2006)が記載したように構築した。ほぼ4kb VP62 DNAインサートをウイルスRNAのRT-PCRにより作製し、ベクターpCR2.1中にクローニングした。図5Aに図解したように、生来のgag p30遺伝子をクローンAM-2-9からQIAGEN OneStep RT-PCRキット (Qiagen) およびプライマー-p30F-EcoR1metb (配列番号68) およびp30R-His (配列番号69) を用いて製造業者プロトコルに従い増幅した。gag p30遺伝子PCR産物をゲル精製した。精製した遺伝子インサートおよびpKRR826ベクターDNAをEco RI + Bam HIで消化し、Chroma Spin カラムで精製し、そしてT4 DNA リガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をDH5a中に形質転換し、形質転換した細胞を30 にてLB+アンピシリン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマー-pKR34-F (配列番号36) およびpKR51-R (配列番号37) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquickPCR精製キット (Qiagen) を通して精製し、プライマー-pKR34-F、pKR51-R、p30F-seq2 (配列番号70) およびp30R-seq2 (配列番号71) を用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pKp30-B2/DH5aと名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、生来のgag p30遺伝子インサートの配列を確認した。配列番号72はクローンpKp30-B2/DH5aにおいて発現されたgag p30組換えタンパク質のヌクレオチド配列を示す。pKp30-B2/DH5aがコードする組換えタンパク質 (p30-PL) は、N-末端メチオニンとそれに続いてga

10

20

30

40

50

g p12の2つのC-末端のアミノ酸、それと融合したgag p30ウイルスタンパク質の全263アミノ酸、および6つのカルボキシ-末端ヒスチジン残基から構成される（配列番号73）。

【0175】

（実施例9）

合成XMRV gag p10遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築

全長XMRV gag p10はGenScript Corporation (Piscataway, NJ) で合成し、実施例5に記載したようにpUC57中に挿入した。この合成gag p10遺伝子は、生来のXMRVウイルスコドンを変更して大腸菌コドンバイアスに一致させ、大腸菌におけるp10組換えタンパク質の発現レベルを増加した。pUC57に基づくプラスミドクローンをDNAの供給源として利用し、次の2つのgag p10発現クローンを作った。

【0176】

A. pJABT_5-D5/XL1の構築

図5Bに示すように、pUC57からのゲル精製したgag p10遺伝子インサートを、QIAGEN One Step RT-PCRキット (Qiagen) を使用し、プライマーABT5-p10cks-F (配列番号74) およびABT5-p10cks-R (配列番号75) を用いて、製造業者プロトコルに従い増幅した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析しかつQIAquick PCR精製キットを用いて精製した。精製したPCR産物とpJ0200ベクターDNAをEco RI + Bam HIで消化し、Chroma Spinカラム上で精製し、そしてT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をXL1-Blue中に形質転換し、形質転換した細胞を37℃にてLB+アンピシリン+1%グルコース寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマーJF19 (配列番号20) およびJR20 (配列番号21) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquick PCR精製キットを用いて精製し、プライマーJF19およびJR20を用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pJABT_5-D5/XL1と名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、gag p10遺伝子インサートの配列を確認した。配列番号76はクローンpJABT_5-D5/XL1において発現されたgag p10-CKS融合タンパク質のヌクレオチド配列を示す。pJABT_5-D5/XL1がコードする組換え融合タンパク質 (p10-CKS) は、CKS/ポリリンカーの246アミノ酸とそれに融合したgag p10ウイルスタンパク質の56アミノ酸およびそれに続く6ヒスチジン残基から構成される（配列番号77）。

【0177】

B. pEABT_5-E4/DH5aの構築

図5Cに図解したように、pUC57からのゲル精製したgag p10遺伝子インサートを、QIAGEN OneStep RT-PCRキット (Qiagen) およびプライマーABT5-p10cks-F (配列番号74) およびABT5-p10xho-R (配列番号78) を用いて増幅した。増幅産物を、アガロースゲル電気泳動により分析しかつQIAquick PCR精製キットを通して精製した。精製したPCR産物とpET-28b (+)ベクターをEco RI + Xho Iで消化し、Chroma Spinカラム上で精製し、そしてT4 DNAリガーゼを用いてライゲートした。ライゲーション産物をDH5a中に形質転換し、形質転換した細胞を37℃にてLB+カナマイシン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーを、コロニーPCRにより2つの隣接するプラスミドプライマーT7プロモーター (配列番号34) およびT7ターミネーター (配列番号35) を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により評価し、QIAquick PCR精製キットを通して精製し、プライマーs T7プロモーターおよびT7ターミネーターを用いて配列決定した。配列決定結果に基づいて、pEABT_5-E4/DH5aと名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、gp10遺伝子インサートの配列を立証した。配列番号79はクローンpEABT_5-E4/DH5aにおいて発現されたgag p10-PET融合タンパク質のヌクレオチド配列を示す。pEABT_5-E4/DH5aがコードする組換えタンパク質 (p10-PET) は、プラスミドhis-タグ/ポリリンカーの36アミノ酸とそれに続くgag p10ウイルスタンパク質の56アミノ酸から構成される（配列番号80）。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 8 】

(実施例 1 0)

大腸菌株に発現したXMRV組換えタンパク質の調製と精製

特に断らない限り、以下は大腸菌中のプラスミド構築物から発現されたXMRV組換えタンパク質を調製しかつ精製する一般的プロトコルである。

【 0 1 7 9 】

A. XMRV組換えタンパク質構築物を伴う大腸菌株の増殖と誘導(1)pKRR826に基づく構築物

pKRR826に基づく構築物を保持するDH5aの培養を、寒天プレートからの単一コロニーを100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを補充した10ml LBブロス (Sigma-Aldrich) を含有する125mlエルレンマイヤーフラスコ (Corning Inc., Corning, NY) 中に接種することにより調製した。このフラスコを振とう軌道型インキュベーター内に置いて、一晚 (約16時間) 30 $^{\circ}\text{C}$ にてインキュベートした。4mlの一晚培養物を、400mlのLBブロス + 100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含有する無菌2リットルフラスコ (Bellco, Vineland, NJ) へ移した。培養物を振とう軌道型エアークューベーター中で30 $^{\circ}\text{C}$ にて $\text{OD}_{600} = 0.7 \sim 0.9$ の細胞密度に到達するまでインキュベートした。細胞を次いで42 $^{\circ}\text{C}$ にて6~8時間誘導した。誘導期間後、細胞を遠心分離により収穫し、LB上清を捨てた。細胞ペレットをさらなる処理まで-70 $^{\circ}\text{C}$ にて貯蔵した。

10

【 0 1 8 0 】

(2)pJ0200に基づく構築物

pJ0200に基づく構築物を有するXL1-Blueの一晚培養物を、寒天プレートからの単一コロニーを100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン + 1%グルコースを補充した10ml LBブロス (Sigma-Aldrich) を含有する125 mlエルレンマイヤーフラスコ中に接種することにより調製した。フラスコを振とう軌道型インキュベーター内に置いて、一晚 (約16時間) 30 $^{\circ}\text{C}$ にてインキュベートした。4mlの一晚培養物を、400mlのLBブロス + 100 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを含有するグルコース無添加の無菌2リットルBellcoフラスコへ移した。培養物を振とう軌道型エアークューベーター中で37 $^{\circ}\text{C}$ にて $\text{OD}_{600} = 0.7 \sim 0.9$ の細胞密度に到達するまでインキュベートした。細胞を次いで1mMのIPTG (イソプロピルチオガラクトピラノシド) (Sigma-Aldrich) で6~8時間誘導した。誘導期間後、細胞を遠心分離により収穫し、LB上清を捨てた。細胞ペレットをさらなる処理まで-70 $^{\circ}\text{C}$ にて貯蔵した。

20

30

【 0 1 8 1 】

(3)pET-28b(+)に基づく構築物

pET-28b(+)に基づく構築物を保持するDH5aの一晚培養物から調製したminiprepプラスミドDNAを用いて、大腸菌BL21 (DE3) コンピテント細胞 (Novagen) を形質転換した。形質転換した細胞、例えばpET28b-p15E/BL21 (DE3) を37 $^{\circ}\text{C}$ にて、1%グルコースを補充したLB + 50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン寒天プレート上でインキュベートした。コロニーを単離のために3回再ストリークした。pET-28b(+)に基づく構築物を有するBL21 (DE3) の一晚培養物を、寒天プレートからの単一コロニーを50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン + 1%グルコースを補充した10ml LBブロス含有する125mlエルレンマイヤーフラスコ中に接種することにより調製した。フラスコを振とう軌道型インキュベーター内に37 $^{\circ}\text{C}$ にて置き、一晚 (約16時間) インキュベートした。4mlの一晚培養物を、400mlのLBブロス + 50 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシンを含有する、グルコース無添加の無菌2リットルBellcoフラスコへ移した。培養物を振とう軌道型エアークューベーター中で37 $^{\circ}\text{C}$ にて $\text{OD}_{600} = 0.7 \sim 0.9$ の細胞密度に到達するまでインキュベートした。

40

【 0 1 8 2 】

細胞を次いで1mMのIPTG (Sigma-Aldrich) で6~8時間誘導した。誘導期間後、細胞を遠心分離により収穫し、LB上清を捨てた。細胞ペレットをさらなる処理まで-70 $^{\circ}\text{C}$ にて貯蔵した。

【 0 1 8 3 】

B. 大腸菌中に不溶の封入体として産生されるXMRV組換えタンパク質の単離と可溶化

50

凍結細胞を解凍し、ペレット1グラム当たり10mlの溶解バッファー（50mM Tris-HCl、pH 8.0、10mM EDTA、150mM NaCl、5% Triton X-100、8% スクロースおよび1mM PMSF（フェニルメタンスルホニルフルオリド）（Sigma-Aldrich）を含有する）を用いて完全に再懸濁した。リゾチームを細胞懸濁液に0.3 mg/mlの最終濃度に加え、その混合物を30分間、氷上でインキュベートして細胞を溶解した。その後MgCl₂およびDNase Iをそれぞれ15mM および単位/mlだけ、溶解した粘性溶液に加え、その混合物を1時間37℃にてインキュベートしてゲノムDNAを消化した。大腸菌内に不溶性封入体として産生した組換えタンパク質を、可溶性細胞タンパク質から遠心分離により分離した。ペレット化した封入体を洗浄し、かつ逐次、遠心分離して、(1)溶解バッファー；(2)水；(3)50mMリン酸ナトリウムバッファー、pH7.0、1M NaCl、5% TritonX-100および2% デオキシコール酸ナトリウムを含有する溶液；および(4)50mMリン酸ナトリウムバッファー、pH7.0を得た。最後に、洗浄した封入体を6Mグアニジン-HCl、50mM Tris-HCl、pH 8.0および0.1% β-メルカプトエタノールの溶液中で一晩4℃にて可溶化した。可溶化した組換えタンパク質を次いで遠心分離により透明にした。

【0184】

C. S-200サイズ排除クロマトグラフィによるXMRV組換えタンパク質の精製

可溶化した組換えタンパク質を、50 mM Tris-HCl、pH 8.0、6M尿素および0.1% β-メルカプトエタノールを含有するバッファーで平衡化したセファクリルS-200サイズ排除カラム（Pharmacia, Piscataway, NJ）に通した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いてS-200カラムからの画分を評価し、組換えタンパク質を含有する画分をプールして4℃にて貯蔵した。

【0185】

D. His-結合ニッケルアフィニティクロマトグラフィによるXMRV組換えタンパク質の精製

プールしたS-200カラムからの組換えタンパク質を、20 mM Tris-HCl、pH 7.9、0.5 M NaCl、5 mMイミダゾール、6M尿素および1mM THP（トリスヒドロキシプロピルホスフィン）を含有する結合バッファー（Novagen）で平衡化したHis-結合ニッケルカラム（Novagen）に通した。結合したタンパク質を10カラム体積の結合バッファーで洗浄し、次いで6カラム体積の洗浄バッファー（20mM Tris-HCl、pH 7.9、0.5M NaCl、20mMイミダゾール、6M尿素および1mM THP）（Novagen）で洗浄し、そして最後に溶出バッファー（20mM Tris-HCl、pH 7.9、0.5M NaCl、1Mイミダゾール、6M尿素および1mM THP）（Novagen）で溶出した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いてニッケルカラムから溶出した画分を評価し、組換えタンパク質を含有する画分をプールした。プールした精製組換えタンパク質を室温にて一晩（16～18時間）1×リン酸緩衝食塩水（PBS；Invitrogen）、pH7.4、1% SDSおよび5mM β-メルカプトエタノールのバッファーに対して透析し、次いで、再び一晩、1×PBS、pH 7.4、0.1% SDSおよび5mM β-メルカプトエタノールを含有するバッファーに対して透析を行った。精製タンパク質を含有する透析した溶液のアリコートを取り、さらなる使用まで-70℃にて貯蔵した。

【0186】

E. XMRV env p15E⁻-CKS組換えタンパク質の調製

XMRV組換えタンパク質env p15E⁻-CKSを発現するプラスミド構築物pJ10B9A（実施例3、セクションD）を運ぶXL1-Blue細胞を、37℃にてLBプロス+アンピシリン中で増殖し、本実施例セクションA2に記載の通り1mM IPTGで誘導した。細胞を溶解し、封入体を本実施例セクションBに記載の通り処理した。ペレット化タンパク質を6Mグアニジン-HCl溶液中で可溶化し、次いで本実施例セクションCに記載の通りセファクリルS-200サイズ排除カラム上で分画した。S-200カラムクロマトグラフィの後、プールした精製p15E⁻-CKS融合タンパク質を、本実施例セクションDに記載の通り、PBS+SDS バッファーに対して透析した。透析したタンパク質のアリコートを取り、将来の使用に備えて-70℃にて貯蔵した。

【0187】

（実施例11）

XMRVピリオンおよびウイルスタンパク質の特徴付け

10

20

30

40

50

電子顕微鏡分析はDU145前立腺癌細胞から産生したXMRV粒子はおよそ100～120nm直径であることを示した。ウイルス粒子の形態学はガンマ-レトロウイルスに典型的なものであって、凝縮した中央コアとかるうじて可視性のスパイクを伴うエンベロープを含む(図6)。

【0188】

図7は本発明により同定したXMRVの抗原タンパク質を示す。XMRVは公知のMuLCVとほぼ95%全体ヌクレオチド配列同一性を共有するので、Friend MuLVに対する(抗MuLV pAb、
-Fと省略する; ATCC、VR-1537AS-Gt(登録商標))およびRauscher-MuLVのエンベロープ糖タンパク質gp69/71に対する(抗Env pAb; ATCC、VR-1521)ヤギポリクローナル抗体をウェスタンブロット(WB)分析に用いた。抗MuLV pAbはXMRVの全ての構造タンパク質を検出することができ、それには、WB ストリップ上の4つのgagタンパク質(p30、p15、p12、およびp10)および2つのenvタンパク質(p15Eおよびgp70)が含まれた。WB分析に基づくと、全てのウイルスタンパク質について明確に分解可能なバンドが明らかであったが(図7)、env gp70は例外であった。env gp70は、62～80kDaの間の領域を不明瞭にするgag前駆体p68/p80との抗体結合の所為で、抗MuLV pAbにより可視性でなかった(図7)。しかし抗Env pAbによると、gp70は明らかに検出され、70kDaにおいて二重バンドを示した(図8、ストリップ7)。以下に記載したWBと組換えXMRV抗原によるWB阻害とを組み合わせ使用し、各タンパク質バンドを同定した。

10

【0189】

スクロース勾配で精製したXMRVウイルス粒子(ABI)からWBストリップを調製した。ウイルス粒子を、150mM NaClおよび0.5% Tritonを含有する10mM Tris-HCl (pH7.5)バッファで100 にて10分間溶解した。ウイルス溶解液タンパク質をドデシルスルホン酸ナトリウム(SDS)の存在のもとでの4～12% NuPAGE Bis-Tris 2次元ゲル(Invitrogen、Carlsbad、CA)上での電気泳動により分離した。ゲル上のタンパク質バンドを電気泳動により、製造業者の取扱説明書に従い二弗化ポリビニリデン(PVDF)膜(Invitrogen)へ転写した。PVDF膜を、カゼインを含有するバッファを用いてブロックし、次いで2mmストリップに切断し、2～8 にて貯蔵した。

20

【0190】

WBを、WesternBreezeキット試薬(Invitrogen)を用いて製造業者取扱説明書に従い実施した。概説すると、ウイルスタンパク質ストリップを2mlのヤギ抗MuLVpAbまたは抗EnvpAb(1:1000に希釈したもの)と共に室温にて1時間インキュベートした。4回連続してキット抗体洗浄溶液による5分間洗浄を行った後、ストリップを次いでアルカリホスファターゼとコンジュゲートした抗ヤギ抗体と共に30分間室温にてインキュベートした。ストリップを記載したように洗浄し、色素生産性基質溶液を加えた。ヤギ抗MuLV pAbと交差反応性であるXMRV溶解液タンパク質は紫色のバンドを発生した。図7に示したように、4つの主なタンパク質が62、40、30および15kDに、ならびにいくつかのマイナーなタンパク質が14kDおよび6kDに検出された。

30

【0191】

抗原性タンパク質の性質をさらに、精製組換えXMRVタンパク質を用いてWB阻害により明確にした(組換えタンパク質の構築および生産は実施例3～10に記載した)。組換えXMRVタンパク質、env gp70、p70、p15E、gag p30、p15、p12およびp10を、個々に、ヤギ抗MuLVpAb(1:2000に希釈したもの)または抗Env pAb(1:3000に希釈したもの)と共に室温にて30分間インキュベートし、特異的抗体をブロックした。生来のウイルスタンパク質を含有するWBストリップを次いで混合物中に加え、1時間室温にてインキュベートした。引き続きの洗浄、抗ヤギ-APコンジュゲートの付加、および発色ステップは上記の通りであった。図8に示すように、XMRV組換えタンパク質の存在におけるWB上の特異的バンドの低下(強度の低下)または消滅に基づいて、XMRVタンパク質を同定した。

40

【0192】

図8のストリップ2は、組換えタンパク質、gag p15(p15-CKS = 配列番号56)が存在すると特異的な抗体結合阻害が起こることを示す。100ug/mlの濃度において、組換えタンパク

50

質p15-CKSは抗gag p15抗体の生来のgag p15タンパク質との結合を特異的に阻害し、ストリップ1と比較して15kDの主なバンドの強度の90%減少をもたらす。従って、主な15kDバンドをXMRVのgag p15タンパク質と同定した。このデータはまた、組換えgag p15-CKSが生来のgag p15タンパク質と、エピトープ提示および抗gag p15抗体との結合について類似していることを実証する。

【0193】

図8のストリップ3は、組換えタンパク質、env p15E (p15E-PET = 配列番号33) による特異的阻害を示す。100ug/mlの濃度において、組換えenv p15E-PETは抗体の生来のenv p15Eタンパク質との結合を特異的に阻害し、ストリップ1と比較して14kDのバンドの完全な消滅をもたらす。従って、主な14kDバンドをXMRVのenv p15Eタンパク質と同定した。このデータはまた、組換えenv p15E-PETが生来のenv p15Eタンパク質と、エピトープ提示および抗env p15E特異的抗体との結合について類似していることを実証する。

10

【0194】

図8のストリップ4は、組換えgag p30 (p30-PL = 配列番号73) タンパク質による特異的阻害を示す。200ug/mlの濃度において、組換えgag p30-PLは抗gag p30抗体の生来のgag p30タンパク質およびその前駆体との結合を特異的に阻害し、ストリップ1と比較して多重バンド (30kD、40~48kDおよび65~75kD) の実質的な低下または完全な消滅をもたらす。従って、主な30kDバンドおよび他のバンド (40~48kDおよび65~75kD) をXMRV gag p30タンパク質および前駆体と同定した。このデータはまた、組換えgag p30-PLが生来のgag p30と、エピトープ提示および抗gag p30特異的抗体との結合について類似していることを実証する。

20

【0195】

図8のストリップ5は、組換えgag p10 (p10-CKS = 配列番号77) タンパク質による特異的阻害を示す。100ug/mlの濃度において、組換えタンパク質p10-CKSは抗gag p10抗体の生来のgag p10タンパク質との結合を特異的に阻害し、ストリップ1と比較して6kDのバンドの完全な消滅をもたらす。従って、6kDバンドをXMRVのgag p10タンパク質と同定した。これらのデータはまた、組換えgag p10-CKSが生来のgag p10タンパク質と、エピトープ提示および抗gag p10抗体との結合について本質的に等価であることを実証する。

【0196】

図8のストリップ6は、組換えgag p12 (p12-CKS ; 配列番号60) タンパク質による特異的阻害を示す。44ug/mlの濃度において、組換えタンパク質p12-CKSは抗gag p12特異的抗体の生来のgag p12タンパク質との結合を特異的に阻害し、ストリップ1と比較して12kDのバンドの完全な消滅をもたらす。従って、12kDバンドをXMRVのgag p12タンパク質と同定した。これらのデータはまた、組換えgag p12-CKSが生来のgag p12タンパク質と、エピトープ提示および特異的抗gag p12抗体との結合について本質的に等価であることを実証する。

30

【0197】

図8のストリップ8および9は、組換えgp70 (gp70 ; 配列番号102) およびenv p70 (p70-PET ; 配列番号50) による、gp70タンパク質に対する抗Env pAb結合の特異的阻害を示す。5ug/mlの濃度において、組換えgp70またはp70の付加は、生来のenv gp70ウイルスタンパク質に対する抗Env pAb結合の特異的阻害をもたらし、ストリップ7と比較して70kDの二重バンドの消滅をもたらした (gp70はp70-PETより優れた阻害を示した)。これは二重バンドがXMRVのenv gp70であることを立証した。このデータはまた、組換えgp70およびp70が生来のenv gp70タンパク質と、エピトープ提示および抗env gp70との特異的結合についてまったく等価であることを実証した。

40

【0198】

総括すると本明細書に記載したデータは、前立腺癌細胞株DU145が産生したXMRV粒子が4種の成熟コア (gag) タンパク質 (p30、p15、p12、およびp10) および2種のenvタンパク質 (p15Eおよびgp70) を含有することを実証する。加えて本発明は、XMRV溶解液タンパク質を用いるWB方法が2種のenvタンパク質 (p15Eおよびgp70) および4種のgagタンパク質 (

50

p15、p12、p30およびp10) に対する抗体を検出する能力を有することを実証する。

【0199】

さらに本発明は、組換えXMRV抗原、2種のenvタンパク質 (p15Eおよびgp70) および4gagタンパク質 (p15、p12、p30およびp10) が対応する生来のウイルスタンパク質とまったく等価であることを見えることを実証する。

【0200】

同定したXMRVの生来のウイルスタンパク質をさらに、次の標準的精製技法、例えばアフィニティークロマトグラフィ、HPLC、分取ゲル電気泳動などに従って実質的に純粋な形態で単離することができる。精製したXMRVの生来のウイルスタンパク質を次いで生体サンプル中の抗XMRV抗体の存在を検出する診断試薬として使用し、前記サンプルを抗原性ウイルスタンパク質と反応させて陽性抗原-抗体複合体の形成をXMRV感染の指標とすることができる。抗原-抗体反応は当業者にとって周知であるいずれかの標準免疫学的技法、例えば、ウェスタンブロット、ELISA、免疫蛍光、組織免疫学試験などにより検出することができる。

【0201】

(実施例12)

アカゲザル (Rhesus Macaques) のXMRVによる実験的感染

A. アカゲザルの選択

3匹の若年成熟アカゲザル (rhesus macaque) (>3年齢 ; >6kgの体重) を the Yerkes National Primate Research Center colony of Emory Universityから選択した。これらは2匹の雄 (R11-10およびRLq-10) と1匹の雌 (RYh-10) を含んだ。3匹のサルは全てSIV、SRVおよびSTLVに対して無曝露でありかつXMRVに対する交差反応性抗体を欠くことが (血清学に基づいて) 文書で証明されていた。部分的MHC分類に基づいて、動物はMamu B.08対立遺伝子または組み合わせMamu A.01/B.17 (他のレトロウイルス、サル免疫不全ウイルスのコントロールの改善に関連する) を含有しなかった。Yerkes main stationの許容に先立つ検疫後、動物はBiosafety レベル 2+区域で飼育された。

【0202】

B. XMRVによる実験感染

基線サンプルの採取後、第0日に、3匹の動物にそれぞれ 3.67×10^5 TCID₅₀/ml XMRVを含有する培養上清10mlを静脈内に接種した。1匹のマカクザル (RLq-10) は第144日に犠牲にした。持続的感染を保証するために、第158日に2匹のマカクザル (R11-10およびRYh-10) に、精製XMRVウイルスの 3.67×10^5 TCID₅₀/mlを再接種した。XMRVを、先に記載 [Dong et al, PNAS 104 : 1655-1660 (2007)] の通り、DU-145 (ヒト前立腺癌細胞株) で培養した。

【0203】

C. サンプル採取

血液を各霊長類から、最初の接種 (PI) 後の第3、4、5、7、9、11、14、18、21、28、35、42、56、73、93、113、132、158日に、および2回目の摂取後の第3、5、7、9、11、13、21、28、34、52、117日に採取した。血液サンプルは、抗凝固剤、EDTAを含有するチューブを用いて静脈穿刺により採取した。チューブを最初250gで10分間 / 室温にて遠心分離し、血漿を0.5mlアリコートで採集し、そして-80 °Cにて貯蔵し、次いで定量RT-PCR、ウェスタンブロットおよびEIAにより分析した。

【0204】

(実施例13)

XMRVを接種したアカゲザルのウェスタンブロット分析

A. 生来のXMRVウイルスタンパク質を用いるウェスタンブロット分析

XMRV接種マカクザル (R11-10、RLq-10およびRYh-10) からの連続採血を、最初に生来のウイルスタンパク質を用いて分析した。WBストリップを実施例11に記載の通り溶解したXMRV粒子を用いて調製した。ヤギ抗ヒトIgMおよびIgG特異的アルカリホスファターゼコンジュゲート (Southern Biotech, Birmingham, AL) を用いてアカゲザルにおけるXMRV感染に

対するIgMおよびIgG応答を個々に検出した。WBで用いたその他の試薬はInvitrogenのWesternBreezeキットからのものであった。WBは次の通り実施した。ウイルスタンパク質ストリップを2mlの霊長類血漿（1：250で希釈したもの）を用いて一晚2～8 にてインキュベートした。連続4回、5分間洗浄した後、ストリップを次いで特異的抗ヒトIgMまたはIgGアルカリホスファターゼ（AP）コンジュゲートを用いて1時間室温にてインキュベートした。ストリップを記載の通り洗浄し、色素生産性基質溶液を加えて紫色バンドを発色させた。図9は、XMRVによる接種前および接種後（PI）の血漿サンプルのWB結果を示す。

【0205】

図9Aは、生来のXMRVウイルスタンパク質により検出したR11-10のIgGおよびIgM応答を示す。霊長類R11-10は11PI日に検出可能なenv p15E（14kDバンド）に対するIgG応答を発現し、次いで3日後にgag p30に対するIgG応答を発現した。両方のIgG応答は93PI日まで持続した。また弱い一過的な抗env p15E IgM応答が9～18PI日にあった。注意すべきは、9PI日に現われたいくつかの49～80kDの間のバンドは、その後、前立腺癌細胞株DU145に由来するヒト細胞のタンパク質に特異的であることが確認され、従ってXMRVとは無関係であった。49～98kDの範囲の抗ヒトタンパク質応答の妨害によって、ウイルス溶解液ストリップを用いて抗env gp70応答を検出することは困難であった。それにも関わらず、検出可能な抗env p15Eおよび抗gag p30 IgG応答を得たことは、R11-10におけるXMRV感染およびセロコンバージョンの成功を実証する。

【0206】

図9Bは、生来のXMRVタンパク質により検出した、アカゲザル、RLq-10によるIgGおよびIgM抗体応答を示す。RLq-10は、env p15E（14kDバンド）に対して9～93PI日に検出可能な、およびgag p30（30kDバンド）に対して14～93PI日に検出可能な持続的なIgG抗体応答を発現した。さらに、RLq-10はgag p15に対して弱いIgG応答およびgag p10に対して一過的な応答（14～35PI日に検出可能な）を表した。RLq-10のIgM抗体応答はR11-10と類似し、弱いおよび一過的抗env p15E（9～28PI日）応答だけが検出された。RLq-10はまた、DU-145ヒト細胞のタンパク質に対して強いIgG応答を発現して49～98kDの多重の強いバンドを9～93PI日に表し、これが抗env gp70応答の可視化を防止した。しかし、検出可能な抗env p15Eおよび抗gag p30 IgG抗体応答はRLq-10におけるXMRV感染およびセロコンバージョンの成功を示す。

【0207】

図9Cは、生来のXMRVタンパク質により検出したアカゲザル、RYh-10におけるIgGおよびIgM抗体応答を示す。R11-10およびRLq-10に類似して、RYh-10はenv p15E（14kDバンド）に対して11～93PI日、およびgag p30（30kDバンド）に対して14～93PI日の持続的なIgG抗体応答を発現した。RYh-10のIgM抗体応答はあまりにも弱いので、ウイルス溶解液ストリップにより検出されなかった。R11-10およびRLq-10に類似して、RYh-10はヒト細胞のタンパク質に対して強いIgG応答を発現し、49～98kDの多重の強いバンドを表した。さらに、2つのバンド、gag p30の下の一つ（28kD）およびenv p15Eの下他の一つ（ほぼ13kD）はXMRV接種前のサンプルを含む全てのサンプルにおいて検出され、従って、この反応性はXMRV感染と無関係であることを示した。2匹の雄マカクザル、1匹の雌マカクザルと一致して、RYh-10も検出可能な抗env p15Eおよび抗gag p30 IgG抗体応答を表し、XMRV感染およびセロコンバージョンの成功を示す。

【0208】

B. 組換えXMRVタンパク質を用いるウェスタンブロット分析

2つの精製組換えXMRVタンパク質、env p15E -CKS（配列番号29）およびgag p30-PL（配列番号73）を選択して、上記の生来のウイルスタンパク質により検出した抗env p15Eおよび抗gag p30 IgG抗体応答を確認した。さらに、組換えenv p70-CKS（配列番号43）を用いて、ヒト細胞タンパク質の妨害によって生来のウイルスタンパク質により容易に検出できなかった抗gp70応答を検出した。WBストリップの調製は、SDSの存在のもとで4～12% NuPAGE Bis-Tris 2次元ゲル（Invitrogen）上での個々の組換えタンパク質の電気泳動により行った。このタンパク質ゲルを電気泳動でPDVF膜に転写した。カゼインを含有するバッ

10

20

30

40

50

ファーでブロックした後、PDVF膜を2mmストリップに切断し、2~8 にて貯蔵した。WBは、2mlの霊長類血漿（1：250で希釈したもの）を用いて一晚2~8 にてインキュベートすることにより実施した。連続4回、5分間洗浄した後、ストリップを次いで抗ヒトIgGアルカリホスファターゼコンジュゲートを用いて1時間室温にてインキュベートした。ストリップを記載の通り洗浄し、色素生産性基質溶液を加えて紫色バンドを発色させた。図10はR11-10についての、組換えタンパク質env p15E -CKS (A)、env p70-CKS (B) およびgag p30-PL (C) によるWB結果を示す。

【0209】

組換えp15E -CKS WBストリップについては、9~93PI日からのR11-10サンプルは主なWBバンドを45kDにて示し、これは組換えp15E -CKSのモノマー型（図10Aのストリップ9~93）である。他の2つのバンド（90および135kDのもの）はp15E -CKSの二量体および三量体型である。従って、2.5ug/ストリップにおける組換えタンパク質p15E -CKSは生来のウイルスタンパク質に対して抗p15E陽性であるサンプルだけでなく、生来のウイルスタンパク質によりほとんど検出されないサンプル（図10Aのストリップ9）も検出した。このデータはXMRV感染後にR11-10で発現された抗p15E応答を立証した。さらにこれらのデータは、特異的抗p15E抗体の検出に対する組換え p15E -CKSの効用を実証した。

10

【0210】

組換えp70-CKS WBストリップについては、9~93PI日からのR11-10サンプルは主なWBバンドを72kDにて示し、これは組換えp70-CKS（図10Bのストリップ9~93）のモノマー型である。ほぼ140kDのバンドはp70-CKSの二量体型であり、他の38kDおよび20kDのマイナーなバンドはおそらくp70-CKSの崩壊タンパク質であろう。組換えp70-CKSとの特異的結合は、XMRV感染後にR11-10が抗p15Eおよび抗p30抗体だけでなく抗gp70抗体を発現することを示した。さらにこれらのデータは、組換えp70-CKSを用いて抗gp70特異的抗体応答を検出できることを実証する。

20

【0211】

組換えp30-PLタンパク質ストリップは生来のウイルスタンパク質ストリップより強力ではないと思われるが、8霊長類R11-10サンプルのうちの7サンプルがウイルス溶解液ストリップに対して抗p30陽性であることを検出した（図10C）。従って、このデータはXMRV感染後に霊長類 R11-10に発現した特異的抗p30抗体応答を立証し；これはまた、抗p30抗体を検出するのに組換えp30-PLが有用であることを実証した。

30

【0212】

C. 総括

3匹の霊長類動物は全て検出可能な抗p15E、抗p70および抗p30抗体応答を発現し、XMRV感染およびセロコンバージョンの直接的確証を提供した。従って、本明細書に提示したデータは、XMRV感染を検出および/または確認する診断試薬として、組換えXMRVタンパク質p15E -CKS、p70-CKSおよびp30-CKSの有用性を実証する。これらの組換えタンパク質を用いるWBは、対応する生来のウイルスタンパク質に対して反応性をもつ全てのサンプルを検出した。これはXMRVでの感染により誘発されるセロコンバージョンパターンの初の実証を意味するものである。

40

【0213】

（実施例14）

ヒト前立腺癌サンプルのウェスタンブロット分析

ヒトにおける抗体応答がXMRV感染後の非ヒト霊長類で観察したものと類似することを確認するために、前立腺癌患者からの血漿サンプルVP234を選択してWB分析を行った。この患者はRNaseIの両方の対立遺伝子に生殖系列突然変異（R462Q）を有し、前立腺癌組織のRT-PCR分析に基づいてXMRV感染と同定されていた [Dong et al, PNAS 104:1655 (2007)]。さらに、VP234の前立腺ゲノムDNAにおけるXMRVプロウイルス組込み部位が同定されていた [Dong et al, PNAS 104:1655 (2007)]。VP234から採集した血漿を、ウイルス溶解液タンパク質、組換えp15E -CKS、および組換えp70-CKSを含有するWBストリップを用いて分析した。WBストリップ調製と手順は実施例13、セクションAおよびBに記載したのと同じ

50

であった。概説すると、WBストリップを、5%ヤギ血清と0.15%Tween 20を含有する希釈剤中のVP234サンプル(1:250希釈)2mlと共にインキュベートした。一晚インキュベーション後に、結合した抗XMRV抗体をヤギ抗ヒトIgGアルカリホスファターゼコンジュゲートと次いで紫色の発色したAP反応産物の発現により検出した。結果を図11に提示した。

【0214】

VP234サンプルは、ウイルス溶解液タンパク質ストリップ上で30kDと15kDにおいて2つのメジャーなバンド、および62kD区域において3つのマイナーなバンドを示した(図11A)。組換えXMRVタンパク質(gag p30、env p15Eおよびgag p15)を用いるWB阻害は、2つのメジャーなバンドはgag p30およびgag p15ウイルスタンパク質に対する抗体であることを立証した。62kD区域のマイナーなバンドは正常な血液ドナーサンプル#85でも示されたので、非特異的結合と考えられた。ウイルス溶解液ストリップはVP234サンプル中の抗p15E応答を検出しなかったが、組換えp15Eストリップはかかる応答を検出し、45kDに弱い抗p15Eバンドを示した(図11B)。組換えp70-CKS WBストリップ上の72kD区域に可視性バンドは無く(図11C)、VP234サンプルに検出可能な抗gp70応答が無いことを示唆した。総括すると、VP234サンプルはXMRVウイルスタンパク質のenv p15E、gag p30およびgag p15に対して検出可能な抗体を示し、抗gag p15が優性な応答であると思われる。

10

【0215】

(実施例15)

XMRVに対する抗体を検出するためのARCHITECT(登録商標)化学発光イムノアッセイ(抗ヒトアッセイフォーマット)

20

同定した潜在的診断試薬(すなわち、p15E-CKS(配列番号29)、p70-CKS(配列番号43)およびgag p30-CKS(配列番号67)を用いて、3つのプロトタイプ化学発光イムノアッセイ(CMIA)を自動ARCHITECT(登録商標)計器システム(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)上で開発した。3つのARCHITECT(登録商標)CMIAは全て、図12に図解した間接抗ヒトアッセイフォーマットを利用する2ステップのイムノアッセイである。第1ステップはサンプル(10ul)、アッセイ希釈剤(90ul)および常磁性微粒子を組み合わせる。サンプル中に存在する抗XMRV抗体は、個々の組換えタンパク質p15E-CKS、p70-CKSまたはgag p30-CKSでコーティングした常磁性粒子上に捕獲される。微粒子を洗浄して無結合のタンパク質を除去する。第2ステップで、微粒子に捕獲された抗XMRV抗体をアクリジニウム標識したヤギ抗ヒトIgGコンジュゲートと共にインキュベートする。さらなる洗浄サイクルの後に、アルカリ過酸化水素溶液を加えてアクリジニウム化学発光シグナルを放出させる。相対的光単位(RLU)として測定した化学発光の強度は、個々の組換えタンパク質p15E-CKS、p70-CKS、p30-CKS または p30-PLが捕獲した特異的抗体の量に比例する。

30

【0216】

CMIAの感度を、XMRV感染アカゲザル、RII-10、RLq-10およびRYh-10からの連続採血によって評価した。図13はARCHITECTアッセイで得た結果を総括する。CMIAとWB結果の比較を容易にするために、RII-10からのサンプルについて得たCMIA試験結果も図10の対応する組換えタンパク質のWBイメージの下に挿入した。図10Aに示すように、p15E-CKSに基づくCMIAは、WBにより抗p15E陽性である全てのサンプルを4~100 S/N(S/N=サンプルのシグナル/第0日におけるサンプルのシグナル)の範囲の高いシグナルで検出した。さらに、p15E-CKSに基づくARCHITECTCMIAは、抗p15E応答が9PI日(S/N=4)に現れ、その後、増加し続けて93PI日(S/N=100)に到達することを示す定性的結果を与えた。類似の結果はp70およびp30に基づくCMIA(図10Bおよび10C)について得られた。これらのデータはXMRVに対する抗体を高感度で検出するCMIAの能力を実証し、そしてXMRVによる感染を検出するこれらの希少な試薬の効用を公式に確立するものである。

40

【0217】

(実施例16)

XMRVのp15Eタンパク質に対する抗体を検出するためのARCHITECT(登録商標)化学発光イムノアッセイ(サンドイッチアッセイ)

さらにアッセイ性能を改善するために、直接二重抗原サンドイッチアッセイを、自動AR

50

CHITECT(登録商標)計器システム(Abbott Laboratories、Abbott Park、IL)上で開発した。ARCHITECT(登録商標)CMIAは、2つのp15E抗原(すなわち、p15E-PET = 配列番号33、およびp15E -CKS = 配列番号29)を利用して抗p15E抗体で二重サンドイッチを形成する2ステップのイムノアッセイである。図14に図解したように、第1ステップにおいてサンプル(100ul)、アッセイ希釈剤(50ul)および常磁性の微粒子(50ul)を組み合わせる。サンプル中に存在する抗p15E抗体をp15E-PETまたはp15E -CKS組換えタンパク質でコーティングされた常磁性粒子上に捕捉する。その微粒子を洗浄して無結合のタンパク質を除去する。第2ステップにおいて、微粒子に捕捉された抗p15E抗体をアクリジニウム標識したp15E -CKS組換え抗原と共にインキュベートする。さらなる洗浄サイクルの後に、アルカリ過酸化水素溶液を加えてアクリジニウム化学発光シグナルを放出させる。

10

【0218】

相対的光単位(RLU)として測定した化学発光の強度は、p15E-PET組換えタンパク質により捕捉された抗p15E抗体の量に比例する。

【0219】

サンドイッチ p15E CMIAの感度を、XMRV感染アカゲザル、RII-10、RLq-10およびRYh-10からの39連続採血によって評価した。図15はp15E CMIAのサンドイッチ アッセイ フォーマットで得た結果を総括する。アッセイフォーマット間の比較を容易にするために、同じ連続採血で得た抗ヒトp15E CMIA結果も図15にプロットした。サンドイッチp15Eアッセイは、WBにより抗p15E陽性である36サンプルを検出した。抗ヒトp15Eアッセイと比較して、サンドイッチp15Eアッセイは、初期のIgM応答(9~14PI日)で、3匹全ての霊長類からはるかに高いシグナルを発生することにより、より優れたセロコンバージョン感度を実証した；これはまた、残りのRII-10およびRYh-10の連続採血に対してより優れたまたは等価の感度を示した。

20

【0220】

さらに、代替りの哺乳動物種についてサンドイッチ p15E CMIAの感受性を、ATCC(VR-1537AS-Gt(登録商標))から得たFriend MuLV(抗MuLV pAb)に対するヤギポリクローナル抗体を用いて評価した。サンドイッチp15E CMIAは、ヤギ 抗MuLV pAbからの抗p15E抗体を終点希釈1:32,000で優れた検出を示した。予想通り、これらのデータは、サンドイッチ p15E CMIAが代替りの哺乳動物種からの抗p15E抗体を検出できることを立証する。

【0221】

最も有意義な改善は、サンドイッチp15Eアッセイが陰性集団と陽性集団の間の分離を増加することができる。97血液ドナー(図16を参照)を用いる特異性の評価(図16を参照)はこの推定陰性集団(他の公知の血液感染性病原体について陰性である)のシグナルは実質的に低く、かつその分布も、抗ヒトp15Eアッセイと比較して、サンドイッチp15Eアッセイにより狭められた。それ故に、36 XMRV陽性霊長類採血は明らかに880 陰性血液ドナーからサンドイッチp15Eアッセイにより分離され、100%(36/36)感度および99.9%(879/880)特異性を得た(図17)。これらのデータはXMRV感染を検出および/またはスクリーニングするためのサンドイッチp15Eアッセイの効用を実証するものである。

30

【0222】

(実施例17)

合成ペプチドを用いるp15Eのエピトープマッピング

p15E抗原の免疫原性領域を、XMRV感染霊長類から得た抗p15E陽性血清に対するp15E合成ペプチドの特異的結合によりマッピングした。8つのペプチドを設計して、p15E抗原の様々な領域を図18に示したようにカバーした。ペプチドはGenScript Co.(Piscataway、NJ)が製造した。これらは固相合成手法によりFmoc化学を用いて合成した。ビオチンをN-末端に加えて固定したストレプトアビジンへの取付けを促進した。全てのペプチドは少なくとも85%純度であると測定された。

40

【0223】

マッピングしたペプチドの抗p15E抗体に対する特異的結合を間接ELISAアッセイにより測定した。概説すると、ビオチン化合成ペプチド(ほぼ2ug/ウエル/100ulアッセイバッフ

50

ァー) をストレプトアビジンをコーティングしたマイクロタイタープレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 上に一晚2~8 にてインキュベートすることにより固定した。洗浄後(2回)、サンプル希釈剤(100ul/ウエル)で1:100に希釈した霊長類サンプルを、固定したペプチドと共に3時間室温にてインキュベートした。洗浄後(4回)、結合した抗p15E抗体を、ヤギ抗ヒトIgGアルカリホスファターゼコンジュゲート(Southern Biotech, Birmingham, AL)により検出した。全てのサンプルを二重で試験しかつインキュベーションの間、連続攪拌した。

【0224】

エピトープマッピング分析の結果を図19に記載した。霊長類RII-10およびRYh-10サンプル(93PI日の採血)は両方とも、3つのペプチド、ABTX-6、(配列番号83)ABTX-4(配列番号84)およびABTX-10(配列番号85)に対する特異的結合を示した。3つのペプチドは全て、カットオフ値0.06より2倍を超える大きいシグナルを有した。ABTX-6ペプチド(配列番号83)は霊長類RYh-10サンプルと強い結合を示し、そのシグナルはカットオフ値(0.06)の37倍を超え、p15E抗原内の免疫優性エピトープであることを示した。

【0225】

(実施例18)

哺乳動物発現用の生来のXMRV env gp70またはgag p30遺伝子を運ぶプラスミドクローンの構築

A. 哺乳動物細胞発現用の生来のXMRV env gp70遺伝子を運ぶプラスミドクローン(pJVp70-E4)の構築

XMRV菌株VP62の3'末端を包含しかつ全env遺伝子を運ぶプラスミドクローンA0-H4を、A. Urisman et al、PloS Pathogens 2:e25(2006)による記載の通り構築した。およそ4.4kb VP62 DNAインサートをウイルスRNAのRT-PCRにより作製し、ベクターpCR2.1中にクローニングした。図20に図解したように、全長生来のenv gp70遺伝子をA0-H4プラスミドDNAからQiagenワンステップRT-PCRキット(Qiagen, Valencia, CA)を用いて製造業者プロトコルおよびプライマーp70-F-NruI(配列番号90)およびp70-R-NotI(配列番号91)によって増幅し、制限酵素部位ならびに6ヒスチジン残基をC末端に導入した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquickPCR精製キット(Qiagen)を用いて精製した。Abbott LaboratoriesのベクターpJV-his-proBNP(Abbott Bioresearch Center, Worcester, MA)を哺乳動物発現用のクローニングベクターとして用いた。精製したenv gp70 PCR産物およびpJV-his-proBNPベクターDNAをNru IおよびNot Iで消化し、Chroma Spinカラムで精製しそしてT4 DNAリガーゼでライゲートした。ライゲーション産物をDH5 コンピテント細胞中に形質転換し、形質転換した細胞を37 にてLB+アンピシリン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーをコロニーPCRによりプライマーp70-F-NruI(配列番号90)およびp70-R-NotI(配列番号91)を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquick PCR精製キットを用いて精製し、そしてプライマーVector1-F(配列番号92)、Vector1-R(配列番号93)、Vector2-F(配列番号94)、Vector2-R(配列番号95)、p70-seq1-F(配列番号96)、p70-seq1-R(配列番号97)、p70-seq3-F(配列番号98)、p70-seq3-R(配列番号99)、p70-F-NruI(配列番号90)およびp70-R-NotI(配列番号91)で配列決定した。配列決定結果に基づいて、pJVp70-E4と名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、env gp70遺伝子インサートの配列を立証した。コロニーを3回再ストリークして、グリセロールストックを単離しかつ調製した。

【0226】

哺乳動物発現用のenv gp70プラスミド構築物は組換えタンパク質pJVp70-E4/DH5 を産生し、そのアミノ酸配列を配列番号100に示す。pJVp70-E4/DH5 がコードする組換えタンパク質(pJVp70)は、プラスミド シグナル配列の22アミノ酸、それと融合したenv gp70ウイルスタンパク質の413アミノ酸、およびヒスチジンの6アミノ酸を含有する。配列番号101は、クローンpJVp70-E4/DH5 中のenv gp70タンパク質のヌクレオチド配列を示し、

これはプラスミド シグナル配列からの66塩基対、続いて生来のXMRVウイルスのRNA由来のenv gp70遺伝子の1239塩基対およびヒスチジンの18塩基対を含有する。配列番号102は発現 / プロセシングされたenv gp70タンパク質を示し、これはenv gp70ウイルスタンパク質の413アミノ酸とヒスチジンの6アミノ酸から成る。

【 0 2 2 7 】

B. 哺乳動物細胞発現用の生来のXMRV gag p30遺伝子を運ぶプラスミドクローン (pJVp30-D2) の構築

全gag遺伝子およびXMRV菌株VP62のpol遺伝子の5'部分を包含するプラスミドクローンAM-2-9を、A. Urisman et al、PloS Pathogens 2 : e25 (2006)による記載の通り構築した。およそ4kb VP62 DNAインサートをウイルスRNAのRT-PCRにより作製し、ベクターpCR2.1中にクローニングした。図21に図解したように、全長の生来のgag p30遺伝子をAO-H4プラスミドDNAからQiagenワンステップRT-PCRキット (Qiagen、Valencia、CA)を用いて製造業者プロトコルおよびプライマー-p30-F-NruI (配列番号103) およびp30-R-NotI (配列番号104)によって増幅し、制限酵素部位ならびに6ヒスチジン残基をC末端に導入した。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquickPCR精製キット (Qiagen)を用いて精製した。Abbott LaboratoriesのベクターpJV-his-proBNP (Abbott Bioresearch Center、Worcester、MA)を哺乳動物発現用のクローニングベクターとして用いた。精製したgag p30 PCR産物およびpJV-his-proBNPベクター-DNAをNru IおよびNot Iで消化し、Chroma Spin カラムで精製しそしてT4 DNAリガーゼでライゲートした。ライゲーション産物をDH5 コンピテント細胞中に形質転換し、形質転換した細胞を37 °CにてLB+アンピシリン寒天プレート上でインキュベートした。個々のコロニーをコロニーPCRによりプライマー-p30-F-NruI (配列番号103) およびp30-R-NotI (配列番号104)を用いてスクリーニングし、プラスミドインサートを増幅した。増幅したインサート産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、QIAquick PCR精製キットを用いて精製し、そしてプライマー-Vector2-F (配列番号94)、Vector2-R (配列番号95)、p30F-seq2 (配列番号105)、p30R-seq2 (配列番号106)、p30-F-NruI (配列番号103) およびp30-R-NotI (配列番号104)で配列決定した。配列決定結果に基づいて、pJVp30-D2と名付けた所望のクローンを同定した。MiniprepプラスミドDNAをこのクローンの一晚培養から調製し、gag p30遺伝子インサートの配列を立証した。コロニーを単離のために3回再ストリークして、グリセロールストックを単離しかつ調製した。

【 0 2 2 8 】

哺乳動物発現用のgag p30プラスミド構築物は、組換えタンパク質pJVp30-D2/DH5 を産生し、そのアミノ酸配列を配列番号107に示す。pJVp30-D2/DH5 がコードする組換えタンパク質 (pJVp30) は、プラスミド シグナル配列の22アミノ酸、それと融合したgag p30ウイルスタンパク質の263アミノ酸、およびヒスチジンの6アミノ酸を含有する。配列番号108はクローンpJVp30-D2/DH5 中のpJVp30タンパク質のヌクレオチド配列を示す。そのDNA配列は、プラスミド シグナル配列からの66塩基対、続いて生来のXMRVウイルスのRNA由来のgag p30遺伝子の789塩基対、およびヒスチジンの18塩基対を含有する。配列番号109は発現 / プロセシングされたgag p30タンパク質を示し、これはgag p30ウイルスタンパク質の263アミノ酸とヒスチジンの6アミノ酸を含有する。

【 0 2 2 9 】

(実施例 19)

哺乳動物細胞で発現されるXMRV組換えタンパク質の調製と精製

A. 哺乳動物発現用のXMRV構築物からプラスミドDNAの調製

pJV-his-proBNPに基づくenv gp70 (pJVp70-E4) またはgag p30 (pJVp30-D2) 構築物を運ぶDH5 コンピテント細胞の1培養をそれぞれ、1ループのグリセロールストックを100 µg/mlアンピシリンを補充した10ml LBブロス (Invitrogen) を含有する3チューブのそれぞれ中に接種することにより調製した。チューブを振とう軌道型インキュベーター内に置き、一晚 (約16時間) 37 °Cにてインキュベートした。5mlの一晚培養物を、500mlのLBブロス + 100 µg/mlアンピシリンを含有する、5個の無菌2リットル振とうフラスコ (Bellco、Vin

eland、NJ)へそれぞれ移した。フラスコを振とう軌道型インキュベーター内に置いて、一晚(約16時間)37℃にてインキュベートした。細胞を遠心分離により収穫し、LB上清を捨てた。細胞ペレットをさらに処理するまで-70℃にて貯蔵した。

【0230】

凍結細胞ペレットを解凍し、プラスミドDNAを5~7µgの細胞ペーストから、Endo Free Plasmid Giga キット(Qiagen)を用いて製造業者の取扱説明書に従い調製した。プラスミドDNAをさらに使用するまで-20℃にて貯蔵した。

【0231】

B. XMRV組換えタンパク質構築物によるHEK哺乳動物細胞のトランスフェクション

HEK293細胞(Invitrogen)を、1.2 Lt Freestyle 293発現培地(Gibco)に 1×10^6 生細胞/mlの最終濃度で再懸濁した。細胞を、37℃にて8%CO₂のインキュベーター内の振とう器テーブルで100rpmにて3時間インキュベートした。15mlトランスフェクション培地中の1.2mgプラスミドDNA+15mlトランスフェクション培地中の2.4mg PEIを組み合わせることにより、プラスミドDNA:PEI複合体を形成した。複合体を10秒間ボルテックス攪拌し、室温にて15分間インキュベートし、そして1.2 Lt HEK293細胞懸濁液に加えた。さらに、20%トリプトンを加えて、細胞懸濁液中の最終濃度を0.5%とした。細胞を、37℃にて8%CO₂のインキュベーター内の振とう器テーブルで100rpmにて4日間インキュベートした。細胞を8000 rpmにて20分間の遠心分離により収穫し、次いで上清を0.22 µmフィルターを通して濾過し、タンパク質精製まで4℃にて貯蔵した。

【0232】

C. XMRV組換えタンパク質のHis結合ニッケルアフィニティクロマトグラフィによる精製

XMRV env gp70およびgag p30タンパク質を、高速タンパク質液体クロマトグラフィ(FPLC)およびC末端HisタグのNi-NTAスーパーフロー樹脂(Qiagen)との結合を用いて精製した。10mlカラムのHis結合樹脂を30mlの水および50mlのイミダゾールバッファー(20mMイミダゾール、50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 8.0)で流量1 ml/minにて洗浄した。HEK293細胞培養からの1.2Ltの濾過した上清液をカラムに、流量1ml/minにて適用し、次いで60mlイミダゾールバッファーで洗浄した。His-タグ付きタンパク質を溶出するために、カラムを25mlの0~100%勾配のイミダゾールバッファー(250mMイミダゾール、50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、0.05% Tween20、pH 8.0)および20mlの100%イミダゾールバッファーで1ml/minの流量にて洗浄し、そして1ml刻みの画分を収集した。カラム画分は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)によるタンパク質分析まで、2~8℃にて貯蔵した。組換えタンパク質を含有するカラム画分をプールし、2~8℃にて24時間。リン酸緩衝食塩水(PBS; Invitrogen)のバッファーに対して透析した。精製タンパク質を含有する透析溶液のアリコート採取し、さらなる使用まで、-20℃にて貯蔵した。

【0233】

(実施例20)

ウェスタンブロット分析を用いる哺乳動物細胞に発現されたXMRV組換えgp70タンパク質の特徴付け

XMRV接種したアカゲザルR11-10の血漿における抗gp70応答を、哺乳動物に発現されるgp70(配列番号102)を用いて検出した。この抗gp70応答は、ヒト細胞タンパク質の干渉があるために、生来のウイルスタンパク質によって容易に検出できなかったからである。WBストリップをgp70タンパク質の電気泳動により、SDSの存在のもとで4~12% NuPAGE Bis-Tris 2次元ゲル(Invitrogen)上で調製した。タンパク質ゲルを電気泳動的にPDVF膜に転写した。カゼインを含有するバッファーによるブロック後、PDVF膜を2mmストリップに切断し2~8℃にて貯蔵した。WBは、実施例11に記載したように、製造業者取扱説明書に従い、WesternBreezeキット試薬を用いて実施した。gp70タンパク質ストリップを一晚2~8℃にて1.0 mlの霊長類血漿(キットの霊長類抗体希釈剤中に1:250で希釈)と共にインキュベートした。キット抗体洗浄液を用いて連続4回、5分間洗浄した後、ストリップを次いで抗ヒトIgGアルカリホスファターゼコンジュゲートと共に1時間室温にてインキュベートした。ストリップを先に記載の通り洗浄し、色素生産性基質溶液を加えて免疫反応性バンド

を発現させた。図22はR11-10に対する、gp70タンパク質によるWB結果を示す。

【0234】

大腸菌が発現したgp70-CKS (図10B)と比較して、哺乳動物が発現したgp70 WBはR11-10サンプルについては実質的に低いバックグラウンド結果を有した。9~132PI日からのR11-10採血は70kD (gp70のモノマー型)にて拡散したバンドを示した(図22のストリップ9~132)。38kD近傍の弱いマイナーなバンドはおそらくgp70の崩壊タンパク質との反応性によるのであろう。gp70に対する特異的結合は、R11-10が、XMRVによる感染後に観察される抗p15E (図10A)および抗p30 (図10C)抗体に加えて、抗gp70特異的抗体を発現することを示す。さらにこれらのデータは、哺乳動物に発現されるgp70が、大腸菌に発現されるgp70-CKSと比較して抗gp70特異的抗体応答の検出にとって有利でありうることを示す。

10

【0235】

(実施例21)

XMRV gp70タンパク質に対する抗体を検出するためのARCHITECT(登録商標)化学発光イムノアッセイ(CMIA)(サンドイッチアッセイフォーマット)

抗gp70抗体応答の検出感度を改善するために、哺乳動物に発現されるenv gp70タンパク質(配列番号102)を用いて自動ARCHITECT(登録商標)計器システム(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)での直接二重抗原 サンドイッチ アッセイを開発した。コンジュゲート効力を増強するために、哺乳動物に発現されるgp70タンパク質を最初にビオチン化し、次いで化学発光アクリジニウム標識したストレプトアビジンと共にインキュベートしてアビジン-ビオチン複合体(ABC) gp70コンジュゲートを形成した。ABCgp70コンジュゲートは多重gp70抗原とストレプトアビジン複合体から成り、シグナル増幅および結合活性改善が得られる。さらに、gp70 ARCHITECT(登録商標)CMIAに対して、ABC gp70コンジュゲートの抗gp70抗体とのインキュベーション時間をより長くするワンステップアッセイフォーマットを設計した。ARCHITECT(登録商標)gp70 CMIAプロトコルでは、サンプル(100ul)、ABC gp70コンジュゲート(50ul)および常磁性微粒子(50ul)をワンステップで組み合わせる。サンプル中に存在する抗gp70抗体は同時に、ABC gp70コンジュゲートおよびgp70抗原をコーティングした常磁性粒子と結合する。微粒子を洗浄して無結合のタンパク質およびABC gp70コンジュゲートを除去する。洗浄サイクルの後に、アルカリ過酸化水素溶液を加えてアクリジニウム化学発光シグナルを放出する。相対的光単位(RLU)として測定した化学発光強度はgp70組換えタンパク質が捕捉した抗gp70抗体の量に比例する。

20

30

【0236】

サンドイッチgp70 CMIAの感度をXMRV感染アカゲザルR11-10(9、11、14、18、42、73、93、および132PI日)からの8連続採血の1:10希釈液で評価し、図23に総括した。gp70およびp15Eアッセイの比較を容易にするために、同じ1:10希釈連続採血について得た、直接p15E CMIA結果もプロットした(図23)。gp70サンドイッチアッセイフォーマットは、WBにより抗gp70および抗p15E陽性である8サンプルの全てを検出した。直接p15Eアッセイと比較して、サンドイッチgp70アッセイは連続採血においておよそ10~28倍高いシグナルならびに採血前(0日)においておよそ3倍低いバックグラウンドシグナルを実証した。ワンステップgp70 CMIAの低いバックグラウンドと高い陽性シグナルの組み合わせはp15E CMIAより高い感度のアッセイに寄与する。注意すべきは、2つのCMIAの間のシグナル強度の差はおそらくアッセイ設計に依るものであって、抗体濃度比較を反映するものではなからう。

40

【0237】

組換えgp70タンパク質は6-ヒスチジンタグ配列を含有するので、サンドイッチgp70 CMIAの感度をまた、抗Hisモノクローナル抗体(抗His Mab、Abcam plc、Cambridge、UK)を用いて数値化した。抗His Mabを正常なヒト血漿に100、10および1ng/mlの濃度にて希釈し、ワンステップgp70 CMIAで試験した。図24に示したように、抗Hisは6.3ng/mlまたは39pMのレベルで検出しうる。

【0238】

さらに、代替の哺乳動物種についてのサンドイッチgp70 CMIAの感度を、ATCC(VR-1537AS-Gt(登録商標))から得たFriendマウス白血病ウイルスに対する(抗MuLV pAb)およ

50

びRauscher-MuLVのエンベロープ糖タンパク質gp69/71に対する（抗Env pAb、ATCC、VR-15 21）ヤギポリクローナル抗体を用いて評価した。サンドイッチgp70 CMIAにおいて、終点希釈は抗MuLV pAbが1：16,000および抗Env pAbが1：10,000であった。これらのデータはサンドイッチgp70 CMIAが代わりの哺乳動物種からのgp70抗体を検出できることを立証した。

【0239】

サンドイッチgp70 CMIAアッセイの特異性を397人の血液ドナー（Gulf Coast Regional Blood Center）についても評価した。3人の血液ドナーはアッセイのカットオフ値1000 RLUを超えた。3人のCMIA反応性のドナー サンプルのうちの1人はWBで立証した特異的gp70反応性を有した。このWBで立証したサンプルを除くと、直接gp70 CMIAアッセイの特異性は99.5%（394/396）と評価された。このアッセイはまた、血液ドナー陰性集団と霊長類R11-10 WBの1：10希釈液との実質的な区別を示した（図25）。これらのデータは、XMRV感染の検出とスクリーニングに対するワンステップgp70 CMIAの効用および値を実証する。

【0240】

（実施例22）

ウェスタンブロット分析を用いる哺乳動物細胞に発現されたXMRV組換えgp30タンパク質の特徴付け

哺乳動物の発現されたgag p30（配列番号109）を用いて、ATCC（VR-1537AS-Gt（登録商標））から得たFriendマウス白血病ウイルスに対するヤギポリクローナル抗体（抗MuLV pAb）、XMRV接種アカゲザル R11-10の血漿、およびヒスチジンに対するマウスモノクローナル抗体（抗His Mab、Abcam）の抗p30 反応性を検出した。WBストリップをp30タンパク質の電気泳動により、SDSの存在のもとで4～12% NuPAGE Bis-Tris2次元ゲル（Invitrogen）上で調製した。タンパク質ゲルを電気泳動的にPDVF膜に転写した。WBは、実施例11に記載したように、製造業者 取扱説明書に従い、WesternBreezeキット試薬を用いて実施した。PVDF膜を分割し、1時間室温にて、1：500希釈の抗MuLV pAb、1：250希釈の抗XMRV霊長類血漿R11-10または1：500希釈の抗His Mab（キット霊長類抗体希釈剤に希釈）と共にインキュベートした。キット抗体洗浄液を用いて連続4回、5分間洗浄により無結合のタンパク質を除去した後、その膜を抗ヤギIgGアルカリホスファターゼコンジュゲート（ヤギ抗MuLV pAb WB）、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼコンジュゲート（抗XMRV霊長類血漿R11-10 WB）または抗マウスIgGアルカリホスファターゼコンジュゲート（抗His Mab WB）と共に1時間室温にてインキュベートした。プロットを先に記載の通り洗浄し、色素生産性基質溶液を加えて紫色のバンドを発現させた。図26は全抗血清のp30タンパク質とのWB反応性を示す。これらの結果は、XMRV感染を検出または確認する診断試薬としてのgag p30タンパク質の効用を実証する。

【0241】

（実施例23）

XMRVのp30タンパク質に対する抗体を検出するためのARCHITECT（登録商標）化学発光イムノアッセイ（サンドイッチ アッセイ フォーマット）

直接二重抗原サンドイッチp30アッセイを、自動ARCHITECT（登録商標）計器システム（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）で開発した。ARCHITECT（登録商標）CMIAは、2つのp30抗原（すなわち、p30-CKS = 配列番号67、およびp30-PL = 配列番号73）を利用して抗p30抗体で二重サンドイッチを形成する2ステップのイムノアッセイである。第1ステップにおいてサンプル（100ul）、アッセイ希釈剤（50ul）および常磁性の微粒子（50ul）を組み合わせる。サンプル中に存在する抗p30抗体をp30-CKS組換えタンパク質でコーティングされた常磁性粒子上に捕捉する。その微粒子を洗浄して無結合のタンパク質を除去する。第2ステップにおいて、微粒子に捕捉された抗p30抗体をアクリジニウム標識したp30-PL組換え抗原と共にインキュベートする。さらなる洗浄サイクルの後に、アルカリ過酸化水素溶液を加えてアクリジニウム化学発光シグナルを放出させる。相対的光単位（RLU）として測定した化学発光の強度は、p30-CKS組換えタンパク質により捕捉された抗p30抗体の量に比例する。

【 0 2 4 2 】

直接p30 CMIAの感度を最初に、gag p30 MuLVに対する（抗p30Mab、ATCC、CRL-1912）またはHisに対する（抗His Mab、Abcam plc、Cambridge、UK）モノクローナル抗体の10倍希釈液を用いて評価した。線形回帰により、検出限界は抗p30 Mabに対して0.56 nMおよび抗His Mabに対して1.18nMであると評価した。セロコンバージョン感度を次いでRII-10の第1感染後14～158日の9回の連続採血を用いて評価した。抗p30応答の動力学的遅延により、このアッセイは2回の早期（14および18日）採血を検出できなかった。しかし、残りの7回の採血を検出した。RII-10およびRYh-10からのさらなる16連続採血を1：10希釈で検出した。従って、合計セロコンバージョン感度は92%（23/25）であった。さらに、サンドイッチp30 CMIAは、ATCC（VR-1537AS-Gt（登録商標））から得たFriendマウス白血病ウイルス（抗MuLV pAb）に対するヤギポリクローナル抗体の抗p30抗体の優れたを示し、終点希釈は1：64,000であった。予想通り、マウス抗p30 Mabおよびヤギ抗MuLV pAbの検出は、サンドイッチp30 CMIAが代替の哺乳動物種からの抗p30抗体を検出できることを立証した。

10

【 0 2 4 3 】

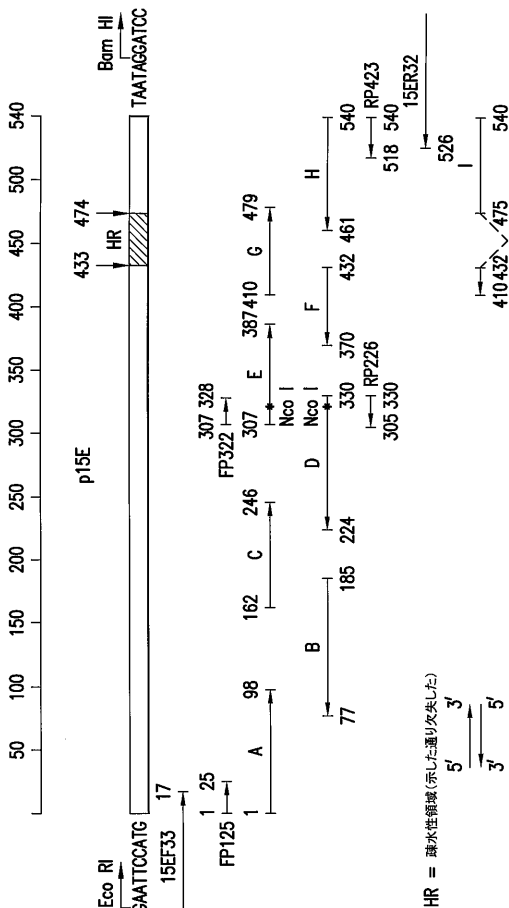
直接p30 CMIAの特異性を985血液ドナーサンプルで評価した。ドナー集団に対するアッセイ値の分布は平均値が420 RLU、SD値が195 RLUであった。8つのサンプルはアッセイカットオフ値の2000 RLUを超えた。8つの反応性ドナーサンプルのうち2つはWBが立証するp30反応性を有した。2つのWBが立証するサンプルを除くと、直接p30 CMIAの特異性は99.4%（977/983）と見積もられた。

20

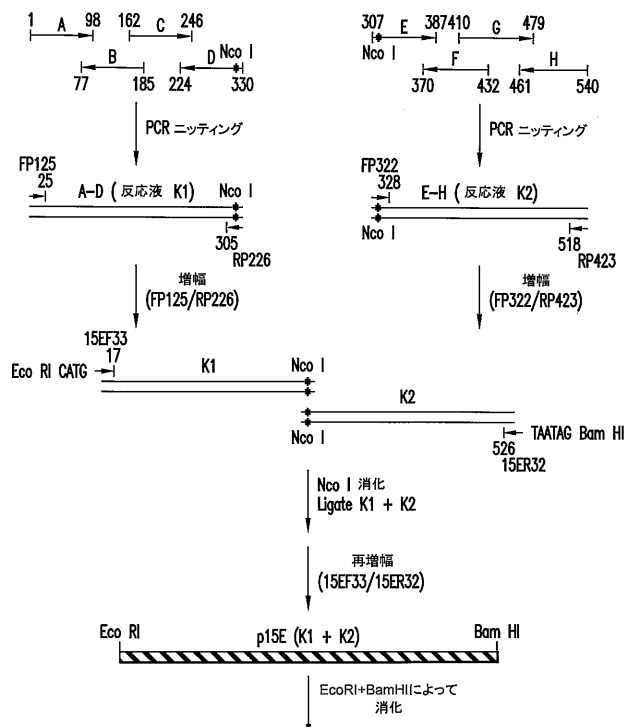
【 0 2 4 4 】

注目すべきこととして、p30アッセイはエンベロープタンパク質と異なるコアタンパク質に対する抗体を検出し、従って、XMRV感染に対する価値ある立証である。

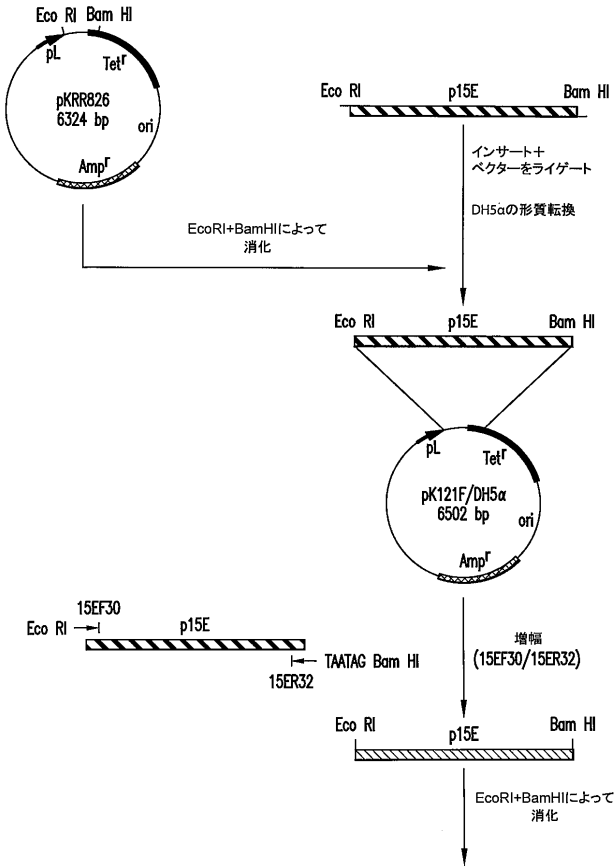
【 図 1 】



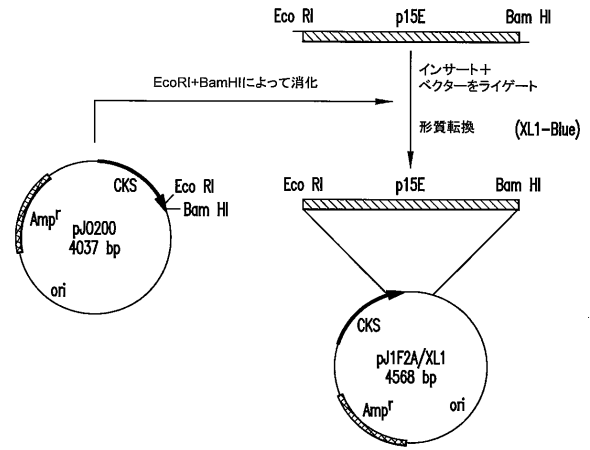
【 図 2 A 】



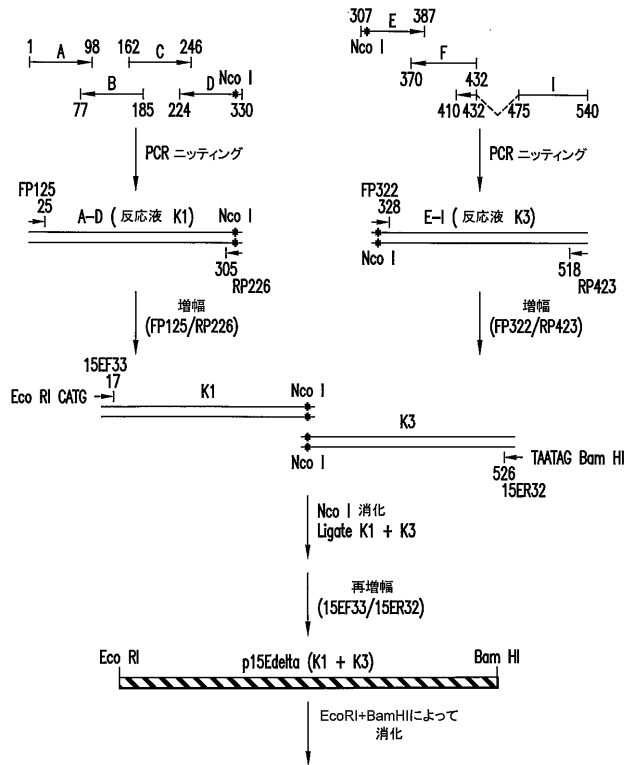
【 図 2 B 】



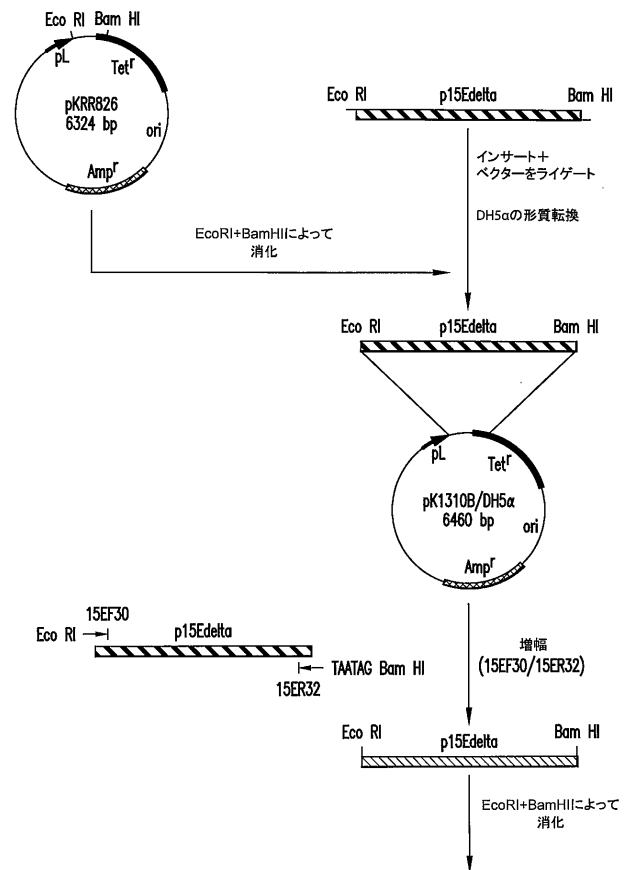
【 図 2 C 】



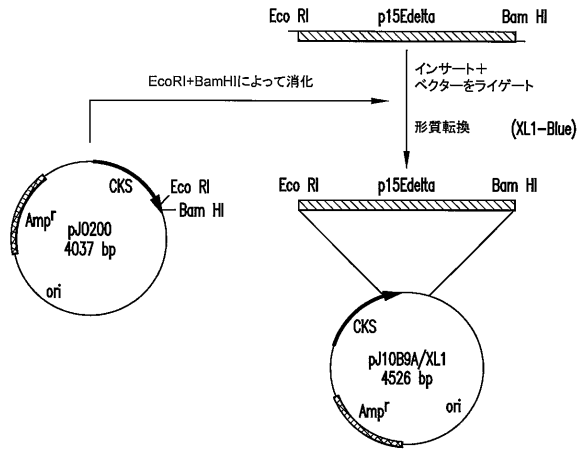
【 図 3 A 】



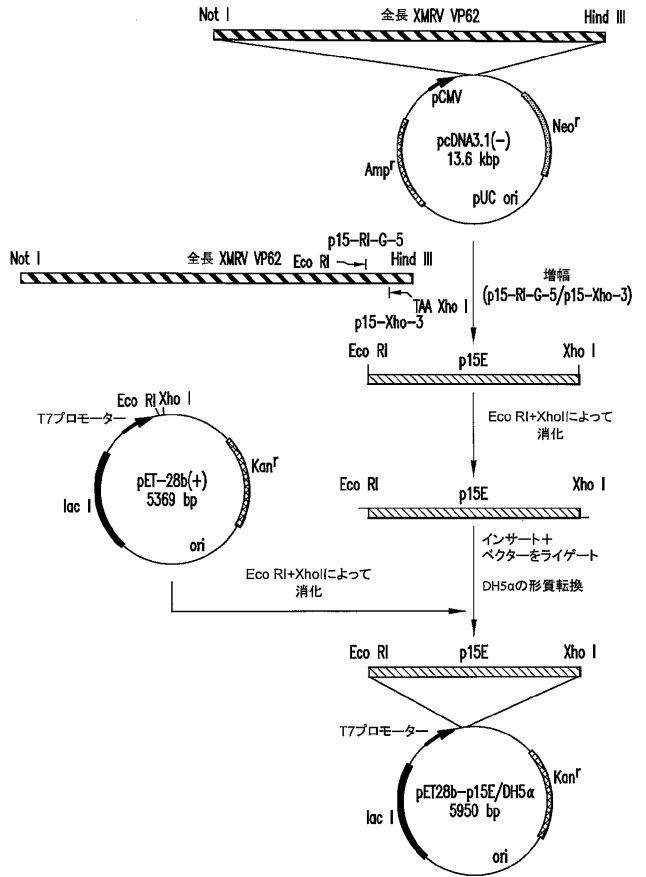
【 図 3 B 】



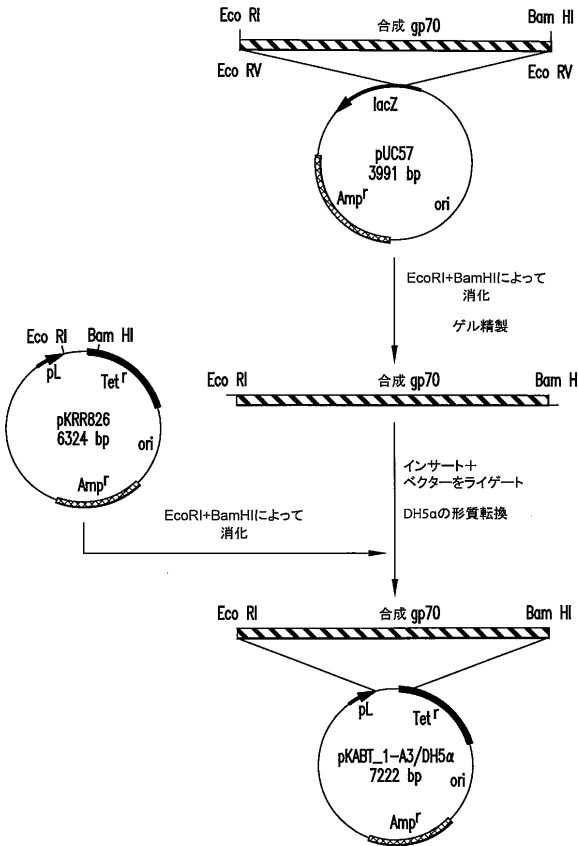
【 図 3 C 】



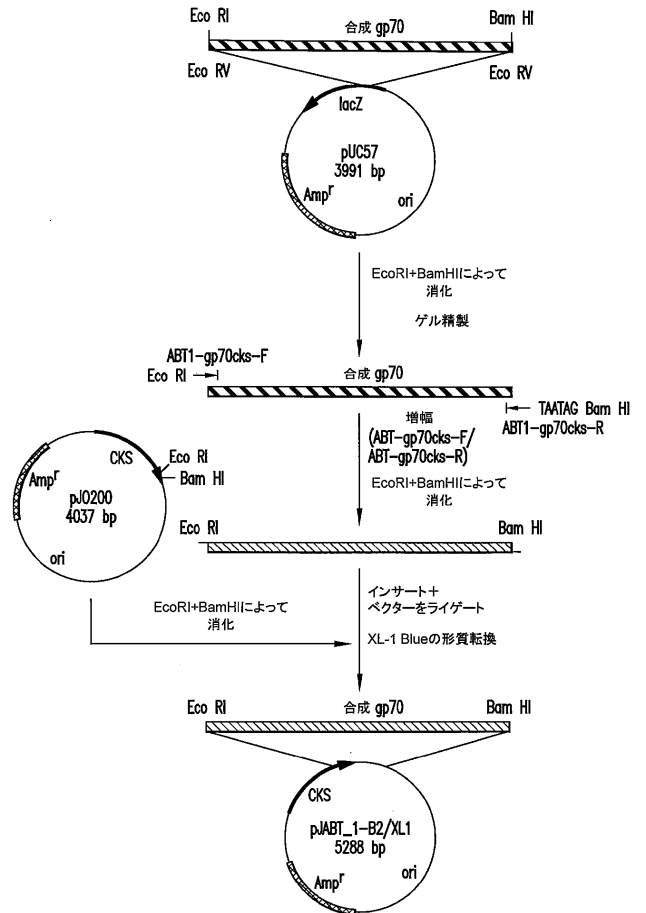
【 図 4 】



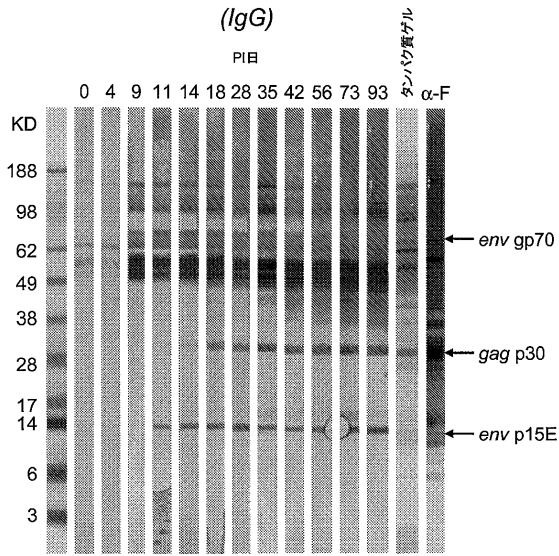
【 図 5 A 】



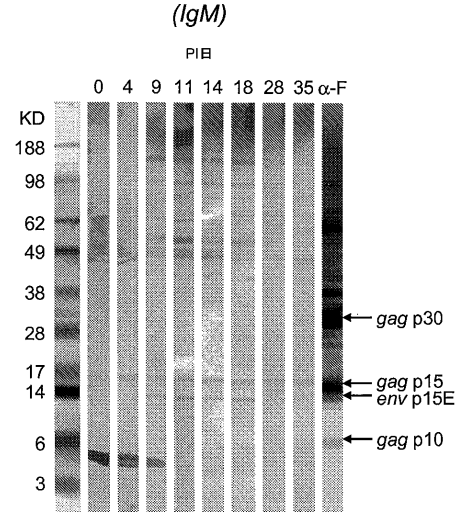
【 図 5 B 】



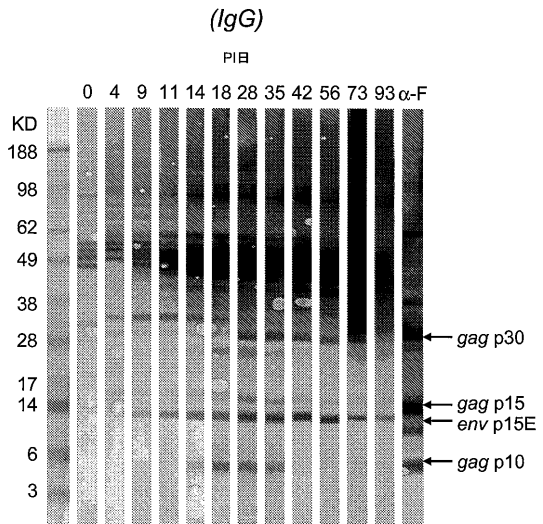
【 図 9 A 1 】



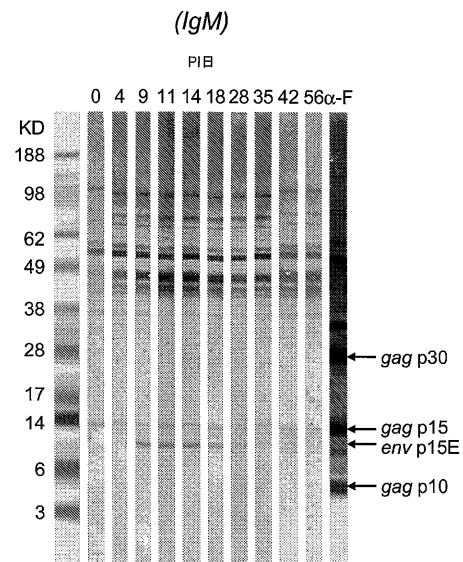
【 図 9 A 2 】



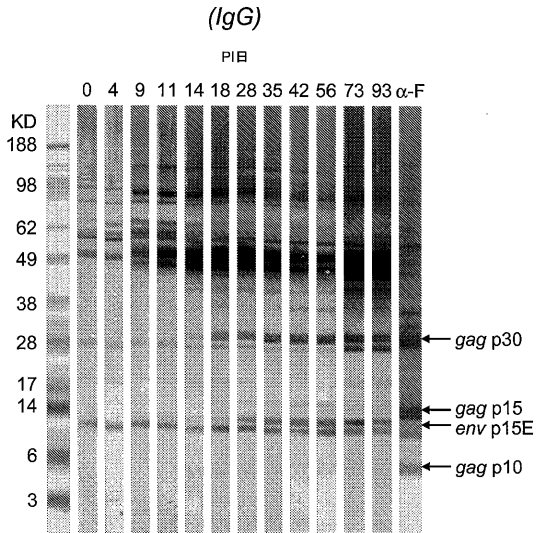
【 図 9 B 1 】



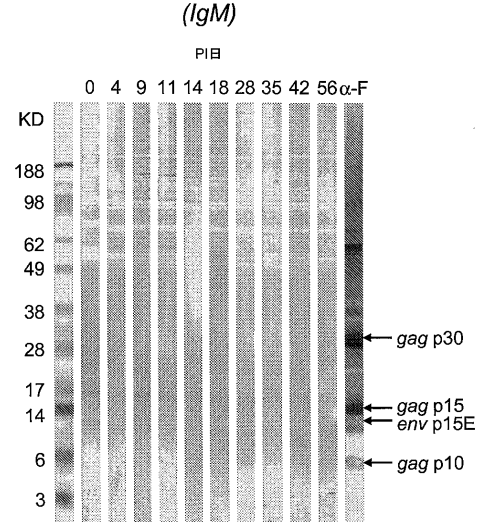
【 図 9 B 2 】



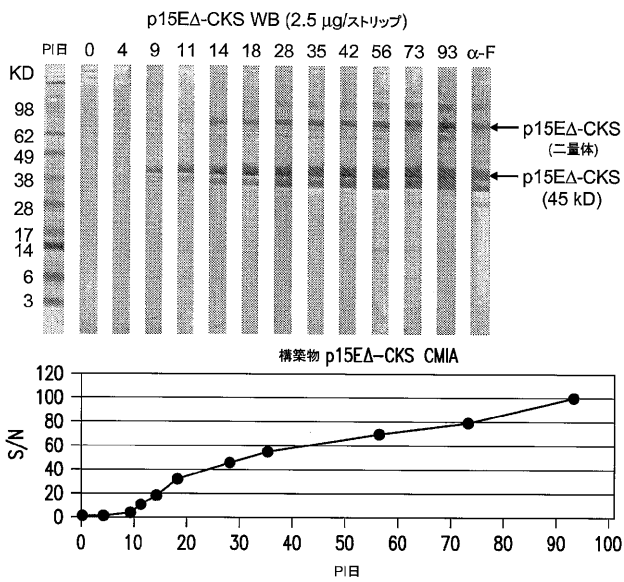
【 図 9 C 1 】



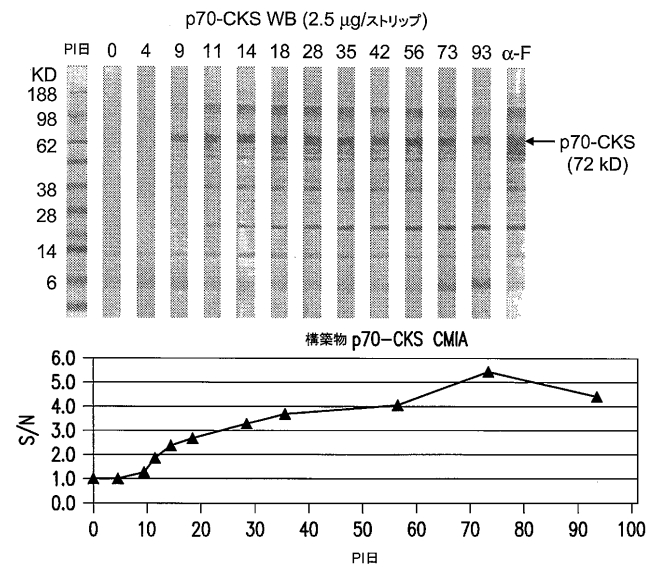
【 図 9 C 2 】



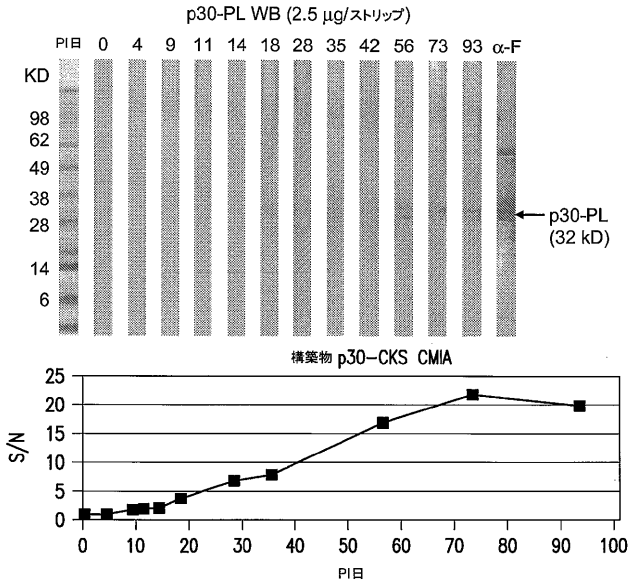
【 図 1 0 A 】



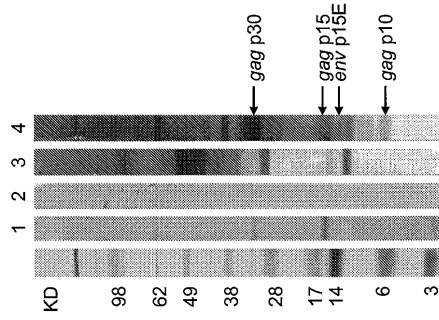
【 図 1 0 B 】



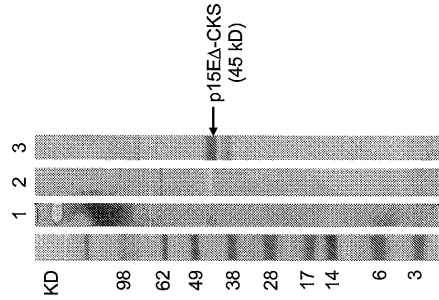
【 図 1 0 C 】



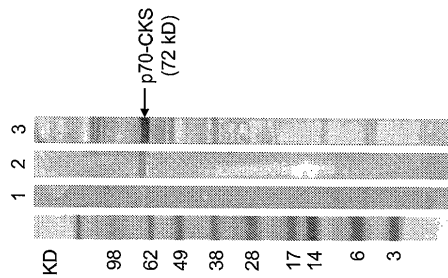
【 図 1 1 A 】



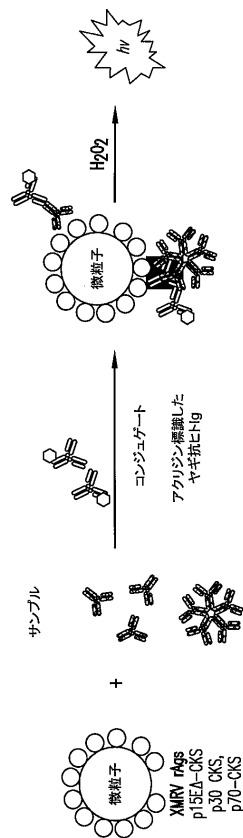
【 図 1 1 B 】



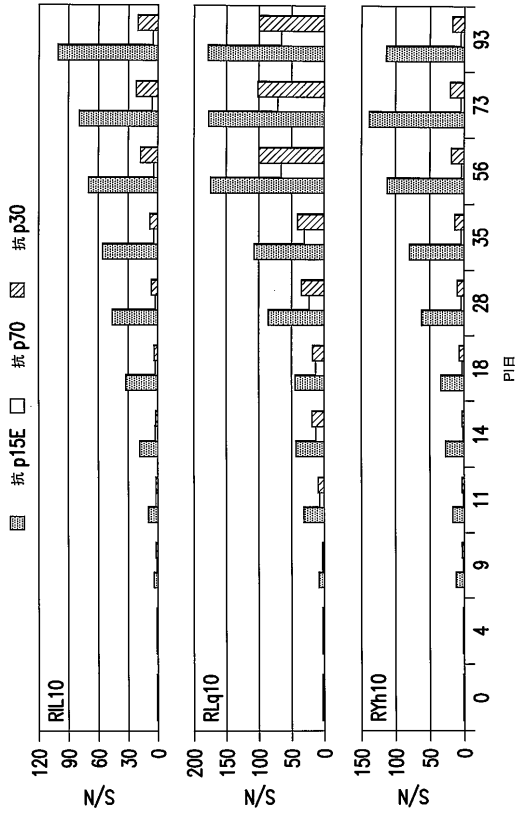
【 図 1 1 C 】



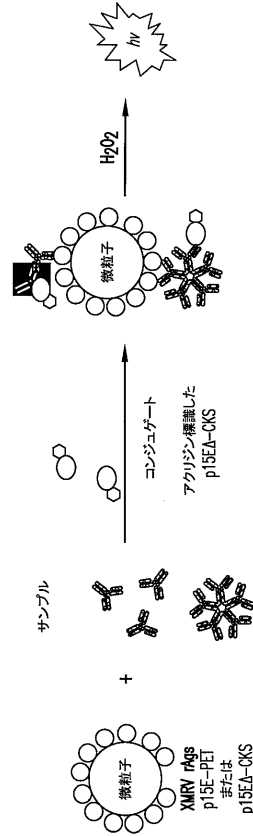
【 図 1 2 】



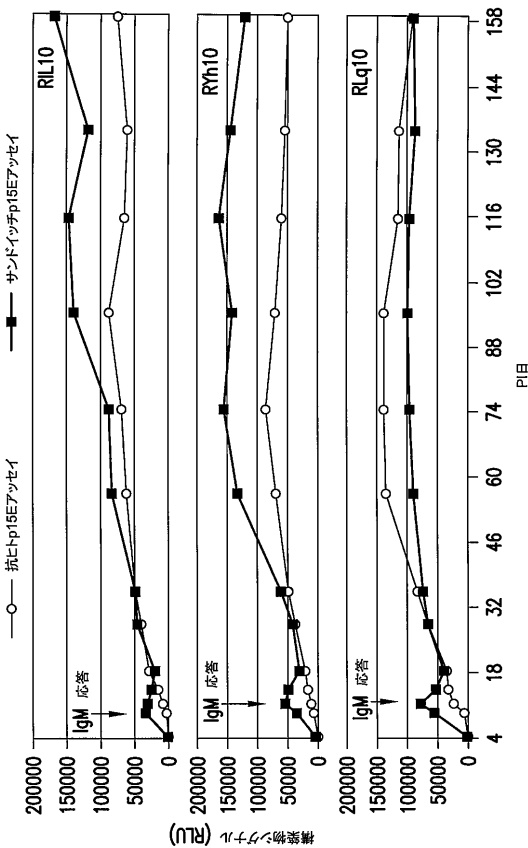
【 図 1 3 】



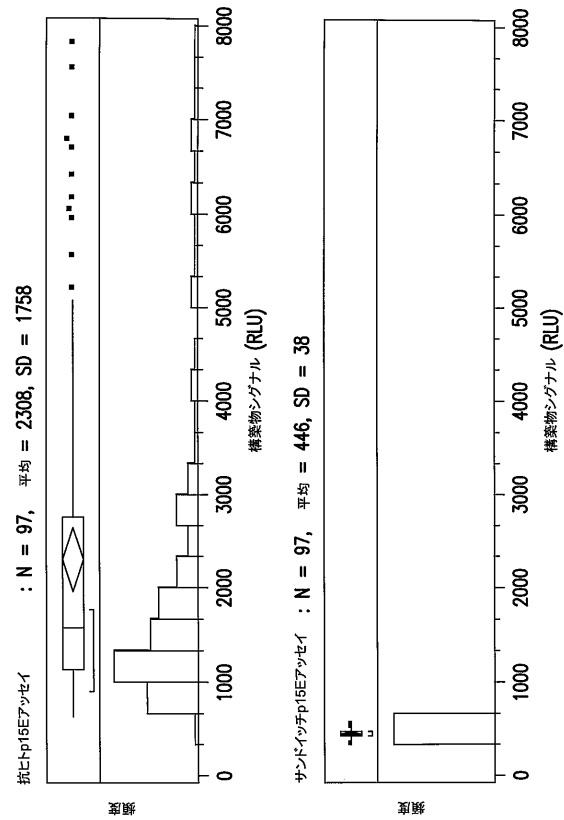
【 図 1 4 】



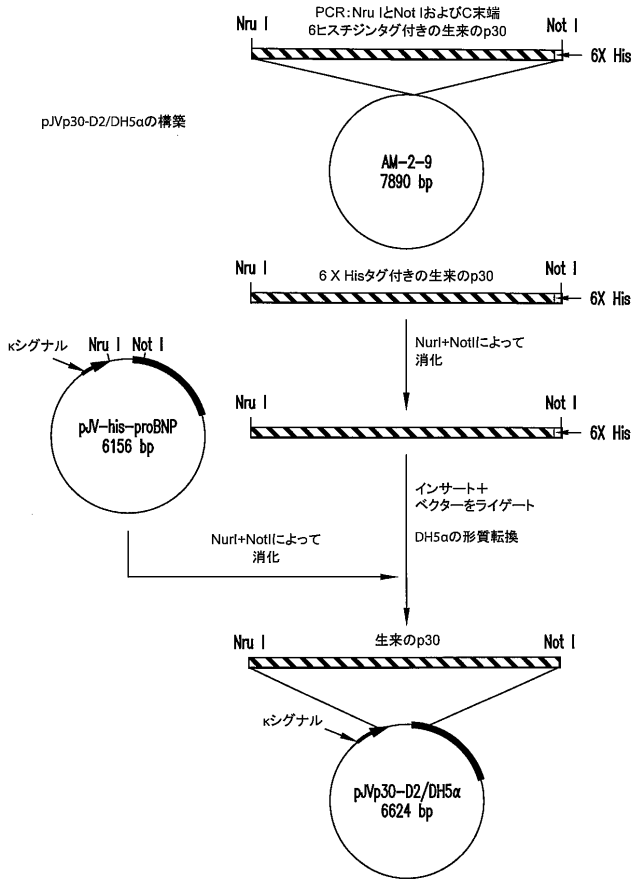
【 図 1 5 】



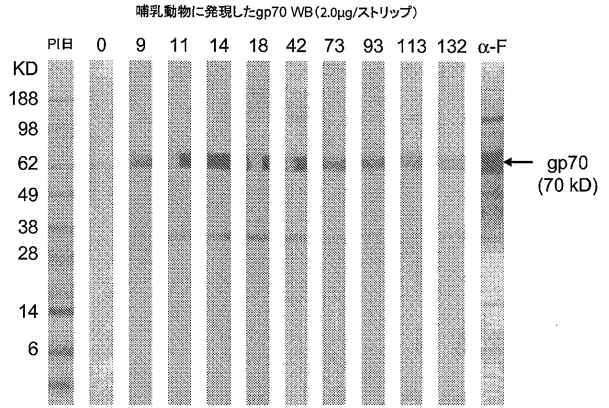
【 図 1 6 】



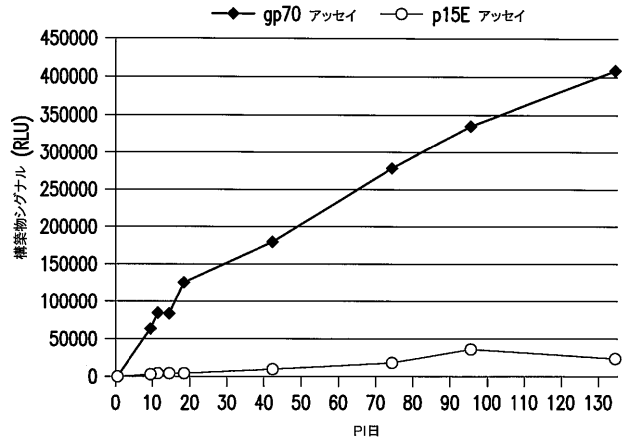
【 図 2 1 】



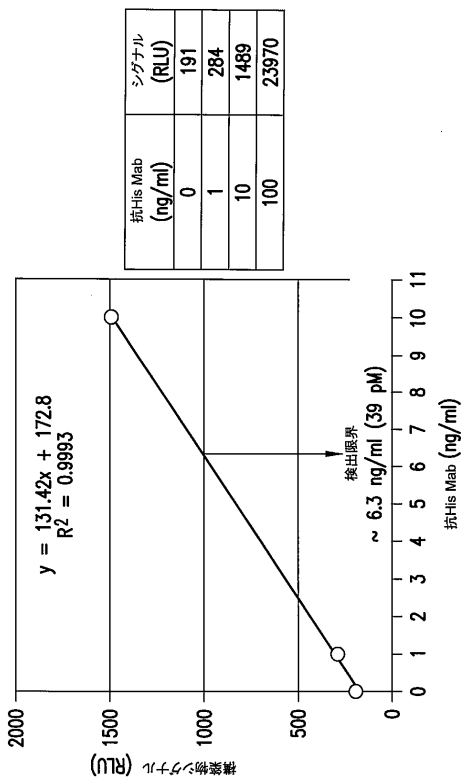
【 図 2 2 】



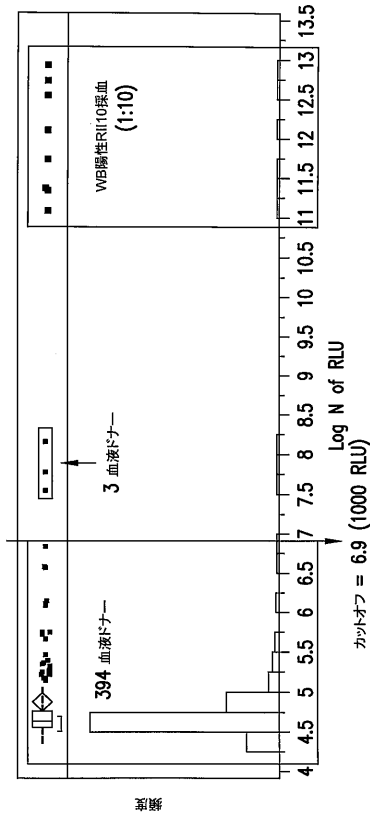
【 図 2 3 】



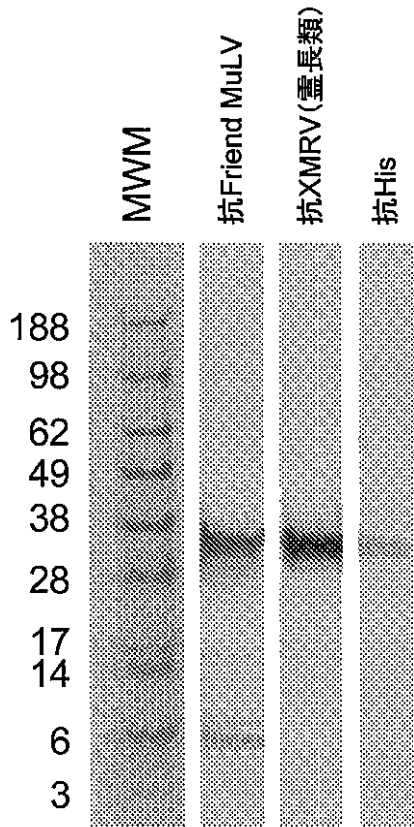
【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【 配列表 】

201253192600001.app

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 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 C 0 8 6
C 0 7 K	14/15 (2006.01)	C 0 7 K	14/15		4 H 0 4 5
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D	
G 0 1 N	33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	H	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N	
G 0 1 N	33/536 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	C	
G 0 1 N	33/566 (2006.01)	G 0 1 N	33/536	A	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/566		
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H	
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/14		
A 6 1 P	13/08 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 K	39/21 (2006.01)	A 6 1 P	13/08		
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/21		
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105		
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02		
		A 6 1 P	15/00		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, S E, 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, I L, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ , OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71)出願人 595033056

ザ クリーブランド クリニック ファウンデーション

The Cleveland Clinic Foundation

アメリカ合衆国 44195 オハイオ州, クリーブランド, オウクリッド アベニュー 9500

9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio, United States of America

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100122389

弁理士 新井 栄一

(74)代理人 100111741

弁理士 田中 夏夫

(72)発明者 チウ, シャオシン

アメリカ合衆国 60031 イリノイ州, ガーニー, シエラ プレイス 752

(72)発明者 ダス グプタ, ジェイディップ

アメリカ合衆国 44124 オハイオ州, メイフィールド ハイ츠, クイーンズ パーク アベニュー 6616

- (72)発明者 ハケット, ジョン, アール.
 アメリカ合衆国 6 0 0 4 8 イリノイ州, リバティービル, メリル コート 3 0 6
- (72)発明者 ルク, カー - チャン, エックス.
 アメリカ合衆国 6 0 0 4 4 イリノイ州, レイク ブラフ, アpartment 3 0 4, ノース
 ウォーキーガン ロード 2 9 6 4 1
- (72)発明者 シルバーマン, ロバート, エイチ.
 アメリカ合衆国 4 4 1 2 2 オハイオ州, ビーチウッド, レッチワース ロード 2 4 6 0 7
- (72)発明者 スワンソン, プリシラ
 アメリカ合衆国 6 0 0 4 8 イリノイ州, リバティービル, パートレット テラス 8 2 9
- F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11
 EA04 GA11 HA01 HA11
 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35 QR55
 QR62 QS25 QS32 QX01
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AA95X AA95Y AB01 CA24 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA08 BA22 CA01 CA53 MA13 MA16
 MA17 MA21 MA31 MA35 MA37 MA38 MA52 MA55 MA60 MA66
 NA14 ZA812 ZB262 ZB272
 4C085 AA03 AA08 BA65 BA67 BB01 BB11 CC08 DD62 EE01 GG01
 GG08 GG10
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZB26 ZB27
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA01 DA86 EA50 FA74

专利名称(译)	XMRV感染的标志物及其用途		
公开(公告)号	JP2012531926A	公开(公告)日	2012-12-13
申请号	JP2012519587	申请日	2010-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司 克里夫兰诊所基金会		
申请(专利权)人(译)	雅培制药 克利夫兰诊所基金会		
[标]发明人	チウシャオシン ダスグプタジェイディップ ハケットジョンアール ルクカーチャンエックス シルバーマンロバートエイチ スワンソンプリシラ		
发明人	チウ,シャオシン ダス,グプタ,ジェイディップ ハケット,ジョン,アール. ルク,カー-チャン,エックス. シルバーマン,ロバート,エイチ. スワンソン,プリシラ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 C07K14/15 G01N33/53 G01N33/569 G01N33/574 G01N33/536 G01N33/566 A61K39/00 A61P35/02 A61P31/14 A61P35/00 A61P13/08 A61K39/21 A61K48/00 A61K31/7105 A61K38/00 A61P15/00		
CPC分类号	A61K39/00 A61P13/08 A61P15/00 A61P31/14 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/04 C07K14/005 C07K16 /1036 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/76 C07K2319/00 C07K2319/21 C12N2740/13022		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12Q1/68.A C07K14/15 G01N33/53. D G01N33/569.H G01N33/53.N G01N33/574.C G01N33/536.A G01N33/566 A61K39/00.H A61P35/02 A61P31/14 A61P35/00 A61P13/08 A61K39/21 A61K48/00 A61K31/7105 A61K37/02 A61P15/00		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024 /DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063 /QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4B065/AA01X 4B065 /AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065 /CA24 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA01 4C084/CA53 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA17 4C084/MA21 4C084/MA31 4C084 /MA35 4C084/MA37 4C084/MA38 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA812 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/BA65 4C085/BA67 4C085 /BB01 4C085/BB11 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086 /ZB26 4C086/ZB27 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA01 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/305604 2010-02-18 US 61/221752 2009-06-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测与异嗜性鼠白血病病毒相关的逆转录病毒 (XMRV) 和XMRV感染相关的疾病的试验。此外, 本发明涉及能够诱导免疫应答的特异性XMRV抗原, 以及与XMRV相关的核酸, 其在诊断, 筛选和治疗中具有很大的实用性。 【选择图】 无

(10) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (JP)	(11) 特許出願公表番号
		特表2012-531926 (2012-531926A)
	(43) 公表日	平成24年12月13日 (2012. 12. 13)
(5) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/00	4 C 0 8 5
	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2012-519587 (2012-519587)	(71) 出願人
(96) (22) 出願日	平成22年6月30日 (2010. 6. 30)	507316642
(85) 翻訳文提出日	平成24年2月29日 (2012. 2. 29)	アボット ラボラトリーズ
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/040676	アメリカ合衆国, イリノイ州, アボット
(87) 国際公開番号	W02011/002936	ト パーク, アボット パーク ロード
(87) 国際公開日	平成23年1月6日 (2011. 1. 6)	1 0 0
(31) 優先権主張番号	61/305, 604	
(32) 優先日	平成22年2月18日 (2010. 2. 18)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	
(31) 優先権主張番号	61/221, 752	
(32) 優先日	平成21年6月30日 (2009. 6. 30)	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 XMRV感染のマーカーとその使用		